



HAL
open science

La compaction de la chromatine au cours de la spermatogenèse : Rôle des bromodomaines de la protéine Brdt.

Jeanne Moinière

► **To cite this version:**

Jeanne Moinière. La compaction de la chromatine au cours de la spermatogenèse : Rôle des bromodomaines de la protéine Brdt.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00349697

HAL Id: tel-00349697

<https://theses.hal.science/tel-00349697>

Submitted on 3 Jan 2009

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

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



Université Grenoble I - Université Joseph Fourier

École doctorale de chimie et science du vivant

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE I

Discipline : Biologie structurale

**La compaction de la chromatine
au cours de la spermatogenèse**

Rôle des bromodomaines de la protéine Brdt

Présentée et soutenue publiquement par

Jeanne Morinière

le 7 octobre 2008

Devant le jury composé de :

Dr. Robert Feil : Rapporteur

Dr. Marc Ruff : Rapporteur

Dr. Anne Houdusse : Examineur

Pr. Winfried Weissenhorn : Examineur

Dr. Saadi Khochbin : Examineur

dirigée par le

Dr. Christoph Müller

Travaux effectués au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire de Grenoble



Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr. Christoph Müller, mon directeur de thèse, de m'avoir donné l'occasion de travailler à l'EMBL et de m'avoir encouragée, particulièrement dans cette dernière étape de rédaction.

Merci aussi au Dr. Stephen Cusack de m'avoir accueillie dans son institut.

Je remercie le Dr. Montserrat Soler-López d'avoir initié ce projet et de me l'avoir transmis (le plan C sur ma liste).

Les clones de Brdt se sont échappés de l'Institut Albert Bonniot. Merci au Drs Saadi Khochbin et Sophie Rousseaux pour l'intéressante collaboration qui s'en est suivie.

Ce travail doit beaucoup au Dr. Carlo Petosa qui m'a apporté une aide scientifique précieuse. Merci Carlo de m'avoir accompagnée sur les lignes, pour ton aide en cristallographie, pour tes questions en apparence anodines. Merci aussi pour ta bonne humeur et ta légèreté.

Je remercie ensuite le Dr. Cédric Clapier avec qui j'ai partagé ces quatre années de paillasse, qui m'a appris les rudiments de la biochimie et m'a présenté le monde de la chromatine. Merci Cédric pour ta disponibilité.

Je remercie également le Dr. Ganesh Natrajan pour son aide en microcalorimétrie, le Dr Marc Jamin d'avoir réalisé les expériences de diffusion statique de lumière, les Drs Guy Schoen et Irina Gutch d'avoir regardé mes échantillons en microscopie électronique.

Bien entendu merci aux amies : Aurélie, Lucy, Majida, Céline, Francine, et à mes autres collègues avec qui j'ai pu discuter pendant les pauses café et surtout beaucoup maudire les protéines qui précipitent.

Merci à vous tous à l'EMBL, Annie, Mary-Jane, Virginie, Benjamin, Denis, José, pour les coups de main quotidiens.

Il y a eu des périodes difficiles. Je remercie Alexandra Manaia de L'European Learning Lab Laboratory de m'avoir permis de mener un projet valorisant à un moment où j'en avais grand besoin.

Un grand merci aussi au Pic Vert, qui m'a permis par l'engagement associatif de répondre à mon besoin d'écologie et de m'aérer les méninges.

Je remercie pour une fois mes parents grâce à qui j'ai pu étudier jusqu'à 27 ans. Merci à Philippe qui m'a fournie en tomates et en poireaux pendant tout ce temps et à Noëlle pour la relecture du manuscrit, elle n'en est pas sortie indemne.

Merci enfin à Yvain de m'avoir accompagnée à Grenoble. Merci pour ta présence pendant ces années incertaines. J'espère que cette thèse sera un peu la tienne.

Cette thèse je la dédie à Lubin qui aura finalement 15 mois lors de la soutenance et qui a sagement patienté que j'ai terminé les manips avant de pointer le bout de son nez...

**La compaction de la chromatine
au cours de la spermatogenèse**

- Rôle des bromodomaines de la protéine Brdt -

-

**Implication of Brdt bromodomains
for chromatin compaction during spermatogenesis**

Table des matières

Préambule.....	6
Introduction.....	8
A. Structures de la chromatine.....	8
I. Territoires fonctionnels.....	8
II. Le nucléofilament « structure en collier de perles ».....	8
III. Structures d'ordre supérieur.....	14
B. Dynamique de la structure chromatinienne.....	17
I. Le remodelage ATP-dépendant.....	17
II. Modifications post-traductionnelles des histones.....	18
III. Intégration de variants d'histones.....	20
IV. Protéines de liaison.....	23
C. Compaction de la chromatine pendant la spermiogenèse.....	24
I. La spermatogenèse en bref.....	24
II. Modifications de la chromatine au cours de la spermiogenèse.....	27
D. La protéine Brdt.....	32
I. Fonctions.....	32
II. Brdt appartient à la famille des protéines BET	33
E. Le bromodomaine : structure et fonction.....	38
F. Déroulement du travail de thèse.....	41
Matériels et Méthodes	43
A. Production des protéines.....	43
I. Clonage.....	43
II. Expression.....	45
III. Purification.....	45

IV. Concentration et conservation.....	46
B. Diffusion statique de lumière.....	47
C. Réticulation chimique.....	47
D. Microcalorimétrie.....	48
I. La calorimétrie à titration isotherme.....	48
II. Mode opératoire.....	49
E. Cristallographie aux rayons X.....	51
I. Production des cristaux.....	51
II. Quelques notions de cristallographie	53
III. Collecte et traitement des données de diffraction.....	56
IV. Affinement du modèle.....	59
V. Validation du modèle moléculaire.....	61

Résultats : Chapitre 1

Caractérisation biochimique des protéines δ C-Brdt, BD1 et BD2.....63

A. Analyse de la protéine δ C-Brdt.....	63
I. Structure primaire.....	63
II. Comportement en solution.....	64
III. Recherche d'états oligomériques.....	64
B. Analyse de la protéine BD1.....	66
I. Comportement en solution.....	66
II. Recherche d'états oligomériques.....	67
C. Analyse de la protéine BD2.....	69
D. Analyse du mélange des protéines BD1 et BD2.....	70
E. Analyse de la protéine BD1-K61Q.....	70

Résultats : Chapitre 2

Quantification des affinités de Brdt vis à vis des différents états d'acétylation des queues N terminales des histones H3 et H4.....71

A. Expériences préliminaires.....	71
-----------------------------------	----

I. Affinités de BD1 pour des peptides H4 courts.....	71
II. Affinités de BD2 pour des peptides H4 courts.....	72
B. Affinités pour la queue N terminale de l'histone H4.....	72
I. Affinités pour un peptide H4 tétra-acétylé.....	73
II. Affinités de BD1 des peptides H4 di-acétylés.....	75
III. Conclusion.....	75
C. Affinités pour la queue N terminale de l'histone H3.....	77
I. Affinités de BD1 et BD2 pour un peptide H3 tétra-acétylé.....	77
II. Affinités de BD2 pour des peptides H3 mono et di-acétylés.....	78
D. Affinités de la protéine BD1-K61Q.....	78

Résultats : Chapitre 3

Structures cristallographiques des bromodomaines de Brdt

en complexe avec les queues d'histones H3 et H4.....80

A. Structure de BD1 en complexe avec un peptide acétylé mimant la queue N terminale de l'histone H4.....	80
I. Cristallisation de BD1 en complexe avec les peptides H4 tétra-acétylé et H4-K5K8ac.....	80
II. Résolution des structures cristallographiques de BD1 en complexe avec les peptides H4 tétra-acétylé et H4-K5K8ac.....	83
III. Arrangement dans l'unité asymétrique.....	88
IV. Architecture de BD1.....	90
V. Surfaces et interactions du complexe BD1/H4-K5K8ac.....	92
B. Structure de BD2 en complexe avec plusieurs peptides acétylés.....	98
I. Cristallisation de BD2 en complexe avec des peptides H3 et H4.....	98
II. Résolution des structures de BD2 en complexe avec des peptides H3 et H4.....	99
III. Structure de BD2 en complexe avec le peptide H3-K18ac.....	102
C. Analyse des structures tridimensionnelles des bromodomaines de Brdt.....	109
I. Des structures de bromodomaine canoniques.....	109
II. Interactions avec le peptide acétylé.....	110
III. Particularités de l'interaction de BD1 et du peptide H4-K5K8ac.....	114
IV. Particularités de l'interaction de BD2 et du peptide H3K18ac.....	116

Discussion et perspectives.....	119
A. Importance du premier bromodomaine de Brdt.....	119
I. Brdt reconnaît l'histone H4 via son premier bromodomaine.....	119
II. Brdt-BD1 reconnaît spécifiquement le motif di-acétylé K5/K8ac de H4.....	120
B. Le second bromodomaine de Brdt reconnaît la modification H3K18ac.....	120
C. Comparaison des affinités de Brdt avec celles des autres protéines de la famille BET.....	121
D. Déterminants structuraux à l'origine de la spécificité des bromodomaines de Brdt.....	124
I. Importance de la boucle BC.....	124
II. BD2 et la di-acétylation.....	127
III. Recherche d'autres sites potentiels pour BD2.....	127
E. Dimérisation	129
I. Cas de Brdt et de ses homologues.....	129
II. Des modes de dimérisation?.....	130
F. La mutation K61Q.....	130
I. Effet in vitro sur l'affinité vis-à-vis de H3 et H4.....	130
II. Effets in vivo.....	131
III. Apports de la structure tridimensionnelle de BD1 dans la compréhension des effets de la mutation K61Q.....	132
IV. Hypothèses : à la recherche d'un mécanisme d'auto-régulation de Brdt	133
V. Conclusion.....	134
G. Perspectives.....	135
I. Le rôle des régions adjacentes.....	135
II. Un dialogue entre les deux bromodomaines de Brdt ?.....	136
III. Brdt et la compaction de la chromatine.....	137
IV. Remarque sur le cas des homologues CBP/P300.....	139
 Conclusion générale.....	 141
 Bibliographie.....	 142

Annexes.....	153
Annexe 1 : Librairies utilisées pour définir le résidu acétyl-lysine.....	154
Annexe 2 : Alignement de séquence des homologues de la famille BET.....	155
Annexe 3 : Structures et affinités de bromodomaines.....	157
Annexe 4 : Résultats détaillés des mesures d'ITC.....	160
Annexe 5 : La mutation K61Q de Brdt et l'infertilité masculine (article soumis)	174

Préambule

Nous avons étudié les bromodomains de la protéine Brdt. Ils sont impliqués dans la compaction du génome qui a lieu au cours des dernières étapes de la spermatogenèse chez les vertébrés. Dans cette étude nous allons essayer d'avancer dans la compréhension de la fonction de la protéine. Pour cela il nous faut passer en revue ce qui est connu des phénomènes de compaction de la chromatine et en particulier de la compaction qui se produit au cours de la spermatogenèse.

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN s'associe à des protéines pour former la chromatine. La quasi-totalité du génome, soit environ 35000 gènes répartis sur presque 2 mètres d'ADN chez l'humain, est ainsi compactée et organisée dans un noyau dont le diamètre avoisine les 10 μ M. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome. Il est formé par l'enroulement de l'ADN autour de protéines appelées histones. Sa répétition tout au long de l'ADN forme le nucléofilament qui constitue le premier niveau de compaction de l'ADN. Le nucléofilament peut adopter plusieurs niveaux d'organisation plus compacts, allant d'une fibre de 30 nm de diamètre au niveau de condensation le plus élevé atteint au sein du chromosome métaphasique.

Dans le cas de la spermatogenèse, la condensation finale de l'ADN est six fois plus forte que dans le cas des chromosomes mitotiques des cellules somatiques. Les histones subissent une acétylation massive avant d'être en grande partie remplacées par de petites protéines basiques appelées protéines de transition qui seront elles-même remplacées par d'autres protéines, les protamines. Ce phénomène est nécessaire pour permettre au spermatozoïde d'être le plus mobile possible et implique que la cellule puisse temporairement fonctionner sans l'ADN nucléaire. La protéine Brdt est impliquée dans les premières étapes de cette compaction, avant le remplacement des histones par des protéines de transition. Ce remodelage a comme substrat une chromatine de composition similaire à celle des cellules somatiques. Les mécanismes impliqués doivent en conséquence être comparables à ceux observés dans les cellules somatiques.

Dans l'introduction qui va suivre, nous étudierons la structure de la chromatine et sa dynamique. Nous passerons ensuite en revue les facteurs susceptibles d'influer sur la compaction de la chromatine au cours de la spermatogenèse et nous examinerons la façon dont la protéine Brdt y est impliquée. Nous étudierons enfin les propriétés des bromodomains.

Partie I:

Introduction

Introduction

A. Structures de la chromatine

I. Territoires fonctionnels

Dans un noyau interphasique on peut observer par microscopie optique deux types de structures chromatiniennes :

- i. L'hétérochromatine, dense, est définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire. Elle correspond à un état répressif vis à vis de la transcription; son niveau d'acétylation est faible. L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole. On distingue l'hétérochromatine constitutive qui contient peu de gènes, formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères (hétérochromatine péricentrique) et des télomères, de l'hétérochromatine facultative qui contient des régions codantes, comme le chromosome X inactif chez la femelle des mammifères.
- ii. L'euchromatine, claire, est décondensée. Elle est répartie à l'intérieur du nucléoplasme et contient les régions actives du génome.

II. Le nucléofilament « structure en collier de perles »

a. la fibre de 11 nm

Le nucléofilament, encore appelé fibre de 11 nm à cause de son diamètre, forme par enroulement de l'ADN autour des octamères d'histones un collier dont les nucléosomes sont les perles. Environ 80 % de l'ADN nucléaire est engagé dans la formation des nucléosomes. Le nucléosome est composé d'une particule de cœur et d'une région de liaison (ou région internucléosomale) qui relie deux particules de cœur adjacentes. La longueur de l'ADN internucléosomale varie selon les espèces et le type cellulaire de 10 à 115 paires de bases environ. Au total, cet ADN constitue les 20% restants de l'ADN nucléaire. Des histones particulières, appelées histones de liaison sont incorporées au niveau de ces régions de liaison.

b. le nucléosome

La structure du nucléosome a été très conservée au cours de l'évolution. La structure cristallographique de sa particule de cœur a été déterminée pour plusieurs espèces à des résolutions allant jusqu'à 1,9 Å (Chantalat et al., 2003 ; Clapier et al., 2008 ; Luger and Richmond, 1998b ; Tsunaka et al., 2005 ; White et al., 2001 ; Luger et al., 1997) [Figure 1]. Elle est composée de 146 paires de bases d'ADN faisant 1.65 tour autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B. L'ADN est maintenu par 116 liaisons hydrogène directes avec les histones localisées en 14 endroits distincts de la particule (Luger and Richmond, 1998b). Les queues N terminales des histones, flexibles, ne sont pas définies dans la structure cristallographique, sauf celle de H4 qui établit une interaction avec un dimère H2A-H2B appartenant à un nucléosome voisin et se trouve ainsi stabilisée (Luger and Richmond, 1998a). Ces queues portent de nombreux sites de modifications post-traductionnelles dont la combinatoire transmet d'importantes informations épigénétiques.

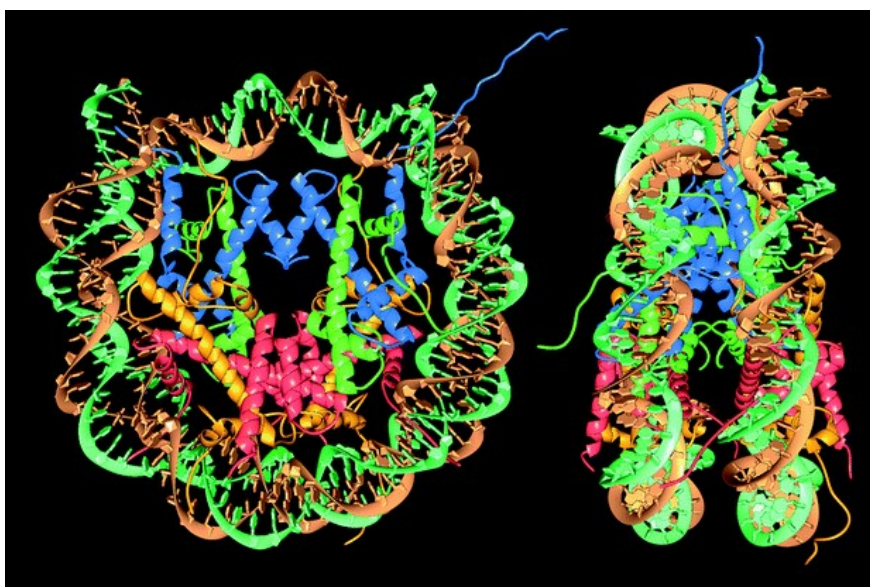


Figure 1: Structure cristallographique du nucléosome de drosophile à 2,8 Å (Luger, 1997). ADN de 146 paires de bases (brun et vert) et histones H4 (bleu), H3 (vert), H2A (orange) et H2B (rouge)

Plusieurs aspects de la structure du nucléosome sont intéressants à noter pour comprendre sa dynamique (d'après Luger, 2006):

- i. Le nucléosome présente un assemblage modulable dans lequel les deux dimères H2A/H2B peuvent être retirés sans que l'interaction de l'ADN et du tétramère (H3-H4)₂ ne soit rompue. Cela reflète le mode d'assemblage *in vivo* et *in vitro* de la particule.
- ii. La surface du nucléosome est très principalement constituée par l'octamère d'histone et présente un relief électrostatique varié (Chakravarthy et al., 2005b). Cette surface est impliquée dans des interactions entre nucléosomes qui conditionnent la formation de structures chromatinienne d'ordre supérieur .

L'assemblage et le désassemblage des nucléosomes impliquent des protéines appelées chaperonnes qui prennent en charge les dimères d'histone. L'insertion de variants d'histone implique des chaperonnes spécifiques. Certaines propriétés du nucléosome sont importantes pour son assemblage et son désassemblage:

- i. Le tétramère (H3-H4)₂ organise les 80 paires de bases centrales de l'ADN, alors que les ~40 pb latérales sont fixées plus faiblement par les dimères H2A-H2B, avec seulement une petite contribution de l'histone H3.
- ii. Le dimère (H2A-H2B) établit avec le tétramère (H3-H4)₂ des contacts étroits qui ne sont cependant pas suffisants pour stabiliser l'association des complexes en absence d'ADN (Park and Luger, 2008).
- iii. Étant donné l'association étroite des dimères (H2A-H2B) et (H3-H4), il est très probable que ces complexes soient les unités de bases utilisées lors de l'assemblage et du désassemblage des nucléosomes. L'analyse de la stoechiométrie du complexe formé par la chaperonne ASF et les histones H3 et H4 révèle d'ailleurs que c'est un dimère de (H3-H4) qui est pris en charge (English et al., 2005).

L'assemblage des nucléosomes procède par une étape de dépôt des dimères (H3-H4) sur l'ADN suivie par une étape de dépôt des dimères (H2A-H2B). Cet assemblage peut être déstabilisé de deux façons : en modifiant l'interface entre les dimères (H2A-H2B) et le tétramère (H3-H4)₂ ou bien en modifiant l'interface entre les histones et l'ADN.

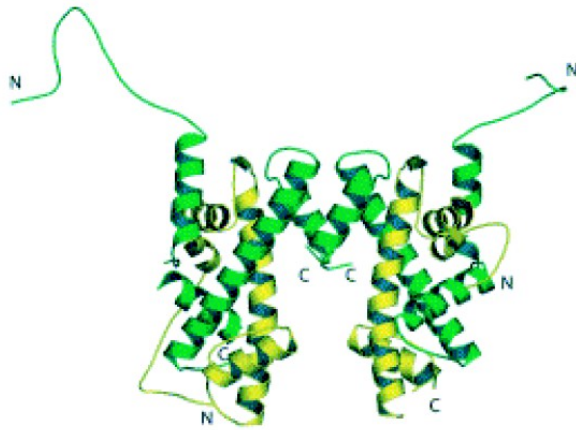
c. Les histones

i. Les histones de cœur

Les histones qui forment l'octamère du nucléosome sont appelées histones de cœur. Ce sont les histones H2A, H2B, H3 et H4. Ces petites protéines basiques sont très conservées au cours de l'évolution. Elles se composent d'un domaine central globulaire et d'extrémités N et C terminales non structurées. Il existe des formes variables de ces histones qui donnent à la chromatine des propriétés particulières. Nous examinerons plus loin les propriétés de ces variants.

La région la plus conservée des histones est leur domaine central, structuré en un motif appelé « histone fold » qui comprend trois hélices séparées par deux boucles (Arents et al., 1991) et qui permet la formation des dimères H2A-H2B et H3-H4 [Figure 2]. Les extrémités N et C terminales des histones, appelées queues, sont plus variables que les domaines centraux et sont dépourvues de structure secondaire. Elles sont particulièrement riches en résidus lysine et arginine. L'hypothèse la plus intuitive est que ces résidus chargés positivement établissent des interactions avec les phosphates de l'ADN, chargés négativement, et stabilisent ainsi la position de celui-ci sur le nucléosome. Il a en effet été montré que les queues des histones influencent l'accessibilité de l'ADN nucléosomal (Lee et al., 1993). Mais il est prédit que leur effet sur la respiration de la particule est faible (Mutskov et al., 1998 ; Polach et al., 2000). Les queues des histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles dont nous allons voir l'importance pour la fonction de la chromatine.

H3-H4 tetramer



H2A-H2B dimer

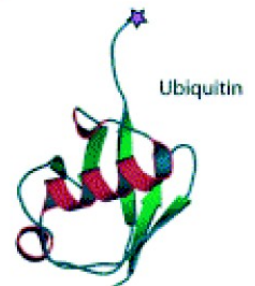
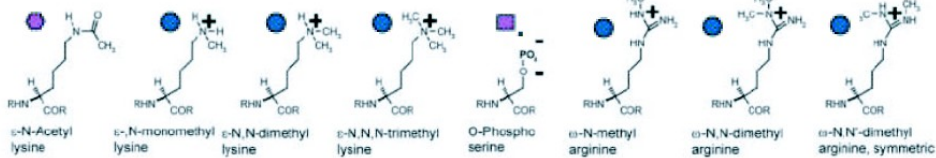
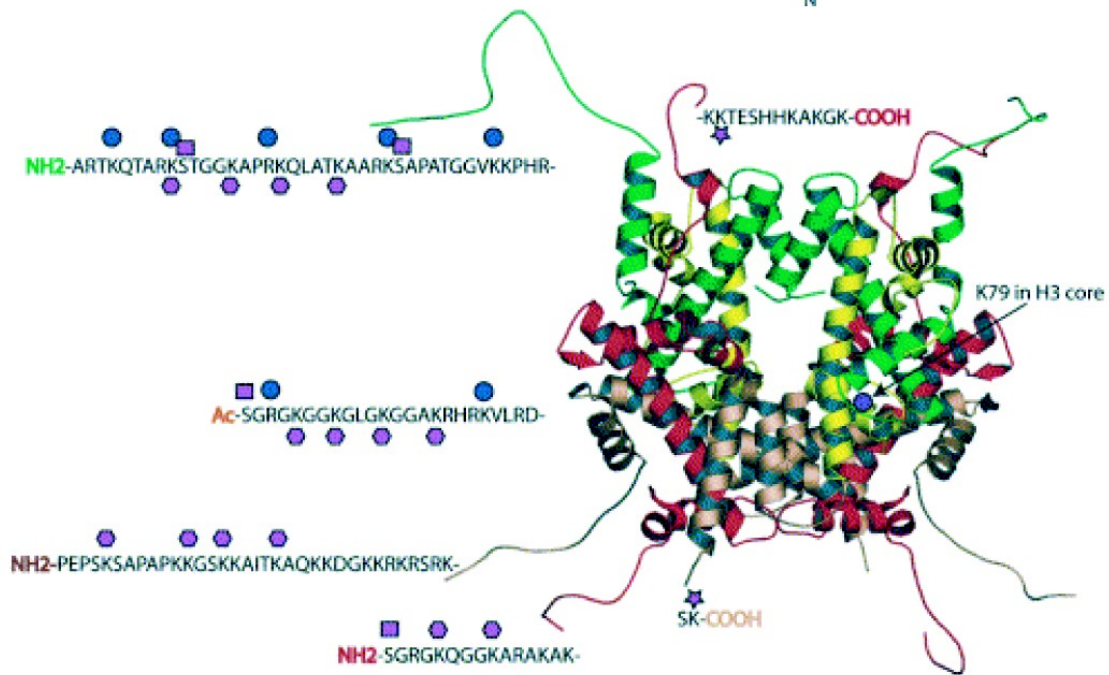
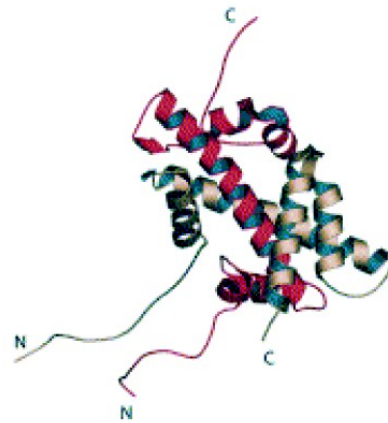


Figure 2: Structures tridimensionnelles des histones et leurs modifications post-traductionnelles. d'après (Khorasanizadeh, 2004)

ii. Les histones internucléosomales ou histones de liaison

L'histone canonique H1 ou un de ses variants peut s'associer avec la région de l'ADN qui lie deux nucléosomes adjacents. Ces histones ne présentent pas d'homologie structurale avec les histones de l'octamère et doivent leur nom au fait qu'elles sont associées *in vivo* avec les nucléosomes dans un rapport stoechiométrique 1:1. La structure de H1 présente trois domaines : deux extrémités N et C terminales non structurées sujettes à plusieurs modifications post-traductionnelles (Godde and Ura, 2008) et une partie centrale, globulaire et conservée, dont la structure en « wing-hélice » a été déterminée pour la première fois en 1987 pour le variant héritocitaire de poulet H5 (Clare et al., 1987) [Figure 3]. Récemment les sites d'interactions de l'histone H1° avec le nucléosome ont été déterminés par une analyse de mutagenèse dirigée (Brown et al., 2006). Cela a permis aux auteurs d'élaborer un modèle de l'interaction de l'histone de liaison avec le nucléosome [Figure 3]. *In vitro* l'histone H1 stabilise le nucléosome en stabilisant sa respiration et en rendant son glissement plus difficile (Pennings et al., 1994; Varga-Weisz et al., 1995). L'histone de liaison influence également le degré de compaction de la chromatine (Thoma et al., 1979 ; Thoma et al., 1983). Son retrait conduit à la décompaction (Fan et al., 2005). A l'inverse, elle prévient également la formation de structures compactes telles que celle des chromosomes mitotiques (Khochbin, 2001).

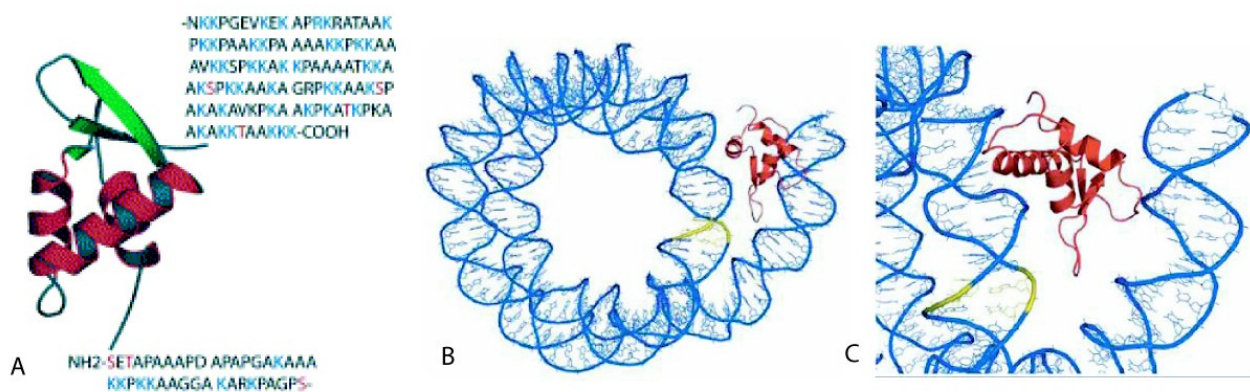


Figure 3: Histone de liaison. A. Structure (d'après Khorasanizadeh2004). B et C. Modélisation de l'interaction de l'histone H1 et du nucléosome aux points d'entrée et de sortie de l'ADN (d'après Brown et al., 2006).

III. Structures d'ordre supérieur

On parle d'ordre supérieur pour la compaction de la chromatine lorsque des structures se forment par repliement de la structure en « collier de perles » [Figure 4]. Ces structures peuvent être perturbées par des variations de charges au niveau de la surface de l'octamère d'histone ou sur des queues des histones ou encore par l'ajout d'autres protéines à la structure de la chromatine.

a. La fibre de 30nm

Une fibre de 30 nm de diamètre se forme par enroulement du nucléofilament (Tremethick, 2007) pour une revue sur la fibre de 30 nm). Pour cette fibre, deux modèles sont actuellement discutés : l'un est issu d'observations par microscopie électronique sur des nucléofilaments de longue taille et contenant l'histone H1. Il propose une structure en solénoïde (hélice à un point de départ) (Robinson et al., 2006). L'autre provient de l'observation de la structure cristallographique à 9 Å d'une fibre contenant 4 nucléosomes (Schalch et al., 2005) et de données de réticulation chimique sur une fibre de 12 nucléosomes (obtenues par le même laboratoire) (Dorigo et al., 2004). Il propose une hélice en zig-zag à deux points de départ [Figure 5]. Le modèle du solénoïde est soutenu par le fait que le diamètre de la fibre n'augmente pas linéairement avec la longueur de l'ADN de liaison et par plusieurs résultats de modélisation par dynamique moléculaire (Beard and Schlick, 2001 ; Katritch et al., 2000). Les auteurs de ce modèle proposent que la divergence entre les théories vient du fait que, contrairement aux fibres observées par microscopie électronique, la fibre observée par cristallographie est courte et ne contient pas l'histone de liaison H1. Ils font

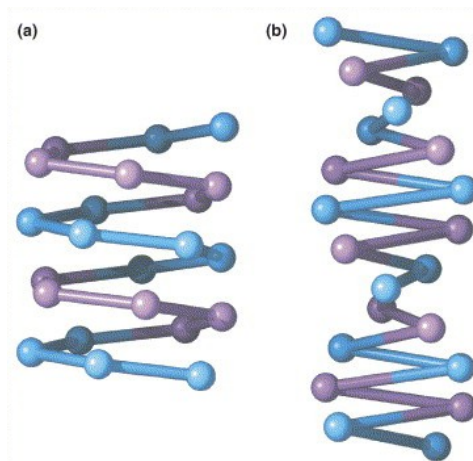


Figure 4: Modèles de la fibre de 30 nm (d'après Robinson2006).
a. Conformation en solénoïde.
b. Conformation en zig-zag

l'hypothèse que les deux structures co-existent dans le noyau et correspondent à différents états fonctionnels de la chromatine. (Robinson and Rhodes, 2006).

Nous avons vu que la fibre de 30 nm est stabilisée par l'histone de liaison H1/H5. Elle dépend également des interactions entre nucléosomes adjacents. Notamment d'une interaction entre les résidus 14 à 25 de la queue N terminale de l'histone H4 avec une région chargée négativement portée par le dimère H2A-H2B d'un nucléosome adjacent. L'importance de cette interaction avait été présente à cause de son existence dans la structure cristalline du nucléosome (Luger and Richmond, 1998a ; Luger et al., 1997). Elle a été confirmée par des analyses de réticulation chimique (Dorigo et al., 2004) qui montrent que les résidus 14 à 19 de H4 sont essentiels à la compaction. Il a de plus été montré que la simple acétylation de la lysine 16 de H4, comme la délétion de la queue H4, empêche la formation de la fibre de 30 nm alors que les résidus 1 à 13 de H4 n'influent pas sur cette compaction (Shogren-Knaak et al., 2006). Une étude récente suggère que c'est la neutralisation de la région acide portée par le dimère H2A-H2B plus que le lien créé par l'interaction avec la queue H4 qui favorise la formation de structures d'ordre supérieur (Chodaparambil et al., 2007). Il a de plus été montré que cette région acide peut servir de surface d'interaction pour la protéine LANA du virus KSHV (Barbera et al., 2006).

b. Repliements de la fibre de 30 nm

Les fibres de 30 nm peuvent subir des compactations supplémentaires pour former des fibres allant de 60 à 300 nm. Pour atteindre la compaction des chromosomes mitotiques, des boucles de 50 000 à 100 000 bases se forment dans la fibre de 30 nm et sont fixées par des protéines qui forment le squelette du chromosome. La structure du chromosome pourrait être formée par trois repliements successifs: une fibre de 60-80 nm s'enroulerait pour former une fibre de 100-130 nm qui s'enroulerait encore pour former la structure de 200-300 nm de large observée en métaphase (voir la revue Belmont, 2006). La structure précise de ces formes compactes de la chromatine n'est pas connue. Mais la formation de structures compactes a notamment été attribuée à des protéines ayant un rôle architectural, qui se comportent comme des agents de réticulation entre nucléosomes (McBryant et al., 2006). Les facteurs de remodelage ATP-dépendant pourraient également être impliqués.

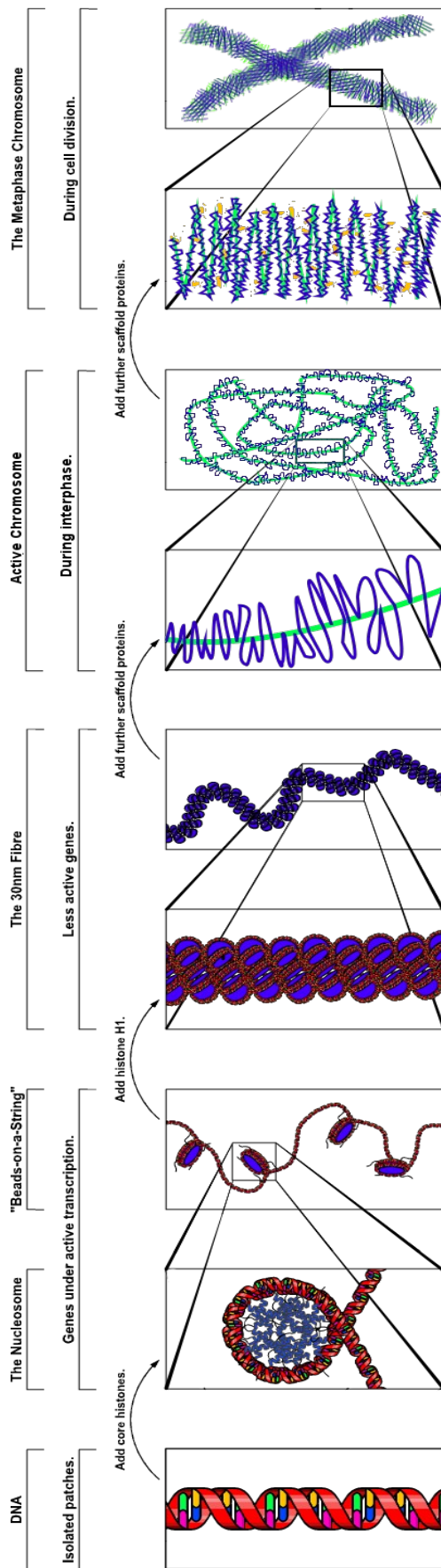


Figure 5: Vue globale de la compaction de l'ADN

B. Dynamique de la structure chromatinienne

Grâce aux MPT et aux domaines de reconnaissance des MPT, la chromatine est capable de recruter de façon spatio-temporelle précise les facteurs qui assurent son remodelage: facteurs de remodelage ATP-dépendant, chaperonnes qui assurent le remplacement des histones canoniques par des variants, enzymes responsables de l'ajout ou du retrait d'une MPT...

On peut distinguer deux types de modifications qui affectent la structure de la chromatine :

- i. Celles qui modifient le relief électrostatique du nucléosome. Elles influencent les interactions du nucléosome et de l'ADN, les interactions entre nucléosomes et les interactions avec les autres protéines. Cela suppose que les nucléosomes soient accessibles aux machineries responsables de ces modifications. Elles sont donc probablement réduites dans les régions où la chromatine est très compacte. Il s'agit principalement des modifications post-traductionnelles et de l'intégration de variants d'histone.
- ii. Celles qui impliquent une action extérieure. Il s'agit des complexes de remodelage ATP-dépendant ou des protéines de liaison ayant un rôle architectural. Ce type d'intervention modifie la structure de la chromatine sans modifier sa composition initiale.

I. Le remodelage ATP-dépendant

Les complexes ATP-dépendant de remodelage de la chromatine contiennent une sous-unité catalytique qui permet de les classer en cinq familles chez les organismes eucaryotes (Swi/Snf, Iswi, NURD/Mi2/CHD, Ino80 et SWR1) et au moins une autre sous-unité. Ils portent des domaines de reconnaissance des MPT (bromodomaine, PHD finger, chromodomaine) et d'autres domaines conservés de fonctions encore inconnues.

Ils sont responsables de plusieurs types de modifications de la structure chromatinienne: glissement des nucléosomes, désorganisation de l'espace des nucléosomes au niveau des promoteurs, assemblage des nucléosomes et organisation des particules de façon régulière sur le nucléofilament (voir les revues Becker and Hörz, 2002 ; Choudhary and Varga-Weisz, 2007 ; Smith and Peterson, 2005). Les complexes de la famille Iswi et Swi/Snf catalysent par exemple le glissement de l'ADN sur l'octamère d'histone par un mécanisme similaire dans lequel une boucle d'ADN est soustraite à l'interaction des histones et se propage autour de la particule (Strohner et al., 2005 ; Zhang et al., 2006 ; Zofall et al., 2006).

Les complexes de remodelage ATP-dépendant coopèrent à l'occasion avec des chaperons d'histones (Angelov et al., 2006 ; Lorch et al., 2006 ; Walfridsson et al., 2007) ou possèdent eux-mêmes une activité de chaperonne (Loyola et al., 2001). De plus, plusieurs observations semblent indiquer que ces complexes sont impliqués dans la régulation des structures chromatiniennes d'ordre supérieur (Maier et al., 2008a ; Maier et al., 2008b).

II. Modifications post-traductionnelles des histones (MPT)

a. Généralités

Les histones portent de nombreux sites de modifications post-traductionnelles. Celles-ci participent à la régulation de la compaction et de l'accessibilité de la chromatine. Elles assurent également le recrutement sur la chromatine de protéines spécifiques de façon spatio-temporelle précise.

Les histones peuvent être mono, di ou tri-méthylés sur les lysines et les arginines, acétylées sur les lysines, phosphorylées sur les sérines, les thréonines et les tyrosines, sumoylées sur les lysines,

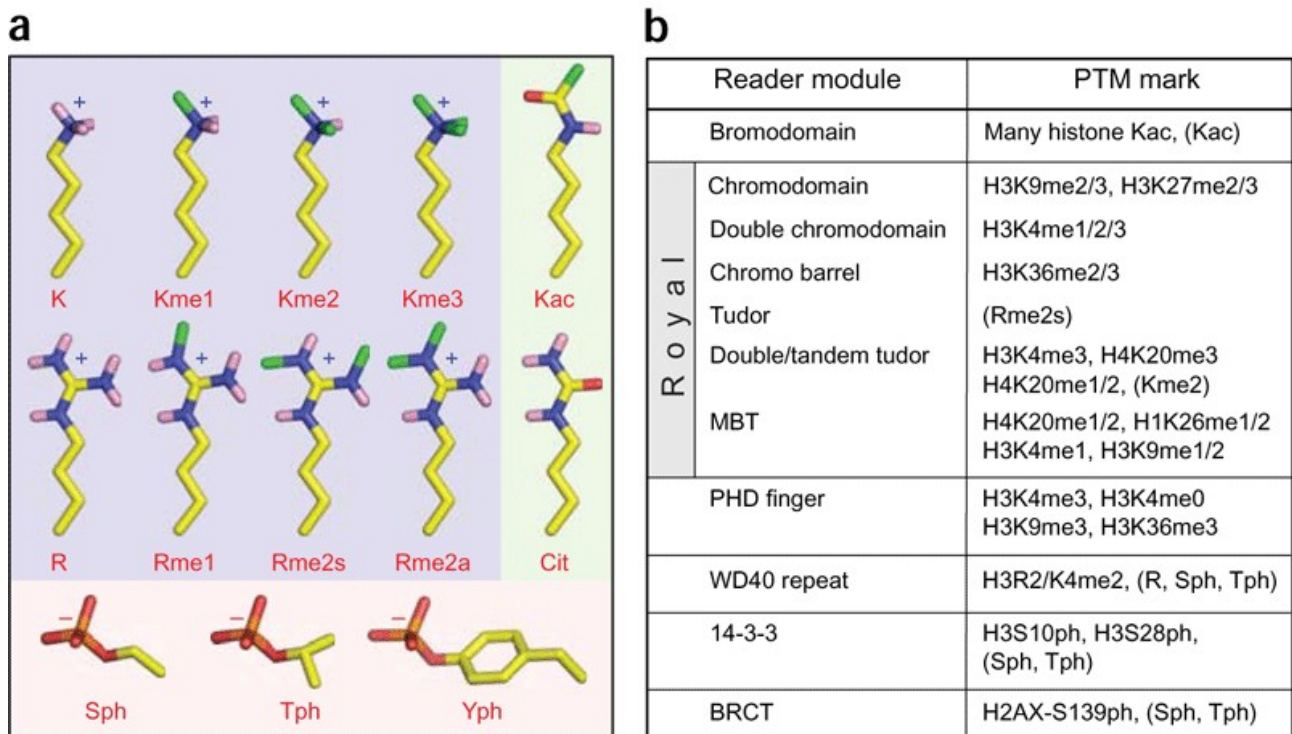


Figure 6: MPT et leurs modules de lecture. A. Structure chimique de quelques MPT. carbone (en jaune), azote (bleu), groupe méthyle (vert), hydrogène (rose), oxygène (rouge), phosphore (orange). B. les modules de lecture et les MPT reconnues

ubiquitinées sur les lysines, ADP ribosylées sur les glutamates; les arginines peuvent être déiminées, les prolines peuvent subir une isomérisation [Figure 6] (voir la revue Kouzarides, 2007).

Les queues des histones de cœur, très accessibles, portent l'essentiel des sites de modification connues à ce jour [Figure 7] mais elle peuvent aussi toucher les domaines centraux des histones (Cosgrove, 2007) et les histones de liaison (Godde and Ura, 2008).

L'identification des enzymes responsables de ces modifications a énormément progressé ces dix dernières années. Des enzymes responsables du dépôt et du retrait ont été identifiées pour chacune d'elles (sauf pour le retrait de la méthylation des arginines qui est pourtant observé). Ainsi, les MPT sont toutes réversibles et dynamiques. L'acétylation est régulée par l'équilibre qui existe entre l'acétylation et la désacétylation, catalysées respectivement par les histones acétyl-transférases à partir de l'acétyl-coenzymeA et les histones désacétylases. Une demi-vie de l'ordre de la minute a été mesurée pour un tel équilibre. Les acétyl-transférases ont une spécificité réduite puisqu'elles modifient plusieurs lysines différentes. Elles peuvent être divisées en trois familles (GNAT, MYST et CBP/P300) selon leurs identités de séquence (Sternier and Berger, 2000).

Les MPT affectent la charge et l'encombrement stérique des résidus (cas de l'acétylation et de la phosphorylation en particulier). Dans les domaines centraux des histones, elles pourraient altérer les interactions avec l'ADN et ainsi réguler la mobilité du nucléosomes (Cosgrove, 2007). L'acétylation d'une lysine du domaine de cœur de H3 (K56) a d'ailleurs été récemment identifiée (Han et al., 2007). Cette lysine fait face au sillon majeur de l'ADN et son acétylation affecte probablement l'interaction avec l'ADN. De même, les interactions qu'établissent les queues des histones avec l'ADN ou les nucléosomes adjacents sont inévitablement modifiées par les changements électrostatiques induits par les MPT. Ainsi, il a été montré que l'hyperacétylation empêche la



Figure 7: Principales MPT identifiées sur les queues des histones canoniques

formation de la fibre de 30 nm (Tse et al., 1998) et qu'elle réduit les interactions entre les queues des histones et l'ADN (Mutskov et al., 1998).

La lysine 16 de H4 semble avoir un statut particulier. La région de H4 qui la contient (résidus 14-19) est essentielle à la formation de la fibre de 30 nm (Dorigo et al., 2004) et, de façon spectaculaire, sa seule acétylation est capable d'inhiber la formation de cette fibre (Shogren-Knaak et al., 2006). D'autre part son acétylation apparaît comme un marqueur garant de la conservation des frontières entre l'hétérochromatine et l'euchromatine (Ladurner et al., 2003). Enfin, il a été montré que l'abolition de l'acétylation sur les lysines de la queue H4 (par mutation des lysines 5, 8, 12 et 16) induit une réduction de la transcription selon un mode graduel et non spécifique en ce qui concerne les lysines 5, 8 et 12 alors que l'abolition de l'acétylation de la lysine 16 touche des gènes particuliers (Dion et al., 2005).

Cependant la fonction principale des MTP réside probablement dans le recrutement de protéines ou de complexes protéiques spécifiques en un endroit et à un moment défini. Des modules de lecture des MPT (bromodomaine, PHD finger, chromodomaine, WD40, ...) capables de discriminer la modification et son contexte [Figure 6] sont en effet présents dans la structure d'un grand nombre de protéines impliquées dans le contrôle des fonctions de la chromatine telles que les acétyltransférases, les déméthylases ou les complexes ATP-dépendant de remodelage de la chromatine (voir la revue Taverna et al., 2007). Ces domaines constituent les modules de lecture d'un code constitué par les différentes combinaisons de MTP des histones et qu'il est convenu d'appeler le code histone (Strahl and Allis, 2000).

III. Intégration de variants d'histones

Contrairement aux histones canoniques, l'expression des variants d'histones n'est pas limitée à la phase S du cycle cellulaire. Des variants d'histones pour H1, H2A, H2B et H3 ont été identifiés chez la plupart des organismes eucaryotes. Aucun variant n'a été identifié pour H4. Certains sont exprimés dans tous les types cellulaires, ils sont dits ubiquitaires [Tableau 1]. D'autres ont une expression tissu-spécifique. Nous étudierons les variants spécifiques du testicule au chapitre concernant la spermatogenèse.

H2A	H2A.Z, H2A.X, H2A.Bbd, MacroH2A
H3	CenH3 et H3.1, H3.2, H3.3
H1	H1.1 à H1.5, H1°, H1oo

Tableau 1: Variants d'histone ubiquitaires identifiés à ce jour

Les variants ont des degrés d'identité de séquence variables, forte dans le cas de H2A.X (82 %) et H3.3 (96 %), faible dans le cas de H2A.Bbd (40 %) ; les identités de séquence des autres variants se situent autour de 60 % (Luger, 2006). La séquence des variants est en général plus conservée encore que celle des histones canoniques, ce qui témoigne de l'importance de leurs fonctions. (voir les revues Bernstein and Hake, 2006 ; Henikoff and Ahmad, 2005 ; Kamakaka and Biggins, 2005).

Les différences existant entre les séquences des histones canoniques et celles des variants entraînent des modifications de la surface de l'octamère. La stabilisation de l'ADN du nucléosome peut ainsi être modifiée. Cela a notamment été mis en évidence pour H2A.Z (Park et al., 2004) et H2A.Bbd. Cette déstabilisation pourrait se traduire *in vivo* par un désassemblage du nucléosome plus ou moins facile, comme cela a été mis en évidence pour H2A.Z. La modification de la surface de l'octamère peut également avoir des conséquences sur les interactions entre nucléosomes et donc sur la formation de structures compactes de la chromatine, c'est le cas pour H2A.Z (Fan et al., 2004). Les variants des histones sont également impliqués dans la régulation du glissement et du remodelage ATP-dépendant des nucléosomes (Flaus et al., 2004 ; Santisteban et al., 2000). Enfin les variations de séquence, notamment au niveau de leurs extrémités N et C terminales, en modifiant les sites de modification post-traductionnelles, sont susceptibles de modifier le code histone porté par les nucléosomes.

L'insertion des variants d'histone dans les nucléosomes implique des chaperonnes probablement spécifiques (Kusch and Workman, 2007), comme c'est le cas pour H2A.Z (Luk et al., 2007).

a. Variants de H2A

Les variants de H2A participent à la constitution de structures chromatinienne dont les propriétés sont particulières (voir les revues (Boulard et al., 2007 ; Chakravarthy et al., 2004)):

- H2A.X a un rôle de senseur des cassures doubles brins de l'ADN qui implique sa phosphorylation (Redon et al., 2002 ; Stucki et al., 2005).
- MacroH2A participe à la constitution de la chromatine du chromosome X inactif des cellules de mammifère (Costanzi and Pehrson, 1998). Il possède une fonction de répression de la transcription probablement due à l'inhibition du remodelage de la chromatine (Angelov et al., 2003 ; Doyen et al., 2006). Ce variant contient un domaine additionnel (le domaine Macro) qui constitue environ les deux tiers de la protéine. MacroH2A pourrait réguler l'ADP ribosylation de l'ADN grâce à une activité catalytique portée par son domaine Macro (Kustatscher et al., 2005 ; Ladurner, 2003). La structure du domaine Macro et celle d'un nucléosome contenant le domaine central de MacroH2A ont été résolues (Chakravarthy et al., 2005a). Elles montrent que la particule de cœur du nucléosome est très similaire à celle d'un nucléosome classique. La même étude montre que le domaine Macro pourrait servir à recruter des protéines ayant une activité histone désacétylase.
- H2A.Z est impliqué dans une série de fonctions différentes, voire contradictoires (Zlatanova and Thakar, 2008). Le variant participe notamment à l'assemblage de la chromatine des centromères (Greaves et al., 2007). La structure d'un nucléosome contenant ce variant a été résolue et révèle que la structure de la particule de cœur du nucléosome est très conservée malgré la divergence des séquences du variant et de H2A (Suto et al., 2000). Toutes les interactions entre l'histone et l'ADN sont conservées. La différence majeure consiste en l'élargissement par deux résidus d'une région acide de la surface du nucléosome. Cette région est impliquée chez H2A dans une interaction avec la queue de l'histone H4 (Dorigo et al., 2004). De façon très intéressante, la capacité du variant d'induire *in vitro* (en présence de la protéine HP1) la formation de la fibre de 30 nm dépend de ces deux résidus qui étendent la région acide (Fan et al., 2004).
- H2A.Bbd diminue la stabilité du nucléosome (Gautier et al., 2004). Son intégration produit des structures chromatinienne plus étendues et incapables de former une fibre de 30nm. Cela pourrait être expliqué par l'absence chez ce variant de la région acide impliquée dans l'interaction entre H2A et la queue H4 (Zhou et al., 2007).

b. Variants de H3

- CENP-A est un déterminant majeur des régions centromériques dont il pourrait déterminer l'identité (Sullivan and Karpen, 2001). Son extrémité N terminale est très différente de celle des autres histones H3 et porte probablement un code histone particulier.
- Les variants H3.1, H3.2, H3.3 ne diffèrent de H3 que par quelques acides-aminés. H3.3 a été identifiée comme une histone de remplacement enrichie en MTP associées à l'activation de la transcription alors que H3.2 est enrichie en MTP associées à la répression de la transcription (Hake and Allis, 2006).

IV. Protéines de liaison

La capacité d'induire la formation de structures compactes de la chromatine a été mise en évidence pour un certain nombre de protéines. L'histone de liaison H1 peut être considérée comme l'une d'entre elles puisqu'elle induit la formation de la fibre de 30 nm *in vitro* (Woodcock, 2006). D'autres protéines, moins abondantes que l'histone H1 agissent comme agent de réticulation et permettent l'assemblage de structures d'ordre supérieur particulières [Figure 8] (McBryant et al., 2006).

Property	Histone H1	MeCP2	MENT	Polycomb
Transcriptional repression	Rarely <i>in vivo</i>	Yes	Yes	Yes
Preferred binding site	Near linker entry–exit	Methylated DNA	Linker DNA	Nucleosome
Chromatin compaction	Yes, zigzag conformation	Yes, high compaction	Yes	Yes, 1 Pc per four nucleosomes
Interarray interactions	Yes	Yes	Yes	Yes

12-nucleosome array +H1 +MeCP2 +MENT +Polycomb

Figure 8: Formation de différentes structures compactes par des protéines ayant un rôle architectural (d'après (Woodcock, 2006))

Ce sont les protéines :

- HP1 (Heterochromatin-associated Protein 1) de drosophile et ses homologues qui forment des dimères en solution (Nielsen et al., 2001). Elles possèdent notamment un chromodomaine qui fixe la modification H3K9me (Thiru et al., 2004). HP1 se lie préférentiellement à la chromatine contenant le variant H2A.Z (Fan et al., 2004).
- Les complexes PcG (Polycomb Group protein) sont impliqués dans le maintien de l'état silencieux de certains gènes. Polycomb comporte un chromodomaine qui reconnaît la modification H3-K27me3 (Fischle et al., 2003). La compaction de la chromatine provoquée par le complexe PRC1 peut être visualisée par microscopie électronique (Francis et al., 2004). Cette étude permet de conclure que PRC1 porte au moins deux sites d'interaction avec les nucléosomes.
- La protéine MENT (Myeloid and Erythroid Nuclear Termination stage specific protein) aviaire interagit avec l'ADN par l'intermédiaire de domaines particuliers pour former des interactions entre nucléofilaments (Springhetti et al., 2003).
- MeCP2 (Methyl-CpG binding protein 2) se lie au dinucléotides CpG méthylés de l'ADN. Elle est capable de recruter des histones désacétylases, d'induire une répression locale de la transcription et provoque une forte compaction de la chromatine (Young et al., 2005).

C. Compaction de la chromatine pendant la spermiogénèse

I. La spermatogénèse en bref

La spermatogénèse est le procédé par lequel sont produits les gamètes mâles (les spermatozoïdes). Les étapes successives se font de l'épithélium des tubes séminifères vers leur lumière où sont libérés les spermatozoïdes [Figure 9]. Ils vont ensuite terminer leur maturation dans l'épididyme.

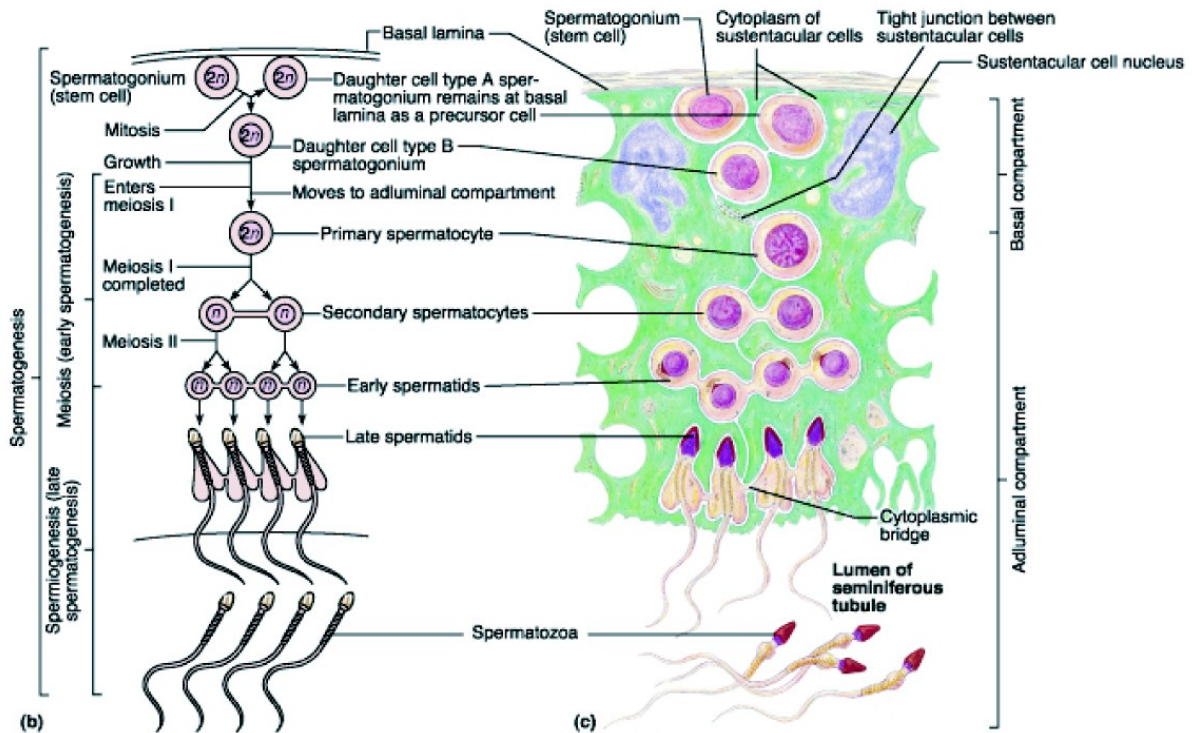
Les cellules germinales souches, appelées spermatogonies, sont localisées à proximité de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies de type A prolifèrent par mitose afin d'assurer leur renouvellement et certaines se différencient en spermatogonies de type B. Les spermatogonies de type B sont caractérisées par plusieurs nucléoles et une forte activité transcriptionnelle, permettant de synthétiser les protéines nécessaires à l'étape de méiose qui va suivre. Les divisions de méiose produisent quatre cellules haploïdes, appelé spermatides à partir d'une cellule diploïde. La prophase

de la première division méiotique est très longue, elle commence par la duplication de l'ADN et se termine par la ségrégation des chromosomes homologues dans les spermatocytes secondaires, par conséquent haploïdes. Les spermatocytes secondaires traversent ensuite une interphase très courte, sans répliquer leur ADN et subissent alors une division de mitose conventionnelle, avec séparation des chromatides soeurs de chaque chromosome. Cette division donne naissance aux spermatides. Commence alors la phase de différenciation terminale appelée spermiogenèse qui s'achève par la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. Tout au long de la spermatogenèse, il existe entre les cellules en voie de différenciation des ponts cytoplasmiques permettant la diffusion des molécules.

Trois transformations majeures s'opèrent au cours de la spermiogenèse :

- i. l'appareil de Golgi se différencie en granules à fonction semblable à celle des lysosomes qui donneront naissance à l'acrosome.
- ii. Le flagelle se forme et l'excès de cytoplasme est évacué sous forme de corps résiduels.
- iii. La dernière transformation concerne la compaction de la chromatine: c'est elle qui va nous intéresser. Au cours de la spermiogenèse, le noyau des spermatides s'allonge et la chromatine se condense en une structure très compacte. Ce phénomène a été observé dans la plupart des espèces étudiées. Le début du remodelage coïncide avec une hyperacétylation des histones de cœur; celle-ci sera suivie d'une disparition quasi totale des histones (Hazzouri et al., 2000 ; Meistrich et al., 1992).

Elles seront remplacées par de petites protéines basiques, spécifiques des testicules, appelées protéines de transition (TP1/2) (Meistrich et al., 2003). Les protéines de transition seront elles-mêmes remplacées par des protéines spécifiques du liquide séminal appelées protamines (Lewis et al., 2003). L'invalidation des gènes TP1/2 chez la souris n'affecte pas les premières étapes de la condensation de la chromatine (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004). Celles-ci semblent être largement dépendantes de la protéine Brdt (Govin et al., 2006).



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

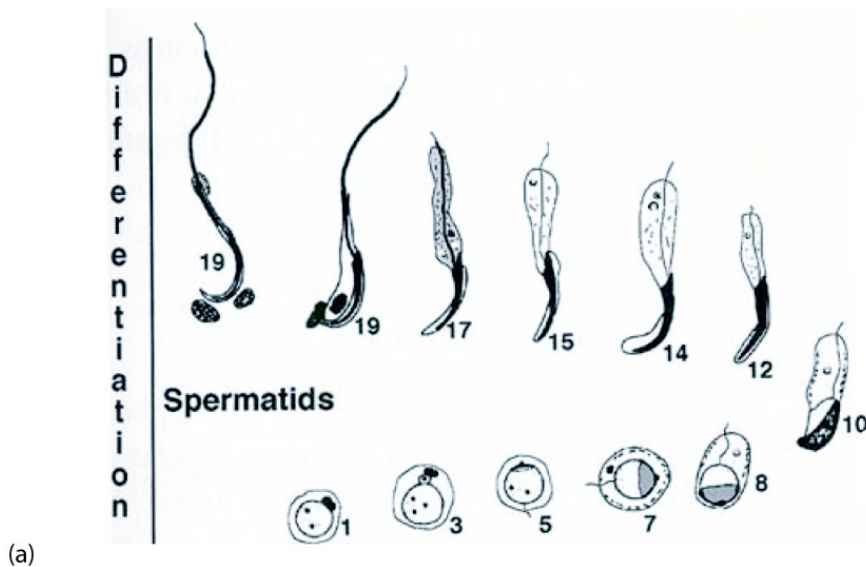


Figure 9: (a) Les trois phases de la spermiogénèse chez la souris

- (i) Spermatides rondes (type 1 à 7) : la chromatine est homogène, il existe une activité transcriptionnelle modérée, l'acrosome se développe.
- (ii) Spermatides en allongement (type 8 à 11) : le noyau des spermatides s'allonge, la chromatine commence à se condenser, la transcription s'arrête.
- (iii) Spermatides en condensation (type 12 à 16) : la chromatine se condense, l'acrosome et le flagelle achèvent leur maturation. Les spermatozoïdes s'individualisent et sont libérés dans la lumière du tube séminifère.

(b) et (c) la spermatogénèse

II. Modifications de la chromatine au cours de la spermiogenèse

Nous allons étudier principalement les modifications ayant lieu au cours de la spermiogenèse [Figure 10] et qui sont donc susceptibles d'intéresser la compaction de la chromatine à laquelle participe la protéine Brdt. Pour une description plus complète de ces phénomènes, voir les revues (Caron et al., 2005 ; Govin et al., 2004).

a. Intégration de variants d'histone

La chromatine qui sert de substrat au remplacement des histones et à la compaction qui suit contient une grande variété de variants d'histones. Certains sont spécifiques du testicule et d'autres sont ubiquitaires (Govin et al., 2004 ; Govin et al., 2007) [Tableau 2]. Les variants ubiquitaires, dont la présence correspond aux phases de méiose et aux premiers stades de la spermiogenèse ne sont probablement pas directement impliqués dans le phénomène de compaction des stades tardifs. Nous allons nous limiter à examiner la fonction possible des variants spécifiques.

	Variants ubiquitaires	Variants spécifiques
H1	H1.1 à H1.5, H1°	H1t, H1t2', HILS1'
H3	H3.1 à H3.3, CENP-A	TH3, H3t
H2A	H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2ABbd	TH2A, H2AL1*', H2AL2*
H2B		TH2B, (H2BFWT), H2BL1'

* spécifiques des régions péricentriques
' expression principalement dans les spermatides en condensation

Tableau 2: Variants d'histone identifiés chez le rat ou la souris (chez l'homme)

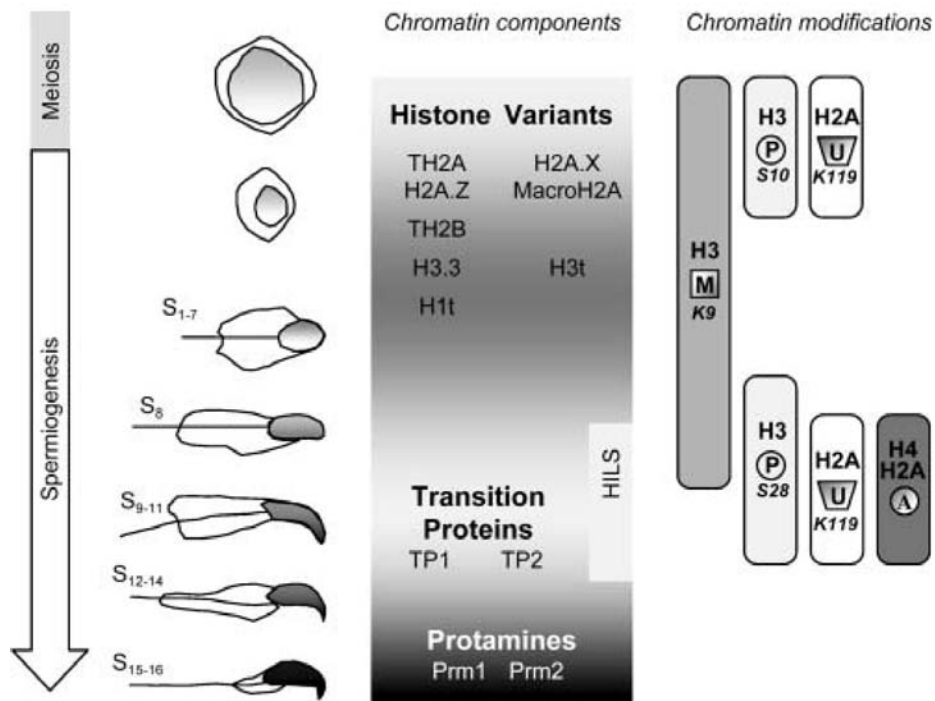


Figure 10: Modifications de la chromatine au cours de la spermatogénèse . A gauche: protéines intégrées à la chromatine. A droite: MTP: Méthylation (M), Phosphorylation (P), Ubiquitination (U), Acétylation (A). (d'après Govin, 2004)

i. Variants des histones de liaison

Le variant H1t est détecté du stade des spermatocytes à celui des spermatides rondes à allongées. Il constitue dans ces cellules jusqu'à 55% des histones de liaison totales (Drabent et al., 1996 ; Steger et al., 1998). Des données expérimentales *in vitro* montrent que H1t est moins fortement associé aux nucléosomes et qu'il a des capacités de condensation de la chromatine amoindries par rapport aux autres types d'histones de liaison présentes chez le rat (De Lucia et al., 1994 ; Khadake and Rao, 1995). Cela suggère que ce variant puisse faciliter la décompaction de la chromatine pour améliorer son accès à d'autres facteurs de remodelage.

Contrairement à H1t, les variants HILS1 et H1t2 sont exclusivement présents pendant la spermiogénèse. H1t2 est détecté à partir du stade des spermatides rondes jusqu'au stade des spermatides condensées. Il est localisé dans la partie apicale du noyau (sous l'acrosome) (Martianov et al., 2005). Le variant HILS1 a été exclusivement détecté dans les spermatides en condensation (stades 9 à 15) (Yan et al., 2003). Les auteurs de cette étude proposent qu'il soit impliqué dans la compaction de la chromatine dont les histones ont déjà été remplacées par des protéines de transition.

ii. Variants des histones de cœur

Variants de H2A

Les queues N terminales des variants H2AL1 et H2AL2 sont sujettes à de nombreuses variations. Elles sont plus réduites dans le cas de TH2A. Dans les deux cas les modifications touchent des résidus porteurs de MTP ou des résidus adjacents. Elles influencent donc potentiellement des fonctions importantes. Les variants de H2A présentent de plus plusieurs mutations dans leur domaines centraux et C terminaux. La région C terminale chargée négativement, connue pour être impliquée dans l'interaction avec la queue H4 et la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur, est d'ailleurs concernée puisqu'elle est quasiment absente chez H2AL1/L2 [Figure 11]. Ces variants ont été identifiés principalement dans les zones péri-centriques des spermatides condensées et dans les spermatozoïdes. Ils dimérisent préférentiellement avec le variant TH2B et forment, par association avec le tétramère (H3-H4)₂, des nucléosomes peu stables (Govin et al, 2007).

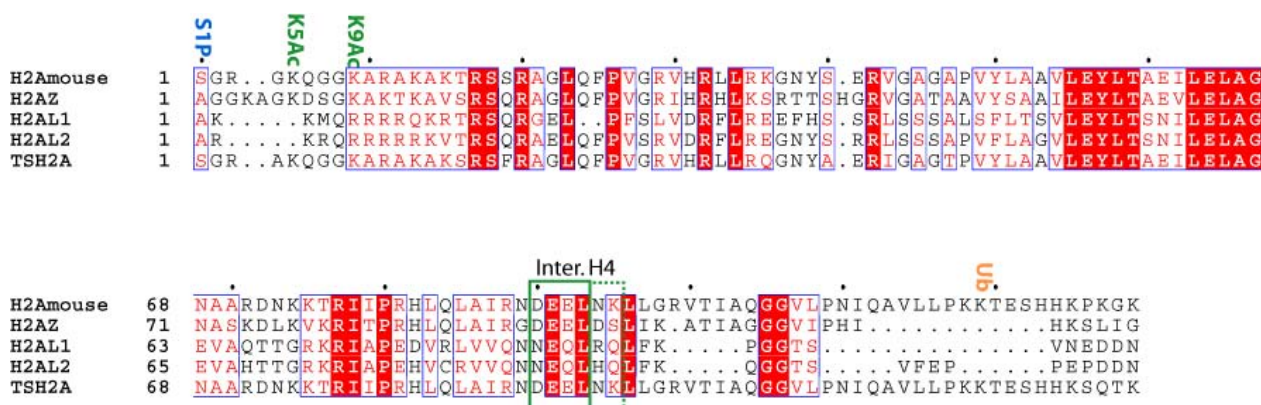


Figure 11: Alignement des séquences des histones H2A, H2AZ, H2AL1, H2AL2 et TH2A de souris. Les sites de MPT sont indiqués ainsi que la région chargée négativement qui interagit avec H4 et qui est impliquée dans la formation de la fibre de 30 nm (cadre vert noté Inter.H4). Cadre en pointillé : les deux résidus de H2AZ qui élargissent la région chargée négativement.

Variants de H2B

Les variants de H2B sont assez conservés dans leurs parties centrales et C terminales. Les queues N terminales sont en revanche très variables.

TH2B est la forme la plus abondante de l'histone H2B dans les spermatides rondes et allongées, elle disparaîtra progressivement jusqu'à n'être plus détectée dans les spermatozoïdes (Govin et al., 2007 ; van Roijen et al., 1998). Sa fonction est inconnue. Contrairement à elle, TSH2B, son homologue chez l'homme est détectée dans les spermatozoïdes matures et pourrait être impliquée

dans les premières étapes du développement de l'œuf (Singleton et al., 2007).

H2BFWT est un variant spécifique du testicule identifié chez l'homme. Il pourrait être associé aux régions télomériques (Churikov et al., 2004). Sa présence n'affecte pas la stabilité des nucléosomes. Il est en revanche incapable de recruter des facteurs de condensation et de participer à l'assemblage des chromosomes mitotiques (Boulard et al., 2006). H2BFWT pourrait être un marqueur épigénétique important pour l'identité des régions télomériques. Sa partie N terminale est extrêmement différente de celle de H2B. De façon générale il présente une similarité faible avec H2B et TH2B ou TSH2B.

Au contraire des variants de H2A, l'incorporation de TSH2B et H2BFWT dans des nucléosomes ne modifie pas la stabilité de ceux-ci (Boulard et al., 2006 ; Li et al., 2005).

Le variant H2BL1 a été identifié exclusivement dans les spermatides condensées et reste présent, contrairement à TH2B, dans les spermatozoïdes matures (Govin et al., 2007). Ce variant pourrait remplacer TH2B dans les stades tardifs de la spermatogenèse.

Variant de H3

H3t est peu différent de H3. Sa queue N terminale est notamment conservée à l'exception de la mutation A24V. Il apparaît dans les spermatides condensées (stades 12-16) où il pourrait remplacer H3 pour faire disparaître la tri-méthylation H3K9 (Govin et al., 2007).

b. Modifications post-traductionnelles

Nous allons particulièrement nous intéresser aux modifications qui touchent la chromatine des cellules post-méiotiques. Celles-ci sont potentiellement impliquées dans le phénomène de compaction de la chromatine qui a lieu au cours des phases terminales de la spermiogenèse (stades 12 à 16) qui implique Brdt [Figure 10].

i. Acétylation

Chez plusieurs espèces il se produit au cours de la spermiogenèse une vague d'acétylation qui précède le remplacement des histones (Govin et al., 2004). L'acétylation survient de façon indépendante d'une activité de réplication ou de transcription et semble plutôt être liée au remplacement des histones qui la suit. En effet les histones ne sont pas remplacées dans les espèces chez lesquelles la chromatine ne subit pas d'hyperacétylation (Kennedy and Davies, 1981). Des

études *in vitro* suggèrent que l'acétylation des histones pourrait faciliter leur remplacement par des protamines (Oliva et al., 1987).

Il a été montré que l'histone H4 est fortement acétylée au cours des stades 9 à 12 chez le rat (Meistrich et al., 1992) et au cours des stades 9 à 11 chez la souris (Hazzouri et al., 2000). Par fractionnement des différents types de spermatides, une étude montre que les histones de cœur sont principalement acétylées sur H4 et H2A et que l'acétylation de H4 touche les lysines K5, K8 et K12 mais pas K16 (Govin et al., 2006).

La dynamique de l'acétylation de H4 a été suivie dans les spermatides grâce à la technique d'immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique de la queue H4 tétra-acétylée: Les spermatides rondes (stades 2-6) sont peu colorées par l'anticorps. Dans les spermatides en cours d'élongation (stade 8), l'acétylation de H4 augmente, elle est distribuée de façon homogène dans l'ensemble du noyau. Au stades 9-10, le signal diminue, sauf dans un domaine central qui s'avère correspondre à la chromatine constitutive péricentrique. Au stade 11, l'acétylation de H4 a complètement disparu (Govin et al., 2007).

ii. Autres modifications post-transcriptionnelles potentiellement impliquées

Des formes ubiquitinées des histone H2A, H2A.Z, H2B, H3, TH3 sont détectées chez le rat dans les spermatides allongées (Baarends et al., 1999 ; Chen et al., 1998). Cette ubiquitination pourrait être impliquée dans le phénomène de dégradation des histones observé à la fin de la spermiogenèse. Une autre voie de dégradation, associée à l'acétylation des histones est également étudiée.

La phosphorylation de la sérine 1 de H4, a été identifiée dans les gamètes mâles en voie de différenciation chez la levure, la drosophile et la souris. Sa présence est détectée chez la souris pendant les phases post-méiotiques et disparaît au début de l'allongement des spermatides à un stade qui correspond à l'hyper-acétylation des histones (Thèse J.Govin, 2006). Chez la levure, en l'absence de cette modification, la compaction de la chromatine est réduite et le volume du noyau est augmenté (Krishnamoorthy et al., 2006). Ainsi, la modification H4S1P semble être impliquée dans la compaction de la chromatine qui a lieu au cours de la spermatogenèse. Aucune explication directe n'a été publiée à ce jour sur la façon dont cette modification intervient. Cependant H4S1P inhibe *in vitro* l'activité histone acétyl-transférase des enzymes EsaI et NuA4 (Utley et al., 2005). Ce qui laisse supposer que cette phosphorylation régule l'acétylation de H4 dans les spermatides.

D. La protéine Brdt

I. Fonctions

Brdt est une protéine spécifiquement exprimée dans les testicules (Shang et al., 2004) et dans les ovocytes (Paillisson et al., 2007). Dans les cellules germinales mâles, son ARN messager est détecté dans les spermatocytes et dans les spermatides allongées (Govin et al., 2006).

La protéine appartient à la famille des protéines BET. Ces protéines comportent toutes dans leurs parties N terminales deux bromodomaines séparés par une région de liaison (longue de 100 résidus environ dans le cas de Brdt).

Son expression dans les spermatides au moment de la compaction de la chromatine et la présence de deux bromodomaines dans sa séquence primaire ont incité l'équipe de S. Kochbin à étudier la fonction de cette protéine encore inconnue. L'équipe a montré par immunofluorescence que la partie N terminale de la protéine contenant les deux bromodomaines et leurs régions adjacentes (δ C-Brdt, résidus 1 à 440) est capable d'induire la compaction de la chromatine acétylée lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules somatiques. Cette capacité est conservée lorsque des noyaux purifiés sont incubés avec la protéine. La compaction induite est dépendante de l'acétylation de la chromatine et de l'intégrité des deux bromodomaines (avec une abolition de la compaction plus drastique pour les mutants dont BD1 a été inactivé) et de leurs régions adjacentes (résidus 1-13 et 392-443) mais indépendante de la présence d'ATP. Enfin, cette étude montre par co-purification que la partie N terminale de la protéine (δ C- Brdt) se lie à la queue tétra-acétylée de l'histone H4 et que l'inactivation de l'un ou l'autre des bromodomaines est suffisant pour abolir cette interaction (Pivot-Pajot et al., 2003).

Des études complémentaires par immunofluorescence montrent que la présence de Brdt et de l'hyperacétylation de H4 suivent parfaitement la même évolution spatio-temporelle. Le signal lumineux correspondant à Brdt est faible dans les spermatides rondes, il est très intense dans les spermatides en début d'allongement puis diminue mais persiste plus longtemps dans les régions péricentriques où subsiste également l'acétylation. L'évolution de l'acétylation de H4, détaillée dans le paragraphe précédent, est parfaitement similaire (Govin et al., 2007 ; Govin et al., 2006).

Brdt est également capable d'induire le relargage de l'histone de liaison H1 (Govin et al., 2006) connue pour empêcher la formation de structures compactes de la chromatines (Khochbin, 2001). On peut noter que ce relargage pourrait aussi être facilité par l'acétylation des histones

(Misteli et al., 2000 ; Perry and Annunziato, 1989). Cette observation laisse envisager que Brdt soit impliqué dans l'incorporation du variant H1LS1 de l'histone H1. Ce variant est spécifiquement exprimé dans les spermatides en condensation.

Enfin, Brdt co-localise avec les régions péricentriques de la chromatine. Dans ces régions les histones ne sont pas remplacées par les protéines de transition et l'hyperacétylation de H4 persiste jusqu'à des stades tardifs de la spermiogenèse. Brdt pourrait être impliqué dans la protection de l'acétylation ainsi que dans la conservation des histones dans ces régions (Govin et al., 2007).

L'importance fonctionnelle de Brdt et de son premier bromodomaine en particulier pour le bon déroulement de la spermiogenèse a été mise en évidence par plusieurs études différentes :

- i. L'inactivation de BD1 a un effet plus prononcé sur la compaction de la chromatine que celle de BD2 (Pivot-Pajot et al., 2003).
- ii. Chez l'homme, un polymorphisme de séquence qui entraîne une mutation dans le premier bromodomaine de Brdt (mutation K62Q de BD1) a été identifié à l'état homozygote uniquement chez des individus infertiles. Cette mutation affecte la stabilité de l'association de Brdt et de la chromatine acétylée (Rousseau et al., article soumis).
- iii. L'inactivation du premier bromodomaine de Brdt chez la souris provoque une stérilité chez les individus touchés et la production de spermatides de morphologie anormale à partir du stade 9 de la spermiogenèse. La mutation provoque également une augmentation de la quantité du variant H1t dans les spermatides (Shang et al., 2007).

II. Brdt appartient à la famille des protéines BET

a. Structure primaire

La famille des protéines BET (Bromodomain and Extra-Terminal) comprend Brdt, Brd2, Brd3 et Brd4 chez les mammifères, la protéine Fsh identifiée chez la drosophile, et les protéines Bdf1 et Bdf2 chez la levure. Contrairement à Brdt qui est exprimé spécifiquement dans les testicules et les ovaires, Brd2, Brd3 et Brd4 sont exprimés de façon ubiquitaire (Shang et al., 2004). Brdt est l'homologue le plus éloigné (environ 47 % d'identité de séquence avec ses paralogues Brd2, Brd3 et Brd4). Brd2 et Brd3 sont les plus proches (environ 60 % d'identité de séquence) (Paillisson et al., 2007).

Les protéines BET présentent sept domaines conservés: deux bromodomains (BD1 et BD2) - séparés par une région dont la longueur varie de 120 résidus pour Brdt à 170 résidus pour Brd4 -, un domaine ET (extra-terminal), un motif A situé entre BD1 et BD2, un motif B situé après BD2, un domaine SEED riche en résidus sérine, aspartate et glutamate, enfin un domaine CTM à l'extrémité C terminale présent chez Brd4, Brdt et Fsh (Florence et Faller, 2001 ; Paillisson et al., 2007 ; Wu et Chiang, 2007) [Figure 12 et alignements des séquences de ces domaines en annexe 3]. Les bromodomains paralogues sont très conservés (71 à 88 % d'identité de séquence), alors que les bromodomains d'une même protéine ont seulement environ 44 % d'identité. Le domaine ET est le plus conservé avec 80 à 89 % d'identité (Paillisson et al., 2007). Nous allons voir que les domaines ET, SEED et CTM assurent des interactions avec d'autres protéines.

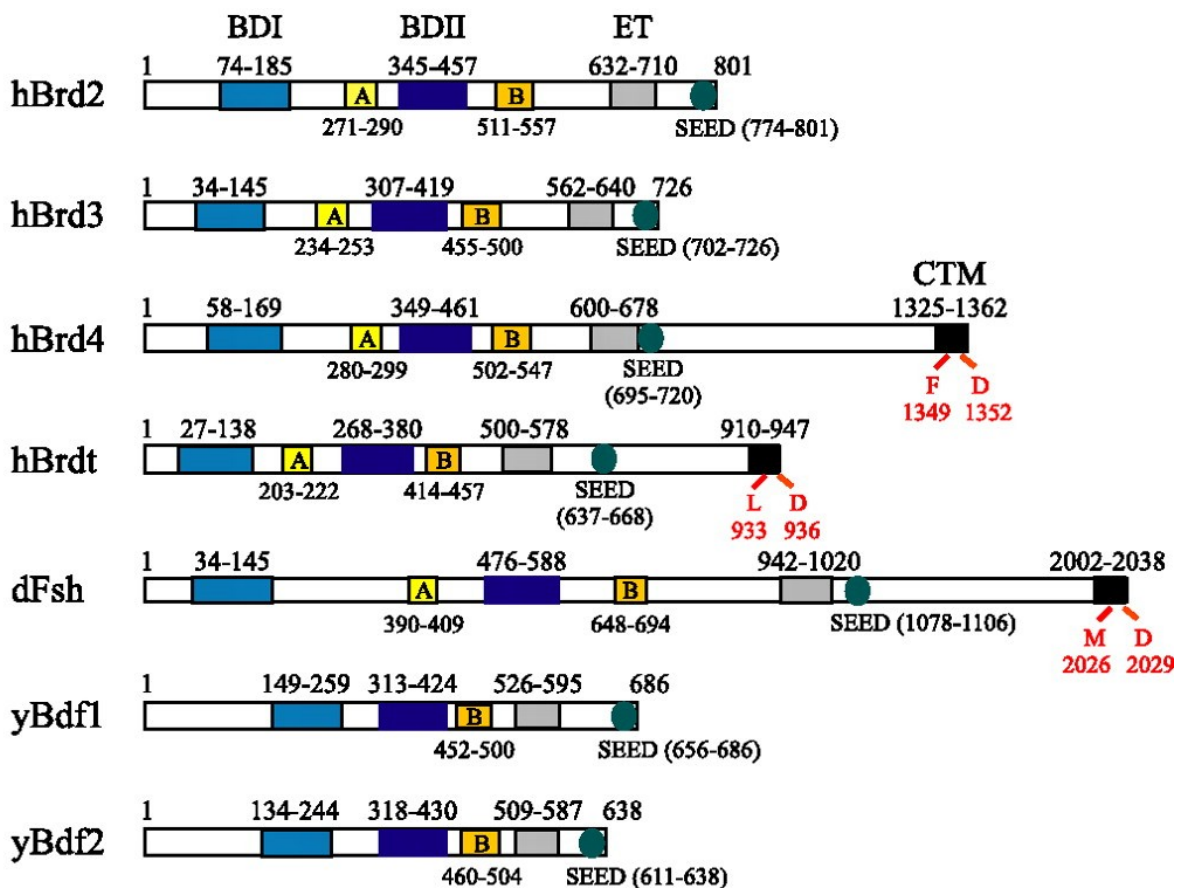


Figure 12: Représentation schématique des protéines de la famille BET mettant en évidence les domaines conservés et les résidus critiques pour l'interaction de Brd4 avec la protéine E2 du virus HPV-16. (en rouge)

b. Aperçu des fonctions des protéines de la famille BET

Contrairement à Brdt, Brd2 et Brd4 sont des gènes essentiels. Leur mutation chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire (Houzelstein et al., 2002 ; Shang et al., 2007).

Brd2 et Brd4 sont principalement associées à l'euchromatine (Denis et al., 2000 ; Mattsson et al., 2002).

Brdt, Brd2, Brd3 et Brd4 restent associées avec la chromatine lors de la compaction qui a lieu pendant la mitose (Dey et al., 2003 ; Dey et al., 2000 ; Kanno et al., 2004 ; Pivot-Pajot et al., 2003). Cela indique que ces protéines pourraient être impliquées dans un phénomène de mémoire cellulaire.

Brd2, Brd3 et Brd4 sont impliquées dans la régulation de la transcription. Brd2 (anciennement RING3) s'associe avec le complexe activateur de la transcription E2F-1 et participe ainsi à l'activation des promoteurs de plusieurs gènes régulateurs du cycle cellulaire (Dey et al., 2000). La protéine s'associe également à E2F-2 (Denis et al., 2006), TBP dont elle assure l'insertion dans le complexe E2F (Peng et al., 2007) et avec la grande sous-unité de la RNA polymérase II (Crowley et al., 2002). La région contenant de domaine SEED de Brd2 est essentielle pour l'interaction avec E2F- 1 et E2F- 2 (Denis et al., 2000). Brd4 s'associe avec plusieurs complexes de régulation de la transcription, dont le complexe Mediator (Wu et al., 2003) et la forme activatrice du complexe P-TEFb (Yang et al., 2008). Sa présence induit une augmentation de la transcription de certains gènes et stimule celle associée au promoteur HIV-1 (Yang et al., 2005). D'autre part, Brd4 fait partie d'un complexe de répression de la transcription utilisé par les virus HPV (Human PapillomaViruses) (Wu et al., 2006). Une étude a montré récemment que la reconnaissance de la chromatine hyper-acétylée sur H4 et H3 par Brd2 et Brd3 a lieu dans des régions occupées par des gènes transcrits et que les protéines ont la propriété d'activer la transcription par la RNA polymérase II (LeRoy et al., 2008). Ces observations indiquent que les protéines Brd2, Brd3 et Brd4 sont de véritables co-facteurs transcriptionnels.

Brd2 et Brd4 sont impliquées dans la ségrégation de génomes viraux. Brd2 et Brd4 s'associent avec la protéine LANA (LAtent Nuclear Antigen) du virus KSHV (Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus) (Ottinger et al., 2006 ; Platt et al., 1999 ; You et al., 2006). Brd4 interagit également avec la protéine E2 du virus HPV (Wu et al., 2006) et permet ainsi l'attachement des virus aux chromosomes mitotiques et leur transmission aux cellules filles. Le domaine CTM a été identifié comme étant responsable de cette interaction pour Brd4. La structure cristallographique à 1,6 Å de la partie N terminale du virus HPV en complexe avec les 20 résidus de Brd4 impliqués montre un

domaine CTM replié en hélice α (Abbate et al., 2006). Le domaine ET de Brd4 semble quant à lui servir de domaine d'interaction pour la protéine LANA de KSHV. Sa structure a été déposée récemment dans la Protéine Data Bank [PDB 2JNS] et montre une structure globulaire faite de trois hélices α et d'une boucle tout à fait compatible avec une telle fonction.

Brd2 et Brd3 ont une activité de chaperon vis à vis des histones. Brd2 et Brd3 rendent possible la transcription dans une fibre contenant des nucléosomes acétylés et Brd2 provoque l'assemblage de nucléosomes sur un brin d'ADN nu à partir d'une fibre de quelques nucléosomes et de nucléosomes désassemblés (LeRoy et al., 2008).

Bdf1 prévient la propagation de l'hétérochromatine. La protéine Bdf1 de levure, similaire à la protéine Brd4 des mammifères, entre en compétition avec Sir (Silent information regulator) pour la fixation de la queue acétylée de l'histone H4 et empêche sa fixation aux zones frontières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine (Ladurner et al., 2003). Cette fonction dépendante de l'acétylation est corrélée avec le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine Swr1 qui permet l'insertion du variant H2A.Z de l'histone H2A dans ces régions (Kobor et al., 2004 ; Krogan et al., 2003 ; Mizuguchi et al., 2004). Bdf1 régule également l'expression de plusieurs gènes et interagit via son domaine ET avec la sous-unité TAF7 du facteur de transcription TFIID (Matangkasombut et al., 2000).

En conclusion, les protéines BET possèdent un grand nombre de fonctions liées à l'organisation de la chromatine qui passent par des interactions variées avec d'autres protéines. Les domaines ET, SEED et CTM sont impliqués dans ces interactions protéine-protéine.

c. Spécificités vis à vis de l'acétylation des histones

Les fonctions évoquées plus haut dépendent pour la plupart de l'acétylation de la chromatine. Nous allons résumer ici les informations disponibles concernant les bromodomains très conservés de ces protéines. Il apparaît entre les bromodomains, même des proches homologues Brd2, Brd3 et Brd4 des différences de spécificité. La diversité des techniques utilisées rend cependant la comparaison délicate.

i. Brd2

Kanno et ses collègues (2004) ont montré *in vivo* par FRET que Brd2 interagit préférentiellement avec la queue N terminale de l'histone H4 tétra-acétylée. Cette interaction est abolie par la mutation des lysines K12 et K5 de la queue H4 en glycine. Elle est réduite si ce sont les lysines K8 et K16 qui sont mutées. Dans la même étude, ils montrent par une expérience de co-purification que Brd2

présente pour le peptide H4-K12ac une forte affinité. La reconnaissance de la mono-acétylation H4-K12ac est ensuite confirmée *in vivo* par la disparition du FRET entre Brd2 et un nucléosome portant la mutation K12R sur l'histone H4 mais pas entre Brd2 et un nucléosome portant la mutation H4-K5R. Ils montrent ensuite que Brd2 ne présente pas d'affinité pour la queue H3 acétylée. De plus l'inactivation de l'un ou l'autre des bromodomains entraîne une réduction significative (50% environ) de l'interaction pour H4, quel que soit le bromodomaine touché (Kanno et al., 2004).

La structure cristallographique du premier bromodomaine de Brd2 met en évidence un dimère dans l'unité asymétrique qui semble exister en solution. La mutation des résidus responsables de la formation du dimère résulte à une perte de l'affinité de Brd2-BD1 pour le peptide H4-K12ac (Nakamura et al., 2007).

La structure du second bromodomaine de la protéine (Brd2-BD2) a également été résolue par RMN (Huang et al., 2007). La perturbation chimique induite par la titration des peptides H4-K8ac, H4-K12ac, H2B-K5ac montre que H4-K12ac est préférentiellement reconnu par Brd2-BD2 parmi ces peptides ($K_d \sim 2,9$ mM).

ii. Brd3

Une étude a montré récemment que l'activation de la transcription induite par la reconnaissance de la chromatine hyper-acétylée sur H4 et H3 par Brd2 et Brd3 était inhibée par la présence des peptides H4-K5ac et H4-K12ac. Témoinnant d'une divergence de fonction entre les proches homologues Brd2 et Brd3, l'inactivation de Brd3 par l'un ou l'autre des peptides est équivalente alors que le peptide H4-K12ac a un effet plus important que H4-K5ac sur l'activité de Brd2 (LeRoy et al., 2008).

iii. Brd4

Dey et ses collègues (2003) ont montré par co-purification que Brd4 interagit avec les peptides H4 tétra-acétylés, avec le peptide di-acétylé H4-K5K12ac et dans une moindre mesure avec le peptide H4-K8K12ac mais pas avec les peptides H4 mono-acétylés sur les lysines K8, K12 ou K16. Par ailleurs, contrairement à Brd2 et Brd3, Brd4 montre une affinité pour les peptides H3 di-acétylés sur les lysines K9 et K14 et mono-acétylés sur la lysine K14 (affinité légèrement plus faible) (Dey et al., 2003).

Récemment la structure de Brd4-BD2 a été obtenue par RMN. La perturbation chimique induite par la titration des peptides H4-K5ac, H4-K12ac, H4-K5K12ac et H3-K9K14ac dans des solutions de BD1 ou BD2 indique que les bromodomains lient les peptides H3 et H4 di-acétylés avec des

affinités similaires. Les affinités de BD1 et BD2 vis à vis des peptides H4-K5ac, H4-K12ac ont été déterminées et sont respectivement égales à 0,8 et 0,6 mM pour BD1 et 1,0 et 1,3 mM pour BD2 (Liu et al., 2008).

iv. Bdf1

Bdf1 reconnaît un peptide H4 tétra-acétylé avec une forte affinité (8,4 μ M) et un peptide H3 tétra-acétylé ou di-acétylé sur les lysines K14 et K18 avec une affinité légèrement plus faible (14 μ M pour H3-K14K18ac) (Ladurner et al., 2003). Bdf1 se lie spécifiquement à la chromatine hyperacétylée sur H3 et H4 mais non-acétylée sur la lysine K16 de H4 des gènes transcrits (Kurdistani et al., 2004). Contrairement à lui, le très proche homologue Bdf2 lie l'histone H4 sans discrimination vis à vis de son état d'acétylation (Matangkasombut and Buratowski, 2003).

E. Le bromodomaine : structure et fonction

Le bromodomaine est un module de 110 acides-aminés environ. Son repliement est très conservé. Il est constitué par l'empilement de 4 hélices en un tonneau qui présente à une de ses extrémités les parties N et C terminales de la chaîne peptidique et à l'autre extrémité les boucles ZA et BC [Figure 13] (Jeanmougin et al., 1997). Ce repliement fait du bromodomaine un module indépendant et permet l'existence de séries de bromodomains placés les uns à côté des autres.

Les bromodomains sont des modules de liaison des lysines acétylées. Ils sont capables de discriminer un site d'acétylation grâce aux résidus adjacents à l'acétyl-lysine. L'adaptation de chaque bromodomaine à son ligand se fait grâce aux boucles ZA et BC de séquences variables qui portent le site de fixation du peptide acétylé (Mujtaba et al., 2007 ; Zeng and Zhou, 2002).

Ils sont présents dans de nombreuses protéines associées à la chromatine, telles que des histones acétyl-transférases ou des complexes de remodelage de la chromatine (Yang, 2004). Les affinités mesurées jusqu'ici entre les bromodomains et les peptides reconnus sont relativement faibles comparées à une affinité de type antigénique ou même d'une reconnaissance enzyme-substrat. Elle varie de quelques milli-molaires à quelques micro-molaires. L'ordre du micro-molaire semble définir une interaction spécifique entre un bromodomaine et un peptide acétylé [Annexe 4A].

Les bromodomains peuvent être seuls, associés par deux ou associés à d'autres domaines de reconnaissance d'une MTP (à un PHD finger par exemple). Par exemple, la protéine Pbl porte six

bromodomains adjacents dont les spécificités vis à vis des sites d'acétylation de l'histone H3 sont toutes différentes. Plus fréquemment, on trouve un tandem de bromodomains. C'est le cas chez les protéines TAFII250 et yRsc4. Les structures cristallographiques de ces tandems révèlent que chaque bromodomaine interagit largement avec l'autre pour former un module ou les deux sites de fixation se trouvent l'un à côté de l'autre (Jacobson et al., 2000 ; VanDemark et al., 2007). D'autres modes ne sont pas exclus. Dans le cas des protéines BET par exemple, les bromodomains sont séparés par une longue région, prédite pour être largement non structurée. Il est donc probable que, dans ce cas, les deux bromodomains soient indépendants l'un de l'autre.

Une unique étude a permis de décrire pour la première fois le repliement du domaine, de mettre en évidence sa capacité d'interagir spécifiquement avec une lysine acétylée (Dhalluin et al., 1999).

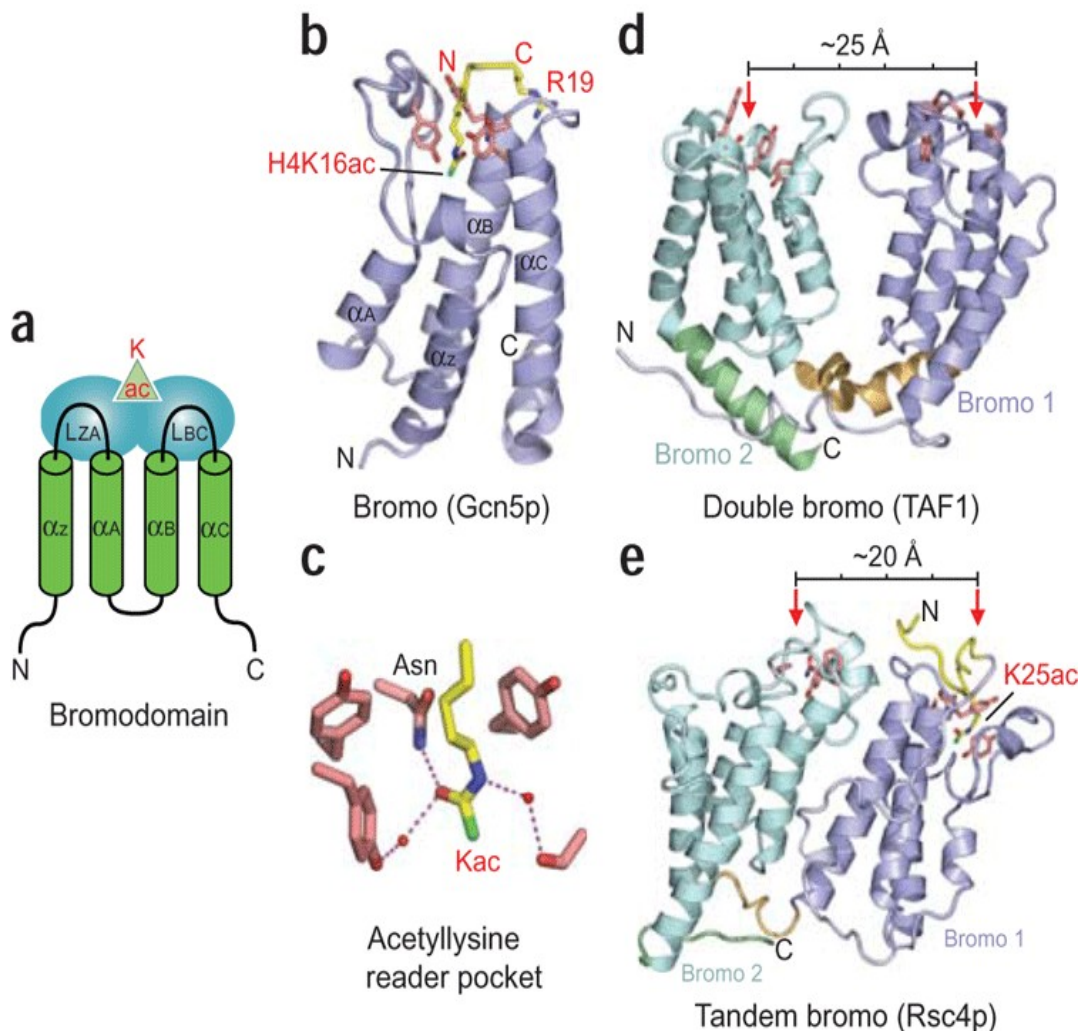


Figure 13: Les bromodomains. a. Repliement des bromodomains. b. Bromodomaine en complexe avec un peptide acétylé. c. Mode de reconnaissance conservé de la lysine acétylée. d. et e. Doubles bromodomains en complexe avec des peptides acétylés

Les auteurs ont déterminé par RMN la structure atomique du bromodomaine de P/CAF et ont mesuré ses affinités pour différents peptides acétylés. Ils ont ensuite montré l'importance des résidus V752, Y760, Y802 et Y809 pour l'interaction avec le peptide. Depuis, de nombreuses autres structures de bromodomains ont été déterminées par RMN ou par cristallographie aux rayons X. Les structures d'environ 25 bromodomains différents sont actuellement disponibles [Annexe 4B]. L'analyse de celles des bromodomains de Brd2, Brd3, Brd4 et Brdt-BD1 montre que leurs structures sont très similaires puisqu'elles présentent des r.m.s.d (déviations moyennes) sur les C α allant de 0,3 à 0,6 Å environ. Il existe relativement peu de structures qui permettent de visualiser l'interaction entre le bromodomaine et un peptide acétylé. Seules les structures en complexe des bromodomains de la protéine de levure GCN5 (Owen et al., 2000), celles des protéines humaines P/CAF (Mujtaba et al., 2002 ; Zeng et al., 2008) et CBP (Mujtaba et al., 2004 ; Zeng et al., 2008) et du double bromodomaine de la protéine de levure Rsc4 (VanDemark et al., 2007) ont été publiées. La structure du complexe γ GCN5/H4acK16 montre pour la première fois les détails structuraux de l'interaction entre la lysine acétylée et la cavité hydrophobe. Elle met notamment en évidence l'existence d'une liaison hydrogène entre le groupe acétyle de la lysine reconnue et une asparagine (N407) conservée chez la grande majorité des bromodomains.

Ces quatre complexes montrent qu'il existe, outre la reconnaissance de la lysine acétylée, des interactions entre les boucles ZA et BC de séquences très variables et les résidus adjacents à la lysine acétylée. Ces interactions permettent de toute évidence aux bromodomains d'acquiescer une spécificité vis à vis des différents sites d'acétylation.

Le site de liaison de la lysine acétylée est formé par une cavité qui existe avant la fixation du ligand. Cela fait de lui une cible potentielle pour de petites molécules bloquant l'interaction entre le bromodomaine et son ligand. Ainsi des inhibiteurs sélectifs de l'interaction entre le bromodomaine de P/CAF et le peptide HIV-1 Tat-K50ac (Zeng et al., 2005) et de l'interaction entre CBP et le peptide P53-K382ac (Sachchidanand et al., 2006) ont été développés. Ces molécules se fixent à l'entrée de la cavité, principalement en contact avec des résidus variables de la boucles ZA. Cela leur permet d'être spécifiques de l'un ou l'autre des bromodomains.

F. Déroulement du travail de thèse

Le projet a débuté suite à la cristallisation de Brdt-BD2 en complexe avec le peptide H4-K12ac et au constat que ce peptide ne montrait pas d'affinité mesurable par ITC pour Brdt-BD2. Nous avons ensuite entrepris d'identifier la spécificité de chacun des bromodomains de Brdt pour les queues N terminales acétylées des histones H4 et H3. Nous avons également déterminé l'impact de la mutation de K61Q de BD1 sur la fixation de son ligand. Ces travaux se sont accompagnés de la résolution par cristallographie aux rayons X des structures de Brdt-BD1 et Brdt-BD2 en complexe avec différents peptides acétylés.

Partie II:

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

A. Production des protéines

I. Clonage

Les protéines δ CBrdt, BD1, BD2 et BD1-K62Q [Tableau 3] dérivent de l'ADNc de la protéine Brdt de souris (référence GenBank: AF019085) fourni par nos collaborateurs. Le clonage des fragments codants pour les protéines δ CBrdt et BD2 a été réalisé par M. Soler dans un vecteur d'expression conçu dans le cadre d'un projet de cristallisation à haut débit. Ce vecteur (pHAR1201) permet d'obtenir les protéines en fusion avec une queue de six histidines, clivable grâce à la présence d'un site de reconnaissance pour la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). Les protéines BD1 et BD1-K62Q ont été obtenues par l'amplification des résidus indiqués dans le tableau 3. Les oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR (Polymerisation Chain Reaction) sont indiqués dans le tableau 4. Chaque insert a été digéré par l'enzyme de restriction BsaI, NcoI ou FatI en 5' et Acc65I en 3' et inséré dans un vecteur pETM11 préalablement linéarisé par la digestion des enzymes NcoI et Acc65I. Les protéines de fusion obtenues possèdent une étiquette six histidines clivable par la protéase TEV.

Protéine	Clone	Vecteur	Bornes / Oligonucléotides	Enzymes de restriction
δCBrdt	SP6	pHAR1201	2 - 442	
BD1	SI-1	pETM11	22-136 / Brdta5'22NcoI - Brdta3'136Acc65I	NcoI/Acc65I
BD1	SI-2	pETM11	25-136 / Brdta5'25NcoI - Brdta3'136Acc65I	NcoI/Acc65I
BD1	SI-3	pETM11	28-136 / Brdta5'28NcoI - Brdta3'136Acc65I	NcoI/Acc65I
BD1	SII-1	pETM11	17-142 / 5'Brdt17 - 3'Brdt142	BsaI/Acc65I
BD1	SII-2	pETM11	17-150 / 5'Brdt17 - 3'Brdt150	BsaI/Acc65I
BD1	SII-3	pETM11	17-154 / 5'Brdt17 - 3'Brdt154	BsaI/Acc65I
BD1	SII-4	pETM11	23-142 / 5'Brdt23 - 3'Brdt142	BsaI/Acc65I
BD1	SII-5	pETM11	23-150 / 5'Brdt23 - 3'Brdt150	BsaI/Acc65I
BD1	SII-6	pETM11	23-154 / 5'Brdt23 - 3'Brdt154	BsaI/Acc65I
BD1	SIII-1	pETM11	12-136 / 5'FatBrdta12 - 3'Brdt135	FatI/Acc65I
BD1	SIII-2	pETM11	12-136 / 5'NcoBrdt12 - 3'Brdt135	NcoI/Acc65I
BD1	SIII-3	pETM11	17-136 / 5'Brdt17 - 3'Brdt135	NcoI/Acc65I
BD1	SIII-4	pETM11	25-142 / Brdta5'25NcoI - 3'Brdt142	NcoI/Acc65I
BD1-K62Q	Q61- 2	pETM11	23 – 142 / 5'Brdt23 - 3'Brdt142	BsaI/Acc65I
BD2	A12	pHAR1201	257 - 383	

Tableau 3: Constructions de Brdt utilisées pendant la thèse

Oligonucléotides	Séquence
Brdta5'22NcoI	CGT CCC ATG GCT AAG AGT GGG CGG TTG AC
Brdta5'25NcoI	CGT CCC ATG GGT CGG TTG ACG AAT CAG CTG
Brdta5'28NcoI	CGT CCC ATG GCT AAT CAG CTG CAG TTC CTA CAG
Brdta3'136Acc65I	GGA CGG TAC CTT ATT GCT CTT CTT GTG GCA TCT GAG ATA ATT TC
5'Brdt17	CATG GGTCTC CCATG GAG TAC ATA AAC ACT AAG AAG AGT GG
5'Brdt23	CATG GGTCTC CCATG AAG AGT GGG CGG TTG
3'Brdt142	CGCG GGTACC TTA CTT ACC ACC CAC AAC TTG C
3'Brdt150	CGCG GGTACC TTA TTG GAT ATC TTT CTT TAT TCT CTC CTT ACC C
3'Brdt154	CGCG GGTACC TTA CGC TAT CTT TTG TTG GAT ATC TTT CTT TAT TCT C
5'FatBrdta12	CGT CCC ATG AAC CCC CCT CCA CCA GAG TAC
5'NcoBrdt12	CGT ACC ATG GGC AAC CCC CCT CCA CCA GAG
3'Brdt135	GGA CGG TAC CTT ACT CTT CTT GTG GCA TCT GAG ATA ATT TCT GC

Tableau 4: Oligonucléotides utilisés pour les clonages de BDI

II. Expression

La protéine δ CBrdt a été produite par des cellules bactériennes BL21-AI (Arabinose Inducible) dont l'induction a été réalisée par l'ajout de 2% d'arabinose dans le milieu de culture et mise en culture pendant une nuit à 18°C. Les protéines BD1, BD2 et BD1-K62Q ont été produites par des bactéries BL21-DE3 après induction par 0,4 mM d'IPTG et mise en culture à 18-25°C pendant une nuit.

III. Purification

Les protéines ont été purifiées selon le même protocole, comprenant 6 étapes :

1. Lyse des cellules par sonication ; ultracentrifugation (30 minutes à 20 000 g) ; récupération du surnageant
2. Première purification d'affinité sur des colonnes de sépharose couplée à du nickel ou du cobalt – Lavage abondant – Elution par un gradient d'imidazole
3. Elimination de l'imidazole et clivage de la queue six histidines par ajout de la protéase TEV dans l'éluat et mise en dialyse pendant une nuit
4. Seconde purification d'affinité pour éliminer les protéines non clivées et la protéase (qui porte une queue six histidines) – récupération directe de l'éluat ou suite à un léger gradient d'imidazole
5. Chromatographie d'exclusion sur gel par chromatographie liquide de haute pression – récupération du pic correspondant à la protéine pure

Vue la grande quantité de protéine nécessaire pour les expériences de microcalorimétrie et de cristallographie (plusieurs dizaines de mg), nous avons utilisé des moyens permettant une automatisation importante. Les purifications d'affinité ont été réalisées sur des colonnes à forte capacité de fixation HiTrap (Amersham) chélatées avec du nickel ou du cobalt en utilisant le système de chromatographie à basse pression AKTAprime. Celui-ci permet de réaliser l'injection du lysat sur la colonne, les lavages, la réalisation du gradient d'imidazole et la collection de l'éluat par fractions de façon automatique tout en suivant l'évolution de la densité optique à 280 nm. La chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée sur des colonnes Superdex 75 (pour BD1 et BD2) ou Superdex200 (pour δ CBrdt) en utilisant un système à haute pression Aktapurifier

permettant de réaliser une vingtaine de cycles d'injection/élution sur la colonne et de collecter les fractions correspondant au pic de protéine de façon automatique.

Pour limiter les dégagements de chaleur dus à la dilution de la solution tampon lors des expériences d'ITC, les solutions tampon ne contiennent pas de Tris et le DTT est éliminé lors de l'étape de chromatographie d'exclusion. La composition des solutions tampons est indiquée ci-dessous [Tableau 5].

	BD1, BD1-K62Q, BD2	δCBrdt
Tampon de lyse	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 7,5 ; 1mM DTT ; 10 mM Imidazole	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 8,0 ; 1mM DTT ; 10 mM Imidazole
Purification d'affinité, tampon A	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 7,5 ; 1mM DTT	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 8,0 ; 1mM DTT
Purification d'affinité, tampon B	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 7,5 ; 1mM DTT ; 500 mM imidazole	500 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 8,0 ; 1mM DTT ; 500 mM imidazole
Tampon de dialyse	250 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 7,5 ; 1mM DTT	250 mM NaCl ; 50 mM Hepes pH 8,0 ; 1mM DTT
Tampon de gel filtration	100 mM NaCl ; 10 mM Hepes pH 7,5	100 mM NaCl ; 10 mM Hepes pH 8,0

Tableau 5: Composition des solutions tampon utilisées lors de la purification des protéines.

IV. Concentration et conservation

Les protéines pures ont été concentrées par centrifugation sur membrane de cellulose jusqu'à une concentration voisine de 40 mg/mL puis congelées par immersion dans un bain d'azote liquide. L'intégrité des protéines après congélation a été vérifiée par diffusion dynamique de lumière et par le maintien de la capacité de BD2 à cristalliser.

B. Diffusion statique de lumière

Pour étudier l'état oligomérique des protéines nous avons utilisé une technique couplant la diffusion statique de lumière à angles multiples (MALLS) et la chromatographie d'exclusion à haute pression. En premier lieu, la chromatographie d'exclusion permet de séparer les molécules selon leur volume hydrodynamique. Ensuite la diffusion statique de lumière qui utilise le fait que l'intensité de la lumière diffusée par une solution est directement proportionnelle à la masse moléculaire moyenne de l'ensemble de ses composants permet de déterminer la masse moléculaire absolue des molécules de chaque pic (Wyatt, 1993). Nous avons pour cela utilisé une colonne de chromatographie d'exclusion de taille couplée à un réfractomètre. Les expériences de MALLS sur BD1 et BD2 ont été réalisées avec les constructions BD1 SI-2 et BD2 A12 dans un tampon constitué de 20 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl, 1 mM DTT. Les expériences sur δ CBrdt ont été réalisées avec la construction SP6 à 8 mg/mL dans un tampon contenant 100 mM NaCl et 10 mM Hepes pH 8,0.

C. Réticulation chimique

Le principe de la réticulation chimique est de créer un lien covalent entre deux groupements fonctionnels d'une molécule biologique par l'intermédiaire d'un agent réticulant. L'agent réticulant est caractérisé par ses groupements fonctionnels (qui vont réaliser le lien covalent) et par la longueur de la chaîne carbonée qui sépare les groupements fonctionnels. Nous avons utilisé le sulfo-EGS [Figure 14] dont les deux groupements réactifs, espacés de 16 Å, réagissent sur la fonction amine terminale et sur les amines ϵ des lysines pour former une liaison amide. Des ponts intermoléculaires sont formés entre molécules voisines en interaction.

Les expériences ont été réalisées avec les protéines BD1 (SII-1), BD2 (A12) et δ CBrdt (SP6) dans leurs tampons de gel filtration [Tableau 5]. Une solution stock d'EGS à 50 mM a été réalisée dans du DMSO et diluée dans de l'eau pour obtenir un gradient de concentration. 1 μ L de chaque dilution a été ajouté à 9 μ L de solution de protéine. La réaction est arrêtée après 20 minutes par ajout de 1 μ L de Tris 1M. Les échantillons ont été analysés par migration électrophorétique sur gel SDS-PAGE.

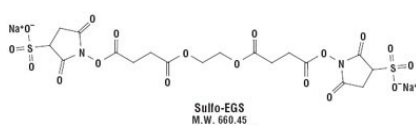


Figure 14: Formule développée du sulfo-EGS

D. Microcalorimétrie

Pour comparer les interactions entre un bromodomaine et différents peptides acétylés nous avons principalement le choix entre les techniques suivantes : résonance magnétique nucléaire, résonance plasmonique de surface, microcalorimétrie (calorimétrie à titration isotherme), dépolarisation de fluorescence. Nous avons choisi la calorimétrie à titration isotherme car elle permet de quantifier précisément des interactions dont les constantes d'affinités varient de 10^2 à 10^9 M et que nous disposons d'un appareil sur place. La technique nécessite cependant de grandes quantités de protéine et de ligand. Elle est aussi relativement longue (environ quatre heures par expérience). Si on considère le nombre d'expériences que nous avons finalement réalisées, une étape préliminaire de criblage aurait pu être utile pour éliminer les peptides n'ayant pas ou peu d'affinité.

I. La calorimétrie à titration isotherme

La calorimétrie à titration isotherme est une méthode très rigoureuse pour caractériser les interactions protéine-ligand puisque la protéine ne subit aucune modification et que les paramètres de la liaison : n (stoechiométrie), ΔH (enthalpie de liaison) et K_a (constante d'association) sont déduits directement de la chaleur de réaction enregistrée (Jelesarov and Bosshard, 1999 ; Pierce et al., 1999). Au cours de l'expérience, une seringue contenant le ligand (le peptide) est titré dans une cellule contenant la solution de macromolécule (la protéine) et cela à température constante. Lorsque le peptide est injecté dans la cellule, les deux matériaux interagissent et de la chaleur est émise ou absorbée, en proportion directe avec la quantité de liaison. Cela permet de déduire les paramètres expérimentaux de la liaison à partir d'une expérience unique. Il faut tout de même noter que dans ce cas l'hypothèse est faite que ces paramètres expérimentaux observés ne sont pas biaisés par des réactions associées telles que des échanges de protons, des changements de conformation, des réactions de dimérisation ou de dénaturation.

Dans le calorimètre, des cellules jumelles sont placées dans un environnement adiabatique. Un appareil thermoélectrique mesure la différence de température entre les cellules et un deuxième appareil mesure la différence de température entre les cellules et l'enceinte [Figure 15]. Les réactions chimiques donnent lieu à un dégagement (ou à une consommation) de chaleur. La différence de température entre cette la cellule expérimentale et la cellule de référence est maintenue constante. La quantité de courant électrique nécessaire pour maintenir cette différence constante au cours du temps est une mesure de la quantité de chaleur échangée lors de la réaction.

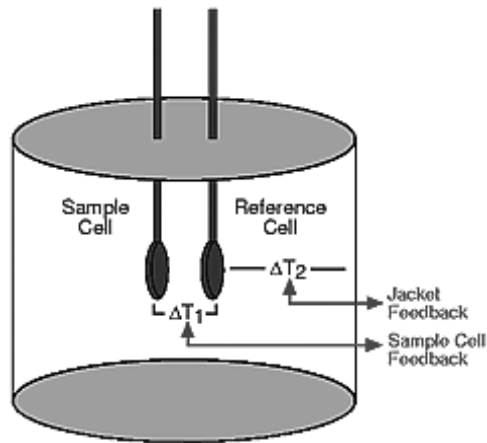


Figure 15: Représentation schématique d'un microcalorimètre.

La présentation classique des données d'une expérience (voir les figures d'ITC en annexe) donne dans un panneau supérieur les variations de ce courant électrique et dans un panneau inférieur son intégration au cours du temps, normalisée par la quantité de peptide injecté, en fonction du rapport molaire peptide/protéine.

II. Mode opératoire

Les expériences ont été réalisées à 25°C avec un micro-calorimètre VP-ITC (MicroCal). Nous avons utilisé les paramètres de liaison observés pour comparer les affinités de δ C-Brdt, BD1, BD2 et BD1-K61Q vis-à-vis de différents peptides. Les solutions de peptides ont été injectées dans la cellule expérimentale contenant 1,7 mL de solution de protéine sous agitation. Une expérience classique consiste en une série de 40 à 50 injections de 5 μ L chacune et espacées de périodes de 300 s pour laisser le système atteindre son équilibre.

Pour minimiser les échanges de chaleur dus aux échanges de protons dans la solution tampon nous avons utilisé un composé dont l'enthalpie d'ionisation est faible. En effet de très faibles variations de pH entre la solution injectée et la solution présente dans la cellule peuvent provoquer de forts dégagements de chaleur si le tampon utilisé possède une enthalpie d'ionisation élevée. C'est par exemple le cas du Tris ($\Delta H_{\text{ionisation}} = 11,4$ kcal/mol). Nous n'avons pas utilisé le phosphate qui présente pourtant une des enthalpies les plus faibles ($\Delta H_{\text{ionisation}} = 0,9$ kcal/mol) car nous pensons qu'il pouvait entrer en compétition avec le groupe acétyle du peptide pour la fixation au

bromodomaine. Nous avons utilisé l'Hepes ($\Delta H_{\text{ionisation}} = 5,7$ kcal/mol) qui reste un tampon acceptable pour l'ITC.

Pour réduire la différence de pH entre la solution de peptide injectée et celle de protéine : (i) les peptides ont été traités avec du carbonate d'hydrogène pour éliminer l'acide trifluorique utilisé lors de leurs purification ; (ii) Les peptides lyophilisés ont été dissouts dans la solution tampon utilisée pour purifier la protéine. Enfin, pour mesurer la chaleur dégagée par la réaction de dilution du peptide, nous avons réalisé une expérience de titration du peptide dans la solution tampon seule. Pour chaque expérience, le signal de cette expérience de dilution du peptide a été soustrait aux données.

Les données ont été analysées avec le programme ORIGIN (MicroCal). L'affinement des paramètres de la liaison : K_a (constante d'affinité, $K_a=1/K_d$), ΔH (enthalpie de liaison), et n (stoechiométrie) a été réalisé par cycles itératifs de minimisation d'un résiduel par la méthode des moindres carrés. La cohérence du modèle par rapport aux données est mesurée par la valeur de χ^2 . Nous avons utilisé un modèle considérant un seul site de fixation par molécule. Les expériences ont été réalisées deux fois au minimum.

Dans le cas de l'affinement des données de δC -Brdt, nous devons choisir entre utiliser un modèle à un site, à deux sites indépendants ou à deux sites coopératifs car la protéine porte deux sites de fixation. Le modèle à un site de fixation est le seul pour lequel les erreurs sur les paramètres de la liaison sont acceptables. C'est donc celui que nous avons utilisé.

Les peptides ont été synthétisés par le laboratoire Peptide Speciality Laboratories (Heidelberg). Les solutions de peptides utilisées ont été obtenues en dissolvant les peptides lyophilisés dans la solution tampon utilisée pour la purification de la protéine. La concentration (de 1,9 mM et 5,6 mM) a été déterminée par analyse d'acide-aminé (réalisées par J.P. Andrieux à l'IBS). Les échantillons de protéines ont été obtenus en diluant la solution stock de protéine dans son tampon de purification. La concentration (entre 0.05 et 0.16 mM) a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction déterminé expérimentalement par analyse d'acide-aminé (réalisées par J.P. Andrieux à l'IBS).

E. Cristallographie aux rayons X

I. Production des cristaux

a. La cristallogénèse

La cristallisation est une transition de phase au cours de laquelle la molécule passe d'un état de soluté à un état de phase solide, le cristal. Le comportement d'une molécule en fonction des variations de son environnement (pH, force ionique, température, pression...) peut être décrit sous forme d'un diagramme de phases dans lequel la courbe de solubilité définit la limite entre la phase soluble et la phase solide (le cristal ou le précipité). Au niveau de cette courbe, les deux états sont en équilibre thermodynamique, au-delà de cette courbe la solution est dite sur-saturée. La sursaturation constitue la force motrice qui conduit à l'initiation de la cristallisation, la nucléation. La croissance du cristal s'opère ensuite à partir de chaque noyau tant que l'état de sursaturation est maintenu.

Aucun moyen théorique ne permet de prévoir les conditions qui mèneront la protéine à cristalliser. Le criblage d'un grand nombre de conditions différentes est souvent utilisé. Ce criblage robotisé permet l'obtention de cristaux de petite taille (de l'ordre de 0,01 mm), de micro-cristaux ou de simples transitions de phases. Les cristaux éventuellement obtenus lors de cette étape, même très petits, peuvent être utilisés directement sur des lignes au rayonnement adapté (microfocus) mais sont plus sensibles aux dommages dus aux radiations. Ainsi, il est souvent nécessaire de reproduire ou d'améliorer la taille des cristaux obtenus lors du criblage.

b. Criblage des conditions de cristallisation

Le laboratoire de cristallisation à haut débit de l'EMBL réalise en routine le criblage de 576 conditions différentes pour chaque échantillon. Un robot de cristallisation (Cartesian PixSys 4200) mélange 100 nL de protéine et de 100 nL de solution de cristallisation. Les gouttes assises sont ensuite mises à équilibrer par diffusion de vapeur à 20°C ou 4°C. Nous avons testé pour chaque échantillon les conditions de cristallisation proposées commercialement par Hampton Research dans les Crystal screen I & II, Crystal screen Lite, PEG-Ion, MembFac, Natrix, Ammonium Sulfate, QuickScreen, Malonate, PEG 6K, PEG LiCl, MPD, Mm, Index, et celles du

Screen Formate, élaborées par le laboratoire de cristallisation de l'EMBL (conditions de cristallisation disponibles à l'adresse <https://htxlab.embl.fr/help/screensmain.php>). Les boîtes ont ensuite été stockées à 20°C dans un robot qui prend une photo des gouttes après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines puis chaque mois.

c. Affinement des conditions de cristallisation

L'affinement a été réalisé par la technique de cristallisation dite de la goutte suspendue dans laquelle le mélange de 1 à 2 μ l de protéine est mélangé à 1 à 2 μ l de la solution de cristallisation et mis à équilibrer au dessus d'un réservoir contenant 0,8 à 1 mL de la solution de cristallisation. Au cours de l'équilibration par diffusion de vapeur les composés volatiles de la goutte et du réservoir se répartissent de façon que les tensions de vapeur à la surface des deux compartiments soient identiques. Ce processus concentre l'agent cristallisant et la protéine dans la goutte et la conduit éventuellement à cristalliser.

Pour améliorer les cristaux de nombreuses techniques peuvent être utilisées. Pour réduire la fréquence de nucléation, nous avons fait varier le rapport entre la protéine et la solution de cristallisation dans la goutte (variation de la cinétique au sein du diagramme de phase). Nous avons également eu recours à l'ensemencement et au micro-ensemencement d'une goutte à l'état sur-saturé par des débris de cristaux.

d. Protection du cristal

Pour éviter les dommages de la radiation dus à la formation de radicaux libres lors de l'exposition aux rayons X, les cristaux sont congelés dans l'azote liquide. Pour éviter que l'eau contenue dans le cristal ne forme de glace, les cristaux sont passés dans un bain de solution de cryoprotection. Nous avons utilisé de 15 à 30 % de PEG400 ou de glycérol dans la solution de cristallisation.

II. Quelques notions de cristallographie

a. Le cristal

Le cristal est un agencement périodique de molécules. La plus petite unité à partir de laquelle on peut reconstituer le cristal par des opérations de translation est la maille cristalline, elle peut appartenir à un système triclinique, monoclinique, orthorhombique, tétragonal, hexagonal ou cubique selon sa géométrie. L'unité asymétrique est le plus petit élément à partir duquel on peut reconstituer le cristal par un certain nombre d'opérations de symétrie (rotation et translation) définies par le groupe d'espace du cristal. Il existe 65 groupes d'espaces différents pour un cristal de protéine. L'unité asymétrique peut contenir une ou plusieurs molécules (ou complexes), qui seront alors liées par une relation de symétrie non cristallographique. Le cristal peut être représenté comme le produit de convolution d'un motif (la macromolécule) par un réseau (caractérisé par la maille et le groupe d'espace du cristal), appelé réseau réel d'axes (a, b, c). Le motif est répété à chaque noeud du réseau suivant les symétries du groupe d'espace.

La cohésion du cristal est assurée par des liaisons de Van der Waals, des ponts salins et des liaisons hydrogène. L'empilement des éléments constitutifs du cristal n'est jamais parfait, on parle de la mosaïcité d'un cristal pour traduire ces défauts. Les espaces ménagés entre les macromolécules sont comblés par des molécules de solvant (eau, ions, tampon...), qui représentent en général 40 à 70 % du volume cristallin, ce qui confère aux cristaux de protéine leur grande fragilité.

b. La diffraction

Les rayons X sont des ondes planes monochromatiques de courte longueur d'onde ($\lambda=100-0,1\text{\AA}$). La diffraction est le résultat de l'interférence entre les rayons X diffusés par l'arrangement périodique des macromolécules qui constituent le cristal. La répétition des motifs dans le cristal permet l'amplification du signal. Les rayons X interagissent avec les atomes du cristal et sont diffusés mais seules les ondes qui diffusent en phase ont entre elles des interférences positives et donneront un signal, c'est la condition de diffraction.

Seuls les éléments qui appartiennent à la famille de plans parallèles, espacés de $d=\lambda/2\sin\theta$ (θ : angle d'incidence du faisceau de rayon X) ont des interférences positives. Cette condition de diffraction pour un cristal est connue sous le nom de Loi de Bragg [Figure 16] et s'écrit alors $N.\lambda=2.d.\sin\theta$

(N : nombre entier, d : distance entre les plans qui diffractent, θ : angle d'incidence du faisceau de rayon X). La famille de plans qui diffracte est appelée famille de plans réticulaires, elle est caractérisée par ses indices de Miller (h, k, l) signifiant le nombre de fois que les plans divisent la maille selon ses 3 directions (a, b, c).

La Loi de Bragg montre que pour un angle d'incidence θ donné, seul un nombre limité de familles de plans diffracte. Pour amener toutes les familles de plans à diffracter, il faut donc faire varier l'angle d'incidence. En pratique le cristal est monté sur une tête goniométrique qui permet sa rotation dans le faisceau. En général, une image est enregistrée tout les $0,5^\circ$ à 1° jusqu'à ce qu'un jeu de données complet soit enregistré, au bout de 180° pour les cristaux de la plus basse symétrie (P1). La loi de Bragg montre également que la résolution (d) est théoriquement limitée par la seule longueur d'onde. C'est pourquoi le rayonnement doit avoir une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les distances interatomiques, c'est à dire de l'ordre de $1,5 \text{ \AA}$ pour pouvoir résoudre des atomes.

La densité électronique appartenant aux plans d'indices h, k, l du réseau réel produit une onde diffractée d'amplitude ($|F|$) et de phase (φ). Cette onde est entièrement définie par son facteur de structure d'expression simplifiée $\mathbf{F}=|F|.e^{i\varphi}$ (\mathbf{F} : vecteur F). On peut passer de la densité au facteur de structure et vice-versa par une opération mathématique, la transformation de Fourier.

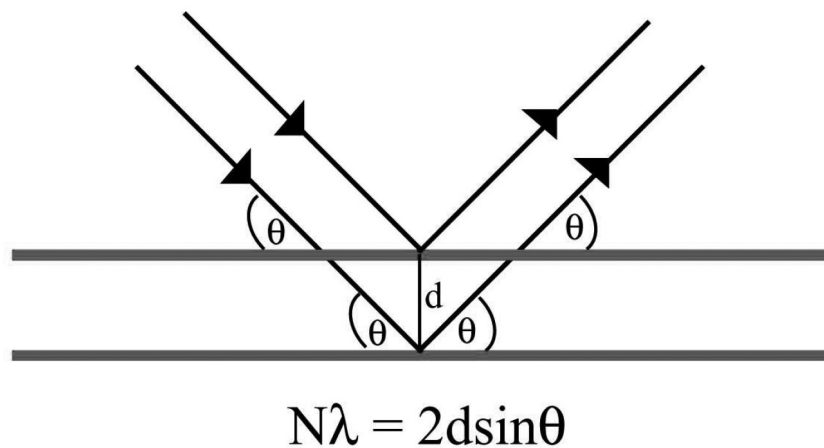


Figure 16: Représentation schématique de la diffraction selon la loi de Bragg. N : nombre entier, d : distance entre les plans qui diffractent, θ : angle d'incidence du faisceau de rayon X

c. L'image

Les clichés de diffraction sont enregistrés sur un écran CCD (Charge Coupled Device) en quelques secondes. L'intensité de la réflexion est directement proportionnelle au carré de l'amplitude de l'onde ($I \sim |F|^2$). Les réflexions (ou taches) de coordonnées (h, k, l) forment un réseau appelé réseau réciproque [Figure 17] qui peut être considéré comme la représentation de la transformée de Fourier du volume du cristal qui diffracte. La loi de Bragg et l'expression de la position de la réflexion sur l'image en fonction de l'angle θ permettent d'établir une relation simple entre la position d'un point dans le réseau réciproque et la distance entre les plans qui diffractent : $d = \lambda / 2 \sin(\text{Arctan}(x/D)/2)$ avec D : distance cristal-détecteur et X : distance de la tache au centre de l'image. On voit que les dimensions du réseau réciproque sont inversement proportionnelles à celles du réseau réel, ce qui explique notamment que l'information de haute résolution se trouve à la périphérie de l'image.

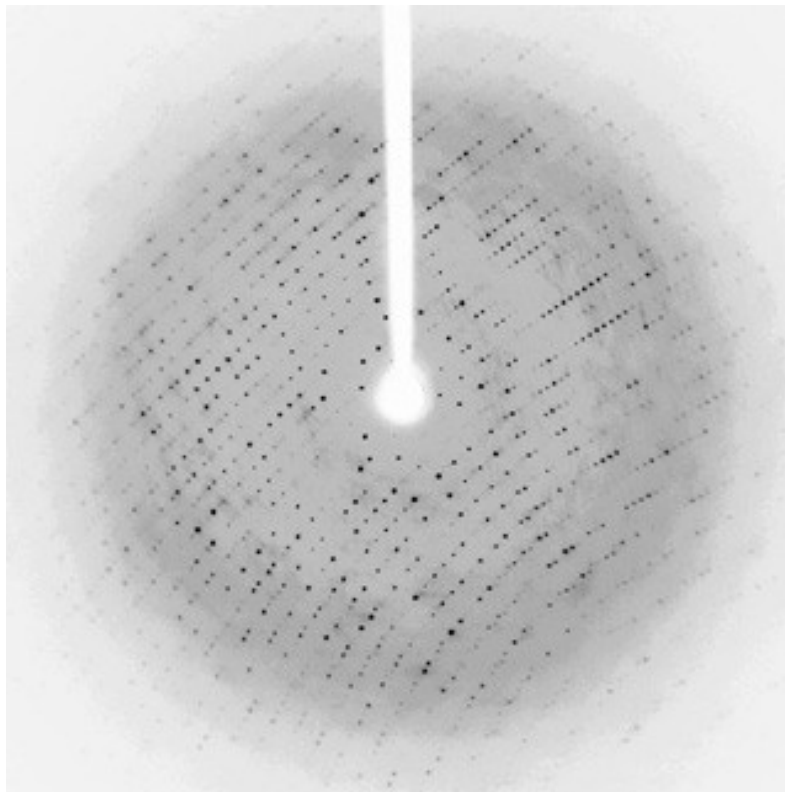


Figure 17: Un cliché de diffraction.

d. Le problème des phases

Le problème majeur de la cristallographie des macromolécules tient dans la perte d'information des phases des ondes diffractées. Seules les intensités des faisceaux diffractés sont enregistrées et l'information de déphasage des ondes les unes par rapport aux autres est perdue. Les détecteurs n'ont pas la capacité technique d'enregistrer cette information temporelle pourtant essentielle pour définir le facteur de structure qui permet de calculer la densité atomique. Le problème des phases peut être résolu de manière expérimentale par l'utilisation de la diffusion anormale et la résolution d'une sous-structure ou par la technique du remplacement moléculaire. Les méthodes faisant appel à la diffusion anormale supposent que la protéine contient des atomes de fort poids moléculaire (S, Se, métaux lourds) qui auront été introduits par trempage des cristaux ou au moment de l'expression de la protéine. Ces méthodes (MIR, MAD, SAD, SIRAS...) sont plus compliquées à mettre en oeuvre puisque la position des atomes lourds doit être connue avant de pouvoir déterminer celle du reste des atomes de la protéine. La technique du remplacement moléculaire ne nécessite qu'un seul jeu de données et s'appuie sur le modèle d'une structure proche pour résoudre le problème des phases.

III. Collecte et traitement des données de diffraction

a. Collecte des données

Nous avons utilisé le rayonnement synchrotron de l'ESRF avec des longueurs d'onde voisines de 1 Å. La ligne microfocuse ID23-eh2 a notamment permis d'irradier des volumes différents d'un même cristal afin de reconstituer un jeu de données complet et de qualité satisfaisante. Le chargement automatique des cristaux (sample-changer) a permis de tester la diffraction de plusieurs cristaux avant d'effectuer la collecte.

b. Intégration et mise à l'échelle

On appelle intégration la démarche allant du jeu d'images de diffraction jusqu'au fichier contenant les réflexions indexées par les entiers h , k , l et mesurées par les amplitudes et leurs écarts-types associés. Ce traitement est effectué de manière automatisé et comporte plusieurs étapes détaillées ci-dessous. Nous avons utilisé les programmes MOSFLM (Leslie, 2006) et SCALA de la suite

CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994) ou la suite XDS/XSCALE (Kabsch, 1993) suivant les cas.

i. Détermination de la maille et du groupe d'espace

Cette première étape de l'intégration est effectuée avec un algorithme d'auto-indexation. Des pics correspondant aux taches de diffraction sont mesurés sur une ou plusieurs images. Une liste de vecteurs entre pics est ensuite écrite. Les pics correspondent à des noeuds du réseau réciproque. L'auto-indexation va donc déterminer trois vecteurs non-coplanaires et le plus petit module permettant de rendre compte de la liste de pics. Le réseau réel est ensuite estimé, celui-ci impose un choix de groupes d'espace limité. Cependant des ambiguïtés peuvent demeurer quant aux axes hélicoïdaux et à leur sens. Ces ambiguïtés ne peuvent être vraiment résolues que pendant l'étape de résolution de la structure.

ii. Indexation, intégration et correction des intensités

Ces étapes sont réalisées avec les programmes MOSFLM ou XDS. Les données sont indexées image par image en affinant un certain nombre de paramètres comme la distance cristal-détecteur, la position du centre du détecteur, l'orientation du cristal, les paramètres de maille etc. Les profils de diffraction prédits sont ajustés aux taches observées. Chaque tache est alors indexée en h , k et l . Dans le même temps, l'intensité de la tache de diffraction est mesurée en appliquant un masque autour de la tache. La couronne interne délimite la surface à intégrer et la couronne externe permet d'estimer le bruit de fond à retrancher de l'intensité intégrée. Chaque tache est donc corrigée du bruit de fond et l'ajustement des masques pour les taches doit être optimal afin de maximiser le rapport signal/bruit. Différentes corrections sont également appliquées comme la correction cinématique de Lorentz tenant compte du passage différentiel des noeuds du réseau réciproque en position de diffraction: un noeud proche de l'axe de rotation sera en position de diffraction plus longtemps qu'un noeud éloigné.

iii. Mise à l'échelle et réduction du jeu de données

L'ensemble des images intégrées sont mises à l'échelle afin de constituer un jeu de données complet. Chaque image diffère par la dose de rayons X reçue et par la baisse du pouvoir de diffraction du cristal. Le jeu de données mis à l'échelle est ensuite moyenné sur les réflexions équivalentes par symétrie ou collectées plusieurs fois. Cette étape est réalisée par le programme

SCALA ou XSCALE. Les données moyennées sur les réflexions équivalentes par symétrie peuvent ensuite être réduites à l'unité asymétrique.

Dans SCALA, la qualité du jeu de données peut être estimée par les valeurs des R_{sym} entre les réflexions équivalentes sur l'ensemble du jeu de données et par le rapport signal/bruit I/σ_I .

$$R_{sym} = \frac{\sum_k \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_k \langle I(h) \rangle}$$

où $I_i(h)$ est la i -ème mesure et $\langle I(h) \rangle$ la moyenne pondérée de toutes les mesures $I_i(h)$ des réflexions équivalentes.

XSCALE utilise un autre critère, le χ^2 ,

$$\chi^2 = \sum_k \sum_i \frac{[I_i(h) - \langle I(h) \rangle]^2}{E^2 \frac{N}{N-1}}$$

où $I_i(h)$ est la i -ème mesure, $\langle I(h) \rangle$ la moyenne pondérée de toutes les mesures $I_i(h)$ des réflexions équivalentes, E est l'erreur du modèle et N est un facteur corrigeant la corrélation entre I et $\langle I \rangle$.

Enfin, les amplitudes sont calculées à partir des intensités avec le programme TRUNCATE. Il faut tenir compte à cette étape des intensités des réflexions faibles qui peuvent avoir été estimées négatives lors de la correction du bruit de fond.

c. Remplacement moléculaire

Il faut pour pouvoir utiliser cette technique disposer d'une structure proche déjà résolue. On fixe en général la limite au-dessous de laquelle le remplacement moléculaire n'est plus possible à 25-30 % d'identité de séquences. La technique, initiée par Rossmann et Blow en 1962 est de plus en plus communément utilisée avec l'accroissement des structures disponibles dans les banques de données.

Son principe repose sur l'utilisation des phases de la structure connue et placée dans la même orientation que la structure à déterminer, en combinaison avec les amplitudes obtenues expérimentalement pour calculer une première carte de densité. Nous avons utilisé pour cela les programmes AMORE (Navaza, 1994) et MolRep de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). Les deux programmes procèdent de façon similaire. Pour superposer au mieux le modèle et la structure à déterminer, le modèle subit d'abord une rotation puis une translation. La

fonction de rotation évaluée, en fonction de l'orientation du modèle par rapport à celle de la structure à déterminer, l'accord entre les vecteurs interatomiques. Ces vecteurs sont obtenus par la fonction de Patterson de type « Self-Patterson ». Si plusieurs molécules existent dans l'unité asymétrique et qu'elles n'ont pas la même orientation (symétries non cristallographiques), alors la fonction de rotation aura plusieurs solutions. Le modèle est ensuite positionné dans la maille par une opération de translation. Une fonction de translation compare les vecteurs intermoléculaires de la structure connue et inconnue pour différentes positions du modèle. Ces vecteurs sont obtenus par la fonction de Patterson de type « Cross-Patterson ».

La qualité des solutions est estimée par la valeur des coefficients C (corrélation) et R (différence) calculée à partir des amplitudes des facteurs de structure du modèle et de la structure à déterminer. L'examen de l'empilement cristallin du modèle permet également de vérifier que la solution est acceptable.

$$C = \frac{\sum_{hk\ell} \left[|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right] \times \left[|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right]}{\sqrt{\sum_{hk\ell} \left[|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right]^2 \sum_{hk\ell} \left[|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right]^2}} \quad R = \frac{\sum_{hk\ell} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hk\ell} |F_{obs}|}$$

IV. Affinement du modèle

Une fois que la première carte de densité est obtenue à partir du modèle issu du remplacement moléculaire commence le processus d'affinement cristallographique. Il vise à optimiser le modèle moléculaire, c'est-à-dire à modifier par une procédure mathématique et des interventions manuelles, ses paramètres (coordonnées des atomes, facteurs B, ajout de molécules d'eau,...) de façon à rendre compte le mieux possible des mesures expérimentales. Du fait du grand nombre de paramètres variables, l'affinement est limité par le rapport du nombre d'observations sur le nombre de paramètres et ne converge de manière satisfaisante que si le nombre d'observations est supérieur au nombre de paramètres. Les paramètres sont en général au nombre de 4 par atome (x, y, z, B). En règle générale, ces 4 paramètres peuvent être affinés si les cristaux diffractent au moins jusqu'à 2,5 Å. Il faut donc, dans la plupart des cas, soit augmenter le nombre d'observations (affinement restreint), soit diminuer le nombre de paramètres, en en fixant certains par exemple (affinement contraint). Les méthodes utilisées ensuite pour réaliser la convergence peuvent être divisées en deux groupes: celles qui utilisent la dynamique moléculaire et les autres, regroupées sous le terme de techniques par minimisation.

a. Affinement par minimisation

Les techniques de minimisation utilisaient initialement la minimisation d'une fonction cible traduisant la différence entre le modèle et les données (d'où leurs noms). Mais la technique statistique du maximum de vraisemblance, plus performante, remplace la minimisation du résiduel dans la plupart des programmes récents.

La technique d'affinement restreint ajoute des restrictions en apportant une information externe de stéréochimie. Les angles et les longueurs de liaison sont connus pour les petites molécules de même que plusieurs autres critères portant sur les angles dièdres propres et impropres. Dans le modèle, ces valeurs ne doivent pas trop s'écarter des valeurs standards et ces écarts constituent des observations supplémentaires.

La technique d'affinement contraint consiste à réduire le nombre des paramètres affinés en imposant des contraintes géométriques. C'est par exemple le cas de l'affinement en « corps rigide » qui affine la position de l'ensemble de la chaîne (ou de la région) définie comme corps rigide sans flexibilité interne.

La technique de minimisation d'énergie minimise une pseudo-énergie potentielle qui est l'énergie potentielle de la molécule complétée par un terme de rayons X. Les termes d'énergie peuvent être considérés comme des restrictions qui s'ajoutent aux paramètres à affiner.

b. Affinement par dynamique moléculaire

Les méthodes utilisant la dynamique moléculaire, le recuit simulé (simulated annealing) ou les méthodes aléatoires de Monte Carlo peuvent explorer un espace de solutions plus vaste, elles ont un rayon de convergence plus grand. Au lieu de minimiser l'énergie potentielle comme c'est le cas pour l'affinement par minimisation d'énergie, on calcule en chaque atome la force dérivée de ce potentiel et on applique à chaque atome un déplacement qui résulte de cette force et d'une vitesse initiale (attribuée aléatoirement aux atomes). Cette énergie cinétique permet au système de franchir des barrières énergétiques de l'ordre son énergie cinétique. Cela évite que l'affinement reste bloqué dans un minimum secondaire. La technique du recuit simulé part d'une température initiale élevée (2500 à 3500 K) et refroidit lentement le système. Elle est capable de déplacer automatiquement des chaînes latérales de plus de 2 Å ou de retourner des liaisons peptidiques. Cela permet de réduire considérablement les interventions manuelles et le nombre d'étapes d'affinement.

c. Stratégie employée

Le modèle obtenu par le remplacement moléculaire a tout d'abord été affiné en considérant chaque molécule de l'unité asymétrique comme un corps rigide avec le programme MolRep. Ensuite nous avons alterné les étapes de dynamique moléculaire, d'affinement par minimisation d'énergie et d'affinement des facteurs B avec le programme CNS (Brünger et al., 1998). Des contraintes de symétrie non cristallographique ont été utilisées entre les deux molécules de protéines et les deux molécules de peptide de l'unité asymétrique. Pour l'affinement du résidu acétyl-lysine, les bibliothèques de CNS décrivant les paramètres concernant les angles et les liaisons ont été complétées (Annexe 1). Le remplacement des chaînes latérales du modèle par celles de la structure réelle, l'ajout des molécules d'eau, la construction du peptide ont été réalisés manuellement, guidés par les cartes de densité, avec le programme COOT (Emsley et Cowtan, 2004).

V. Validation du modèle moléculaire

Le processus d'affinement est suivi par les facteurs R et R_{free} dont la diminution concomitante indique une amélioration globale du modèle sans modélisation de bruit de fond. La méthode de validation croisée écarte de l'affinement 5-10 % des données qui serviront à calculer le facteur R_{free} ce qui permet une estimation objective du protocole d'affinement (Brünger, 1993). La géométrie des liaisons covalentes, les planarités, les angles dièdres avec notamment le diagramme de Ramachandran, les interactions non covalentes, les liaisons hydrogène, les ponts disulfures, la stéréochimie, ont été analysés et comparés à celles de structures bien définies de même résolution par le programme PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

Partie III:

Résultats

Résultats : Chapitre 1

Caractérisation biochimique des protéines δ C-Brdt, BD1 et BD2

A. Analyse de la protéine δ C-Brdt

I. Structure primaire

La protéine δ C-Brdt comprend les résidus 2 à 442 de la protéine Brdt de souris. Son poids moléculaire théorique est de 50 kDa et son pH isoélectrique théorique est égal à 6,8. Elle est constituée par deux bromodomaines nommés BD1 (résidus 29 à 124) et BD2 (résidus 264 à 368) entre lesquels se place une région longue de 130 résidus. Cette région charnière apparaît peu structurée par l'analyse de sa structure primaire. Elle est caractérisée par l'absence quasi totale de prédictions de structures secondaires et des probabilités de désordre importantes. Une région moins désordonnée existe probablement dans la partie centrale de la protéine. Quatre résidus (181-184) sont en effet prédits organisés en hélice α et ont des probabilités de désordre plus basses que le reste de la région. Ces probabilités restent cependant plus hautes que dans les régions occupées par les bromodomaines. Les régions N et C terminales (avant BD1 et après BD2) sont très probablement désordonnées.

II. Comportement en solution

La protéine s'est avérée soluble et facilement purifiable selon le protocole indiqué précédemment avec un rendement global après concentration de l'ordre de 10 mg/L de culture. La protéine est pourtant partiellement instable puisqu'elle subit une précipitation lors de son passage de 4°C à température ambiante. La précipitation est réversible en une heure environ. L'analyse de la solution par diffusion statique de lumière a montré que la solution de protéine après sa renaturation présente les mêmes propriétés (rayon hydrodynamique, monodispersité, absence d'agrégat) que la solution avant précipitation.

III. Recherche d'états oligomériques

Pour les expériences de microcalorimétrie, il était important de connaître l'état oligomérique de la protéine en solution, en présence ou en absence de son ligand principal, le peptide H4 tétra-acétylé.

La masse moléculaire et la polydispersité des espèces présentes dans une solution de δ C-Brdt à 8 mg/mL en présence et en absence du peptide H4-4ac (dans un rapport 1:8) ont été déterminées par diffusion statique de lumière. Quel que soit la présence ou l'absence du peptide, les résultats indiquent que la protéine est un monomère de masse moléculaire 50 kDa et que la solution est monodisperse [Figure 18].

D'autre part, la réaction de réticulation chimique à l'EGS réalisée sur un mélange de la protéine et du peptide H4 tétra-acétylé dans un rapport 1:10 ne provoque pas l'apparition de structures de taille supérieure à celles existant dans la solution native [Figure 19]. L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des échantillons ayant subi la réaction de couplage indique la présence de protéines aux masses 50 796, 51 148, 54 355, 57 269 Da. Ces résultats sont incompatibles avec l'existence de formes multimériques de la protéine dans la solution et confirment ceux obtenus par diffusion statique de lumière.

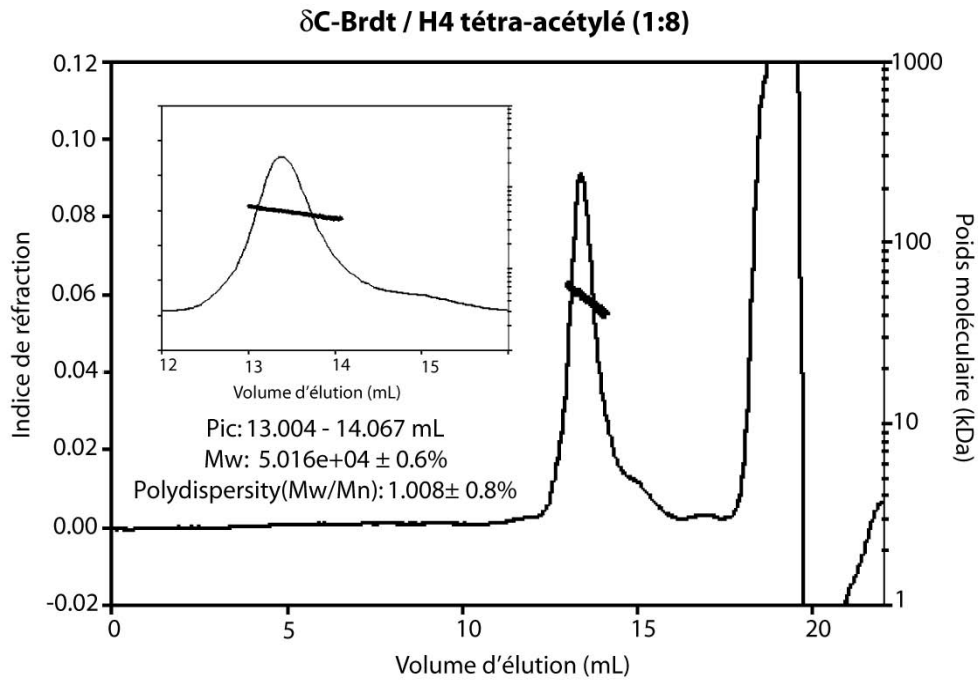


Figure 18: Expérience de diffusion statique de lumière couplée à une chromatographie d'exclusion sur un mélange de la protéine δ C-Brdt en mélange avec le peptide H4 tétra-acétylé.

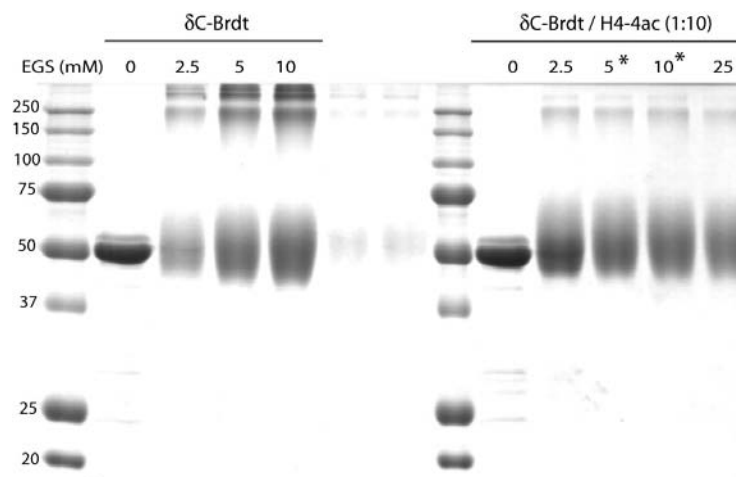


Figure 19: Expérience de couplage chimique d'un mélange de δ C-Brdt et du peptide H4 tétra-acétylé dans un rapport 1:10. Les astérisques indiquent les échantillons analysés par spectrométrie de masse.

B. Analyse de la protéine BD1

Les différentes constructions de BD1 utilisées présentent un poids moléculaire compris entre 14,1 et 15,8 kDa et un pH isoélectrique compris entre 9,0 et 9,2.

I. Comportement en solution

Le comportement en solution des protéines de la première série de clonages montre que les résidus 22 à 28 de l'extrémité N terminale interviennent dans la stabilisation du domaine [Tableau 6]. La protéine SI-3 débutant au résidu 28 est insoluble bien que la première hélice du domaine ne débute qu'au résidu 29 dans la structure que nous avons résolue. Nous verrons que ces résidus chapeautent la région charnière entre les boucles B et C et stabilisent par des interactions avec les hélices B et C la structure du bromodomaine.

La deuxième série de clonage montre que les résidus 142 à 150 de l'extrémité C terminale stabilisent eux aussi la structure du bromodomaine puisque la protéine SII-4 à haute concentration précipite lorsqu'elle est amenée à température ambiante alors que la protéine SII-5 reste stable dans les mêmes conditions [Tableau 6]. Les protéines sont produites avec un bon rendement (7,5 à 16,6 mg/L de culture) sauf SII-3 pour laquelle la faible production obtenue tient peut être à un problème lors de la mise en culture des bactéries ou lors de la purification. Ces protéines ont été utilisées pour réaliser les essais de cristallogénèse et les expériences de microcalorimétrie.

La troisième série de clonage [Tableau 6] a été utilisée exclusivement pour la cristallographie.

Clone	Résidus	Comportement en solution	Production par litre de culture après purification et concentration
SI-1	22-136	Soluble	1,5 mg
SI-2	25-136	Soluble à 4°C / précipite à 20°C	n.d.
SI-3	28-136	Insoluble	-
SII-1	17-142	Soluble	7,5 mg
SII-2	17-150	Soluble	7,6 mg
SII-3	17-154	Soluble	1,1 mg
SII-4	23-142	Soluble à 4°C / précipite à 20°C et forte concentration	15,3 mg
SII-5	23-150	Soluble	16,6 mg
SIII-1	12-136	Soluble	n.d.
SIII-3	17-136	Soluble	n.d.

Tableau 6: Comportement en solution des différentes constructions de la protéine BD1

II. Recherche d'états oligomériques

Une expérience de diffusion statique de lumière couplée à la chromatographie d'exclusion a été réalisée sur BD1 SI-2 de poids moléculaire théorique 13,7 kDa. L'instabilité de la protéine à température ambiante provoque sa répartition sur un grand volume d'élution et une erreur importante sur la mesure de son poids moléculaire [Figure 20]. Cependant le poids moléculaire déterminé ($13,3 \pm 0,4$ kDa) indique que la protéine doit être monomérique dans les conditions de l'expérience. Nous n'avons pas observé de variation dans le poids moléculaire de BD1 ni en présence de BD2 ni en présence de BD2 et du peptide H4 tétra-acétylé.

D'autre part des expériences de réticulation chimique sur une solution de BD1 montrent qu'aucune structure oligomérique ne se forme en présence ou en absence du peptide H4 tétra-acétylé [Figure 21]. Nous pouvons observer dans le cas des expériences sur le mélange BD1/H4-4ac le dédoublement de la bande correspondant à BD1. Cette seconde espèce de poids moléculaire légèrement supérieure correspond sans doute au complexe qui se forme entre le bromodomaine et le peptide.

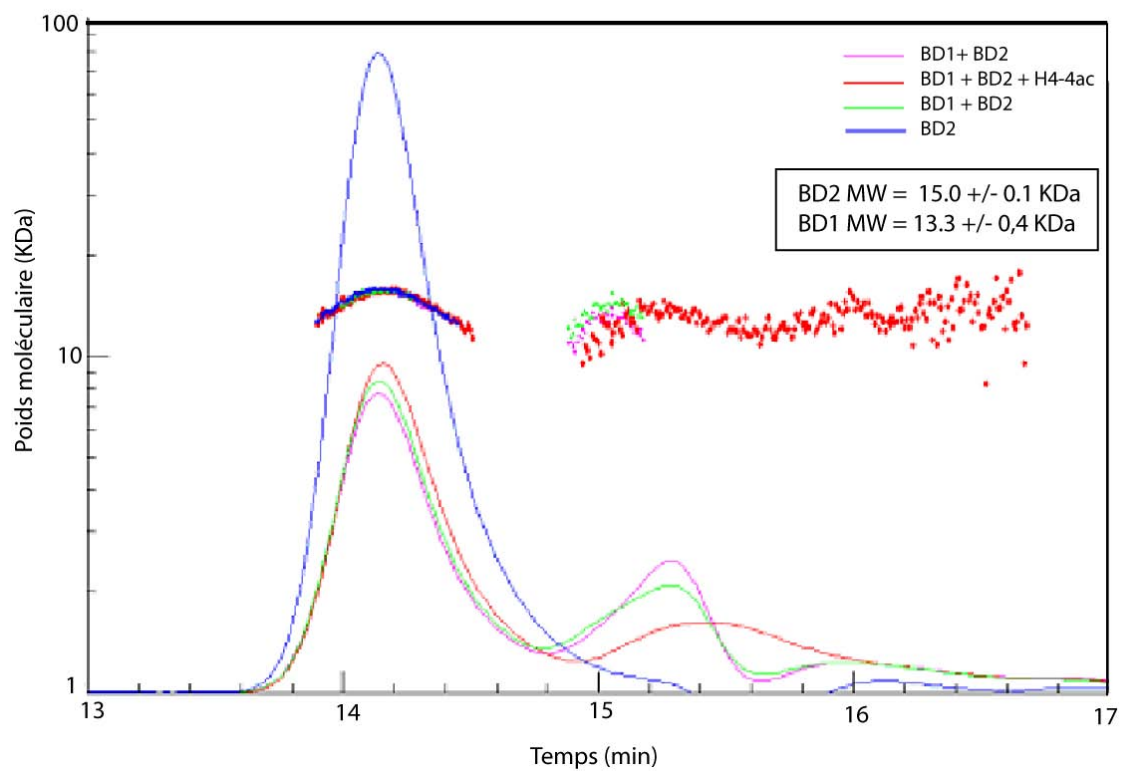


Figure 20: Diffusion statique de lumière sur des solutions de BD1 et BD2

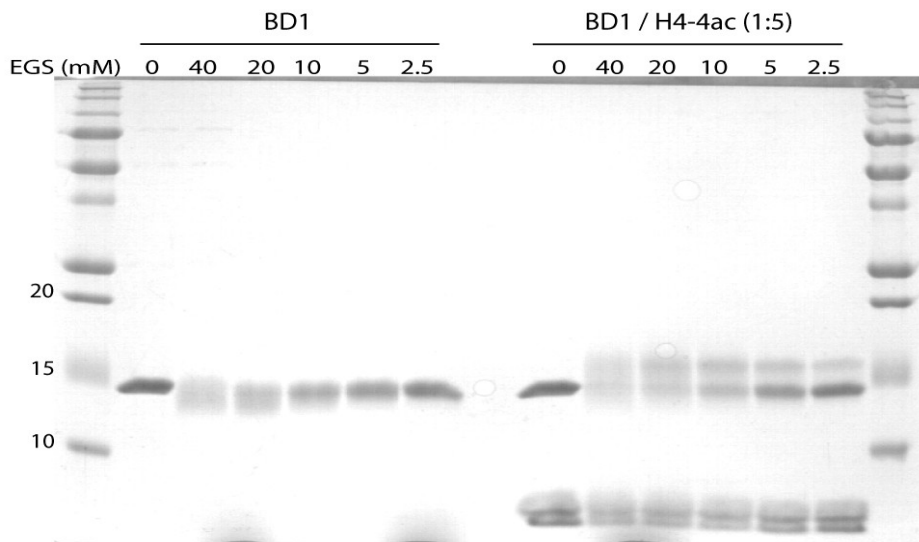


Figure 21: Expérience de réticulation chimique sur une solution de BD1 et de BD1+ H4 tétra-acétylé

C. Analyse de la protéine BD2

La protéine BD2 (clone A12) présente un pH isoélectrique égal à 6,05. Son poids moléculaire théorique est de 14,9 kDa. Elle est très soluble et stable en solution. La production après purification et concentration est de 22 mg/L de culture environ. Une expérience de réticulation chimique [Figure 22] montre que le domaine est monomérique en solution et qu'il ne se produit pas de dimérisation en présence du peptide H4 tétra-acétylé. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par diffusion statique de lumière, où le poids moléculaire déterminé pour BD2 est de 15 +/- 0,1 kDa.

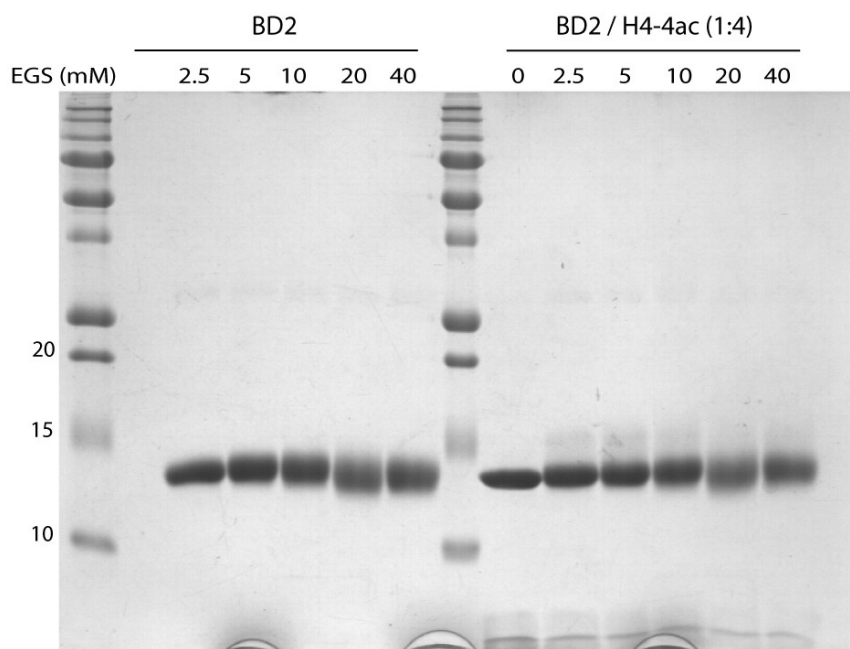


Figure 22: Expérience de réticulation chimique sur une solution de BD2 et de BD2+ H4 tétra-acétylé

D. Analyse du mélange des protéines BD1 et BD2

Par ailleurs aucune structure dimérique n'a été observée lorsque les domaines BD1 et BD2 sont mélangés, en présence ou en absence du peptide H4 tétra-acétylé, ni par réticulation chimique [Figure 23] ni par diffusion statique de lumière [Figure 20].

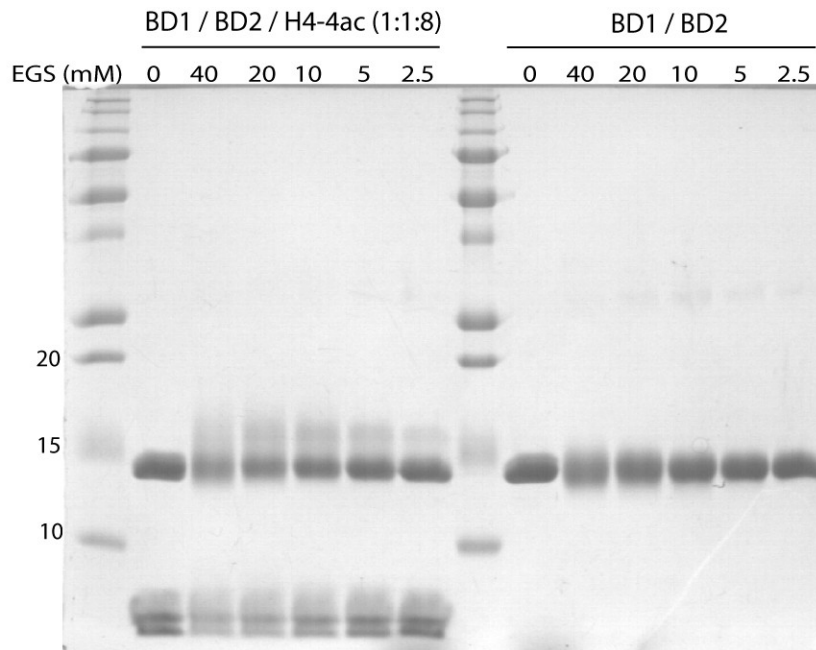


Figure 23: Expérience de réticulation chimique sur une solution de BD1+BD2 et de BD1+ BD2+ H4 tétra-acétylé

E. Analyse de la protéine BD1-K61Q

Le comportement de la protéine BD1-K61Q (clone Q61-2) en solution est similaire à celui de BD1. La protéine est très soluble à 4°C ou à basse concentration (~ 5 mg/mL), mais précipite si une solution à haute concentration (~ 40 mg/mL) est portée à température ambiante. Nous avons obtenu par litre de culture environ 13 mg de protéine pure et après concentration.

Résultats : Chapitre 2

Quantification des affinités de Brdt vis à vis des différents états d'acétylation des queues N terminales des histones H3 et H4

A. Expériences préliminaires

Nous avons tout d'abord examiné l'affinité des bromodomains 1 et 2 de Brdt pour des peptides courts (10 résidus) mimant la queue N terminale de l'histone H4 mono-acétylée de souris sur les lysines 5, 8, 12 ou 16 [Tableau 7].

Nom	Séquence
sH4-K5ac	SGRG-K(ac)-GGKG
sH4-K8ac	GKGG-K(ac)-GLGK
sH4-K12ac	KGLG-K(ac)-GGA
sH4-K16ac	KGGA-K(ac)-RHRK

Tableau 7: Peptides H4 courts

I. Affinités de BD1 pour des peptides H4 courts

La titration des peptides sH4-K5ac et sH4-K8ac dans une solution de BD1 produit un dégagement de chaleur caractéristique d'une réaction de fixation [Annexe 2A]. Cependant il n'a pas été possible de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction. En fixant le nombre de sites égal à un ($n=1$) pour réduire le nombre des paramètres à affiner, il est tout de même possible d'obtenir une convergence des autres paramètres (K_a et ΔH). L'affinité déterminée de BD1 pour ces peptides est alors de l'ordre du milli-molaire. La réaction de titration des peptides sH4-K12ac et sH4-K16ac

produit un signal en partie endothermique et dont le profil ne correspond pas à une réaction d'interaction entre un bromodomaine et un peptide acétylé [Annexe 4A]. Ces expériences indiquent qu'il existe entre BD1 et les peptides H4 courts mono-acétylés sur les lysines 5 et 8 une affinité faible non quantifiable par ITC.

II. Affinités de BD2 pour des peptides H4 courts

L'affinité de BD2 vis à vis des peptides sH4-K5ac, sH4-K8ac et sH4-K12ac a également été mesurée [Annexe 4B]. Nous n'avons pas détecté d'affinité significative pour ces peptides. En particulier, BD2 n'a pas montré d'affinité pour le peptide sH4acK12 avec lequel il avait pourtant co-cristallisé. Nous verrons dans le chapitre 4 comment la structure cristallographique du complexe BD2/H4-K12ac peut expliquer cela.

B. Affinités pour la queue N terminale de l'histone H4

Nous avons ensuite examiné l'interaction de BD1 et BD2 avec l'histone H4 tétra-acétylée ou di-acétylée sur les lysines K5, K8, K12 et K16. Nous avons pour cela utilisé des peptides longs (20 résidus) mimant la queue N terminale de l'histone H4 de souris [Tableau 8].

Nom	Séquence
H4-4ac ou H4 tétra-acétylé	SGRG-K(ac)-GG-K(ac)-GLG-K(ac)-GGA-K(ac)-RHRK
H4-K5K8ac	SGRG-K(ac)-GG-K(ac)-GLGKGGAKRHRK
H4-K8K12ac	SGRGKGG-K(ac)-GLG-K(ac)-GGA-K(ac)-RHRK
H4-K12K16ac	SGRGKGGKGLG-K(ac)-GGA-K(ac)-RHRK
H4-K5K12ac	SGRG-K(ac)-GGKGLG-K(ac)-GGA-K(ac)-RHRK
H4-K8K16ac	SGRGKGG-K(ac)-GLGKGG-K(ac)-RHRK
H4-K5ac	SGRG-K(ac)-GGKGLGKGGAKRHRK
H4-K8ac	SGRGKGG-K(ac)-GLGKGGAKRHRK

Tableau 8: Peptides H4 longs

I. Affinités pour un peptide H4 tétra-acétylé

a. δ C-Brdt

L'interaction de la partie N terminale de Brdt (δ C-Brdt) et du peptide H4 tétra-acétylé est largement exothermique. Elle est caractéristique d'une réaction de fixation d'un peptide acétylé par un bromodomaine [Annexe 4D et Figure 24]. La titration du peptide dans la solution tampon produit un signal endothermique constant. Nous avons soustrait sa régression linéaire aux données de la fixation. Les paramètres moyens issus de la répétition de quatre expériences indiquent une stoechiométrie de 1:1 entre le peptide et la protéine et une constante de dissociation (K_d) égale à 11,4 μ M.

b. BD1

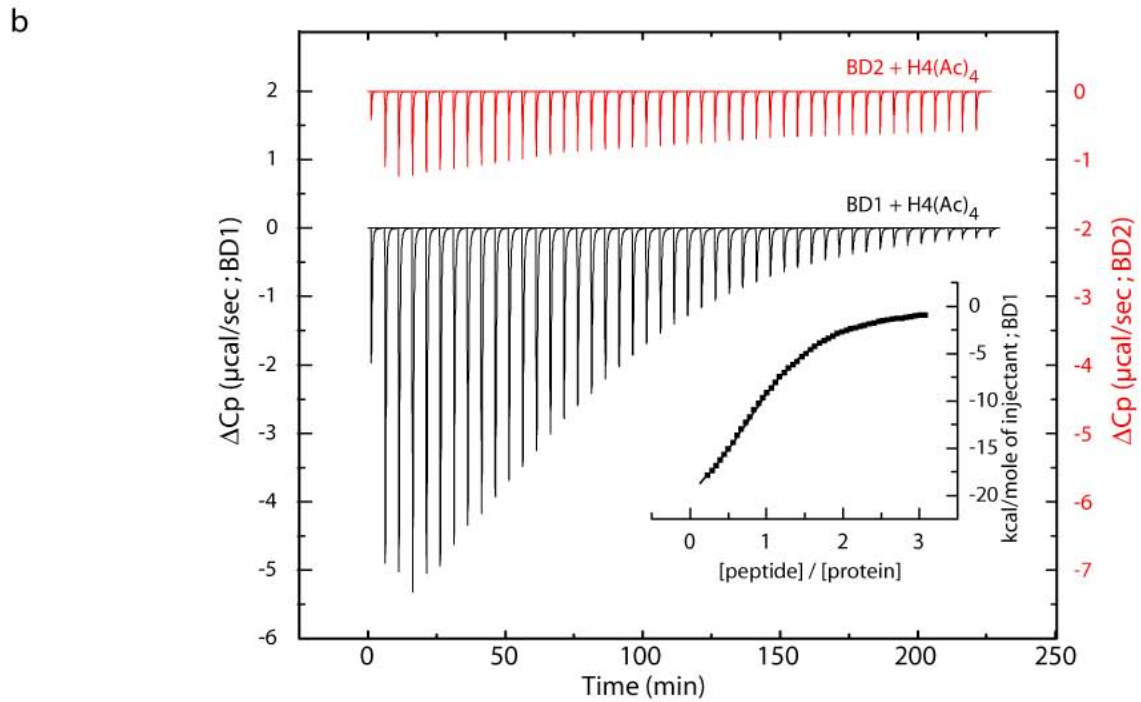
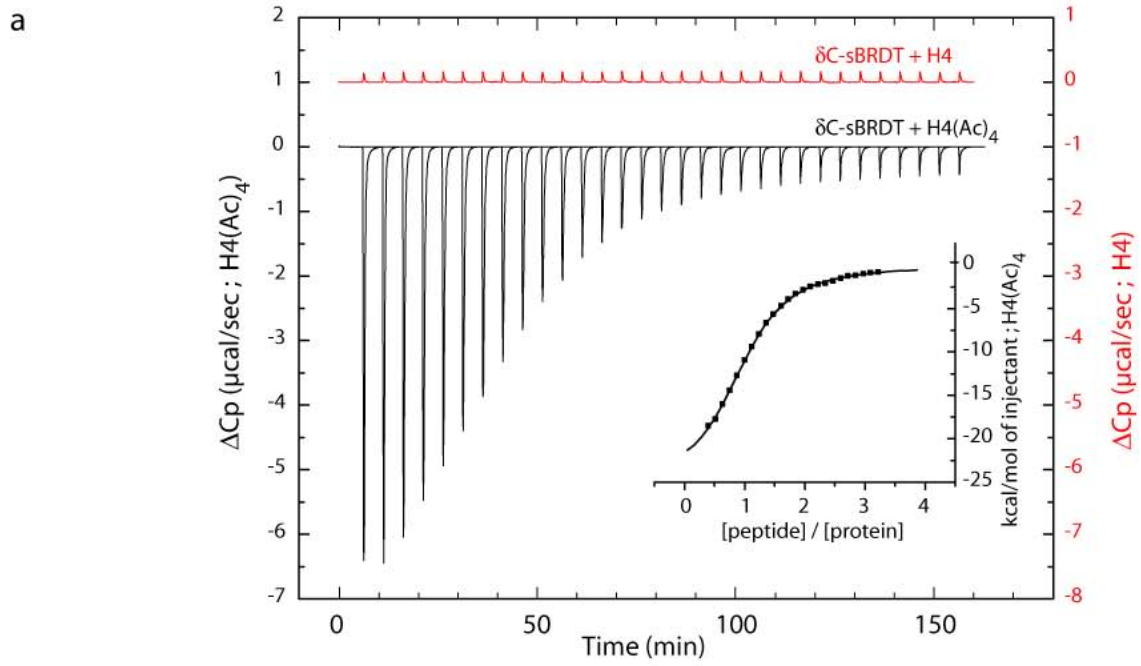
La titration du peptide H4-4ac dans la solution de BD1 produit un dégagement de chaleur important [Annexe 4C et Figure 24]. La régression linéaire du signal de la dilution du peptide a été soustraite aux données de la réaction de fixation. Les paramètres moyens issus de la répétition de quatre expériences permettent de déterminer un K_d de 28 μ M et une stoechiométrie de 1:1 entre le peptide H4-4ac et BD1. Cette affinité est environ deux fois plus forte que celle observée pour δ C- Brdt. Aucun échange de chaleur significatif n'a été enregistré pour la titration d'un peptide non acétylé dans une solution de BD1. Cela confirme que l'interaction est spécifique vis à vis de l'acétylation.

c. BD2

La titration du peptide H4 tétra-acétylé dans une solution de BD2 produit un dégagement de chaleur faible [Annexe 4D et Figure 24]. La réaction de dilution du peptide dans la solution tampon est au contraire exothermique. Même après la soustraction de ce signal, il n'a pas été possible de déterminer les paramètres de l'interaction. En fixant le nombre de sites égal à un ($n=1$), la convergence des paramètres peut cependant être obtenue. L'affinité ainsi déterminée est de l'ordre du milli-molaire.

d. Conclusion

Il apparaît ainsi que l'interaction entre la partie N terminale de Brdt et la queue N terminale acétylée de l'histone H4 est réalisée par l'intermédiaire du premier bromodomaine BD1 et que cette interaction dépend de l'acétylation des lysines.



c

Protéine	Peptide	K_d (μM)	N
$\delta\text{C-sBRDT}$	unacetylated H4	$>10^3$	n.d.
$\delta\text{C-sBRDT}$	tetra-acetylated H4	11.4 ± 2.2	1.01 ± 0.03
BD1	" " "	28.0 ± 6.1	1.01 ± 0.02
BD2	" " "	$>10^3$	n.d.

Figure 24: Comparaison des affinités de $\delta\text{C-Brdt}$, BD1 et BD2 pour le peptide H4 tétra-acétylé.

II. Affinités de BD1 des peptides H4 di-acétylés

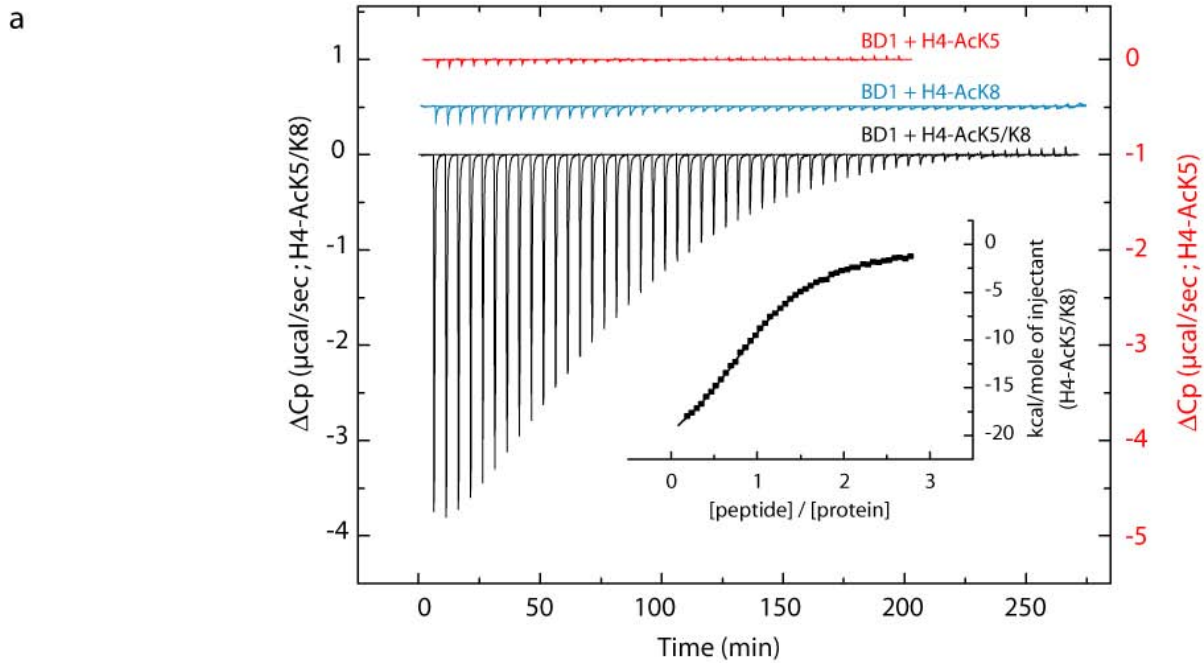
Pour aller plus loin dans l'identification du motif reconnu par Brdt, nous avons mesuré l'affinité de BD1 pour différents peptides mimant la queue N terminale de l'histone H4 di-acétylée [Tableau 8].

Quatre des cinq peptides testés ont montré un signal significatif après la soustraction de celui de la dilution du peptide. L'interaction la plus forte est mesurée pour le peptide H4-K5K8ac ($K_d=21,9 \mu\text{M}$). Les affinités déterminées pour les autres peptides di-acétylés sont 6 à 15 fois plus faibles ($117 \mu\text{M}$ pour H4-K12K16ac ; $193 \mu\text{M}$ pour H4-K8K12ac et $340 \mu\text{M}$ pour H4-K5K12ac) [Figure 24 et Annexe 4E et 4F] sauf pour le peptide H4-K8/K16ac, qui présente une affinité trop faible pour être mesurée [Figure 25 et Annexe 2G]. Ainsi BD1 fixe H4-K5/K8ac presque aussi bien que le peptide H4 tétra-acétylé.

De façon surprenante, les résultats préliminaires, obtenus avec des peptides courts et mono-acétylés, n'avaient pas permis de détecter d'interaction entre BD1 et les peptides sH4-K5ac et sH4-K8ac. De plus nous avons vu que BD1 n'a pas d'affinité pour le peptide H4 non acétylé. Cela indique que BD1 a besoin pour fixer le peptide H4 que celui-ci soit au moins di-acétylé. Nous avons tout de même vérifié que le domaine ne montre pas d'affinité pour les peptides H4 long (20 mers) mono-acétylés sur les lysines K5 ou K8. Le signal obtenu suite à la titration de ces peptides est trop faible pour permettre la détermination des paramètres de l'interaction. Après la soustraction du signal de la dilution du peptide et en fixant le nombre de sites égal à 1, l'affinité obtenue est de l'ordre de 1 mM pour H4-acK5 et de l'ordre de 10 mM pour H4-acK8 [Figure 25 et Annexe 4G].

III. Conclusion

La di-acétylation apparaît ainsi comme le motif minimum essentiel à l'établissement d'une interaction entre BD1 et le peptide H4. La di-acétylation K5/K8ac étant préférentiellement reconnue. Le classement des peptides selon leurs affinités montre que l'affinité décroît quand la distance entre les deux lysines acétylées augmente ($K5/K8ac > K12/K16ac \approx K8/K12ac > K5/K12ac > K8/K16ac$).



b

Peptide	Acetylation	K_d (μM)	N
	None	$>10^3$	n.d.
	K5/K8/K12/K16	28.0 ± 6.1	1.01 ± 0.02
	K5/K8	21.9 ± 1.7	1.00 ± 0.03
	K8/K12	192 ± 22	1.06 ± 0.01
	K12/K16	116 ± 22	0.99 ± 0.04
	K5/K12	340 ± 66	1.01 ± 0.04
	K8/K16	$>10^3$	n.d.
	K5	$>10^3$	n.d.
	K8	$>10^3$	n.d.
	K9/K14/K18/K23	390 ± 35	1.00 ± 0.06

Figure 25: a. BD1 reconnaît le motif di-acétylé K5/K8 de la queue H4. b. Comparaison des affinités de BD1 pour les queues N terminales des histones H3 et H4.

C. Affinités pour la queue N terminale de l'histone H3

Nous avons ensuite examiné l'interaction des bromodomains de Brdt avec la queue acétylée de l'histone H3. Nous avons pour cela utilisé une collection de peptides longs (23 résidus) mimant la queue N terminale de l'histone H3 de souris [Tableau 9].

Nom	Séquence
H3	QTARKSTGGKAPRKQLATKAARK
H3 tétra-acétylé ou H3-4ac	QTAR-K(ac)-STGG-K(ac)-APR-K(ac)-QLAT-K(ac)-AARK
H3-K9K14ac	QTAR-K(ac)-STGG-K(ac)-APRKQLATKAARK
H3-K9K18ac	QTAR-K(ac)-STGGKAPR-K(ac)-QLATKAARK
H3-K14K18ac	QTARKSTGG-K(ac)-APR-K(ac)-QLATKAARK
H3-K14K23ac	QTARKSTGG-K(ac)-APRKQLAT-K(ac)-AARK
H3-K18K23ac	QTARKSTGGKAPR-K(ac)-QLAT-K(ac)-AARK
H3-K14ac	QTARKSTGG-K(ac)-APRKQLATKAARK
H3-K18ac	QTARKSTGGKAPR-K(ac)-QLATKAARK
H3-K23ac	QTARKSTGGKAPRKQLAT-K(ac)-AARK

Tableau 9: Peptides H3 longs

I. Affinités de BD1 et BD2 pour un peptide H3 tétra-acétylé

Les domaines BD1 et BD2 montrent après soustraction du signal de la dilution du peptide, des affinités pour le peptide H3 tétra-acétylé respectivement égales à 390 μM et 214 μM et des stoechiométries de 1:1 entre le peptide et la protéine [Annexe 4H]. En comparaison, l'affinité de BD1 pour la queue H4 est environ dix fois supérieure. BD2 en revanche reconnaît préférentiellement la queue H3 tétra-acétylée mais n'interagit pas avec H4 tétra-acétylé. Aucun échange de chaleur ne résulte de la réaction contrôle de titration du peptide H3 non acétylé dans une solution de BD2. Cela indique que l'interaction de BD2 et de la queue N terminale de H3 est spécifique vis-à-vis de l'acétylation [Figure 27].

II. Affinités de BD2 pour des peptides H3 mono et di-acétylés

Pour déterminer précisément le motif d'acétylation reconnu par BD2 sur la queue de l'histone H3, nous avons procédé à des expériences similaires en utilisant des peptides mono et di-acétylés. Les expériences de titration des peptides H3 diacétylés sur les lysines K14/K23 ou K9/K14, et mono-acétylés sur K14 ou K23 n'ont pas permis de déterminer les paramètres d'une interaction [Annexe 4I]. Il existe cependant un dégagement de chaleur associé à l'injection des peptides H3-K9/K14ac et H3-K14/K23ac qui ne peut pas être expliqué par la seule réaction de dilution du peptide. Même en fixant le nombre de sites égal à un, il n'a pas été possible d'obtenir de solution satisfaisante à l'affinement des paramètres de la liaison. L'affinité de BD2 pour ces peptides doit en conséquence être supérieure à 1 mM.

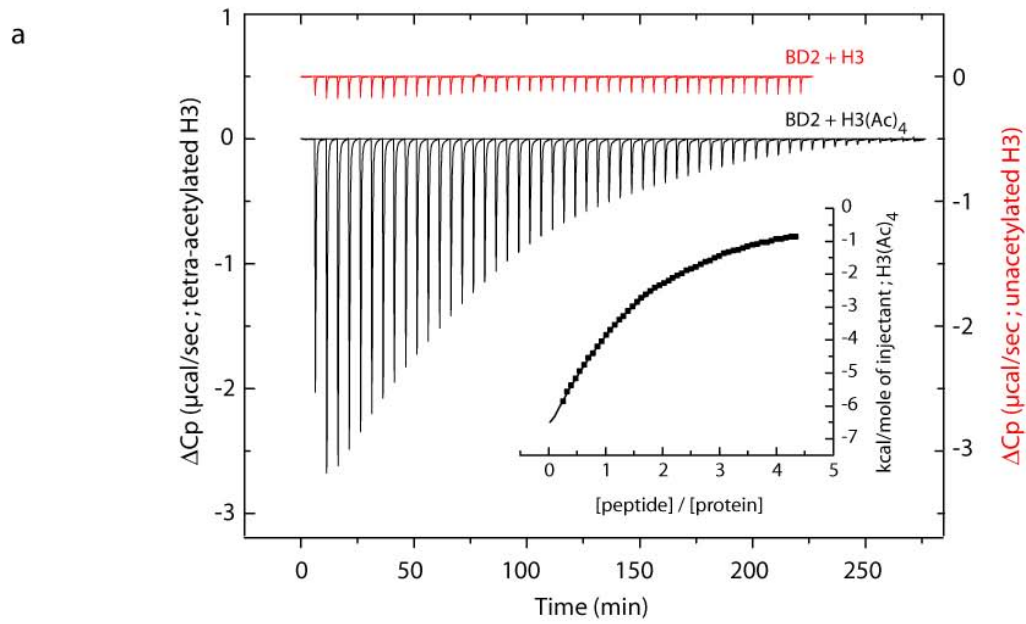
En revanche, nous avons pu déterminer l'affinité de BD2 pour les peptides H3-K18ac, H3-K9/K18ac et H3-K14/K18ac (K_d respectivement égaux à 251 μM , 519 μM et 217 μM) [Annexe 4J et 4K]. Ces affinités sont comparables entre elles et similaires à celle observée pour le peptide H3 tétra-acétylé (214 μM) [Figure 27].

Il semble donc que le motif minimum nécessaire à l'interaction de BD2 et de la queue N terminale de l'histone H3 soit l'acétylation de la lysine K18.

D. Affinités de la protéine BD1-K61Q

Les résultats obtenus pour la protéine BD1 portant la mutation K61Q ressemblent à ceux obtenus pour la protéine sauvage. BD1-K61Q fixe le peptide H3 tétra-acétylé avec une affinité 18 fois plus faible ($K_d=275 \mu\text{M}$) par rapport aux peptides H4 tétra-acétylé et H4-K5/K8ac, pour lesquels il présente des affinités similaires (15,7 μM et 14,9 μM). Son affinité pour les peptides H4 mono-acétylés sur les lysines K5 et K8 est trop faible pour être mesurée [Annexes 4L et 4M].

Ainsi, le mutant BD1-K61Q présente une spécificité vis des queues N terminale de H3 et H4 similaire à celle de la protéine BD1 sauvage. La mutation K61Q entraîne même une légère augmentation globale des affinités mesurées pour H3 et H4 (de 21 μM à 15 μM pour H4-4ac et de 390 μM à 275 μM pour H3-4ac). Ce qui entraîne chez la protéine Brdt-K61Q une diminution de la différence qui existait entre les affinités de BD1 et BD2 vis-à-vis de la queue N terminale tétra-acétylée de H3 (275 μM pour BD1 et 214 μM pour BD2 chez le mutant contre 390 μM pour BD1 et 214 μM pur BD2 chez la protéine sauvage).



b

Peptide	Acetylation	K_d (μM)	N
H3	None	$>10^3$	n.d.
"	K9/K14/K18/K23	214 ± 48	1.03 ± 0.11
"	K9/K14	$>10^3$	n.d.
"	K14/K18	217 ± 19	1.00 ± 0.05
"	K18/K23	176 ± 52	1.00 ± 0.03
"	K9/K18	519 ± 173	0.98 ± 0.04
"	K14/K23	$>10^3$	n.d.
"	K14	$>10^3$	n.d.
"	K18	251 ± 62	1.03 ± 0.11
"	K23	$>10^3$	n.d.
H4	K5/K8/K12/K16	$>10^3$	n.d.

Figure 26: Affinités de BD2 pour la queue N terminale de l'histone H3 acétylée

Résultats : Chapitre 3

Structures cristallographiques des bromodomaines de Brdt en complexe avec les queues d'histones H3 et H4

A. Structure de BD1 en complexe avec un peptide acétylé mimant la queue N terminale de l'histone H4

I. Cristallisation de BD1 en complexe avec les peptides H4 tétra-acétylé et H4-K5K8ac

Pour obtenir une protéine soluble et stable à 20°C, qui cristallise et dont les cristaux soient de qualité suffisante, nous avons testé 10 clones différents de BD1 [Tableau 10]. La construction initiale A11, issue d'un projet de cristallisation à haut débit, n'avait pas permis d'obtenir de cristaux.

Les bornes de la première série de clones (SI) ont été choisies d'après une estimation du début et de la fin du domaine réalisée par l'alignement de la séquence primaire du domaine avec celles d'autres bromodomaines. La structure des bromodomaines de Gcn5 (Owen et al., 2000), PCAF (Mujtaba et al., 2002), CBP (Mujtaba et al., 2004), TAFII250 (Jacobson et al., 2000) et Brdt-BD2 (nos données) étant connue, nous avons pu en déduire approximativement les limites du domaine. Nous avons utilisé ces limites comme bornes pour nos constructions. La construction 28-136 s'est avérée insoluble, la construction 25-136 partiellement soluble mais instable. Seule la construction 22-136 s'est avérée soluble et stable à haute concentration (environ 30 mg/mL). Cette construction n'ayant pas cristallisé, une seconde série de clonages a été réalisée.

Pour la seconde série de clonages, nous nous sommes appuyé sur une modélisation de la structure du domaine, prenant comme modèle la structure de l'homologue Brd2 BD1 [PDB:1XOJ] récemment cristallisé (Nakamura et al., 2007). Les bornes E17 ou K23 ont été retenues pour l'extrémité N terminale et K142, Q150 ou A154 à l'extrémité C terminale.

Clone	Résidus	Solubilité/Stabilité	Cristallise (diffraction)
A11	17-141	soluble	Non
SI-1	22-136	soluble	Non
SI-2	25-136	instable: précipite	Non
SI-3	28-136	insoluble	-
SII-1	17-142	soluble	Non
SII-2	17-150	soluble	Non
SII-3	17-154	soluble	Non
SII-4	23-142	instable: précipite	Non
SII-5	23-150	soluble	Oui (6,0 Å)
SII-6	23-154	-	-
SIII-1	12-136	soluble	Oui (2,6 Å)
SIII-2	12-136	-	-
SIII-3	17-136	soluble	Oui (2,4 Å)
SIII-4	25-142	-	-

Tableau 10: Clones de BD1 réalisés pour la cristallisation

De ces six constructions, cinq ont été testées. La construction 23-150 a permis d'obtenir des cristaux du domaine en complexe avec le peptide H4 tétra-acétylé (20 résidus). Ces cristaux ont été reproduits manuellement en utilisant un mélange contenant 20 mg/mL de protéine et soit le peptide H4 tétra-acétylé soit le peptide H4-K5K8ac (20 résidus). Le rapport entre la protéine et le peptide varie de 1:2 à 1:5. Les cristaux, de forme rhomboédrique et pouvant atteindre 300 µm x 300 µm x 100 µm ont été obtenus en 2 à 3 jours dans plusieurs conditions contenant de 1,1 à 1,2 M K₂HPO₄ et 0,02 à 0,2 M NaH₂PO₄.

Cependant, malgré la variation des conditions de congélation, leur diffraction n'a pas permis d'obtenir de jeu de données dont la résolution dépasse 6 Å. Les cristaux, montés dans un capillaire contenant la solution mère, ont été exposés aux rayons X sans congélation. Les images obtenues étant similaires à celles obtenues après congélation, nous avons conclu qu'ils présentaient un désordre intrinsèque, indépendant d'une éventuelle dégradation due à la congélation, qui explique

leur mauvaise diffraction. Attestant d'une structure cristalline peu stable, on observe que les cristaux commencent à se dissoudre après une semaine environ. Pour tenter d'améliorer la diffraction nous avons sans résultat déshydraté les cristaux par bain prolongé dans le cryoprotectant. Nous avons également reproduit ces cristaux en ajoutant 5 à 10% d'éthylène glycol dans la condition de cristallisation. Les cristaux ont vu leur croissance ralentie : une semaine environ au lieu des 2-3 jours sans additif. Ils ont également commencé à se dégrader plus tardivement. Cependant leur diffraction n'a pas connu d'amélioration notable.

Dans une troisième série de clonage nous avons utilisé les bornes 12-136 et 17-136, bornes utilisées pour cristalliser Brd4 [pdb:2OSS] et Brd3 [pdb:2NXB], deux structures récemment publiées dans la banque de données PDB. Un cristal rhomboédrique d'environ 150 μm de long [Figure 27A] a été obtenu au robot de cristallisation pour le domaine 12-136 à une concentration de 15 mg/ml en mélange avec le peptide H4 tétra-acétylé (20 résidus) dans un rapport 1:1,7 dans la condition 2,4 M ammonium sulfate, 0,1 M MES pH6. Ce cristal a été congelé dans l'azote liquide après un bain dans une solution de cryoprotection (2,4 M ammonium sulfate, 0,1 M MES pH6,0, 30% glycerol). Bien que les images de diffraction indiquent un désordre interne important [Figure 27B], ces cristaux ont permis d'obtenir un jeu de données à 2,63 Å de résolution.

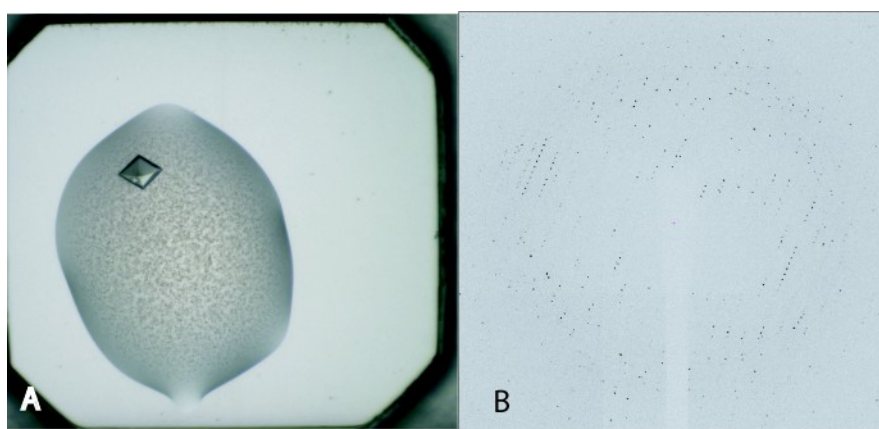


Figure 27: A. Nano-goutte: BD1 (12-136) à 15 mg/mL + H4-4ac (1:1.7) (2.4 M NH₄SO₄, 0.1 M MES pH 6.0) B. Image de diffraction (résolution: 2.80 Å).

Pour améliorer la résolution, nous avons cherché à obtenir d'autres cristaux en criblant les 96 conditions contenant toutes de l'ammonium sulfate du screen « Nextal ammonium sulfate ». Des cristaux ont été obtenus pour les domaines 12-136 et 17-136 en mélange avec les peptides H4-K5K8ac long (20 résidus) et H4-K5K8ac court (16 résidus) dans des rapports molaires allant de

1:2 à 1:20 entre la protéine et le peptide. Une vingtaine de conditions différentes ont mené à la cristallisation. La diffraction des cristaux les plus prometteurs a été testée aux rayons X sur la ligne microfocuse ID23-eh2.

Un de ces cristaux, obtenu avec la construction 17-136 à une concentration de 15 mg/mL en mélange avec le peptide H4-K5K8ac (20 résidus) dans un rapport molaire 1:20, dans la condition 2,4 M ammonium sulfate, 0,1 M Hepes pH 7 [figure 28A], congelé dans 2,4 M ammonium sulfate, 0,1 M Hepes pH 7, 30 % glycérol, a permis de collecter sur la ligne microfocuse ID23-2 un jeu de données allant jusqu'à 2,37 Å malgré une diffraction faible et la présence de plusieurs réseaux superposés [Figure 28B].

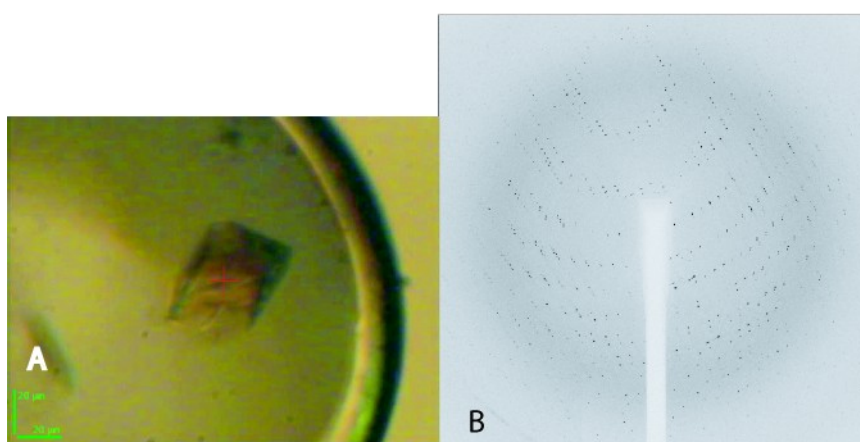


Figure 28: A. Cristal de BD1 + H4-K5K8ac B. Image de diffraction Résolution: 2.30 Å.

II. Résolution des structures cristallographiques de BD1 en complexe avec les peptides H4 tétra-acétylé et H4-K5K8ac

a. Structure de BD1 en complexe avec le peptide H4 tétra-acétylé

Un jeu de données à 2,63 Å a été collecté à L'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) sur la ligne microfocuse ID23-eh2. Les données ont été intégrées et mises à l'échelle avec la suite de programmes XDS/XSCALE (Kabsch, 1993). Les valeurs statistiques du jeu de données sont indiquées ci-dessous [Tableau 11].

	BD1 + H4acK5,8,12,16	BD1 + H4acK5,8
Collecte des données		
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètre de maille (Å)	a=49,41 b=60,35 c=98,01 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=49,29 b=61,22 c=97,91 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Ligne à l'ESRF	ID23-eh2	ID23-eh2
Résolution globale (Å)	20,0-2,6	20,00-2,37
coquille externe (Å)	2,8-2,6	2,40-2,37
Complétude (%)	96,0 (88,3)	96,7 (63,3)
Nb. de réflexions observées	34813 (4042)	39871 (439)
uniques	8758 (1339)	12142 (281)
Redondance	4,0 (3,0)	3,3 (1,6)
R _{sym} (%) ²	8,3 (23,9)	14,3 (41,2)
I/ σ (I) *	15,26 (5,6)	7,11 (2,3)
Affinement du modèle		
R _{cryst} /R _{free} (%) ³ (réflexions)	23,7 / 27,4	20,1 / 25,6
Nb. d'atomes de protéine	2061	1856
de peptide	83	109
d'eau	108	157
R.m.s.d (déviation moyenne)		
Longueur des liaisons (Å) /des angles (°)	0,011/1,42	0,007/1,16
Résidus dans le Ramachandran plot		
Plus favorable / autorisé (%)	88,9 / 11,1	91,0 / 9,0
¹ Les valeurs entre parenthèses sont celles de la coquille externe de résolution. ² $R_{sym} = \sum_{hkl} I_{hkl} - \langle I \rangle / \sum_{hkl} I_{hkl}$, où I_{hkl} est l'intensité mesurée pour la réflexion d'indices hkl et $\langle I \rangle$ est l'intensité moyenne des réflexions observées. ³ $R_{cryst} = \sum_{hkl} F_o - F_c / \sum_{hkl} F_o$, où F_o et F_c sont respectivement les amplitudes des facteurs de structure observés et calculés. Le R_{free} est égal à R_{cryst} pour une portion sélectionnée aléatoirement de 5% des réflexions non utilisées pour l'affinement		

Tableau 11: Statistiques des données cristallographiques.

La structure a été résolue par la technique du remplacement moléculaire à l'aide du programme MolRep de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). La structure tridimensionnelle de l'homologue Brd4 [PDB 2OOS] a été utilisée comme modèle. Deux solutions ont été obtenues (facteur R= 0,572 et 0,576). Ce qui est cohérent avec le résultat du calcul de l'état d'hydratation du cristal selon Matthews qui indique que l'unité asymétrique contient le plus probablement 2 molécules, avec un pourcentage d'hydratation de 52,6 % [Tableau 12].

Nb. Molécules	$M_{\text{coef.}}$ ($\text{\AA}^3/\text{Da}$)	% solvant
1	5.19	76.31
2	2.59	52.62
3	1.73	28.93
4	1.30	5.23

Tableau 12: Calcul du coefficient de Matthews ($M_{\text{coef.}}=V/M.Z$ avec V : volume de la maille, M : masse moléculaire de la protéine et Z : nombre de molécules dans la maille). Dimensions de la maille orthorhombique: $a=49.4 \text{ \AA}$ $b=60.2 \text{ \AA}$ $c=98.1 \text{ \AA}$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $MW = 14.2 \text{ Kda}$

Pour déterminer le groupe d'espace, le remplacement moléculaire a été réalisé dans tous les groupes d'espaces orthorhombiques. Après comparaison des résultats, le groupe $P2_12_12_1$ a été choisi car il donne clairement la meilleure solution.

Un premier affinement constitué de 20 cycles d'affinement où chaque monomère est considéré comme un corps rigide avec le programme MolRep de la suite CCP4, suivi de 10 cycles d'affinement restreint avec le programme Refmac (Murshudov et al., 1997), aboutit à un modèle dont les facteurs R et Rfree sont respectivement égaux à 0,287 et 0,388. Le calcul des cartes associées au modèle indique clairement la présence d'une densité atomique continue dans le site de liaison du bromodomaine [Figure 29].

Nous avons poursuivi cet affinement avant la construction du peptide. Il a été constitué de cycles de calculs avec le programme CNS (Brünger et al., 1998) et de modifications manuelles du modèle réalisées avec le programme COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Chaque phase calcul porte sur l'affinement de la géométrie (incluant des contraintes de symétrie non cristallographique entre les deux monomères) et de l'affinement des facteurs B.

La densité obtenue a permis de placer facilement les deux résidus acétyl-lysine mais compte tenu du fait que le peptide porte 4 acétyl-lysines, il s'est avéré difficile d'assigner sans ambiguïté le reste de

la séquence du peptide. Il n'est pas exclu que nous observions la densité moyenne de plusieurs modes de liaison. Cependant il existe pour la leucine L10 une densité bien visible qui nous a fait privilégier les séquences K(ac)GGK(ac)G (molécule 1) et AGK(ac)GGK(ac)G (molécule 2) où les acétyl-lysines 5 et 8 occupent le site de fixation. Ceci est en accord avec les résultats d'ITC qui indiquent que BD1 présente pour le peptide di-acétylé H4-acK5,8 la meilleure affinité.

Structure de BD1 en complexe avec le peptide H4-acK5,8

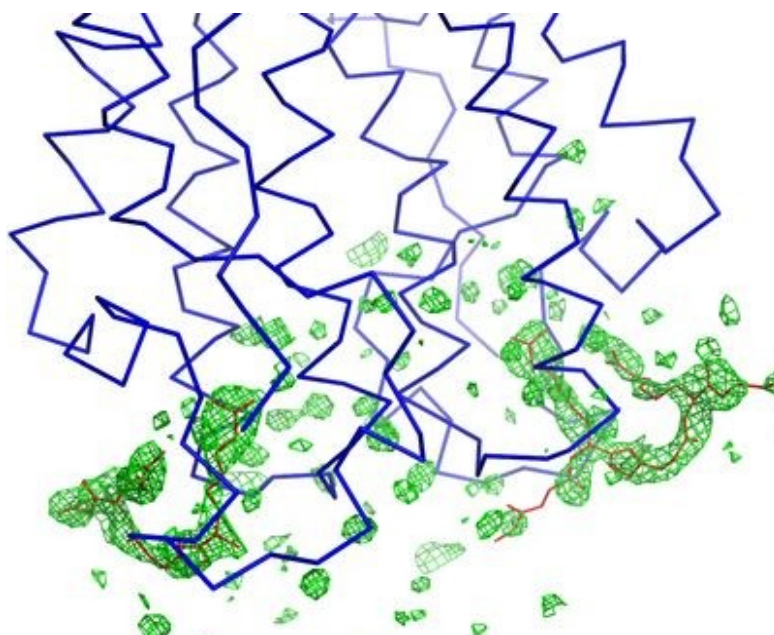


Figure 29: Omit map à 2,3 sigma de la densité manquante après le remplacement moléculaire. En rouge: modèles des peptides construits en fin d'affinement.

Pour lever le doute sur l'assignation de la séquence du peptide nous avons résolu la structure de BD1 en complexe avec un peptide mimant la queue de l'histone H4 uniquement acétylé sur les lysines 5 et 8 (H4-acK5,8, 20 mers).

Un jeu de données à 2,37 Å a été obtenu sur la ligne microfocuse ID23-eh2 de l'ESRF. Les cristaux présentaient une mauvaise diffraction: diffraction circulaire au centre du cristal, diffraction faible, plusieurs réseaux superposés, perte rapide de diffraction. Plusieurs séries d'images complémentaires ont été collectées en irradiant différents volumes à la périphérie du cristal. De ces images a été conservé le plus petit nombre nécessaire pour obtenir des statistiques satisfaisantes lors de l'intégration et de la mise à l'échelle réalisées avec XDS et XSCALE. Le choix des images ainsi fait, les dimensions de la maille ont été recalculées en tenant compte des résultats obtenus pour chaque

série d'images et la mise à l'échelle a été recalculée avec ces nouvelles dimensions. Les statistiques finales sont indiquées dans le tableau ci-dessus [Tableau 11].

Pour résoudre la structure, nous avons utilisé les phases de la structure de BD1 obtenue précédemment, dont les résidus 12 à 16, les molécules d'eau et les peptides ont été supprimés. Après un premier affinement constitué de 20 cycles d'affinement comme corps rigide à 4 Å, 10 cycles d'affinement comme corps rigide à 2,7 Å et 10 cycles d'affinement restreint, les facteurs R et Rfree étaient respectivement égaux à 0,257 et 0,320. Une densité continue indiquait clairement la présence du peptide dans le site actif de chaque monomère [figure 30].

La densité des deux acétyl-lysines et de la leucine 10 de la chaîne B étant bien visibles, nous avons en premier lieu construit le peptide avec l'AcK5 dans le site principal. Les facteurs R et Rfree du modèle final sont respectivement égaux à 0,204 et 0,248. Pour vérifier que la direction choisie était la bonne, le peptide a été construit avec l'acK8 dans le site principal. Reflétant une plus grande divergence entre la densité et le modèle, les facteurs R et Rfree sont moins bons (respectivement égaux à 0,219 et 0,280). Ces résultats confirment la direction du peptide avec l'acK5 qui occupe le site principal.

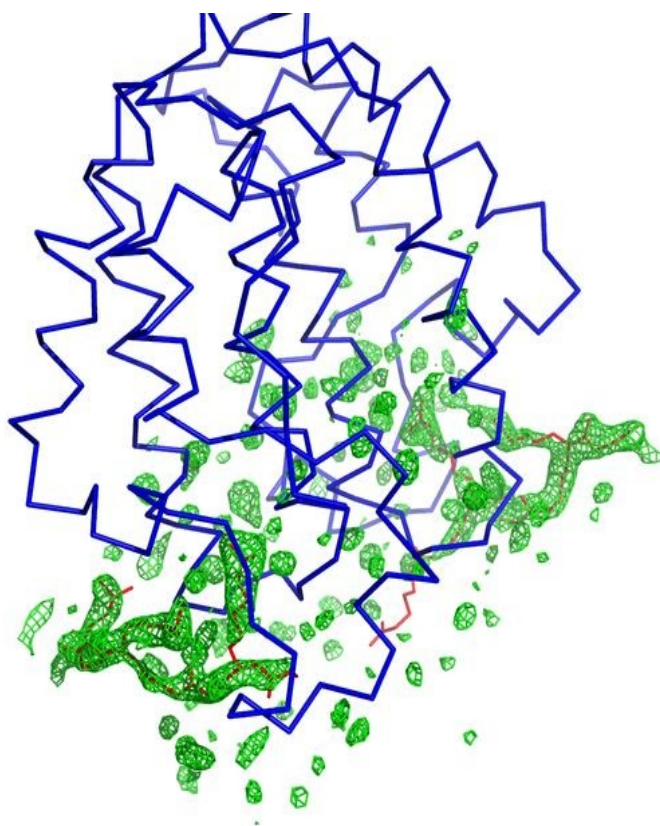


Figure 30: Densité manquante après le remplacement moléculaire: omit map à 2,3 sigma et modèle final du peptide (en rouge).

III. Arrangement dans l'unité asymétrique

La structure de BD1 en complexe avec le peptide H4 tétra-acétylé et celle en complexe avec le peptide H4-K5K8ac sont parfaitement superposables et présentent un r.m.s.d entre $C\alpha$ pour 220 atomes (résidus 27-136 des chaînes A et B) égal à 0.25 Å [Figure 31]. Dans les deux cas chaque unité asymétrique contient deux molécules de BD1 formant un dimère dont les molécules A et B sont superposables avec un r.m.s.d entre $C\alpha$ pour 110 atomes (résidus 27 à 136) égal à 0,26 Å. Un peptide est présent dans chaque site de liaison des bromodomains A et B. Ils forment respectivement les chaînes Q et P. Le tableau 13 résume la composition des chaînes protéiques présentes dans les deux structures.

Chaînes	BD1 (12-136)	BD1 (17-136)
	+H4-acK5,8,12,16 (1-20)	+H4-acK5,8 (1-20)
	Résidus définis dans le modèle	
A	12-136	27-136
B	14-136	27-136
Q	5-9	3-10
P	3-9	3-11
R	-	-2-18

Tableau 13: Constitution des chaînes présentes dans les structures cristallographiques

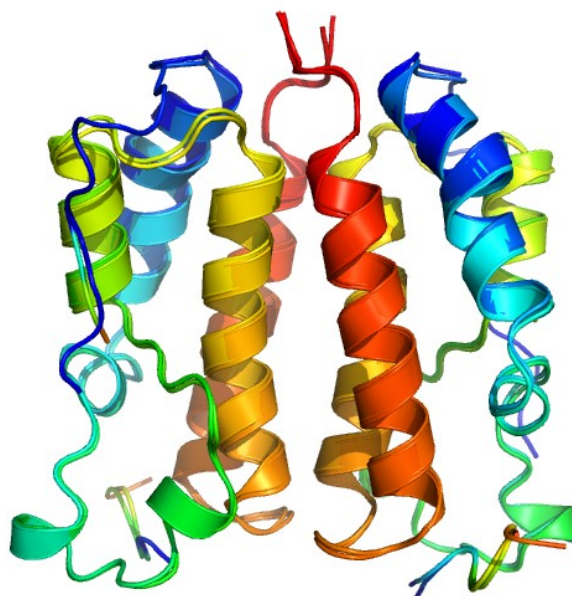


Figure 31: Dimère de BD1. Superposition de BD1(12-136) et de BD1(17-136).
Chaque molécule est colorée selon le même gradient allant du bleu pour l'extrémité N terminale au rouge pour l'extrémité C terminale.

Les peptides P et Q sont superposables avec un r.m.s.d entre Ca pour 8 résidus (résidus 5 à 8, molécules P et Q) de 0,49 Å. Au delà des résidus 5 à 8, des divergences apparaissent entre les chemins suivis par les peptides P et Q [Figure 31]. Il existe probablement pour les résidus en dehors du site de liaison une grande flexibilité qui peut expliquer la divergence des chaînes et la disparition de la densité.

Dans le cas de la structure de BD1 en complexe avec le peptide H4-K5K8ac, un peptide supplémentaire (chaîne R) a été construit. Il correspond très probablement aux résidus Ala-2 et Met-1 (venant du vecteur de clonage) et Glu17, Tyr18 (premiers résidus de la construction). Ces résidus sont visibles dans le cas de la molécule B mais la densité n'a pas permis d'assigner la séquence exacte. Le peptide occupe la même place que les résidus 15 à 18 de BD1 (12-136), à l'interface entre la molécule B et une molécule A appartenant à une unité asymétrique voisine [Figure 32]. Le fait qu'il existe pour ces 4 résidus une densité alors que les résidus 19 à 26 suivant ne sont pas définis (ou le sont mal) confirme le fait que cette partie N terminale de la protéine participe à la constitution de l'interface et se trouve ainsi stabilisée. La présence d'un peptide à cet endroit conditionne probablement la formation de l'empilement cristallin tel que nous l'observons.

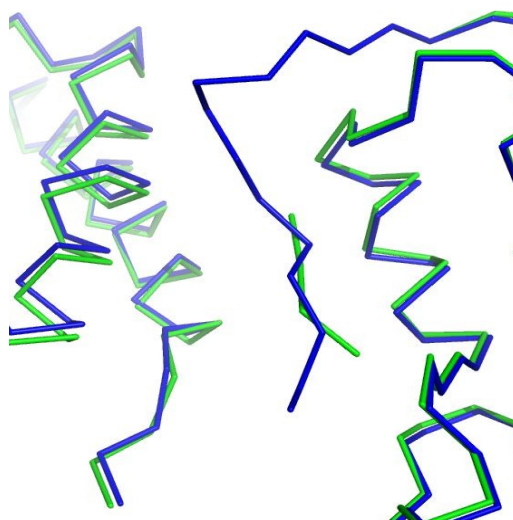


Figure 32: Extrémité N terminale des deux structures superposées BD1 (12-136) en bleu et BD1 (17-136) en vert. La chaîne R se trouve à l'interface entre une molécule B et une molécule A.

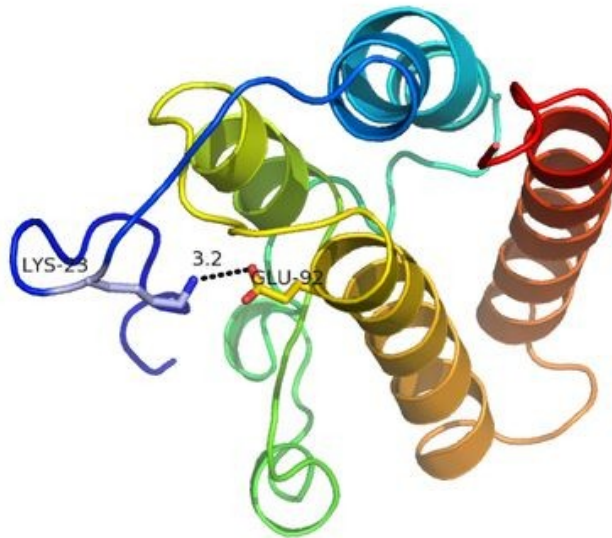


Figure 33: l'extrémité N terminale de BD1 chapeaute le bromodomaine.

Nous avons observé lors de la purification des protéines que les résidus 22 à 27 confèrent à BD1 une meilleure stabilité. Cette partie de la molécule forme une boucle qui chapeaute le bromodomaine [Figure 33]. La lysine K23 établit une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Y86 de la région située entre les boucles B et C et un pont salin avec l'acide glutamique E92 de la boucle C, le résidu R26 forme une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Y87 de la boucle entre les hélices B et C, et la thréonine T28 établit une liaison ionique avec la glutamine Q134 de l'extrémité C terminale de la seconde molécule du dimère. Cet ensemble d'interactions rigidifie très probablement le repliement du bromodomaine et peut expliquer que les protéines BD1 qui commencent aux résidus 25 et 28 soient respectivement instable et insoluble.

IV. Architecture de BD1

BD1 présente un repliement classique de bromodomaine, exclusivement constitué d'hélices, de tours et de boucles. L'assignement des structures secondaires par le programme DSSP (Kabsch, 1983) indique cinq hélices alpha: αZ (résidus 29-44), $\alpha A'$ (résidus 65-68), αA (résidus 75-83), αB (résidus 90-107), αC (résidus 113-124) et une hélice 3_{10} : $\alpha Z'$ (résidus 49-51). Ces hélices sont identiques chez les deux molécules du dimère. Les hélices Z, A, B et C sont empilées et forment le coeur allongé du domaine. Les extrémités N et C terminales de la chaîne protéique sont rassemblées d'un côté. A l'opposé, les boucles ZA (résidus 45-74) et BC (résidus 108-112) forment le site de

liaison du peptide [Figure 34]. Une troisième structure en hélice notée π D est assignée pour les résidus 57 à 60 de la boucle ZA par le programme de calcul de structure secondaire DSS de PyMol. Cette hélice implique une insertion de résidus propre à la famille des protéines BET. Elle est présente chez Brd2-BD2 (Huang et al., 2007), Brd4-BD2 [PDB:2OUO] et Brd2-BD1 (Nakamura et al., 2007) chez qui elle présente les caractéristiques d'une hélice π (4,4 résidus par tour, diamètre réduit de 2,8Å, (Rajashankar and Ramakumar, 1996)).

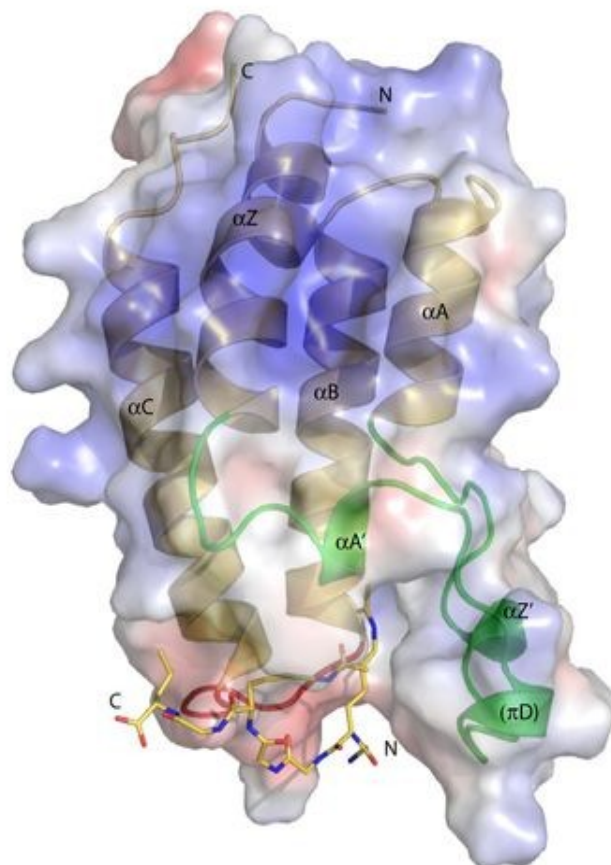


Figure 34: Structures secondaires de BDI. Boucles ZA en vert et BC en rouge.

V. Surfaces et interactions du complexe BD1/H4-K5K8ac

a. La surface de BD1

Le calcul des charges électrostatiques existant à la surface de BD1 a été réalisé en appliquant la fonction de potentiels « Amber » à tous les atomes de BD1 en utilisant le logiciel APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (Baker et al., 2001) implémenté dans PyMOL (W. L. DeLano., 2002) (script de Michel George Lerner). Il met en évidence la polarité du bromodomaine, avec une face électronégative qui forme dans le cristal l'interface du dimère et une face électropositive, tournée dans le cristal vers le solvant [Figure 35].

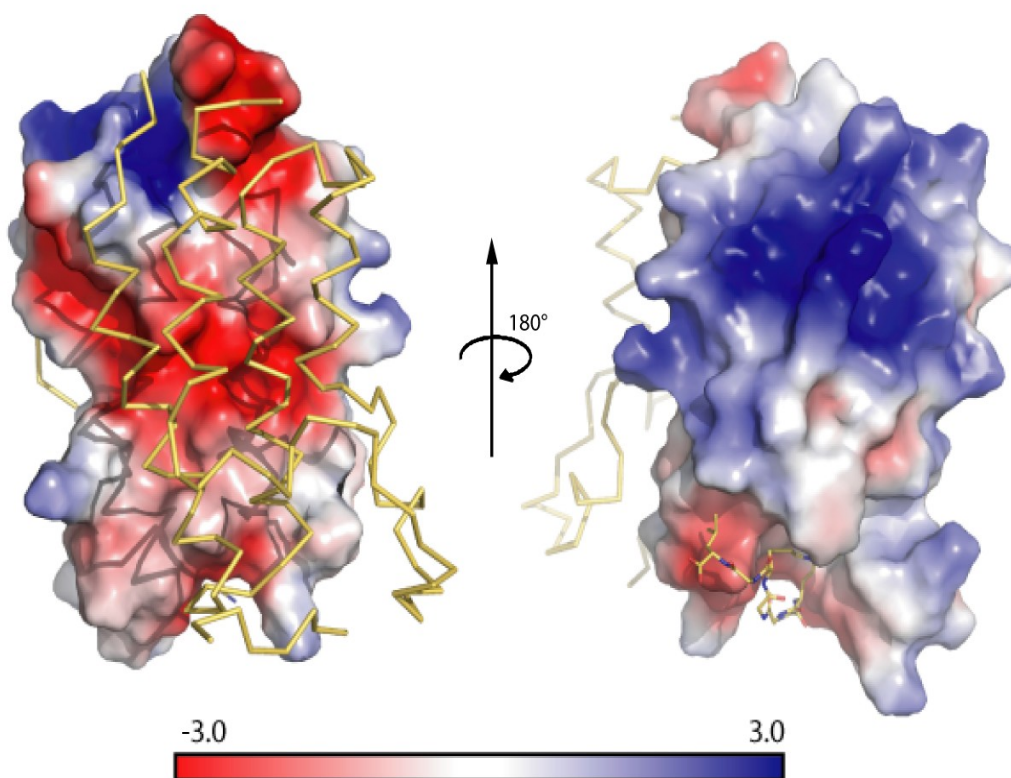


Figure 35: Représentation du potentiel électrostatique à la surface de BD1.

b. Interaction entre les molécules A et B du dimère

L'interface entre les molécules A et B occupe environ 18 % de la surface accessible au solvant de chaque monomère avec une surface d'interaction de 1280 Å². D'après l'analyse de PISA (Krissinel and Henrick, 2007), un outil d'analyse des interfaces et de prédiction des éventuelles structures quaternaires proposé par l'Institut Européen de Bioinformatique, les résidus constituant l'interface sont: L27, T28, N29, Q30, I68, E88, K89, A90, S91, E92, I94, E95, N98, T99, F101, S102, Y105, L106, N108, K109, T110, V115, G119, E122, K123, F125, M126, L129, S130, M132, P133, Q134, E135, E136 sur la molécule B et les mêmes résidus moins Y107 et plus K70 et T71 sur la molécule A. Au total, 30 résidus constituent principalement la surface d'interaction. Sur l'ensemble de ces résidus, 13 sont de nature hydrophobe, soit 43,3 % de la totalité. Entre les deux molécules s'établissent 14 liaisons hydrogène [Tableau 14]. Aucune interaction ionique (ponts salins) ni autre liaison de plus haute énergie n'est observée. Globalement l'interaction est donc stabilisée par des forces hydrophobes et des liaisons polaires de faible énergie. Avec un gain d'énergie libre de solvation ($\Delta G = -8,1$ kcal/mol) associé à la formation du complexe, PISA conclut que le dimère AB doit être stable en solution. Cependant nous n'avons pas pu observer cette dimérisation expérimentalement.

	Molécule B	Distance (Å)	Molécule A
1	THR 28 [OG1]	3,0	GLU 135 [OE1]
2	ASN 29 [N]	2,9	GLU 136 [OE1]
3	LYS 89 [NZ]	3,1	SER 130 [O]
4	ALA 90 [N]	2,8	GLU 135 [OE1]
5	ASN 98 [ND2]	2,8	GLU 95 [OE1]
6	SER 102 [OG]	3,1	SER 102 [OG]
7	THR 110 [OG1]	3,5	LEU 106 [O]
8	GLU 136 [OE1]	2,8	GLU 135 [O]
9	GLU 135 [OE1]	3,0	THR 28 [OG1]
10	GLU 136 [OE1]	2,1	ASN 29 [N]
11	SER 130 [O]	3,0	LYS 89 [NZ]
12	GLU 135 [OE1]	2,9	ALA 90 [N]
13	GLU 95 [OE2]	3,0	ASN 98 [ND2]
14	LEU 106 [O]	3,4	THR 110 [OG1]

Tableau 14: Liaisons hydrogène entre les molécules A et B

c. Interaction entre BD1 et le peptide

i. Interaction entre la molécule B et le peptide P

Avec 498 \AA^2 , l'interface entre la molécule B et le peptide H4-K5K8ac représente 6,9 % de la surface accessible au solvant du bromodomaine et 50 % de celle du peptide . Elle implique l'ensemble des résidus du peptide et les résidus F47, W49, P50, F51, V55, L60, K61, L62 et Y65 de la boucle ZA d'une part et C104, Y107, N108, K109, D112, D113, I114, V116 et M117 de la boucle BC et des extrémités des hélices B et C d'autre part.

Le site de fixation des acétyl-lysines est essentiellement hydrophobe. Il est formé en surface par un sillon constitué par les résidus W49, P50, I114, M117 et L60 dans lequel se place la chaîne latérale de l'acK8 [Figure 36]. Il existe dans cette partie un réseau de liaisons hydrogène liant le carbonyle du groupe acétyle de l'acK8, une molécule d'eau (W6), l'amine du groupe acétyle de l'acK5 et le carbonyle de la proline 50 [Figure 38].

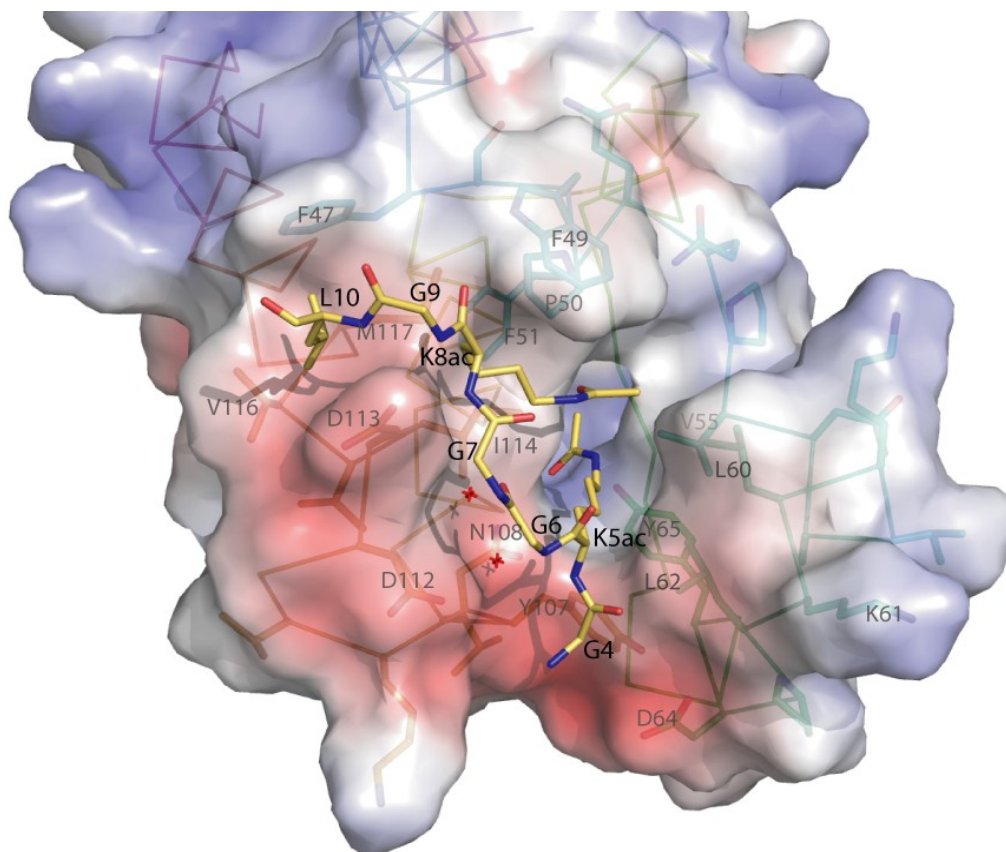


Figure 36: Site de fixation du peptide à la surface de BD1 coloré selon son potentiel électrostatique

Le site est ensuite constitué d'une cavité dont les dimensions avoisinent 12 Å de long et 5 Å de large [Figure 37]. La première partie de la cavité est formée par les résidus I114, N108, Y107, P50, F51, Q53, P54, V55, L60, L62 et Y65 [Figure 36]. Elle est occupée par la chaîne latérale de l'acK5 qui établit une liaison hydrogène avec l'amine de l'asparagine 108 via son groupe carbonyle. La partie profonde de la cavité est ensuite occupée par cinq molécules d'eau qui forment un important réseau de liaisons hydrogène auquel participe l'acK5. Ce réseau implique le groupe carbonyle de l'acétyl de l'acK5, les cinq molécules d'eau et les résidus Y65, C104, N103, M73, M100 et Q53 [Figure 38]. Les résidus P54, Y66, I69, P72 et D74 participent également à la constitution du fond de la cavité.

La chaîne principale du peptide se place au contact d'une surface électropositive constituée par les résidus D64, Y107, N108, G111, D112 et D113 formant un demi-cercle autour du site de fixation des acétyl-lysines.

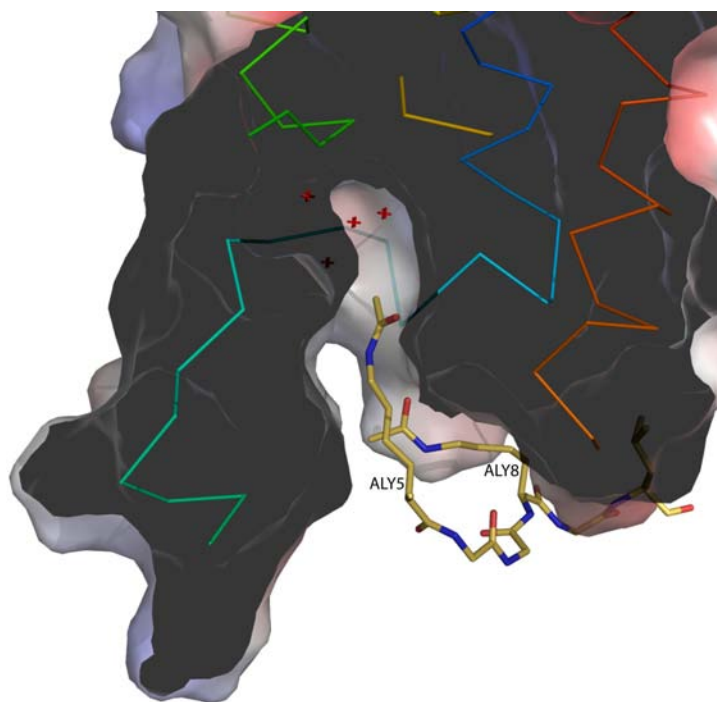


Figure 37: Site de fixation principal vu en coupe.

Dans sa partie N terminale le peptide n'établit pas d'interaction directe avec le bromodomaine. Les amines des liaisons peptidiques des résidus G4, acK5 et G6 se placent cependant en regard du groupe acide de l'acide aspartique D112 [Figure 36]. C'est par l'intermédiaire de deux molécules d'eau (W92 et W108) que l'amine de l'acK5 et le carbonyle de la glycine 6 forment des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des résidus D112 et N108 et avec les chaînes principales des résidus I114 et D113 [Figure 38].

La partie C terminale du peptide vient ensuite s'enrouler autour du relief électro-négatif que forme le groupe acide de l'aspartate D113 [Figure 36]. L'amine de la liaison peptidique de l'acK8, celui de la glycine G9 et celui de la leucine L10 forment des liaisons hydrogène avec ce groupe acide [Figure 38]. La chaîne latérale de la leucine L10 s'enfouit dans un site hydrophobe constitué par les résidus F47, V116 et M117 [Figure 36].

Ainsi le peptide est stabilisé uniquement par des interactions polaires et hydrophobes. Cependant, avec un gain d'énergie libre de solvation ($\Delta G = -9,8$ kcal/mol) associé à la formation du complexe BP, PISA conclut que le complexe BP est stable en solution, ce que nous avons pu observer et quantifier expérimentalement.

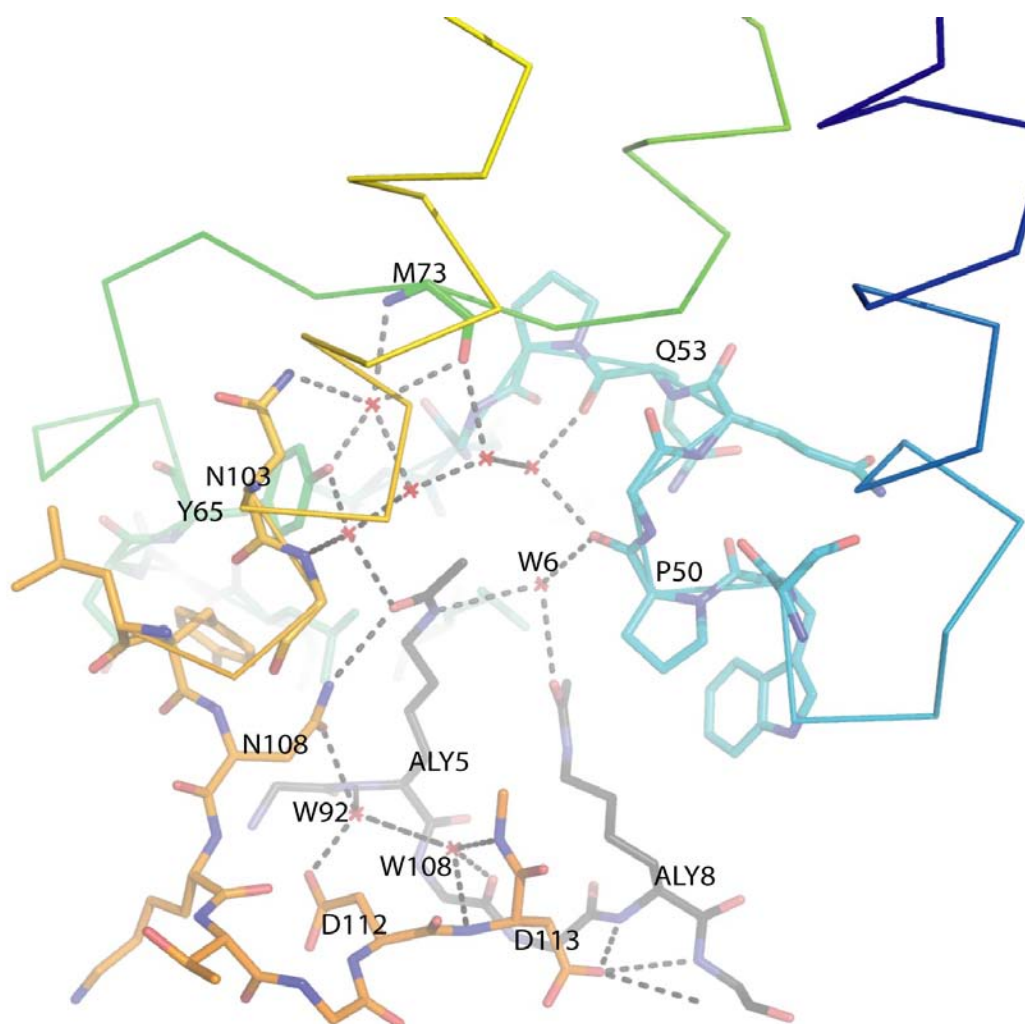


Figure 38: Réseaux de liaisons hydrogène stabilisant l'interaction de BDI et du peptide P. L'hélice C a été cachée pour plus de clarté.

ii. Interaction entre la molécule A et le peptide Q

L'interface et les interactions entre la molécule A et le peptide Q sont très similaires à celles qui existent entre la molécule B et le peptide P. L'interface de 498 Å², implique les mêmes résidus que pour la molécule B plus P63, E64, M100 mais n'implique pas les résidus F47 et V116.

Jusqu'au résidu G9, le peptide est parfaitement superposable au peptide P et présente les mêmes interactions que lui. Cependant le peptide Q compte dans sa partie N terminale un résidu visible de plus, l'arginine R3, qui établit des liaisons hydrogène avec les résidus N36 et Q32 d'une molécule symétrique. Le peptide Q présente également une conformation différente à son extrémité C terminale. En effet le site hydrophobe dans lequel se loge la leucine L10 du peptide P se trouve ici occupé par la valine V58 d'une molécule symétrique. Un changement de conformation de la glycine G9 permet à la chaîne Q d'obliquer à angle droit par rapport au chemin suivi par la chaîne P. La leucine L10 vient dans ce cas se stabiliser au contact d'une molécule symétrique. Cette dernière conformation ne reflète probablement pas une situation physiologique. Elle ne sera donc pas discutée en détail. Avec un gain d'énergie libre de solvatation ($\Delta G = -7,5$ kcal/mol) associé à la formation du complexe, le serveur PISA conclut que le complexe AQ est stable en solution.

B. Structure de BD2 en complexe avec plusieurs peptides acétylés.

Les premières structures de BD2 et du complexe BD2/H4-K12ac ont été obtenues par M. Soler dans le cadre d'un projet de cristallisation à haut débit. Le clone A12 issu de ce projet, codant pour les résidus 275 à 382, a ensuite été utilisé pour améliorer les cristaux du domaine en complexe avec le peptide H4-K12ac et pour les co-cristallisations de BD2 avec les peptides H4-K5ac, H4-K8ac, H4-K16ac, H3 tétra-acétylé et H3-K18ac [Tableau 15].

H4-K5ac	GRGK(ac)GGKG
H4-K8ac	GKGGK(ac)GLGK
H4-K12ac	KGLG(ac)GGAK
H4-K16ac	KGGAK(ac)RHRK
H3-tétra-acétylé	KQTARK(ac)STGGK(ac)APRK(ac)QLATK(ac)AARK
H3-K18ac	KAPRK(ac)QLATK

Tableau 15: Séquence des peptides utilisés pour les co-cristallisations

Seules les structures de BD2 en complexe avec les peptides H4-K12ac et H3-K18ac s'avèrent contenir le peptide et présenter pour lui une densité susceptible d'être interprétée. Nous présenterons dans ce chapitre la structure de BD2 en complexe avec H3-K18ac car c'est celle qui correspond le plus probablement au complexe physiologique. Nous n'avons en effet pas pu mesurer d'affinité entre BD2 et l'histone H4 en solution. La structure en complexe avec H4-acK12 sera décrite dans la discussion.

I. Cristallisation de BD2 en complexe avec des peptides H3 et H4

Le domaine BD2 seul ou en complexe avec un peptide acétylé cristallise dans de nombreuses conditions différentes. A chaque criblage des six fois 96 conditions de cristallisation, nous avons obtenu des cristaux dans une soixantaine de conditions sur lesquelles une dizaine ont permis d'obtenir des cristaux de taille satisfaisante. Les cristaux les plus prometteurs ont été cryogénisés dans l'azote liquide après un passage dans une solution de cryoprotection de composition identique

à la solution mère additionnée de 15 à 30 % de glycérol. Les cristaux choisis pour collecter ont été obtenus dans des conditions similaires, indiquées dans le tableau ci-dessous [Tableau 16].

Composition	Conc. (mg/mL)	Ratio prot:pep	Conditions de cristallisation	Photo n°
BD2	30		0.1 M Hepes pH 7.5 ; PEG 6000	
BD2+H4-K5ac	30	1:2	0,1 M Tris pH 8,5 ; 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 12% glycérol	3
BD2+H4-K8ac	30	1:2	0,1 M Tris pH 8,5 ; 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 12% glycérol	4
BD2+H4-K12ac	30	1:2	0.1 M Hepes pH 7.5 ; PEG 6000	1
BD2+H4-K16ac	25	1:5	0,1 M Tris pH 8,5 ; 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 12% glycérol	
BD2+H3 tétra-acétylé	30	1:5	0,1 M Tris pH 7,5 ; 1,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ;12% glycérol	
BD2+H3-K18ac	25	1:5	0,1 M Hepes pH 7,5 ; 2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ;2% PEG 400	2

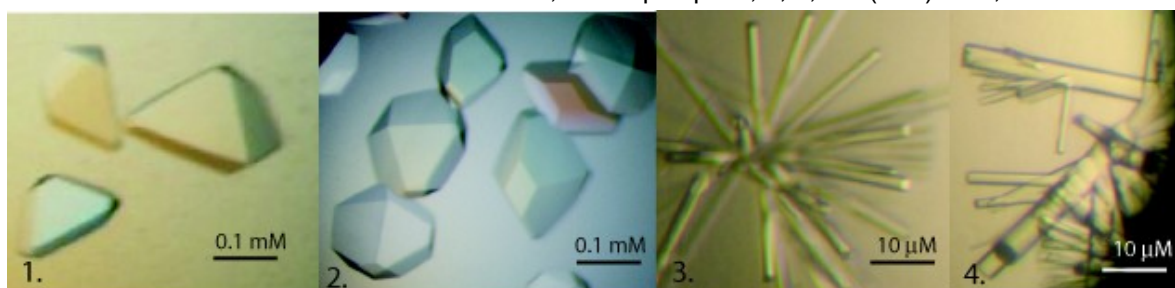


Tableau 16: Conditions de cristallisation de BD2 et de ses complexes

II. Résolution des structures de BD2 en complexe avec des peptides H3 et H4

Pour les structures en complexe avec les peptides H4-K5ac, H4-K8ac, H4-K12ac et H4-K16ac, l'intégration des données et la mise à l'échelle ont été réalisées avec les programmes Mosflm (Leslie, 2006) et Scala de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). Pour les structures en complexe avec H3-K18ac et H3 tétra-acétylé nous avons utilisé pour le traitement des données les programmes XDS et XSCALE (Kabsch W., 1993). Les groupes d'espace et les paramètres de maille des cristaux sont résumés dans le tableau ci-dessous [Tableau 17]. Les structures ont été déterminées par la technique du remplacement moléculaire avec le programme MolRep en utilisant comme modèle de départ la structure de BD2 sans ligand. A chaque fois, deux molécules par unité asymétrique ont été trouvées. A l'issue du remplacement moléculaire les modèles ont été affinés avec MolRep en considérant chaque monomère comme un corps rigide. Les cartes de densité atomique calculées à ce stade indiquent clairement la présence d'un peptide dans le

site de fixation de BD2 dans le cas des cristallisations avec les peptides H4-K12ac, H3 tétra-acétylé et H3-K18ac.

Dans le cas du complexe avec le peptide H3 tétra-acétylé, la résolution ne permet pas d'assigner la séquence du peptide qui occupe le site actif. En effet seuls 5 résidus sont visibles sur les 23 que compte le peptide. Mais si nous superposons cette densité à celle obtenue pour le complexe avec le peptide H3-K18ac il est facile de constater que celles-ci correspondent très probablement aux mêmes résidus. Cela confirme la préférence de BD2 pour une acétylation de l'histone H3 en position K18.

Dans le cas des co-cristallisations avec les peptides H4-K5ac, H4-K8ac et H4-K16ac, nous observons dans le site de fixation une densité atomique positive non continue mais celle-ci est réduite à ce qui correspondrait à la présence de la chaîne latérale de la lysine acétylée. Il pourrait aussi bien s'agir de molécules d'eau venant remplir la cavité hydrophobe du site de fixation. Le groupe d'espace de ces structures, identique à celui de la structure de BD2 sans ligand, et différent de celui des structures de BD2 contenant un peptide, semble indiquer que le peptide est absent.

Composition	Groupe d'espace	Paramètres de maille (Å, °)	Résolution (Å)
BD2	P3 ₂ 21	a=b=70,3 c=125,0 α=β=90 γ=120	2,5
BD2+H4acK5	P3 ₂ 21	a=b=70,3 c=124,8 α=β=90 γ=120	2,0
BD2+H4acK8	P3 ₂ 21	a=b=70,3 c=125,2 α=β=90 γ=120	2,0
BD2+H4acK12	P4 ₁ 2 ₁ 2	a=b=77,0 c=83,3 α=β= γ=90	2,2
BD2+H4acK16	P3 ₂ 21	a=b=70,5 c=124,9 α=β=90 γ=120	2,3
BD2+H3-4ac	P4 ₁ 2 ₁ 2	a=b=101,7 c=79,5 α=β= γ=90	3,5
BD2+H3acK18	P4 ₁ 2 ₁ 2	a=b=101,3 c=79,3 α=β= γ=90	2,1

Tableau 17: Principales caractéristiques des cristaux de BD2.

L'affinement de la géométrie et des facteurs B des modèles a été mené en utilisant le programme CNS (Brünger et al., 1998). Il a été réalisé en alternance avec les étapes de modifications manuelles en utilisant le programme COOT (Emsley et Cowtan, 2004), et complété par des étapes de dynamique moléculaire ou recuit simulé en utilisant le programme CNS. La géométrie a été vérifiée par le programme Procheck de la suite CCP4. Les statistiques de la collecte des données et de l'affinement des modèles de BD2 et de ses complexes avec les peptides H4-K12ac et H3-K18ac sont présentées dans le tableau ci-dessous [Tableau 18].

	BD2	BD2+H4-K12ac	BD2+H3-K18ac
Collecte des données			
Ligne à l'ESRF	ID14-eh4	ID13	ID23-eh1
Résolution globale (Å)	62,5-2,5	30,0-2,2	20,0-2,1
coquille externe (Å)	2,6-2,5	2,7-2,2	2,2-2,1
Complétude ¹ (%)	100(100)	99,4(99,5)	91,6(93,9)
Nb. de réflexions observées	76048(11050)	61460(8975)	233710(23939)
uniques	12906(1832)	1263(1760)	30338(2956)
Redondance	5,9(6,0)	5,0(5,1)	7,7 (8,0)
R _{sym} (%) ²	9,0(31,4)	8,9(42,2)	11,1(61,2)
I/σ(I) *	19,0(6,3)	14,5(3,8)	6,99(2,94)
Affinement du modèle			
R _{cryst} /R _{free} (%) ³ (reflections)	20,7/23,4	20,8/25,3	21,5 / 24,5
Nb. d'atomes de protéine	1983	1984	2041
d'eau	91	127	253
Rmsd longueur des liaisons(Å)	0,007	0,006	0,013
des angles (°)	1,20	1,15	1,35
Résidus dans le Ramachandran plot			
Plus favorable / autorisé (%)	90,4/9,6	94,8/5,2	93,6/6,4
¹ Les valeurs entre parenthèses sont celles de la coquille externe de résolution. ² $R_{sym} = \sum_{hkl} I_{hkl} - \langle I \rangle / \sum_{hkl} I_{hkl}$, où I_{hkl} est l'intensité mesurée pour la réflexion d'indices hkl et $\langle I \rangle$ est l'intensité moyenne des réflexions observées. ³ $R_{cryst} = \sum_{hkl} F_o - F_c / \sum_{hkl} F_o$, où F_o et F_c sont respectivement les amplitudes des facteurs de structure observés et calculés. <i>R_{free} est égal à R_{cryst} pour une portion sélectionnée aléatoirement de 5% des réflexions non utilisées pour l'affinement</i>			

Tableau 18: Statistiques des données cristallographiques.

III. Structure de BD2 en complexe avec le peptide H3-K18ac

a. Structure globale et arrangement dans l'unité asymétrique

Les deux molécules de l'unité asymétrique forment un dimère dont les sites de fixation se trouvent à l'opposé l'un de l'autre [Figure 39]. Chaque monomère lie un peptide H3-K18ac, représentés par les chaînes X et Y. Les deux molécules du dimère montrent un repliement parfaitement similaire, y compris dans les régions flexibles des boucles ZA et BC. Les monomères sont superposables avec un r.m.s.d (déviations moyennes) sur les 112 C α des résidus 265 à 376 égal à 0,35 Å et un r.m.s.d sur les 6 C α des résidus 16 à 21 des peptides X et Y égal à 0,30 Å. Le peptide Y présente à ses extrémités N et C terminales respectivement un et deux résidus supplémentaires définis par rapport au peptide X [Tableau 19].

Chaîne	Résidus
Protéine BD2	
A	258-381
B	265-376
Peptide H3-acK18	
X	15-21 APRK(ac)QLA
Y	14-23 AAPRK(ac)QLATA

Tableau 19: Résidus définis dans la structure du complexe BD2:H3-acK18

L'architecture de BD2 est celle d'un bromodomaine classique constitué des 4 hélices alpha principales [α Z (résidus 264-289), α A (res.318-326), α B (res.333-343), α C (res.352-368)] qui forment un bras rigide et de deux boucles ZA et BC qui forment le site de fixation du peptide. La longue boucle ZA (résidus 289-318) contient elle-même 3 hélices secondaires : α Z' (res.285-296), π D (res.300-304) et α A' (res.308-311). La boucle BC (résidus 343-352) est beaucoup plus courte.

Le calcul des potentiels électrostatiques existant à la surface de BD2 en appliquant la fonction de Amber à tous les atomes avec le programme APBS implémenté dans Pymol (W. L. DeLano., 2002) met en évidence une surface électronégative constituée par les résidus exposés allant de la seconde partie de la boucle ZA jusqu'au milieu de l'hélice α B. BD1 présente également une large région chargée positivement mais celle-ci concerne la surface de l'hélice α A et celle de la partie centrale des hélices α B et α C. Cette surface constitue l'interface entre les deux molécules du dimère dans les

cristaux de BD1 alors que dans le cas de BD2 l'interface du dimère apparaît peu chargée [Figure 40].

La superposition des structures de BD2, du complexe BD2/H3-K18ac et du complexe BD2/ H4-K12ac montre que seule la boucle ZA subit un changement de conformation suite à la fixation du peptide. Ces changements de conformation illustrent bien le rôle d'adaptation au substrat joué par la boucle ZA. En revanche, aucun changement ne survient dans la boucle BC suite à la fixation des peptides [Figure 41]. La flexibilité de la seconde partie de la boucle ZA est encore mise en évidence par l'examen des facteurs B de ses atomes, plus élevés que ceux des atomes de la boucle BC et du corps du bromodomaine [Figure 42] .

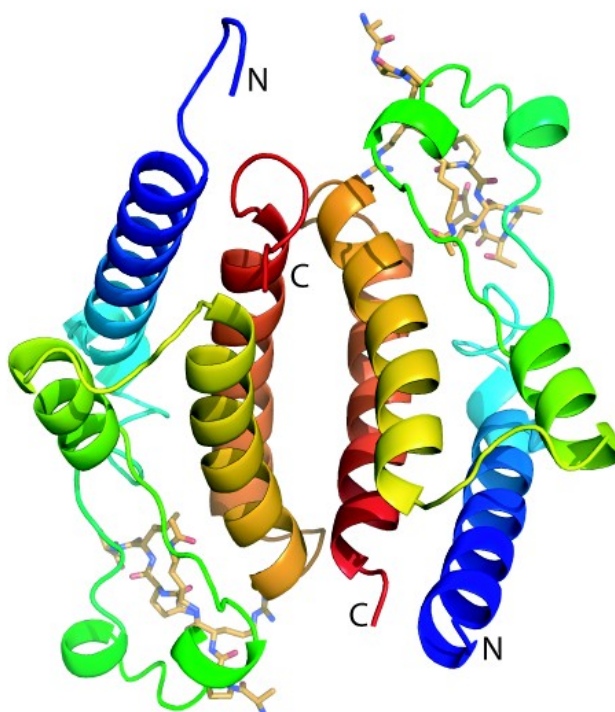


Figure 39: Dimère de BD2. Chaque molécule est colorée de la même façon par un dégradé de couleur.

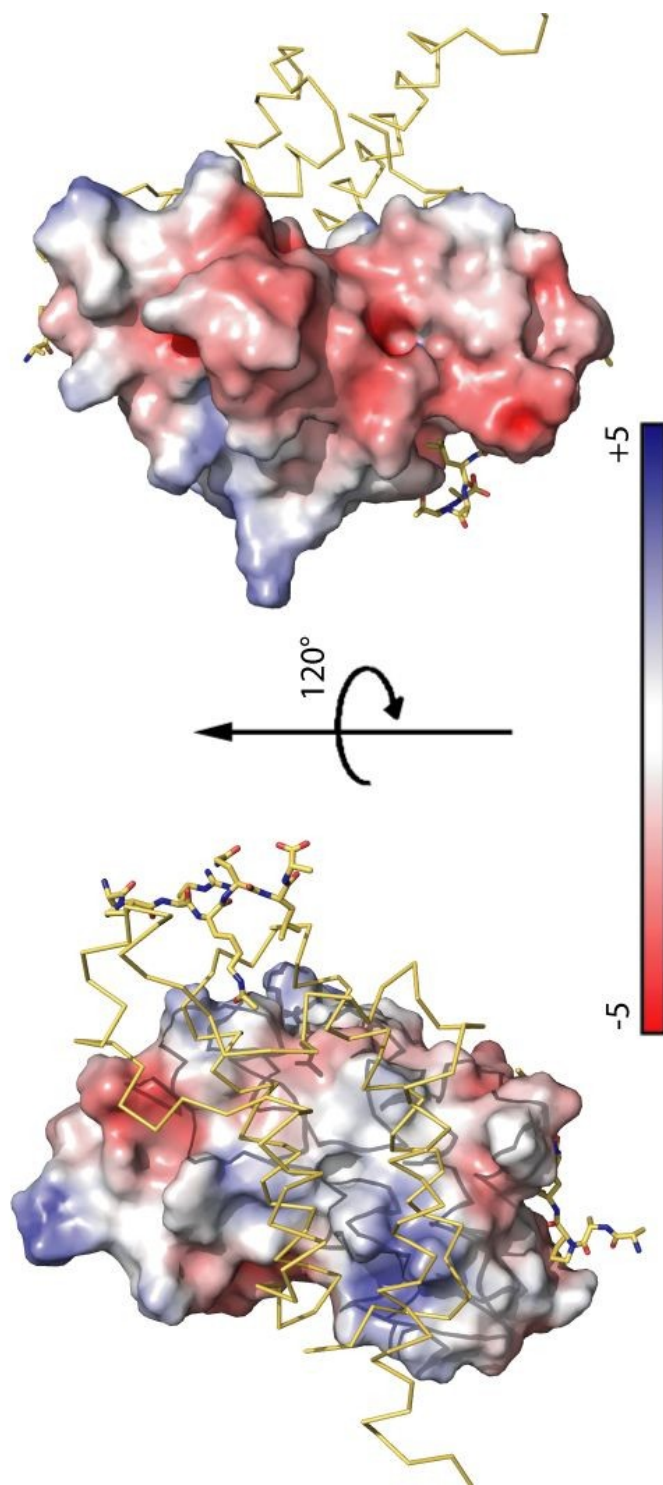


Figure 40: Représentation du potentiel électrostatique à la surface de BD2

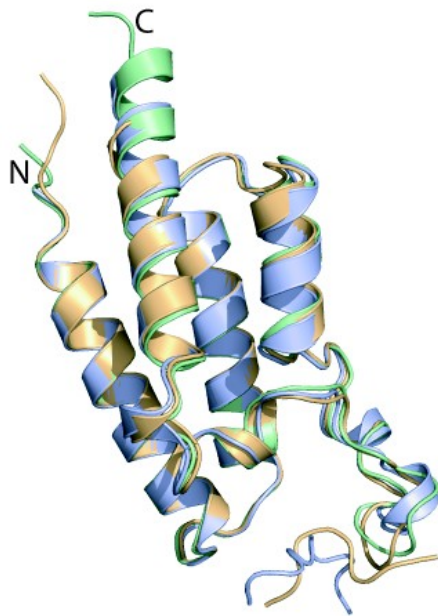


Figure 41: Superposition de la structure de BD2 (en vert), du complexe BD2/H3-K18ac (en bleu) et du complexe BD2/H4-K12ac

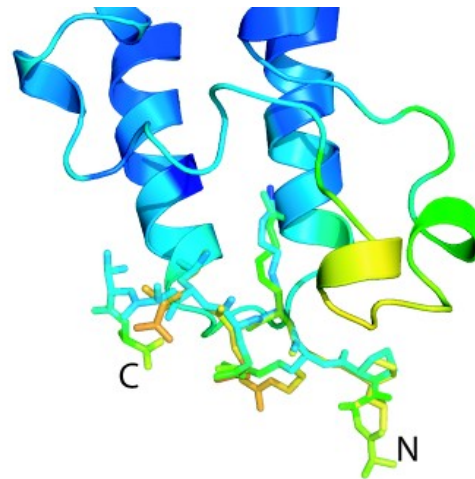


Figure 42: Complexe BD2/H3-K18ac: superposition des peptides H3-K18ac (chaînes X et Y) et boucle ZA. Du bleu au rouge les facteurs B vont du plus bas au plus élevé.

b. Interaction entre les deux molécules du dimère

Avec 933 \AA^2 , la surface d'interaction entre les deux molécules du dimère représente environ 13% de la surface totale de BD2. Elle est formée principalement par les résidus Y334, R341, L342, M345, Y348, K349, N351, P353, V358, R362, N365, D366, E369, L370, F372, A373, K374 et I375 des molécules A et B plus V311, V312, K313, N314 et N346 de la molécule B. L'interaction est stabilisée par 12 liaisons hydrogène et 4 ponts salins [Tableau 20]. Avec un gain d'énergie libre associé à la formation du dimère de $-5,5 \text{ kcal/M}$ le service PISA (Krissinel et Henrick, 2007) proposé par l'EBI conclut que le dimère ne doit pas être stable en solution. En accord avec cette prédiction, nous n'avons pas observé de dimérisation expérimentalement.

Liaisons hydrogène		
Molécule A	Dist. [Å]	Molécule B
LYS 349 [O]	2,6	LYS 374 [NZ]
ASN 351 [O]	3,5	LYS 374 [NZ]
ARG 362 [O]	2,9	ARG 362 [NH2]
ASP 366 [OD1]	2,4	ARG 362 [NE]
GLU 369 [OE2]	3,1	GLN 365 [NE2]
ALA 373 [O]	2,5	LYS 349 [NZ]
ILE 375 [O]	3,1	LYS 349 [NZ]
ASP 377 [O]	3,0	LYS 349 [NZ]
LYS 349 [NZ]	3,3	PRO 376 [OXT]
ARG 362 [NH1]	3,6	ASP 366 [O]
LYS 374 [NZ]	2,8	LYS 349 [O]
LYS 374 [NZ]	3,0	ASN 351 [O]

Ponts salins		
Molécule A	Dist. [Å]	Molécule B
ASP 366 [OD1]	2,39	ARG 362 [NE]
ASP 366 [OD1]	2,82	ARG 362 [NH2]
LYS 349 [NZ]	3,29	PRO 376 [OXT]
ARG 362 [NE]	3,92	ASP 366 [OD2]

Tableau 20: Liaisons hydrogène et ioniques entre les molécules A et B

c. Interaction entre BD2 et le peptide H3-K18ac

Bien que nous observions pour les chaînes latérales des résidus R17 et acK18 des rotamères différents, l'interaction entre la molécule A et le peptide X est tout à fait similaire à celle qui existe entre la molécule B et le peptide Y [Figure 41]. Le peptide Y présente à ses extrémités N et C terminales respectivement un et deux résidus définis supplémentaires par rapport au peptide X et des facteurs B plus bas. C'est pourquoi nous allons utiliser le modèle du complexe que forment les molécules B et Y pour discuter de l'interaction de BD2 et de H3-acK18.

Avec environ 560 Å², la surface d'interaction de BD2 et du peptide H3-K18ac représente 43 % de la surface totale accessible au solvant du peptide et 7% de celle de BD2. Elle est formée sur BD2 par les résidus W292, P293, F294, V298, L303, G304, L305, H306, N307 et Y308 de la boucle ZA, M343 et C347 de l'hélice αA, Y350, N351, P352, D354, H355, G356 et V357 de la boucle BC et M360 de la boucle αC et par l'ensemble des résidus du peptide excepté par l'alanine A15.

Le peptide est stabilisé par 4 liaisons hydrogène, un pont salin [Tableau 21] et plusieurs interactions hydrophobes. Avec un gain d'énergie libre de solvatation égal à - 8,3 kcal/M le service PISA (Krissinel and Henrick, 2007) prédit que le dimère doit être stable en solution.

Liaisons hydrogène		
BD2 (chaîne B)	Dist. [Å]	H3-acK18 (chaîne Y)
ASP 354 [OD1]	3,1	ARG 17 [NH2]
TYR 350 [OH]	3,6	PRO 16 [O]
ASN 351 [ND2]	2,9	ALY 18 [OH]
HIS 355 [NE2]	2,7	ALY 18 [O]
Pont salin		
ASP 354 [OD1]	3,1	ARG 17 [NH2]

Tableau 21: Liaisons polaires et ioniques entre le peptide H3-acK18 et BD2

La chaîne latérale de la lysine acétylée acK18 s'engage dans la cavité hydrophobe du site de fixation formée à cet endroit par les résidus P293, F294, N296, P297, V298, Y300 L303, L305, Y308, N351, V357. Une liaison hydrogène s'établit entre le groupe carbonyle du groupement acétyle porté par la lysine acK18 et l'amine de l'asparagine N351. La partie profonde de la cavité est occupée par un réseau de liaisons hydrogène très comparable à celui observé dans le site de fixation de BD1. Il implique l'amine et le carbonyle de la chaîne latérale de la lysine acétylée, l'hydroxyle de Y308, l'amine de N346 et les chaînes principales des résidus P293, N296, V298, M316 et M343 bordant la cavité [Figure 43]. Les résidus P297, Y309, I312, P315 et D317 participent également à la constitution de la partie profonde de la cavité.

A la surface du site de fixation, par son extrémité N terminale, le peptide établit une interaction hydrophobe entre le cycle de la proline P16 et le cycle de l'histidine H306 [Figure 44]. Le carboxyle de la chaîne principale de la proline P16 participe ensuite à un réseau de liaisons hydrogène via une molécule d'eau avec les chaînes latérales de l'asparagine N307 et de la tyrosine Y350. Dans la partie centrale du peptide, l'asparagine R17 établit une interaction ionique avec le groupe acide de l'aspartate D354. La chaîne principale de la lysine acétylée acK18 établit des liaisons polaires par son carboxyle avec l'histidine H355 et par son amine via une molécule d'eau avec l'asparagine N351. La glutamine Q19 n'établit aucun contact avec BD2. La leucine L20 se place dans un site hydrophobe constitué par les résidus W292, P293, E356, V357, M360. L'alanine A21 et la thréonine T22 se placent en regard de la surface hydrophobe formée par la phénylalanine W292 et la méthionine M360 [Figure 44].

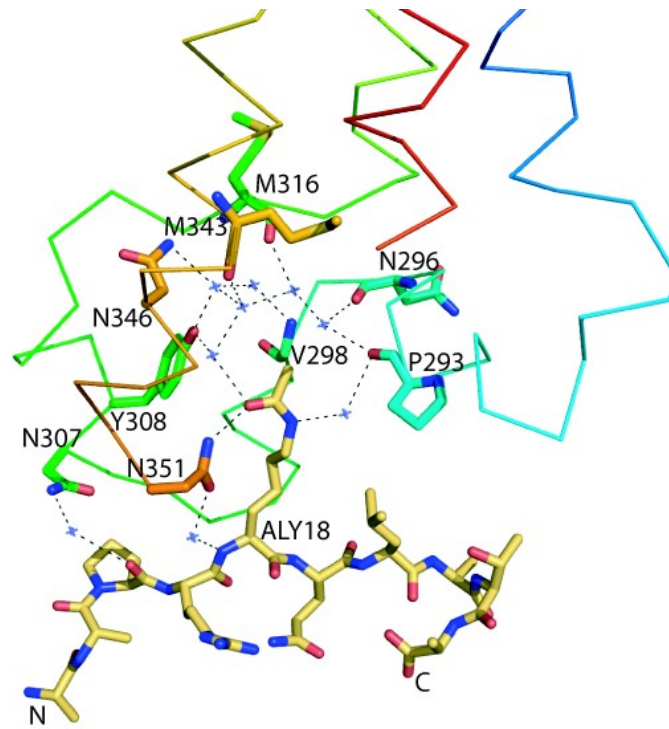


Figure 43: Liaisons hydrogène stabilisant l'interaction de BD2 dans la cavité du site de fixation

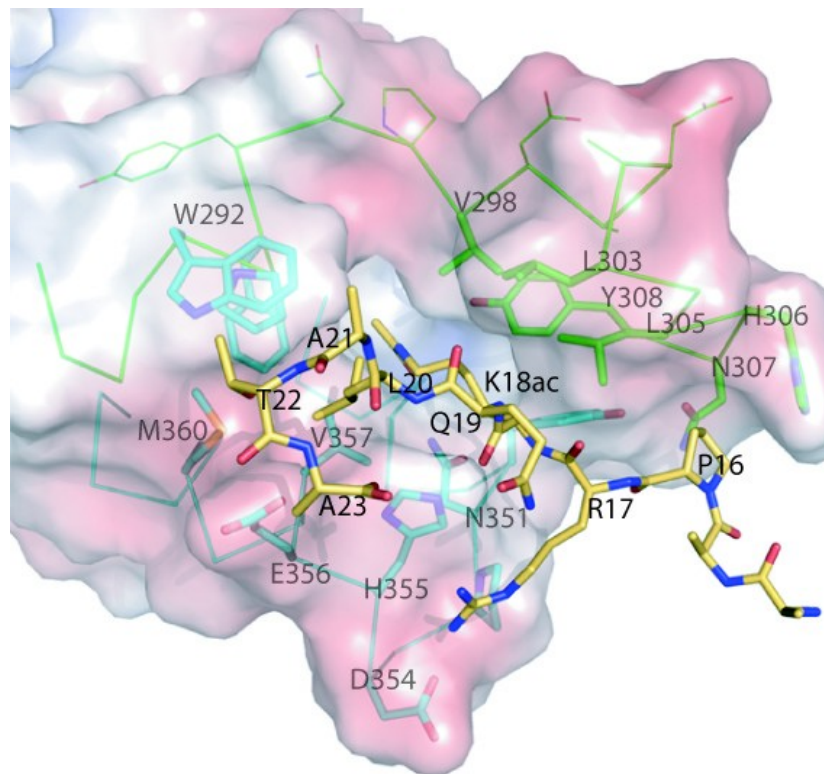


Figure 44: Surface du site de fixation de BD2 colorée selon son potentiel électrostatique et peptide H3-acK18

C. Analyse des structures tridimensionnelles des bromodomaines de Brdt

I. Des structures de bromodomaine canoniques

La structure générale de BD1 est tout à fait comparable à celle de BD2 et à celle des bromodomaines pour lesquels nous disposons d'une structure [Tableau 22]. Les principales variations sont, comme attendu, localisées dans les boucles ZA et BC [Figure 45].

On remarque notamment une insertion importante dans la boucle ZA du second bromodomaine de Rsc4.

Protéine	yGcn5	hPCAF	hCBP	hTAFII250	yRsc4	hBrg1	hBrd7
PDB	1E6I	2RNX	2RNY	1EQF	2ROV	2GRC	2I7K
Protéine	Brd3-BD1	Brd3-BD2	Brd4-BD1	Brd4-BD2	Brd2-BD2	Brd2-BD1	
PDB	2NXB	2OOS	2OSS	2OUO	2DVV	2DVQ	

Tableau 22: Principales structures de bromodomaines connues utilisées pour la superposition.

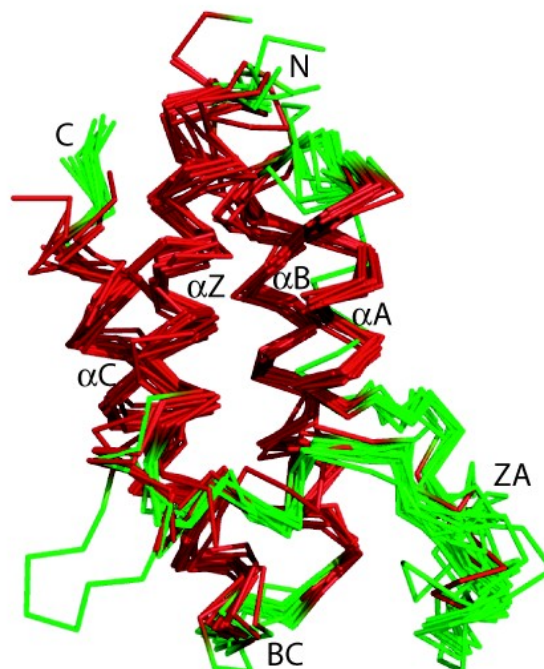


Figure 45: Superposition des structures de bromodomaines connues.

II. Interactions avec le peptide acétylé

Nous avons observé que les sites de fixation des peptides sont constitués d'une cavité hydrophobe qui constitue le site de fixation de l'acK5 de H4 et de l'acK18 de H3, d'un site hydrophobe secondaire dans lequel se place l'acK8 de H4 et la leucine L20 de H3, et de résidus de surface qui entrent en interaction avec les résidus adjacents aux lysines acétylées.

a. L'interaction avec l'acétyl-lysine qui occupe la cavité principale est très conservée

La cavité du site de fixation est observée chez tous les bromodomaines dont la structure a été résolue. Les résidus F51, Y65, P72, N103 et N108 de BD1 et leurs équivalents chez les autres bromodomaines sont essentiels à la constitution de la cavité et sont conservés à l'identique.

La lysine acétylée y occupe une position similaire dans les complexes Brdt-BD1/H4-K5K8ac, Brdt-BD2/H3-K18ac, Brdt-BD2/H4-K12ac, Gcn5/H4-K16ac (Owen et al., 2000), Rsc4-BD1/Rsc4-K25ac (acK25 en CIS) (VanDemark et al., 2007), Brd2-BD1/H4-K12ac [PDB:2DVQ] [Figure 46]. Par contre la position de la lysine acétylée est différente dans les complexes PCAF/Tat (Mujtaba et al., 2002) et CBP/ P53 (Mujtaba et al., 2004).

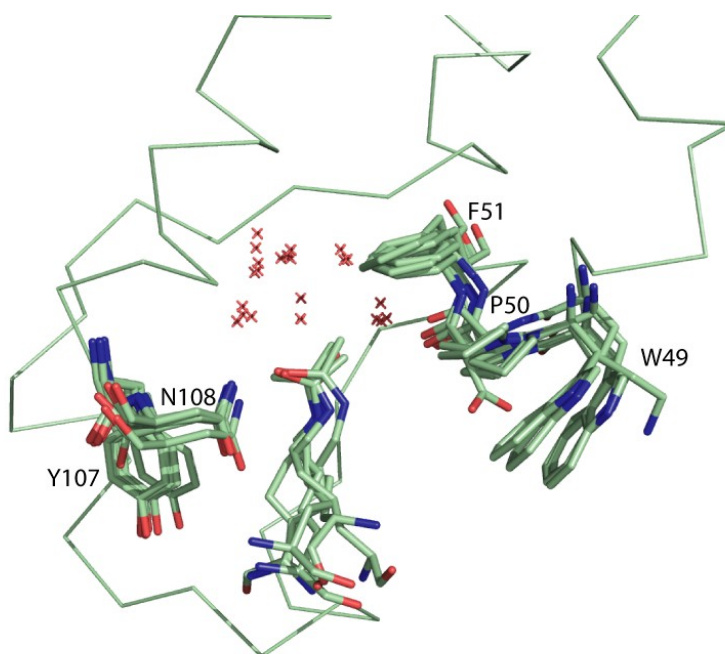


Figure 46: Superposition des lysines acétylées, de certains résidus conservés de la cavité et des molécules d'eau conservées pour les complexes *Brdt-BD1/H4-acK5/K8*, *Brdt-BD2/H3-acK18*, *Brdt-BD2/H4acK12*, *gcn5/H4acK16*, *Rsc4-BD1acK25*, et *Brd2-BD1/H4acK12*

La liaison hydrogène qui s'établit entre le groupe carbonyle de l'acétyle de la lysine et une asparagine de la cavité (N108 chez BD1) est conservée chez l'ensemble de ces complexes sauf pour Rsc4-BD1/Rsc4-K25ac (à cause de la position en CIS de l'acK25), CBP/P53 et PCAF/Tat.

L'asparagine impliquée dans cette liaison est conservée chez environ 86 % des séquences disponibles dans les banques de données (y compris chez les bromodomains de CBP et PCAF). Récemment les auteurs des complexes CBP/ P53 et PCAF/Tat ont publié de nouveaux résultats qui montrent l'existence de cette liaison hydrogène pour des complexes de CBP et PCAF avec des queues des histones H3 et H4 acétylées (Zeng et al., 2008). Il semble donc que cette liaison hydrogène soit conservée, du moins chez les bromodomains qui possèdent l'asparagine équivalente à N108 de Brdt-BD1.

Le réseau de liaisons hydrogène qui occupe le fond de la cavité et participe à la stabilisation de la lysine acétylée est lui aussi conservé chez Brdt-BD1/H4-K5K8ac, Brdt-BD2/H3-K18ac, Brdt-BD2/H4-K12ac, Gcn5/H4-K16ac et les récents complexes de PCAF et CBP.

b. Un nouveau mode de reconnaissance d'une double acétylation par un unique bromodomaine

Nos avons montré que Brdt-BD1 a besoin pour établir une interaction significative de la présence d'une di-acétylation de la queue H4. L'affinité de BD1 pour les peptides H4 di-acétylés diminue avec l'allongement de la région qui sépare les deux lysines acétylées ($K5/K8=22 \mu\text{M} > K12/K16=116 \mu\text{M} \approx K8/K12=192 \mu\text{M} > K5/K12=340 \mu\text{M} > K8/K16 > 10^3 \mu\text{M}$). Nous avons déterminé la structure cristallographique de BD1 en complexe avec le peptide H4-K5K8ac. Celle-ci révèle un mode nouveau de reconnaissance entre un bromodomaine et un peptide acétylé. Dans cette structure, les deux lysines acétylées K5ac et K8ac s'enfouissent dans la même cavité hydrophobe du site de fixation. Il est possible que l'éloignement des lysines acétylées joue un rôle important dans la diminution de l'affinité mesurée pour les autres peptides di-acétylés. L'enfouissement de la seconde lysine acétylée pourrait devenir difficile, voir impossible quand la longueur de la région qui sépare les deux acétyl-lysine augmente. Ainsi, la façon dont l'interaction avec un peptide di-acétylé sur les lysines 5 et 12 peut se faire n'est pas évidente à déduire de la structure en complexe avec H4-K5K8ac. Il semble difficile que le peptide puisse adopter une conformation qui permette aux deux acétyl-lysines, séparées par 6 résidus, de se placer dans le site hydrophobe de façon comparable aux acétyl-lysines 5 et 8 qui ont seulement 2 glycines entre elles.

c. Des interactions variables avec le reste du peptide

Le peptide H4-K16ac présente une surface complémentaire à celle du sillon que forme le site de fixation du bromodomaine de Gcn5 mais sa chaîne principale établit une seule liaison hydrogène directe avec la protéine. La spécificité pour la séquence adjacente à la lysine acétylée vient de la liaison des chaînes latérales des résidus en K+2 (R17) et K+3 (H18) par rapport à la lysine acétylée (Hudson et al., 2000).

L'étude des structures de PCAF et CBP en complexe avec des peptides acétylés H3 et H4 permet aux auteurs de prédire que les peptides qui seront reconnus avec la meilleure affinité par PCAF sont ceux qui présentent un résidu hydrophobe en K+2 et un résidu chargé ou aromatique en K+3 alors que ceux reconnus préférentiellement par CBP devront avoir un résidu hydrophobe en K+1 et K+2, un résidu chargé positivement en K-1, et un résidu aromatique en K-2 (Mujtaba et al., 2007; Zeng et al., 2008).

Nous avons vu que Brdt-BD1 interagit principalement avec les résidus en K+3 (AcK8) et K+5 (L10) et que Brdt-BD2 établit ses interactions principales avec le peptide en K-2 (P16), K-1 (R17), et K+2 (L20).

Dans ces cinq cas, les résidus du peptide qui sont reconnus entourent la lysine acétylée, s'éloignant d'elle au plus de cinq acides-aminés. La reconnaissance implique les boucles ZA et BC (de séquences très variables) sans qu'il soit possible de dégager une position préférentiellement impliquée dans l'interaction avec le peptide. La flexibilité de ces boucles permet probablement à chaque bromodomaine de s'adapter à son substrat.

d. Un chemin similaire à la surface du site

Pour autant les chemins suivis par les peptides H4-K5K8ac, H3-K18ac, H4-K16ac et Rsc4-K25ac à la surface de leurs sites de fixation sont comparables. Ils empruntent tous un sillon principalement formé par l'asparagine très conservée (qui forme avec la lysine acétylée une liaison hydrogène) et par le résidu qui la précède (le plus souvent une tyrosine : chez Brdt-BD1, Brdt-BD2, yGcn5, yRsc4-BD1 ou une phénylalanine : chez yRsc4-BD2 par exemple). L'orientation de la chaîne peptidique de H4-K5K8ac, celle de H3-K18ac et celle de Brd2-BD1/H4-K12ac [PDB:2DVQ] sont les mêmes, elle est opposée à celle des peptides H4-K16ac et Rsc4-K25ac [Figure 47]. Le peptide H4-K12ac dans la structure en complexe avec Brdt-BD2 emprunte un chemin perpendiculaire par rapport à celui que nous venons de décrire. Ce peptide ne présentait pas pour BD2 d'affinité

mesurable par ITC. Il est probable que ce chemin alternatif soit dû à une affinité très basse pour BD2. La lysine acétylée acK12 se place de façon similaire aux autres lysines acétylées mais le reste de la chaîne est très peu stabilisé par le bromodomaine. Il est probable que ce chemin alternatif soit dû à une interaction non spécifique avec le bromodomaine. De même le peptide H4-K20ac qui est considéré comme non spécifique car il présente pour P/CAF une affinité faible par rapport à d'autres peptides (Zeng et al., 2008) ne passe pas dans le sillon de l'asparagine conservée.

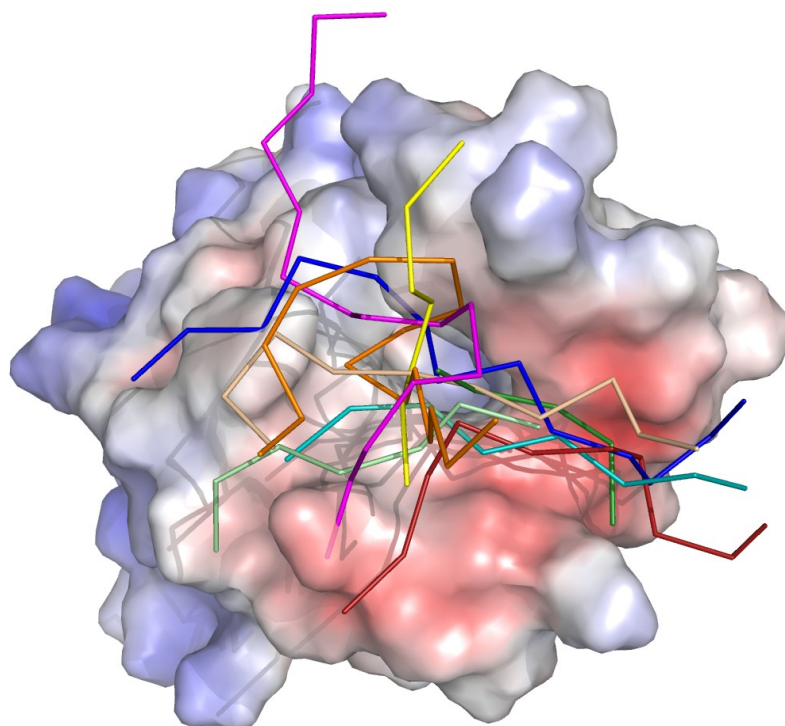


Figure 47: Chemin suivi à la surface de Brdt-BD1 par les peptides des structures de Brdt-BD1/H4-acK5/K8 (vert clair), Brdt-BD2/H3-acK18 (beige), gcn5/ H4acK16 (vert foncé), Brd2-BD1/H4acK12 (rouge), Rsc4acK25 (bleu clair) et Brdt-BD2/H4acK12 (jaune), PCAF/H3K9ac (rose), PCAF/H3K36 (bleu foncé), CBP/H4K20 (orange)

III. Particularités de l'interaction de BD1 et du peptide H4-K5K8ac

a. La cavité hydrophobe

Les résidus P50, F51, V55, L60, L62, Y65, Y107, N108, I114 de BD1 constituent la cavité du site de fixation occupé par l'acK5. Excepté la leucine L60 et l'isoleucine I114, ils sont conservés (identiques ou similaires) parmi les bromodomaines de structure connue [Figure 49]. La leucine L60 appartient à une l'insertion de 2 acides-aminés, commune aux protéines de la famille BET et aux bromodomaines de CBP et P300 mais absente des bromodomaines de Gcn5, Rsc4, TafII250, PCAF, Brg1, Brd7 et ACF1. La présence ce cette insertion a pour effet de resserrer l'entrée de la cavité.

b. Le second site hydrophobe

L'isoleucine I114 se trouve sur le côté opposé de la cavité et constitue principalement la surface du site de fixation de la seconde lysine acétylée acK8. A cette position on trouve soit une isoleucine (BD1 des protéines BET, Rsc4-BD1, Rsc4-BD2, Brg1 et ACF1), soit une valine (BD2 des protéines BET, hCBP, hP300) soit une leucine (hTAFII250-BD1) soit une tyrosine (hTAFII250-BD2, yGcn5, hPCAF, hBrd7).

La substitution de l'isoleucine par une leucine ou une valine ne provoque pas de changement important ni du relief ni du potentiel électrostatique de la surface. Par contre, la substitution du résidu par une tyrosine provoque un encombrement stérique important. La superposition des structures de Brdt-BD1 en complexe avec le peptide H4-K5K8ac et de celle du bromodomaine de Gcn5 [PDB:1E6I] qui présente une tyrosine à cette position montre que la fixation de la première lysine acétylée n'est pas gênée mais que celle de la seconde lysine acétylée devient impossible [Figure 48]. Les autres résidus (W49 et M117) qui constituent le site de l'acK8 sont variables sauf chez les bromodomaines BD1 et BD2 de la famille BET.

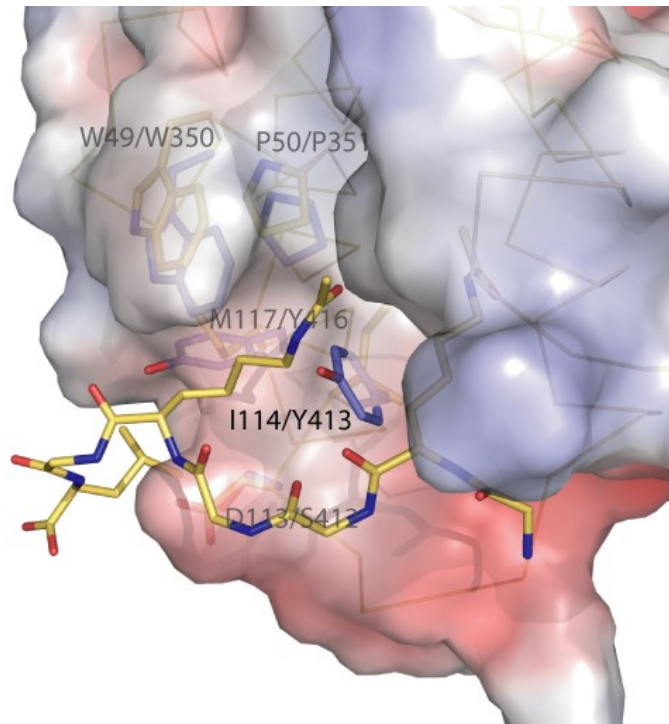


Figure 48: Surface de Brdt-BD1 et peptide H4acK5,K8. Résidus qui forment le site hydrophobe de la seconde lysine acétylée (en jaune) et résidus correspondants de γ Gcn5 [PDB:1E6I] (en bleu).

c. Le sillon du peptide

Les résidus qui forment la couronne électropositive et ceux qui forment le site hydrophobe de la leucine L10 sont variables chez les bromodomaines étudiés sauf au sein des domaines BD1 des protéines de la famille BET chez qui les principaux résidus impliqués dans l'interaction avec le peptide H4-K5K8ac sont conservés. De plus aucune des variations de séquence entre ces bromodomaines ne semble pouvoir affecter la liaison du peptide soit parce que le résidu est trop éloigné du site soit parce qu'il s'agit d'un remplacement par un résidu de même nature. La seule variation de séquence touchant un résidu situé à proximité du site de fixation (mais qui n'établit pas d'interaction avec le peptide) se trouve à la position G111. Ce résidu est situé dans la boucle BC, nous allons voir l'importance de celle-ci pour l'établissement de la différence de spécificité entre Brdt-BD1 et Brdt-BD2. On trouve à cette position une thréonine chez Brd2-BD1 et Brd3-BD1 et une glycine chez Brd4-BD1.

IV. Particularités de l'interaction de BD2 et du peptide H3K18ac

Comme pour BD1, les principaux résidus qui constituent le site de fixation de l'acK18 sont conservés chez l'ensemble des bromodomains de structure connue, à l'exception de la leucine L303 et de la valine V357. Ces deux résidus sont variables sauf chez les domaines BD2 des protéines de la famille BET. Il s'agit de la leucine L303 qui appartient à l'insertion de la boucle ZA caractéristique de la famille BET et de la valine V357 qui constitue le second site hydrophobe du site de fixation.

Les résidus impliqués dans l'interaction avec le reste du peptide - en particulier l'aspartate D357 qui établit une liaison ionique avec la chaîne latérale de l'arginine R17 - sont variables, sauf chez les domaines BD2 de Brd2, Brd3 et Brd4. Au sein des domaines BD2 des protéines de la famille BET, les principaux résidus impliqués dans l'interaction avec le peptide H3-K18ac sont conservés à l'identique. On note deux positions qui subissent un changement dont une est située dans la boucle BC. A cette position, le glutamate E355 de Brdt-BD2 est substitué par un aspartate chez Brd2 alors que le glutamate est conservé chez Brd3 et Brd4. Il est donc probable que la spécificité de Brdt-BD2 vis à vis du peptide H3-K18ac soit conservée au moins chez Brd3 et Brd4. En accord avec cela, il a été montré que Brd2 ne présente pas d'affinité pour l'histone H3 acétylée (Kanno et al., 2004) alors que Brd4 reconnaît le peptide H3-K9/K14ac avec une affinité similaire au peptide H4-K5/K12ac (Dey et al., 2003 ; Liu et al., 2008).

Partie IV:

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

A. Importance du premier bromodomaine de Brdt

I. Brdt reconnaît l'histone H4 via son premier bromodomaine

Nous avons montré que l'affinité du premier bromodomaine de Brdt pour une queue N terminale synthétique de l'histone H4 tétra-acétylée est quasiment aussi forte que celle de l'ensemble de la partie N terminale de Brdt (δ C-Brdt) contenant les deux bromodomains et leurs régions adjacentes (respectivement 11,4 μ M et 28 μ M). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pivot-Pajot et ses collègues, qui montrent que δ C-Brdt est co-purifié avec un peptide H4 tétra-acétylé mais que la co-purification n'a pas lieu si BD1 est inactivé (Pivot-Pajot et al., 2003). Confortant la spécificité de BD1 pour la queue H4, le domaine n'a pas montré d'affinité pour un peptide mimant la queue N terminale de l'histone H3 tétra-acétylée. La constante de dissociation pour la liaison du peptide H4 tétra-acétylé est comparable à celle déterminée pour la liaison du double bromodomaine de TAFII250 pour différents peptides H4 acétylés ou à celle du double bromodomaine de Bdf1 pour les peptides H4 tétra-acétylés et H3-K14ac/K18ac [Tableau 23]. Ainsi Brdt et Bdf1 qui sont homologues et appartiennent tout les deux à la famille des protéines BET, pourraient avoir la même spécificité. Cependant, dans leur étude, A. Ladurner et ses collègues déterminent l'affinité de la protéine entière mais non celles des domaines BD1 et BD2 de façon indépendante.

Protéine	Peptide	Affinité (Kd)	Référence
TAFII250	H4 tétra-acétylé	5,3 +/- 0,2 μ M	(Jacobson et al., 2000)
	H4-acK5,12	1,4 +/- 0,3 μ M	
	H4-acK5,16	5,6 +/- 0,2 μ M	
	H4-acK16	39 +/- 7 μ M	
Bdf1	H4 tétra-acétylé	8,4 +/- 0,2 μ M	(Ladurner et al., 2003)
	H3-acK14/K18	~14 μ M	

Tableau 23: Affinités comparables à celles de Brdt-BD1

Nos résultats confirment l'association de Brdt et de l'histone H4 acétylée observé in-vivo par J. Govin et ses collègues. Ceux-ci ont montré que dans les spermatides la chromatine subit, avant sa compaction, une vague d'acétylation qui touche les histones H4 (sur les lysines 5,8 et 12) et H2A et que Brdt est associé à ces régions hyperacétylées (Govin et al., 2006). L'importance de BD1 est encore mise en évidence par une étude qui montre que dans une souris dont seul le premier bromodomaine a été inactivé, le nombre des spermatides dont la chromatine est condensée chute considérablement et que leur morphologie est sévèrement altérée (Shang et al., 2007).

II. Brdt-BD1 reconnaît spécifiquement le motif di-acétylé K5/K8ac de H4

Nous avons identifié les déterminants nécessaires et suffisants à la reconnaissance du peptide H4 tétra-acétylé par Brdt-BD1. Nos résultats montrent que BD1 a besoin, pour établir une interaction significative, de la présence d'une di-acétylation de la queue H4 et qu'il ne montre pas d'affinité comparable pour les peptides H4 mono-acétylés. BD1 reconnaît préférentiellement la di-acétylation des lysines K5/K8 de H4 avec une affinité qui souligne la spécificité de l'interaction. Ces résultats sont cohérents avec l'état hyperacétylé de l'histone H4 dans les spermatides allongés et la détection majoritaire de l'acétylation des lysines 5, 8 et 12 (Govin et al., 2006).

B. Le second bromodomaine de Brdt reconnaît la modification H3K18ac

Le second bromodomaine de Brdt présente une affinité pour la queue de l'histone H3 tétra-acétylée ($K_d = 214 \mu\text{M}$) et ne montre pas d'affinité significative pour la queue H4 acétylée. Bien que dix fois plus faible que celle de BD1 pour la queue H4, cette affinité a pu être mesurée pour plusieurs peptides différents portant une acétylation de la lysine K18. Une seule acétylation est suffisante pour induire une reconnaissance similaire à celle observée pour le peptide H3 tétra-acétylé. L'affinité observée est comparable à celle du bromodomaine de Gcn5 pour différents peptides mono-acétylés ($K_d \sim 900 \mu\text{M}$) (Hudson et al., 2000), à celle de P/CAF pour H4-K8ac ($K_d = 346 \mu\text{M}$) (Dhalluin et al., 1999) ou à celles mesurées entre les bromodomains de CBP et P/CAF et différents peptides H3 et H4 mono-acétylés (K_d entre 128 et 402 μM) (Zeng and Zhou, 2008). L'affinité de Brdt pour un peptide H3 acétylé est partagée par Brd4 (Dey et al., 2003) et

Bdf1. Ce dernier montre une forte affinité pour un peptide di-acétylé sur les lysines K14 et K18 ($K_d \sim 14 \mu\text{M}$) (Ladurner et al., 2003). Soulignant encore une fois la différence fonctionnelle entre Brdt et Brd2, Brd2 ne présente pas d'affinité pour la queue H3 (Kanno et al., 2004). Compte tenu de l'affinité relativement faible de Brdt-BD2 pour H3K18ac, nous pouvons envisager que ce ne soit pas là son substrat le plus important du point de vue physiologique. Cependant la sélectivité de l'interaction pour la lysine acétylée H3K18ac indique que BD2 reconnaît préférentiellement cette région. Nous verrons comment la structure tridimensionnelle du complexe BD2/H3-K18ac peut aider à définir les déterminants de cette sélectivité.

C. Comparaison des affinités de Brdt avec celles des autres protéines de la famille BET

Nous avons vu au chapitre précédent que la conservation des séquences des domaines BD1 de la famille BET est telle que, si le mode de fixation des peptides était identique, il est très probable que la capacité de fixer le peptide H4-K5K8ac observée pour Brdt soit conservée. Des études concernant les protéines Brd2, Brd3, Brd4, Bdf1 et Bdf2 montrent d'ailleurs que la reconnaissance de l'histone H4 est probablement un caractère commun à toutes les protéines de la famille BET (voir l'introduction). Cependant les lysines acétylées précisément reconnues par chacun des bromodomains de Brd3, Brd4, Bdf1 et Bdf2 restent à identifier.

a. Brd4

De façon identique à Brdt, le domaine BD1 de Brd4 porte une glycine à l'une des deux positions variables de la boucle BC (voir le chapitre 3 des résultats). Une étude montre que Brd4 possède la capacité de fixer un peptide di-acétylé H4-K5K12ac mais pas H4-K12ac (le peptide H4-K5K8ac n'a pas été testé dans cette étude) (Dey et al., 2003). Ces affinités sont comparables à celles de Brdt puisque nous avons montré que bien qu'avec une affinité faible, le peptide H4-K5K12ac est également fixé par Brdt-BD1. Il est donc envisageable que Brd4-BD1 et Brdt-BD1 partagent la même spécificité.

b. Brd2

Le cas Brd2 est le mieux étudié. Il a été montré :

- i. in-vivo par FRET que la protéine reconnaît spécifiquement l'histone H4 acétylée sur la lysine K 12 et que l'inactivation de l'un de ses deux bromodomaine provoque la réduction du transfert de fluorescence observée pour la protéine sauvage de 50% environ (Kanno et al., 2004).
- ii. que son premier bromodomaine Brd2-BD1 forme in-vivo et in-vitro un dimère en solution et que l'intégrité de ce dimère conditionne la fixation du peptide H4-K12ac (Nakamura et al., 2007). Les auteurs de cette étude proposent que le site acide qui est formé à l'interface des deux molécules sert à fixer un résidu basique de la queue H4 (K8, K16 ou R17 par exemple) et que le dimère fixe peut-être les queues N terminales de deux histones H4.
- iii. que son second bromodomaine Brd2-BD2 reconnaît parmi les peptides H2B-K5ac, H4-K8ac et H4-K12ac préférentiellement H4-K12ac ($K_d \sim 2,9 \mu\text{M}$) et qu'il se trouve in-vitro sous forme monomérique en solution (Huang et al., 2007).
- iv. Plusieurs structures en complexe avec des peptides H4 acétylés sur la lysine 12 sont disponibles dans la PDB (PDB: 2DVQ, 2DVR, 2DVS). L'analyse de l'une d'elle, un complexe entre Brd2-BD1 et un peptide H4-K12ac dont les résidus 1 à 15 sont visibles [PDB:2DVQ] indique que le peptide prend à la surface du site un chemin légèrement différent de celui du peptide H4 dans le cas du complexe avec Brdt (comparer les peptides rouge et vert clair sur la Figure 47). Dans cette structure Brd2-BD1 forme un dimère qui fixe deux peptides H4-K12ac. Le premier peptide place sa lysine acétylée acK12 dans le site de fixation classique d'un des bromodomaine et sa lysine K8 se place effectivement dans le site acide formé à l'interface du dimère. Le site hydrophobe de la seconde molécule du dimère est occupé par la lysine acétylée K12ac du second peptide. Aucune liaison ionique ne s'établit entre le peptide H4-K12ac et Brd2-BD1. Le peptide est stabilisé par l'interaction hydrophobe de la lysine acétylée, des liaisons hydrogène avec la chaîne principale du peptide et avec la chaîne latérale de la lysine K8.

Nous avons essayé de savoir si un seul peptide di-acétylé en K5/K12 pouvait occuper ces trois sites. La distance entre le site de la lysine 8 et le second site de fixation est égal à environ 13 Å (mesure entre les C α des résidus K8 et K12ac). La distance entre les C α des résidus Kac5 et Kac8 du peptide H4-K5/K8ac dans la structure en complexe avec Brdt-BD1 est égale à 8,5 Å environ. La distance entre le site acide et le second site hydrophobe est donc un peu longue. Mais compte tenu

que la distance parcourue par la chaîne peptidique des résidus Kac5 à Kac8 est extensible en fonction de la conformation des glycines qui la composent et que le chemin suivi à la surface du dimère peut varier légèrement, il est envisageable que le dimère puisse fixer le peptide H4-K5/K12ac en enfouissant les deux lysines acétylées dans chacun de ses sites hydrophobes et la lysine K8 dans le site acide de l'interface.

Quoi qu'il en soit, il semble qu'il existe entre Brdt et Brd2 une différence de spécificité puisque Brd2 reconnaît spécifiquement le peptide mono-acétylé H4-K12ac alors que Brdt a besoin d'une double acétylation de l'histone H4. Il apparaît aussi que Brd2-BD1 forme un dimère en solution alors que nous avons montré que ce n'est pas le cas pour Brdt-BD1. Les différences importantes de fonction existant entre les deux protéines peuvent expliquer cela. Alors que Brd2 est exprimée dans tout les tissus, Brdt est exprimée spécifiquement dans les testicules (Shang et al., 2004). Brd2 est associée à l'euchromatine mais largement exclue de l'hétérochromatine (Crowley et al., 2002; Denis et al., 2000; Mattsson et al., 2002), au contraire Brdt s'associe avec l'hétérochromatine (Govin et al., 2006). Brd2 est capable d'activer la transcription de plusieurs promoteurs alors que Brdt intervient dans un phénomène de compaction de la chromatine (LeRoy et al., 2008; Pivot-Pajot et al., 2003). Il se pourrait aussi que la différence de spécificité observée s'explique par la différence des techniques utilisées (le FRET dans le cas Brd2 et l'ITC dans le cas de Brdt) et le fait que les peptides testés ne soient pas exactement les mêmes (par exemple le peptide H4-K5K8ac n'a pas été testé dans l'étude de Brd2).

D. Déterminants structuraux à l'origine de la spécificité des bromodomains de Brdt

I. Importance de la boucle BC

a. Analyse structurale par la comparaison des structures de BD1 et BD2

Nous avons observé pour BD1 un mode de liaison faisant intervenir la fixation de deux acétyl-lysines. La discrimination du peptide et le choix de H4 en particulier est principalement gouvernée par la capacité de la chaîne peptidique à établir des interactions hydrophobes par l'intermédiaire de la deuxième acétylation AcK8 (K+3) et de la leucine L10 (K+5). Dans le cas de BD2, la discrimination du peptide passe par une liaison ionique avec l'arginine R17 (K-1) et des interactions hydrophobes avec la leucine L20 (K+2), l'alanine 21 (K+3) et la thréonine T22 (K+4) mais aussi avec la proline P16 (K-2).

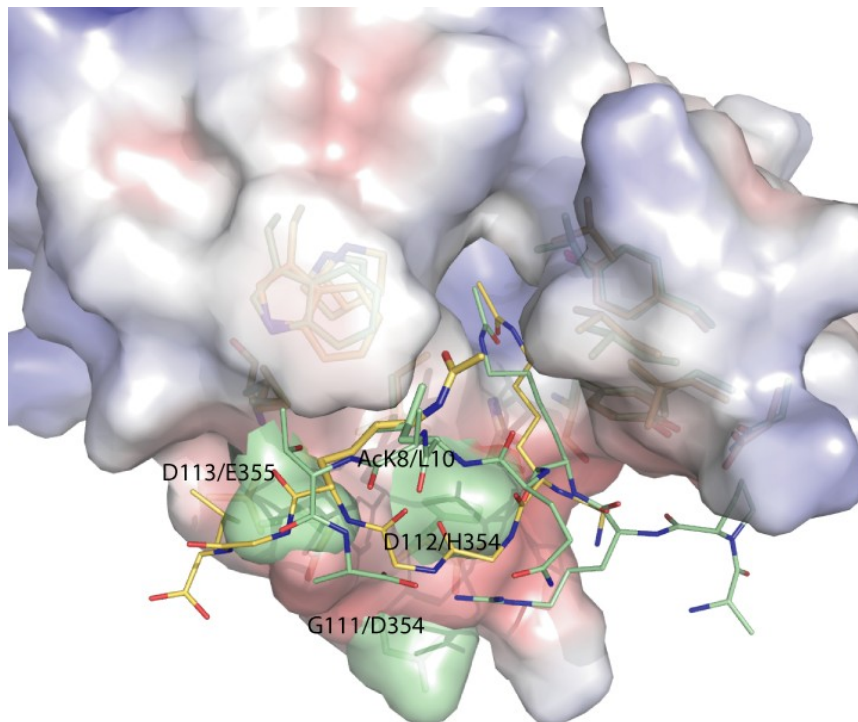


Figure 50: Surface de Brdt-BD1 et de Brdt-BD2 (en vert) et les peptides reconnus, respectivement H4-acK5,8 (en jaune) et H3-K18ac (en vert)

Pourtant la cavité principale ainsi que le site hydrophobe secondaire sont conservés chez BD1 et BD2. Les majeures différences entre les sites de fixation se réduisent à trois substitutions adjacentes portées par la boucle BC. Aux résidus G111, D112 et D113 de BD1 se substituent les résidus D354, E355 et H356 de BD2. Les acides D112 et D113 de BD1 (qui constituent une surface d'interaction pour la chaîne principale du peptide H4) sont remplacés par un glutamate et une histidine chez BD2. Cela entraîne un encombrement stérique qui empêcherait le passage de la chaîne du peptide H4. Dans le site de BD2, le peptide H3 emprunte ainsi un chemin plus en surface qui semble incompatible avec la fixation d'une seconde lysine acétylée [Figure 50].

Enfin, la substitution de l'aspartate D354 de BD2 par la glycine G111 chez BD1 fait que la liaison ionique qui existe entre l'arginine R17 du peptide H3 et le résidu D354 de BD2 ne pourrait s'établir dans le cas d'un complexe BD1/H3. Nous avons pourtant mesuré pour les domaines BD1 et BD2 des affinités comparables vis à vis du peptide H3 tetra-acétylé. Il est possible que BD1 compense la perte de la liaison ionique par sa capacité à fixer une seconde lysine acétylée.

b. Importance de la boucle BC pour la spécificité de BD1

Dans le but de vérifier l'importance des résidus de la boucle BC des bromodomains BD1 et BD2 pour la reconnaissance du ligand, nous avons conçu un mutant de la protéine BD1 (BD1^{mutBC}) dont la boucle BC (résidus K109, T110, G111, D112, D113 et I114) serait remplacée par celle de BD2 (résidus P352, P353, D354, H355, E356 et V357). Les affinités la protéine BD1^{mutBC} pour les peptides H4-K5ac, H4-K5K8ac et H3-K18ac ont été mesurées par ITC [Tableau 24]. Elles montrent que la sélectivité du mutant vis-à-vis de la diacétylation est réduite plus de 9 fois par rapport à celle du domaine BD1 (1010 /195 par rapport à >1000 /22). Ce qui représente une perte de fonction significative. Par ailleurs, l'affinité du mutant pour le peptide H3-K18ac est similaire à celle des domaines BD1 et BD2 sauvages (respectivement 360, 390 et 251 μ M). Nous n'avons pas déterminé l'affinité de BD1 le peptide H3-K18ac mono-acétylé mais il serait intéressant de le faire pour savoir si cela représente un gain de fonction pour BD1.

Peptide	BD1, Kd (μ M)	BD1 ^{mutBC} , Kd (μ M)
H4-K5ac	>1000	1010 +/- 50
H4-K5K8ac	22	195 +/- 3
H3-K18ac	n.d.	360 +/- 15

Tableau 24: Comparaison des affinités de BD1 et du mutant BD1^{mutBC}

c. Importance de la boucle BC in-vivo

S. Kochbin et ses collègues ont réalisé les mêmes mutations sur la protéine δ C-Brdt couplée à la GFP (δ C-Brdt-BD1mut2) et ont étudié par recouvrement de fluorescence après blanchiment (FRAP) sa mobilité dans un noyau dont la chromatine est hyperacétylée. On observe un recouvrement de fluorescence pour le mutant beaucoup plus rapide que pour la protéine sauvage [Figure 51]. Cette mobilité accrue indique que l'association du mutant à la chromatine est fortement diminuée et confirme l'importance de la boucle BC de BD1 pour la fixation de la chromatine hyperacétylée.

Manip 964 22/02/08

+TSA
65 sec / 1 image toutes les 2 sec

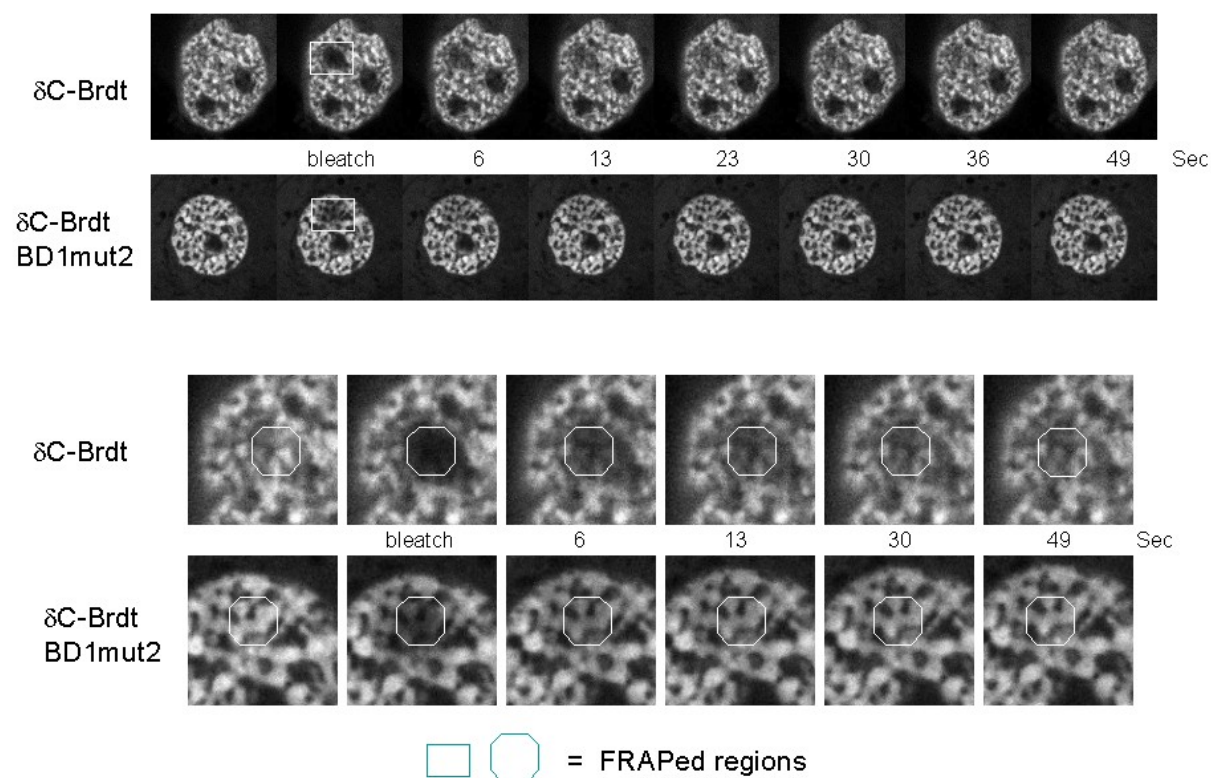


Figure 51: Expérience de FRAP sur δ C-Brdt dont la boucle BC de BD1 est remplacé par celle de BD2. Figure communiquée par S.Kochbin

II. BD2 et la di-acétylation

La superposition des complexes de Brdt-BD1/H4-K5K8ac et Brdt-BD2/H3-K18ac montre que la leucine L20 du peptide H3 occupe le site hydrophobe de l'acK8 du peptide H4. [Figure 50]. On peut alors se demander si BD2, comme BD1, est capable de fixer une di-acétylation. Par ITC nous avons montré que les affinités de BD2 pour H3 tétra-acétylé, H3-K18ac, H3-K18K23ac et H3-K14K18ac sont similaires. Ce qui indique que la di-acétylation n'est pas nécessaire et même qu'elle n'améliore pas l'affinité pour le peptide. De plus, l'examen du complexe BD2/H3-K18ac suggère que la possibilité de fixer une lysine acétylée supplémentaire dans le site hydrophobe secondaire de BD2 est improbable à cause de l'encombrement stérique de la boucle BC.

Nous n'avons d'ailleurs pas mesuré d'affinité pour le peptide H4 tétra-acétylé qui porte le motif K(ac)xxxK(ac)R. Ce motif aurait la possibilité d'établir une liaison ionique avec le résidu D354 de façon comparable au peptide H3-K18ac et présente une double acétylation. Le fait que nous n'ayons pas mesuré d'affinité pour ce motif indique également que la liaison ionique (entre le résidu R17 de H3 et BD2) et l'interaction hydrophobe (entre le résidu K18ac de H3 et BD2) et ne sont pas suffisants pour expliquer l'affinité mesurée pour les peptides H3 acétylés sur la lysine K18. Cela souligne l'importance des interactions hydrophobes de BD2 avec les résidus P16, A21 et T22 de H3 qui viennent compléter la liaison ionique avec l'arginine R17 et l'interaction avec la lysine acétylée K12ac. Que nous n'ayons pas observé d'affinité pour ce motif indique également que la présence d'une seconde acétylation n'est pas importante pour la reconnaissance du peptide par BD2.

III. Recherche d'autres sites potentiels pour BD2

Brdt-BD2 a montré une sélectivité pour le motif ${}_{15}\text{APRK}(\text{ac})\text{QLAT}_{22}$ de H3. La recherche d'un autre site dont les caractéristiques électrostatiques et stériques sont similaires permet notamment de constater que la queue H2A porte autour de sa lysine K5 (${}_{2}\text{GRGKQGGK}_{9}$) une région dont les propriétés stéréochimiques semblent compatibles avec la reconnaissance par BD2. Un modèle d'une telle interaction montre que l'interaction ionique entre l'arginine en K-1 est remplacée par une interaction similaire avec l'arginine en K-2 du peptide H2A et qu'une liaison ionique supplémentaire et possible avec la lysine K9 [Figure 52]. Les interactions hydrophobes qui se faisaient avec les résidus P16, A21 et T22 de H3 sont remplacées par d'autres interactions hydrophobes avec les glycines G2, G7 et G8. En accord avec un tel modèle, il a été montré que les lysines les plus touchées par l'hyperacétylation des histones qui se produit dans les spermatozoïdes sont les lysines K5, K8 et K12 d'H4 et la lysine K5 d'H2A (Govin et al., 2006).

D'autres sites pourraient éventuellement être reconnus par BD2, tels que les lysines K23 (₁₈YINTKKSGRL₂₇) ou K61 (₅₈AVKLKLPDY₆₅) de la protéine elle-même. Cependant aucun phénomène d'acétylation de Brdt n'a été rapporté à ce jour et nous avons vu la fragilité des hypothèses concernant la prédiction d'une reconnaissance entre un bromodomaine et un peptide.

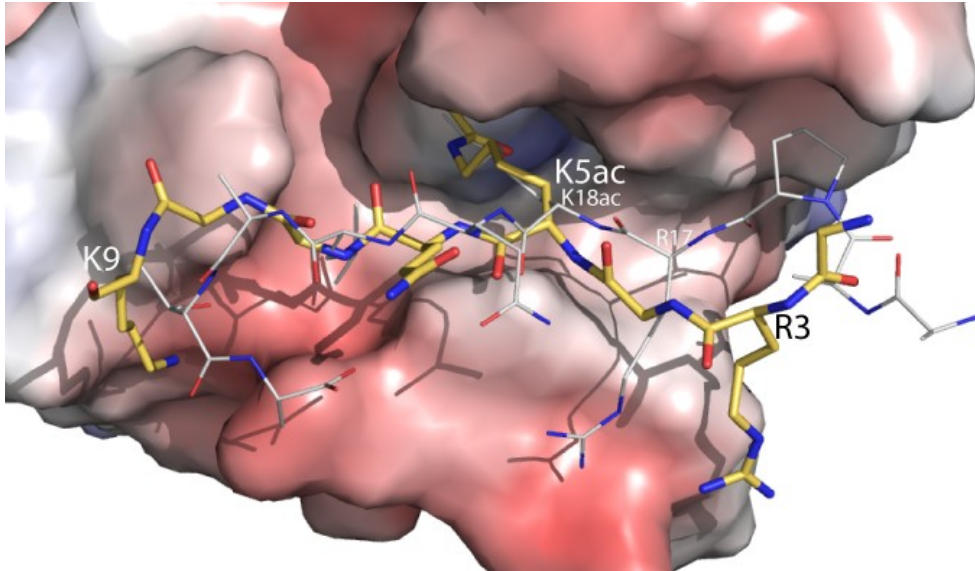


Figure 52: Modélisation du peptide H2A-K5ac (en jaune) dans le site de fixation de Brdt-BD2. Comparaison avec les interactions du peptide H3-K18ac (en blanc).

E. Dimérisation

I. Cas de Brdt et de ses homologues

La question de la dimérisation de BD1 et BD2, sous forme homo ou hétéro-dimérique, se pose d'autant plus fortement que les protéines ont cristallisé sous forme de dimère et qu'il a été montré que l'homologue Brd2-BD1 se trouve sous forme de dimère en solution (Nakamura et al., 2007).

Cependant nous n'avons pas observé de dimérisation de δ C-Brdt in-vitro, en présence ou en absence du peptide H4 tétra-acétylé. Le tableau 25 illustre le fait que les dimères observés en cristallographie ne sont pas forcément observés en solution (cas de Brdt-BD1 et BD2 et de Brd2-BD2). L'analyse de PISA, un outil informatique de prédiction et d'analyse des structures quaternaires à partir de la structure cristallographique proposé par l'EBI (Krissinel and Henrick, 2007) est en accord avec les résultats expérimentaux dans le cas de Brd2-BD1, Brd2-BD2 et Brdt-BD2 mais pas de Brdt-BD1. Il serait intéressant de comparer le comportement en solution de chaque homologue en utilisant la même technique et les mêmes conditions expérimentales (de force ionique notamment) pour pouvoir conclure à une éventuelle dimérisation des domaines BD1 mais pas BD2 des protéines de la famille BET.

Structure cristallographiques [PDB-ID]	Dimère dans l'unité asymétrique	Prédiction de PISA¹	Dimère en solution
Brdt-BD1	Oui	Oui	Non
Brdt-BD2	Oui	Non	Non
Brd2-BD1 [1XOJ]	Oui	Oui	Oui (Nakamura et al., 2007)
Brd2-BD2 [2DVV]	Non (1 mol.)	-	Non (Huang et al., 2007)
Brd2-BD2 [2E3K]	Oui	Non	n.d.
Brd3-BD1 [2NXB]	Non	-	n.d.
Brd3-BD2 [2OO1]	Oui	Non	n.d.
Brd4-BD1 [2OSS]	Non (1 mol.)	-	Non (Liu et al., 2008)
Brd4-BD2 [2OUO]	Non (1 mol.)	-	Non (Liu et al., 2008)

Tableau 25: Comportement oligomérique des bromodomains BD1 et BD2 chez les homologues Brd2, Brd3 et Brd4.

II. Des modes de dimérisation?

La superposition des dimères cristallographiques des bromodomains Brdt-BD1, Brd2-BD1, Brdt-BD2, Brd2-BD2 et Brd3-BD2 montre que les dimères se sont pas parfaitement superposables (sauf dans le cas de Brdt-BD2 et Brd3-BD2). Ils peuvent se classer en deux catégories: dans la première les sites de fixation du peptide acétylé se placent côte à côte (cas de Brdt-BD1 et de Brd2-BD1), dans la seconde les sites se placent à l'opposé l'un de l'autre (cas de Brdt-BD2, Brd2-BD2 et Brd3-BD2). Malgré ces différences l'analyse des résidus impliqués dans la dimérisation indique qu'ils appartiennent aux mêmes régions des bromodomains (hélice B, hélice C, boucle BC et extrémité C terminale), dans le cas des domaines BD1 comme dans celui des domaines BD2. De plus, les résidus précisément impliqués sont en grande partie les mêmes pour chaque homologue. La similarité des modes de dimérisation peut être expliquée par la très forte conservation de séquences entre les domaines hétérologues BD1 ou BD2 dont découlent les propriétés électrostatiques qui dirigent la cristallisation.

F. La mutation K61Q

La mutation K61Q a été mise en évidence chez l'homme. Elle est due à un polymorphisme de séquence qui entraîne la mutation de la lysine K61 du premier bromodomaine de Brdt en une glutamine. Cette mutation est probablement impliquée dans certaines infertilités masculines puisque ce polymorphisme a été identifié, à l'état homozygote, uniquement chez des individus infertiles (Rousseau et al, article soumis, annexe 5).

I. Effet *in vitro* sur l'affinité vis-à-vis de H3 et H4

La mutation K61Q du premier bromodomaine n'entraîne pas de changement majeur dans les propriétés d'association de BD1 avec les histones H3 et H4; on note même une légère augmentation globale de l'affinité par rapport au domaine sauvage [Tableau 26].

	BD1 WT (Kd)	BD1-K61Q (Kd)
H4-4ac	28,0 μ M	15,7 μ M
H4-K5/K8ac	21,9 μ M	14,9 μ M
H3-4ac	389 μ M	275 μ M

Tableau 26: Comparaison des affinités de BD1 et du mutant BD1-K61Q

Ces résultats sont en accord avec des résultats de co-purification obtenus par nos collaborateurs qui montrent que l'association du mutant et de la queue H4 tétra-acétylée résiste mieux à une augmentation de la force ionique que celle de la protéine sauvage et que l'inactivation de BD2 n'influence pas cette interaction (S. Rousseau, résultats non publiés) [Figure 53].

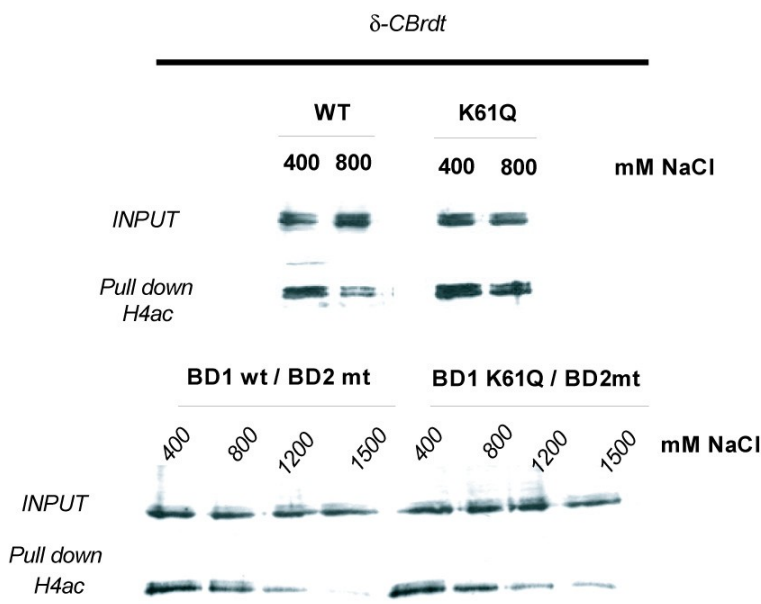


Figure 53: L'interaction de δ C-Brdt-K61Q et du peptide H4 tétra-acétylé résiste mieux à l'augmentation de la force ionique que celle de la protéine sauvage (Figure fournie par S. Rousseau).

II. Effets *in vivo*

a. Effet sur l'association à la chromatine

S. Rousseau et ses collègues ont montré par des expériences de recouvrement de fluorescence après blanchiment (FRAP) que l'association du mutant δ C-Brdt-K61Q (partie N terminale de Brdt comprenant les deux bromodomains et leurs régions adjacentes) à la chromatine acétylée est significativement réduite par rapport celle de la protéine sauvage (Rousseaux et al., article soumis, annexe 5).

b. Effet sur la compaction de la chromatine

La même équipe a montré que la compaction de la chromatine induite par Brdt dans des cellules de mammifère traitées à la TSA (un inhibiteur des histones désacétylases) est perturbée dans le cas du mutant δ C-Brdt-K61Q [Figure 54].

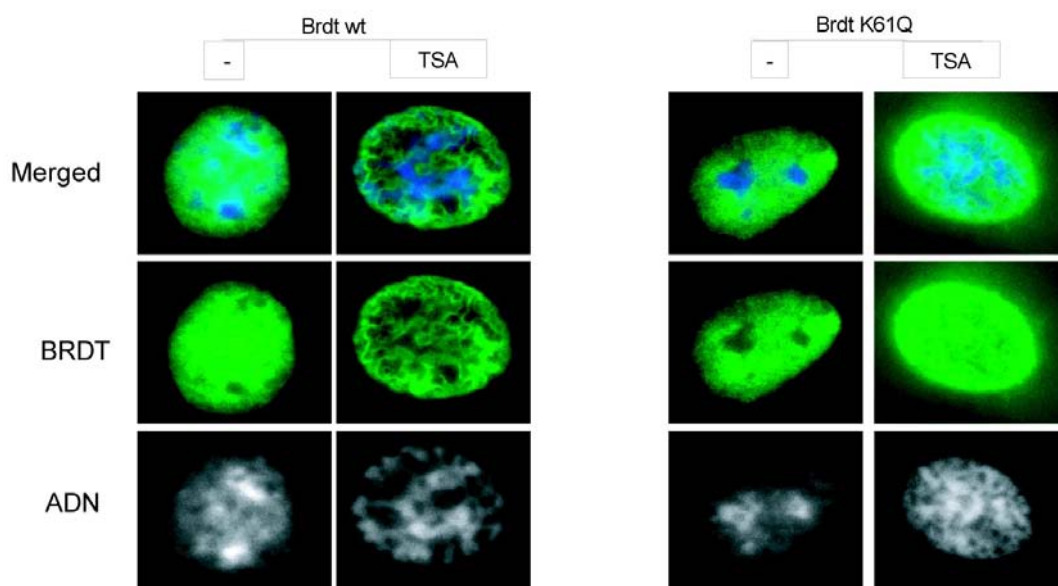


Figure 54: Compaction de la chromatine associée à Brdt (Figure fournie par S. Rousseau).

III. Apports de la structure tridimensionnelle de BD1 dans la compréhension des effets de la mutation K61Q

La structure de BD1 en complexe avec le peptide H4-K5K8ac montre que la lysine K61 est située dans la boucle ZA de façon très exposée au solvant mais ne contacte pas le peptide [Figure 55]. La plus courte distance entre la lysine et le peptide est de 6,7 Å. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la lysine interagisse avec l'extrémité N terminale de l'histone H4 qui n'est pas définie (résidus R3, G2 et S1). Cependant le peptide se trouve dans un sillon électropositif qu'il devrait quitter pour se diriger vers la lysine K61. Cette hypothèse semble peu probable.

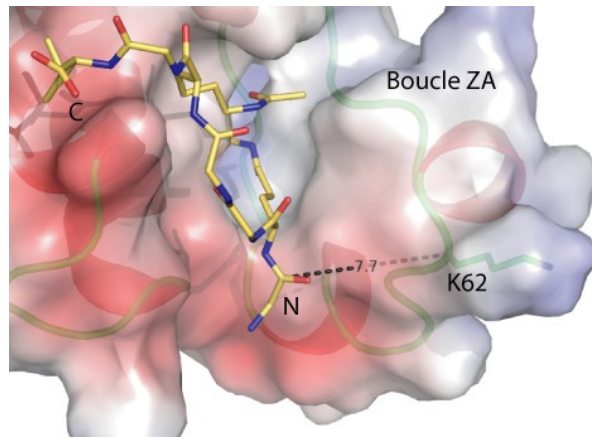


Figure 55: Situation de la lysine K61 de Brdt-BD1

Ainsi, la structure de BD1 en complexe avec le peptide H4 montre que la lysine K61 ne contacte probablement pas la queue H4 directement. Cela expliquerait que nous n'avons pas mesuré de modification majeure dans l'affinité du mutant BD1-K61Q pour les peptides H3 et H4. Une hypothèse possible serait que la lysine établisse une interaction avec l'ADN du nucléosome sous-jacent. La lysine adjacente K59 et la lysine K109, située sur la boucle BC sur le côté opposé du site de fixation, pourraient participer à une telle interaction. Cela aurait pour effet de renforcer l'association de Brdt à la chromatine. En donnant un point d'ancrage sur le nucléosome la liberté de mouvement de Brdt par rapport à celui-ci serait réduite par rapport à une situation où Brdt fixerait uniquement la queue flexible de l'histone H4. Cette interaction orienterait ainsi la protéine de façon moins aléatoire.

IV. Hypothèses : à la recherche d'un mécanisme d'auto-régulation de Brdt

La proximité de la lysine K61 et du site de fixation permet d'envisager que BD1 puisse fixer sa propre lysine K61 acétylée suite à un réarrangement de la boucle ZA. Il est en effet possible de modéliser une conformation de la boucle ZA dans laquelle l'amine de la chaîne latérale de la lysine K61 occupe la même position que celle de la lysine K5ac dans la structure de BD1 en complexe avec le peptide H4-K5K8ac [Figure 56A].

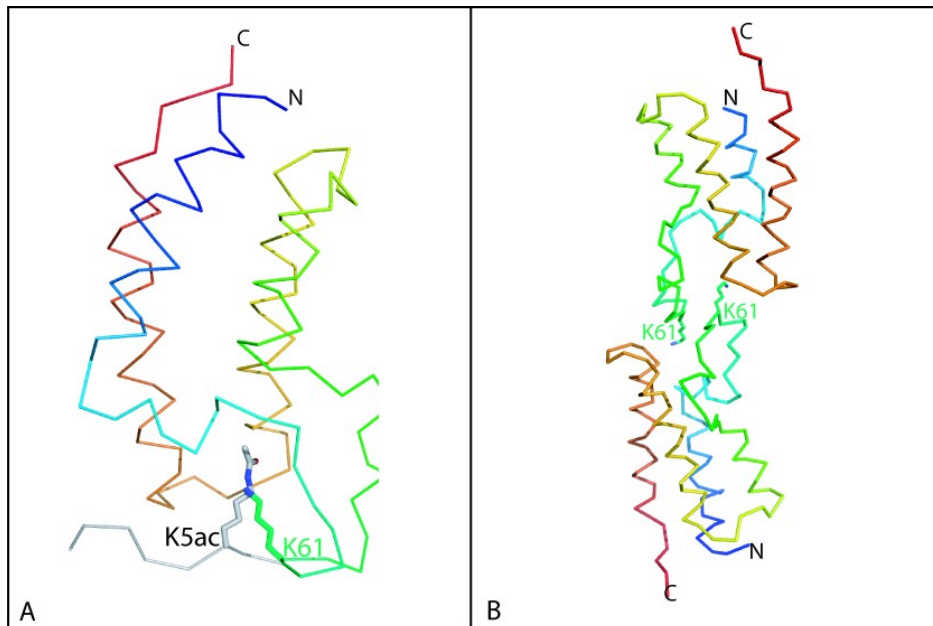


Figure 56: Modélisations de la structure de BD1. A. La lysine K61 occupe le site de fixation de son propre bromodomaine. Comparaison avec la position de la lysine K5ac du peptide H4-K5/K8ac (en gris). B. Dimère de Brdt-BD1 dans lequel chaque bromodomaine fixe la lysine K61 de l'autre.

Une autre possibilité de reconnaissance de la lysine K61 par BD1 passe par la formation d'une structure symétrique entre deux bromodomaines BD1, chacune des molécules fixant la lysine K61ac de l'autre [Figure 56B]. Les caractéristiques stéréochimiques de la région qui entoure la lysine 61 paraissent de plus être compatibles avec une reconnaissance par BD1 telle que nous l'avons analysée d'après la structure avec le peptide H4-K5/K8ac. La séquence AVKLLKP des résidus 57 à 63 comporte en effet deux lysines qui pourraient être acétylées et qui sont séparées par une leucine (au lieu de deux glycines dans le peptide H4-K5/K8ac) et entourées de résidus hydrophobes (comme dans le cas du peptide H4-K5/K8ac).

V. Conclusion

La mutation K62Q de Brdt-BD1 est associée chez l'homme à l'infertilité masculine (S. Rousseau, article soumis). Un alignement de séquences montre que ce résidu est variable même au sein des protéines de la famille BET. Cela conforte l'hypothèse de l'implication de cette lysine dans une fonction spécifique de Brdt, telle que la compaction de la chromatine observée pendant la spermiogénèse.

Il existe ainsi une contradiction apparente entre les résultats in-vivo et in-vitro. Alors qu'in-vitro l'affinité du mutant pour les queues N terminales H3 et H4 tétra-acétylées est légèrement accrue, l'association à la chromatine in-vivo est déstabilisée. Cette contradiction peut être expliquée par l'hypothèse selon laquelle les lysines K61, K59 et K109 interagissent avec l'ADN du nucléosome et stabilisent ainsi l'association de Brdt-BD1 à la chromatine. Lors des expériences d'ITC utilisant uniquement des peptides mimant les queues acétylées des histones, nous n'avons pas considéré l'interaction avec l'ADN dans nos mesures.

Une telle hypothèse confère à Brdt-BD1 un rôle structural d'orientation et de stabilisation de la protéine par rapport au nucléosome. La déstabilisation induite par la mutation K61Q pourrait ainsi compromettre le recrutement de facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine. De même, le désordre induit dans l'orientation de Brdt à la surface des nucléosomes pourrait empêcher des interactions jouant un rôle structural dans la compaction. Dans l'ensemble, cela pourrait expliquer que l'inactivation de BD1 abolisse totalement la compaction de la chromatine induite par Brdt alors que l'effet de l'inactivation de BD2 est moins drastique (Pivot-Pajot et al., 2003).

G. Perspectives

I. Le rôle des régions adjacentes

Pivot-Pajot ses collègues ont montré que la délétion des résidus 1 à 13 ou des résidus 392 à 443 abolit l'activité de remodelage de la chromatine de δ C-Brdt. Il ont également montré que la protéine exprimée en cellule de mammifère porte dans cette partie C terminale une phosphorylation dont l'absence n'est pas à l'origine de la perte de fonction puisque la protéine exprimée dans un système bactérien est également capable d'induire la compaction de la chromatine (Pivot-Pajot et al., 2003).

Nous avons observé que l'extrémité N terminale de Brdt (résidus 12 à 27) est essentielle à sa cristallisation et que ces résidus chapeautent le bromodomaine puis forment une hélice qui vient se placer parallèlement aux hélices A et B, avant de passer à la surface de la boucle ZA. Une conformation similaire est observée pour les structures cristallographiques de Brd3-BD1 [PDB-2NXX] et Brd4-BD1 [PDB-2OSS] [Figure 57]. Nous avons aussi pu constater que les résidus 22 à 25 de Brdt-BD1 étaient importants pour la stabilité de la protéine en solution et qu'ils stabilisaient probablement le repliement du bromodomaine.

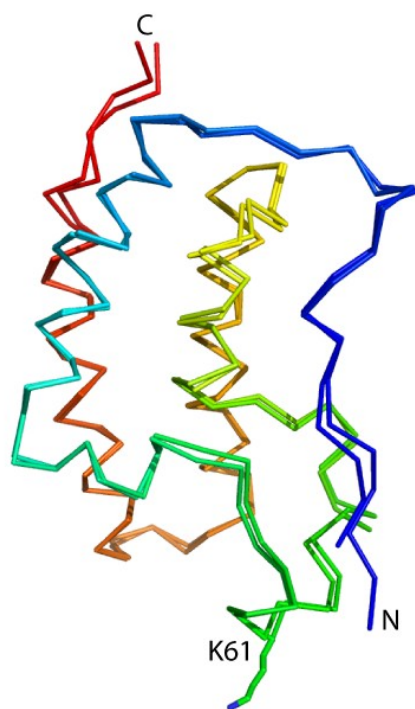


Figure 57: Structures des domaines BD1 de Brdt et Brd2 montrant leurs extrémités N terminales (débutant respectivement aux résidus N12 et S42) et la lysine K61 de Brdt.

Cependant le rôle dans le remodelage de la chromatine des résidus 1 à 13, manquants dans notre structure et celui de la partie C terminale de la protéine reste à élucider.

II. Un dialogue entre les deux bromodomaines de Brdt ?

Nos expériences d'ITC ont permis d'attribuer l'affinité de Brdt pour la queue de l'histone H4 tétra-acétylée à son premier bromodomaine. En effet l'affinité de BD2 pour un peptide H4 tétra-acétylé est négligeable ($K_d > 10^3$ M) devant celle de la partie N terminale de Brdt (δ C-Brdt, qui contient les deux bromodomaines et leurs régions adjacentes) ou devant celle de Brdt-BD1 (K_d respectivement égaux à 14 μ M et 28 μ M). Des résultats similaires ont été obtenus par co-purification in-vitro des protéines BD1 et BD2 recombinantes avec un peptide H4 tétra-acétylé (S. Khochbin et al., résultats non publiés). Dans cette expérience, BD1 se fixe au peptide H4 acétylé alors que BD2 n'est pas observé. Pourtant une expérience montre que si on exprime la protéine δ C-Brdt dans des cellules de mammifère, la protéine présente dans l'extrait cellulaire co-purifie avec un peptide H4 tétra-acétylé et que cette co-purification est abolie dans le cas des protéines δ C-Brdt dont BD1 ou BD2 ont été inactivés. (Pivot-Pajot et al., 2003). Cela paraît contredire l'absence d'affinité entre BD2 et le

peptide H4 tétra-acétylé observée par ITC et co-purification in-vitro et semble indiquer que l'interaction de Brdt et de l'histone H4 hyperacétylée peut être régulée in-vivo et que cette régulation implique BD2. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- (i) La présence d'une modification post-traductionnelle de Brdt régule une interaction entre BD1 et BD2 qui influence l'interaction de Brdt-BD1 et de l'histone H4 hyperacétylée (un autre facteur occupe/cache le site de fixation de BD1 dans le cas où BD2 est inactivé)
- (ii) La présence des régions adjacentes aux bromodomaines (extrémité N et C terminales et partie reliant les deux bromodomaines) modifie le comportement de BD1 quand BD2 est inactif.
- (iii) BD2 présente une affinité résiduelle pour H4 tétra-acétylé suffisante pour que sa disparition fasse passer l'interaction de DeltaC-Brdt et du peptide H4 sous le seuil de détection du western-blot (peu probable).

Un phénomène d'auto-régulation a récemment été rapporté pour Rsc4, un facteur de remodelage de la chromatine impliqué dans l'activation de la transcription. Cette protéine contient un double bromodomaine dont le premier reconnaît une lysine acétylée située à l'extrémité N terminale de lui-même, entraînant l'inhibition de l'interaction du second bromodomaine et de son ligand (H3-acK14) (VanDemark et al., 2007). Cependant il s'agit là d'une inhibition d'un bromodomaine sur l'autre alors que, dans le cas de Brdt, il semble s'agir de l'activation de BD1 par BD2. L'existence éventuelle d'un mécanisme de régulation entre les deux bromodomaines de Brdt reste donc à éclaircir.

Un modèle qui expliquerait les résultats de co-purification sur la protéine exprimée en système eucaryote pourrait être que la lysine K61 subit in-vivo une acétylation si elle n'est pas protégée par la partie N terminale de Brdt ou par BD2. Cette acétylation empêcherait l'association de BD1 à la chromatine soit parce que l'ADN chargé négativement repousse l'acétyle soit parce que la lysine acétylée occupe le site actif de BD1.

III. Brdt et la compaction de la chromatine

Pivot-Pajot et ses collègues ont montré que Brdt est capable d'induire la compaction de la chromatine dans des cellules de mammifère dont la chromatine est hyperacétylée. Nous avons montré in-vitro que les bromodomaines de Brdt étaient capables de discriminer les différents états d'acétylation des queues H4 et H3. Il est très probable que la capacité de BD1 d'interagir spécifiquement avec la queue acétylée de H4 soit conservée in-vivo. Le second bromodomaine de

Brdt montre in-vitro une préférence pour la lysine acétylée K18 de H3 mais l'affinité relativement faible mesurée peut faire penser qu'il existe in-vivo d'autres ligands pour BD2. Nous avons fait l'hypothèse que la région de la lysine K5ac de la queue de l'histone H2A pouvait convenir. Brdt pourrait être impliqué dans la compaction de la chromatine de différentes façons.

a. Une fonction de chaperonne ?

Brdt pourrait agir comme protéine chaperonne. Allant dans ce sens, il a été montré que Brdt est capable d'induire le relargage de l'histone de liaison H1 des zones de la chromatine où il induit une compaction (Govin et al., 2006) . Il est donc envisageable que Brdt soit responsable du remplacement des histones de liaison H1 de type somatique par les variants spécifiques du testicule H1t et H1s ou de l'incorporation d'autres variants d'histones. Confortant cette hypothèse, une fonction de chaperonne a récemment été mise en évidence pour les homologues Brd2 et Brd3 (LeRoy et al., 2008).

b. Une fonction architecturale ?

Brdt pourrait avoir un rôle structural direct par la stabilisation d'une structure chromatinienne compacte. Cela implique que Brdt interagisse avec plusieurs nucléosomes adjacents. Il serait alors logique que chacun des bromodomaines de Brdt reconnaisse un nucléosome différent.

Une telle fonction de réticulation a été décrite pour plusieurs protéines telles que des protéines du groupe polycomb, les protéines Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), Myeloid and erythroid nuclear termination stage specific protein (MENT) et SIR3Pp (McBryant et al., 2006) ou encore pour la protéine L3MBT1 de la famille des protéines MBT (Malignant Brain Tumor) qui est capable d'induire la compaction de la chromatine selon un mode direct dépendant de la méthylation (Trojer et Reinberg, 2008).

Hormis la fixation des lysines acétylées par les bromodomaines de Brdt, d'autres interactions pourraient être impliquées. Les lysines K61 et K59 pourraient contacter l'ADN des nucléosomes et orienter Brdt par rapport à ceux-ci. La face nettement basique que possède BD1 pourrait servir de surface d'interaction (avec l'ADN par exemple). La face acide de BD1 pourrait également être impliquée dans des interactions importantes. Enfin, les régions adjacentes aux bromodomaines, indispensables à la compaction induite par Brdt pourraient établir des contacts importants pour une éventuelle fonction architecturale de Brdt.

c. Un lien avec les variants de l'histone H2A ?

Il est intéressant de noter que le dimère H2A/H2B porte une région acide qui sert de surface d'interaction pour la queue de l'histone H4. Cette surface est impliquée dans la stabilisation de la fibre de 30nm et dans l'établissement de structures compactes d'ordre supérieur. Il semble que ce soit la neutralisation de celle-ci qui conditionne la compaction de la chromatine (voir l'introduction). Cette région basique est également utilisée par le récepteur nucléaire LANA de l'herpesvirus KSHV qui assure sa transmission aux cellules filles en s'attachant aux chromosomes mitotiques. La structure cristallographique d'un complexe entre un nucléosome et le peptide LANA montre que celui-ci se place au contact de la région acide de façon similaire à la queue H4.

Au cours de la spermiogenèse, les variants H2AL1, H2AL2 et H2BL1 des histones H2A et H2B sont incorporés aux nucléosomes et provoquent in-vitro la déstabilisation de ceux-ci (Govin et al., 2007). Nous avons vu que H2AL1 et H2AL2 ont une région acide réduite (Figure 11). Ces variants pourraient ainsi être impliqués dans le phénomène de compaction de la chromatine. Soit en altérant la stabilité des nucléosomes et en facilitant le remplacement des histones par les protéines de transition, soit en facilitant la compaction de la chromatine grâce à la disparition partielle de la région acide, soit en servant de surface d'interaction pour des protéines spécifiques (Brdt par exemple).

IV. Remarque sur le cas des homologues CBP/P300

Il a été récemment montré que les bromodomaines des proches homologues P300 et CBP ont des préférences différentes vis à vis de l'état d'acétylation de la protéine MyoD. P300 présente une affinité accrue pour le peptide di-acétylé MyoD-acK99/K102 par rapport aux peptides mono-acétylés sur K99 ou sur K102. Par contre la lysine K99 est suffisante pour la fixation de CBP (Wei et al., 2008). Seuls 4 résidus diffèrent entre les bromodomaines de CBP et P300 : ce sont les mutations N1132-S1096 à l'extrémité de la boucle ZA, V1158-I1122 dans le centre de l'hélice A, F1178-Y1142 à l'extrémité de la boucle BC et A1185-S1146 au début de l'hélice C.

Les résidus critiques pour la liaison de Brdt-BD1 et du peptide H4-K5K8ac sont W50, P51, I114, M117. L'alignement des séquences de Brdt, CBP et P300 indique que les résidus aux positions correspondantes chez CBP et P300 sont respectivement L, P, V, F et L, P, V, Y. Les résidus F1178 de CBP et Y1142 de P300 sont placés dans la boucle BC impliquée dans la sélectivité de BD1.

La superposition des structures de Brdt-BD1/H4-K5K8ac et du bromodomaine de CBP [PDB-2RNY] montre qu'aucun encombrement stérique flagrant n'empêche la fixation de la seconde

lysine acétylée dans le site de fixation du bromodomaine de CBP. La modélisation de la mutation F1178Y qui remplace la phénylalanine F1178 de CBP par une tyrosine comme c'est le cas chez P300 (Y1142) montre qu'une liaison hydrogène entre la tyrosine et le résidu X du peptide H4 di-acétylé est possible alors qu'elle ne l'était pas avec la phénylalanine de CBP. Cette liaison hydrogène pourrait expliquer que, contrairement au bromodomaine de CBP, celui de P300 reconnaisse préférentiellement un peptide di-acétylé.

Conclusion générale

Ce travail a permis de déterminer la spécificité de chacun des bromodomaines de Brdt vis à vis des queues N terminales acétylées des histones H4 et H3. BD1 présente pour un peptide H4 di-acétylé sur les lysines K5 et K8 une affinité qui témoigne de la spécificité de l'interaction ($K_d \sim 20 \mu\text{M}$) alors que BD2 montre une spécificité plus réduite pour des peptides H3-K18ac ($K_d \sim 250 \mu\text{M}$). Les structures cristallographiques des complexes de BD1 et BD2 et de ces peptides ont permis de définir les déterminants structuraux de la sélectivité des bromodomaines de Brdt.

Nous avons également étudié l'effet de la mutation de la lysine K61 en glutamine sur les affinités de BD1. Cette mutation est impliquée chez l'humain dans des cas d'infertilité masculine et provoque la destabilisation de l'association de Brdt à la chromatine. Nos données montrent que les affinités de BD1 ne sont pas modifiées. Par contre la structure cristallographique du complexe BD1/H4K5K8ac indique que la lysine K61 pourrait être impliquée dans une interaction entre Brdt et l'ADN. BD1 aurait ainsi une fonction d'orientation et de stabilisation de Brdt sur les nucléosomes. Cela pourrait expliquer l'importance particulière de BD1 pour la fonction de Brdt.

Un modèle de la compaction de la chromatine par Brdt reste à élaborer. Il faudrait notamment savoir si la queue N terminale de l'histone H3 est le substrat physiologique de BD2 ou si celui-ci fixe un autre site (H2A-K5ac par exemple). Il faudrait ensuite savoir si BD1 et BD2 interagissent avec le même nucléosome ou avec deux nucléosomes différents. Au vu de la composition de la protéine Brdt et des fonctions de ses homologues il semble assez probable que Brdt ait un rôle architectural de protéine de liaison. Dans ce cas il serait logique que chacun des bromodomaines lient un nucléosome différent. Cela reste à déterminer.

Enfin, nous avons mis en évidence un nouveau mode de reconnaissance entre un bromodomaine et un peptide di-acétylé. La structure cristallographique du complexe BD1/H4-K5K8ac montre que les deux acétyl-lysines K5ac et K8ac se placent ensemble dans le site de fixation hydrophobe de BD1. Ce mode de liaison est probablement partagé par d'autres bromodomaines. Ces données ajoutent un degré de complexité supplémentaire au code histone lié à l'acétylation puisque le bromodomaine était jusque là considéré comme un module de liaison d'une seule lysine acétylée. De nombreuses études pourraient être reconsidérées à la lumière de cette nouvelle définition du bromodomaine.

Bibliographie

- Abbate, EA., Voitenleitner, C. and Botchan, MR. (2006). Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol. Cell* 24, 877-889.
- Angelov, D., Bondarenko, VA., Almagro, S., Menoni, H., Mongélard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, VM., 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.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P., Hans, F., Côté, J., Khochbin, S., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11, 1033-1041.
- Arents, G., Burlingame, RW., Wang, BC., Love, WE. and Moudrianakis, EN. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10148-10152.
- Baarends, WM., Hoogerbrugge, JW., Roest, HP., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, JH. and Grootegoed, JA. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 207, 322-333.
- Baker, NA., Sept, D., Joseph, S., Holst, MJ. and McCammon, JA. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10037-10041.
- Barbera, AJ., Chodaparambil, JV., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, JC., Luger, K. and Kaye, KM. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856-861.
- Beard, DA. and Schlick, T. (2001). Computational modeling predicts the structure and dynamics of chromatin fiber. *Structure* 9, 105-114.
- Becker, PB. and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 247-273.
- Belmont, AS. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 632-638.
- Bernstein, E. and Hake, SB. (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol.* 84, 505-517.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, TK. and Dimitrov, S. (2007). Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell. Biochem.* 41, 71-89.
- Boulard, M., Gautier, T., Mbele, GO., Gerson, V., Hamiche, A., Angelov, D., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006). The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1518-1526.
- Brown, DT., Izard, T. and Misteli, T. (2006). Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 250-255.
- Brünger, AT. (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 49, 24-36.

- Brünger, AT., Adams, PD., Clore, GM., DeLano, WL., Gros, P., Grosse-Kunstleve, RW., Jiang, JS., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, NS., Read, RJ., Rice, LM., Simonson, T. and Warren, GL. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 905-921.
- Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2005). How to pack the genome for a safe trip. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 38, 65-89.
- Chakravarthy, S., Bao, Y., Roberts, VA., Tremethick, D. and Luger, K. (2004). Structural characterization of histone H2A variants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69, 227-234.
- Chakravarthy, S., Gundimella, SKY., Caron, C., Perche, P., Pehrson, JR., Khochbin, S. and Luger, K. (2005a). Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7616-7624.
- Chakravarthy, S., Park, Y., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, RS. and Luger, K. (2005b). Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett.* 579, 895-898.
- Chantalat, L., Nicholson, JM., Lambert, SJ., Reid, AJ., Donovan, MJ., Reynolds, CD., Wood, CM. and Baldwin, JP. (2003). Structure of the histone-core octamer in KCl/phosphate crystals at 2.15 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 1395-1407.
- Chen, HY., Sun, JM., Zhang, Y., Davie, JR. and Meistrich, ML. (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.* 273, 13165-13169.
- Chodaparambil, JV., Barbera, AJ., Lu, X., Kaye, KM., Hansen, JC. and Luger, K. (2007). A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1105-1107.
- Choudhary, P. and Varga-Weisz, P. (2007). ATP-dependent chromatin remodelling: action and reaction. *Subcell. Biochem.* 41, 29-43.
- Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E. and Zalensky, A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* 84, 745-756.
- Clapier, CR., Chakravarthy, S., Petosa, C., Fernández-Tornero, C., Luger, K. and Müller, CW. (2008). Structure of the Drosophila nucleosome core particle highlights evolutionary constraints on the H2A-H2B histone dimer. *Proteins* 71, 1-7.
- Clore, GM., Gronenborn, AM., Nilges, M., Sukumaran, DK. and Zarbock, J. (1987). The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J.* 6, 1833-1842.
- Collaborative Computational Project, N4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* D50, 760-763.
- Cosgrove, MS. (2007). Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility. *Expert Rev Proteomics* 4, 465-478.
- Costanzi, C. and Pehrson, JR. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599-601.
- Crowley, TE., Kaine, EM., Yoshida, M., Nandi, A. and Wolgemuth, DJ. (2002). Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of Pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein. *Mol. Endocrinol.* 16, 1727-1737.
- De Lucia, F., Faraone-Mennella, MR., D'Erme, M., Quesada, P., Caiafa, P. and Farina, B. (1994). Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 32-39.

- Denis, GV., McComb, ME., Faller, DV., Sinha, A., Romesser, PB. and Costello, CE. (2006). Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *J. Proteome Res.* 5, 502-511.
- Denis, GV., Vaziri, C., Guo, N. and Faller, DV. (2000). RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F. *Cell Growth Differ.* 11, 417-424.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T. and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8758-8763.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, AE., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J. and Ozato, K. (2000). A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6537-6549.
- Dhalluin, C., Carlson, JE., Zeng, L., He, C., Aggarwal, AK. and Zhou, MM. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain.. *Nature* 399, 491-496.
- Dion, MF., Altschuler, SJ., Wu, LF. and Rando, OJ. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5501-5506.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, RR. and Richmond, TJ. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571-1573.
- Doyen, C., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, VM., Hamiche, A., Roeder, RG., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1156-1164.
- Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B. and Doenecke, D. (1996). Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol.* 106, 247-251.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics.. *Acta Crystallographica Section D* 60, 2126--2132.
- English, CM., Maluf, NK., Tripet, B., Churchill, MEA. and Tyler, JK. (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.
- Fan, JY., Rangasamy, D., Luger, K. and Tremethick, DJ. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell* 16, 655-661.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, TJ., Bhattacharyya, R., Bouhassira, EE., Stein, A., Woodcock, CL. and Skoultchi, AI. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123, 1199-1212.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, SA., Kim, Y., Allis, CD. and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870-1881.
- Flaus, A., Rencurel, C., Ferreira, H., Wiechens, N. and Owen-Hughes, T. (2004). Sin mutations alter inherent nucleosome mobility. *EMBO J.* 23, 343-353.
- Florence, B. and Faller, DV. (2001). You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front. Biosci.* 6, D1008-18.
- Francis, NJ., Kingston, RE. and Woodcock, CL. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574-1577.
- Gautier, T., Abbott, DW., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J. and Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* 5, 715-720.

- Godde, JS. and Ura, K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *J Biochem* 143, 287-293.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459-3469.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. and Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* 176, 283-294.
- Govin Jérôme. Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermiogénèse. 311p. Thèse : Biologie : Grenoble 1 : 2006
- Govin, J., Lestrat, C., Caron, C., Pivot-Pajot, C., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2006). Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis.. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* , 155-172.
- Greaves, IK., Rangasamy, D., Ridgway, P. and Tremethick, DJ. (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 525-530.
- Hake, SB. and Allis, CD. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6428-6435.
- Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R. 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.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, AK., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., Khochbin, S. and Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 950-960.
- Henikoff, S. and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 133-153.
- Houzelstein, D., Bullock, SL., Lynch, DE., Grigorieva, EF., Wilson, VA. and Beddington, RSP. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3794-3802.
- Huang, H., Zhang, J., Shen, W., Wang, X., Wu, J., Wu, J. and Shi, Y. (2007). Solution structure of the second bromodomain of Brd2 and its specific interaction with acetylated histone tails.. *BMC Struct. Biol.* 7, 57.
- Hudson, BP., Martinez-Yamout, MA., Dyson, HJ. and Wright, PE. (2000). Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain.. *J. Mol. Biol.* 304, 355-370.
- Jacobson, RH., Ladurner, AG., King, DS. and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module.. *Science* 288, 1422-1425.
- Jeanmougin, F., Wurtz, JM., Le Douarin, B., Chambon, P. and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited.. *Trends Biochem. Sci.* 22, 151-153.
- Jelesarov, I. and Bosshard, HR. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 12, 3-18.
- Kabsch W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* 26, 795--800.
- Kabsch, W. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.. *Biopolymers* 22(12), 2577-2637.
- Kamakaka, RT. and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants?. *Genes Dev.* 19, 295-310.

- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, RM., Jang, MK., Lenardo, MJ. and Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol. Cell* 13, 33-43.
- Katritch, V., Bustamante, C. and Olson, WK. (2000). Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations. *J. Mol. Biol.* 295, 29-40.
- Kennedy, BP. and Davies, PL. (1981). Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J. Biol. Chem.* 256, 9254-9259.
- Khadake, JR. and Rao, MR. (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* 34, 15792-15801.
- Khochbin, S. (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271, 1-12.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259-272.
- Kobor, MS., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, MD., Gin, JW., Jennings, JL., Link, AJ., Madhani, HD. and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* 2, E131.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, WL., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, CD., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, MT. and Berger, SL. (2006). Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 2580-2592.
- Krissinel, E. and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774-797.
- Krogan, NJ., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, DP., Beattie, BK., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4207-4218.
- Kurdistani, SK., Tavazoie, S. and Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117, 721-733.
- Kusch, T. and Workman, JL. (2007). Histone variants and complexes involved in their exchange. *Subcell. Biochem.* 41, 91-109.
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. and Ladurner, AG. (2005). Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 624-625.
- Ladurner, AG. (2003). Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* 12, 1-3.
- Ladurner, AG., Inouye, C., Jain, R. and Tjian, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell* 11, 365-376.
- Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D. and Thornton, J. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst* 26, 283-291.
- Lee, DY., Hayes, JJ., Pruss, D. and Wolffe, AP. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- LeRoy, G., Rickards, B. and Flint, SJ. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol. Cell* 30, 51-60.

- Leslie, AGW. (2006). The integration of macromolecular diffraction data.. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 48-57.
- Lewis, JD., Song, Y., de Jong, ME., Bagha, SM. and Ausió, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111, 473-482.
- Li, A., Maffey, AH., Abbott, WD., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, AO. and Ausió, J. (2005). Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* 44, 2529-2535.
- Liu, Y., Wang, X., Zhang, J., Huang, H., Ding, B., Wu, J. and Shi, Y. (2008). Structural basis and binding properties of the second bromodomain of Brd4 with acetylated histone tails. *Biochemistry* 47, 6403-6417.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B. and Kornberg, RD. (2006). Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3090-3093.
- Loyola, A., LeRoy, G., Wang, YH. and Reinberg, D. (2001). Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev.* 15, 2837-2851.
- Luger, K. (2006). Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* 14, 5-16.
- Luger, K. and Richmond, TJ. (1998a). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 140-146.
- Luger, K. and Richmond, TJ. (1998b). DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 33-40.
- Luger, K., Mäder, AW., Richmond, RK., Sargent, DF. and Richmond, TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luk, E., Vu, N., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y. and Wu, C. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol. Cell* 25, 357-368.
- Maier, VK., Chioda, M. and Becker, PB. (2008a). ATP-dependent chromatosome remodeling. *Biol. Chem.* 389, 345-352.
- Maier, VK., Chioda, M., Rhodes, D. and Becker, PB. (2008b). ACF catalyses chromatosome movements in chromatin fibres. *EMBO J.* 27, 817-826.
- Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2808-2813.
- Matangkasombut, O. and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell* 11, 353-363.
- Matangkasombut, O., Buratowski, RM., Swilling, NW. and Buratowski, S. (2000). Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* 14, 951-962.
- Mattsson, K., Kiss, C., Platt, GM., Simpson, GR., Kashuba, E., Klein, G., Schulz, TF. and Szekely, L. (2002). Latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus-8 induces and relocates RING3 to nuclear heterochromatin regions. *J. Gen. Virol.* 83, 179-188.
- McBryant, SJ., Adams, VH. and Hansen, JC. (2006). Chromatin architectural proteins. *Chromosome Res.* 14, 39-51.
- Meistrich, ML., Mohapatra, B., Shirley, CR. and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-488.

- Meistrich, ML., Trostle-Weige, PK., Lin, R., Bhatnagar, YM. and Allis, CD. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 170-181.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M. and Brown, DT. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877-881.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W., Sen, S. and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, JE., Ott, M., Verdin, E. and Zhou, M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain.. *Mol. Cell* 9, 575-586.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Yan, S., Plotnikova, O., Sachchidanand, Sanchez, R., Zeleznik-Le, NJ., Ronai, Z. and Zhou, M. (2004). Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation.. *Mol. Cell* 13, 251-263.
- Mujtaba, S., Zeng, L. and Zhou, M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain.. *Oncogene* 26, 5521-5527.
- Murshudov, GN., Vagin, AA. and Dodson E J (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.* D53, 240-255.
- Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J. and Dimitrov, S. (1998). Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6293-6304.
- Nakamura, Y., Umehara, T., Nakano, K., Jang, MK., Shirouzu, M., Morita, S., Uda-Tochio, H., Hamana, H., Terada, T., Adachi, N., Matsumoto, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Ozato, K., Padmanabhan, B. and Yokoyama, S. (2007). Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4.. *J. Biol. Chem.* 282, 4193-4201.
- Navaza, J. (1994). . *Acta Cryst* A50, 157-163.
- Nielsen, AL., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, JA., Remboutsika, E., Chambon, P. and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* 7, 729-739.
- Oliva, R., Bazett-Jones, D., Mezquita, C. and Dixon, GH. (1987). Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 17016-17025.
- Ottinger, M., Christalla, T., Nathan, K., Brinkmann, MM., Viejo-Borbolla, A. and Schulz, TF. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. *J. Virol.* 80, 10772-10786.
- Owen, DJ., Ornaghi, P., Yang, JC., Lowe, N., Evans, PR., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P. and Travers, AA. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p.. *EMBO J.* 19, 6141-6149.
- Paillisson, A., Levasseur, A., Gouret, P., Callebaut, I., Bontoux, M., Pontarotti, P. and Monget, P. (2007). Bromodomain testis-specific protein is expressed in mouse oocyte and evolves faster than its ubiquitously expressed paralogs BRD2, -3, and -4.. *Genomics* 89, 215-223.
- Park, Y. and Luger, K. (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 282-289.

- Park, Y., Dyer, PN., Tremethick, DJ. and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 24274-24282.
- Peng, J., Dong, W., Chen, L., Zou, T., Qi, Y. and Liu, Y. (2007). Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation. *Mol. Cell. Biochem.* 294, 45-54.
- Pennings, S., Meersseman, G. and Bradbury, EM. (1994). Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10275-10279.
- Perry, CA. and Annunziato, AT. (1989). Influence of histone acetylation on the solubility, H1 content and DNase I sensitivity of newly assembled chromatin. *Nucleic Acids Res.* 17, 4275-4291.
- Pierce, MM., Raman, CS. and Nall, BT. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 19, 213-221.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein.. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5354-5365.
- Platt, GM., Simpson, GR., Mitnacht, S. and Schulz, TF. (1999). Latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with RING3, a homolog of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene. *J. Virol.* 73, 9789-9795.
- Polach, KJ., Lowary, PT. and Widom, J. (2000). Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* 298, 211-223.
- Rajashankar, KR. and Ramakumar, S. (1996). Pi-turns in proteins and peptides: Classification, conformation, occurrence, hydration and sequence. *Protein Sci.* 5, 932-946.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162-169.
- Robinson, PJJ. and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 336-343.
- Robinson, PJJ., Fairall, L., Huynh, VAT. and Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6506-6511.
- Sachchidanand, Resnick-Silverman, L., Yan, S., Mutjaba, S., Liu, W., Zeng, L., Manfredi, JJ. and Zhou, M. (2006). Target structure-based discovery of small molecules that block human p53 and CREB binding protein association. *Chem. Biol.* 13, 81-90.
- Santisteban, MS., Kalashnikova, T. and Smith, MM. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, DF. and Richmond, TJ. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436, 138-141.
- Shang, E., Nickerson, HD., Wen, D., Wang, X. and Wolgemuth, DJ. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation.. *Development* 134, 3507-3515.
- Shang, E., Salazar, G., Crowley, TE., Wang, X., Lopez, RA., Wang, X. and Wolgemuth, DJ. (2004). Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis.. *Gene Expr. Patterns* 4, 513-519.

- Shirley, CR., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R. and Meistrich, ML. (2004). Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* 71, 1220-1229.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J., Pazin, MJ., Davie, JR. and Peterson, CL. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Singleton, S., Mudrak, O., Morshedi, M., Oehninger, S., Zalenskaya, I. and Zalensky, A. (2007). Characterisation of a human sperm cell subpopulation marked by the presence of the TSH2B histone. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 392-397.
- Smith, CL. and Peterson, CL. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65, 115-148.
- Springhetti, EM., Istomina, NE., Whisstock, JC., Nikitina, T., Woodcock, CL. and Grigoryev, SA. (2003). Role of the M-loop and reactive center loop domains in the folding and bridging of nucleosome arrays by MENT. *J. Biol. Chem.* 278, 43384-43393.
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D. and Bergmann, M. (1998). Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 939-945.
- Sterner, DE. and Berger, SL. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435-459.
- Strahl, BD. and Allis, CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strohner, R., Wachsmuth, M., Dachauer, K., Mazurkiewicz, J., Hochstatter, J., Rippe, K. and Längst, G. (2005). A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 683-690.
- Stucki, M., Clapperton, JA., Mohammad, D., Yaffe, MB., Smerdon, SJ. and Jackson, SP. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Sullivan, B. and Karpen, G. (2001). Centromere identity in *Drosophila* is not determined in vivo by replication timing. *J. Cell Biol.* 154, 683-690.
- Suto, RK., Clarkson, MJ., Tremethick, DJ. and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1121-1124.
- Taverna, SD., Li, H., Ruthenburg, AJ., Allis, CD. and Patel, DJ. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1025-1040.
- Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, HR., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, PR., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, NV. and Laue, ED. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* 23, 489-499.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403-427.
- Thoma, F., Losa, R. and Koller, T. (1983). Involvement of the domains of histones H1 and H5 in the structural organization of soluble chromatin. *J. Mol. Biol.* 167, 619-640.
- Tremethick, DJ. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128, 651-654.
- Trojer, P. and Reinberg, D. (2008). Beyond histone methyl-lysine binding: how malignant brain tumor (MBT) protein L3MBTL1 impacts chromatin structure. *Cell Cycle* 7, 578-585.

- Tse, C., Sera, T., Wolffe, AP. and Hansen, JC. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4629-4638.
- Tsunaka, Y., Kajimura, N., Tate, S. and Morikawa, K. (2005). Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res.* 33, 3424-3434.
- Utley, RT., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S. and Côté, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8179-8190.
- van Rooijen, HJ., Ooms, MP., Spaargaren, MC., Baarends, WM., Weber, RF., Grootegoed, JA. and Vreeburg, JT. (1998). Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum. Reprod.* 13, 1559-1566.
- VanDemark, AP., Kasten, MM., Ferris, E., Heroux, A., Hill, CP. and Cairns, BR. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation.. *Mol. Cell* 27, 817-828.
- Varga-Weisz, P D;Blank, T A;Becker, P B. (1995). Energy-dependent chromatin accessibility and nucleosome mobility in a cell-free system. *EMBO J.* 14, 2209-2216.
- W. L. DeLano. (2002). The pymol molecular graphics system., CA:DeLano.
- Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, CM. and Ekwall, K. (2007). A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *EMBO J.* 26, 2868-2879.
- Wei, L., Jamonnak, N., Choy, J., Wang, Z. and Zheng, W. (2008). Differential binding modes of the bromodomains of CREB-binding protein (CBP) and p300 with acetylated MyoD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 279-284.
- White, CL., Suto, RK. and Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* 20, 5207-5218.
- Woodcock, CL. (2006). Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 213-220.
- Wu, S. and Chiang, C. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 282, 13141-13145.
- Wu, S., Lee, A., Hou, SY., Kemper, JK., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Chiang, C. (2006). Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev.* 20, 2383-2396.
- Wu, S., Zhou, T. and Chiang, C. (2003). Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6229-6242.
- Wyatt, P. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica chimica acta* 272, 1-40.
- Yan, W., Ma, L., Burns, KH. and Matzuk, MM. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10546-10551.
- Yang, X. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling.. *Bioessays* 26, 1076-1087.
- Yang, Z., He, N. and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 28, 967-976.

- Yang, Z., Yik, JHN., Chen, R., He, N., Jang, MK., Ozato, K. and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol. Cell* 19, 535-545.
- You, J., Srinivasan, V., Denis, GV., Harrington, WJJ., Ballestas, ME., Kaye, KM. and Howley, PM. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes. *J. Virol.* 80, 8909-8919.
- Young, JI., Hong, EP., Castle, JC., Crespo-Barreto, J., Bowman, AB., Rose, MF., Kang, D., Richman, R., Johnson, JM., Berget, S. and Zoghbi, HY. (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17551-17558.
- Zeng, L. and Zhou, MM. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513, 124-128.
- Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z. and Zhou, M. (2005). Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2376-2377.
- Zeng, L., Zhang, Q., Gerona-Navarro, G., Moshkina, N. and Zhou, M. (2008). Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* 16, 643-652.
- Zhang, Y., Smith, CL., Saha, A., Grill, SW., Mihardja, S., Smith, SB., Cairns, BR., Peterson, CL. and Bustamante, C. (2006). DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol. Cell* 24, 559-568.
- Zhao, M., Shirley, CR., Mounsey, S. and Meistrich, ML. (2004). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol. Reprod.* 71, 1016-1025.
- Zhou, J., Fan, JY., Rangasamy, D. and Tremethick, DJ. (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1070-1076.
- Zlatanova, J. and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16, 166-179.
- Zofall, M., Persinger, J., Kassabov, SR. and Bartholomew, B. (2006). Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 339-346.

Annexes

Annexe 1

Librairies utilisées pour définir le résidu acétyl-lysine dans le programme cns

Fichier protein_rep.par (paramètres concernant les angles et les liaisons)

```
{* Bonds *}
bond C CH3E 947.200 1.516 ! 0.025
{* Angles *}
angle CH3E C NH1 440.686 116.500
angle CH3E C O 485.856 120.800
{* Dihedral angles *}
dihe CH2E NH1 C CH3E $kdih_rigid 1 0.0
dihe CH2E NH1 C O $kdih_rigid 1 180.0
{* Improper angles *}
impr C O CH3E NH1 $kimpr_strong 0 0.0
```

Fichier protein_top (paramètres concernant la topologie)

```
RESIDue ALY
GROUp
ATOM N TYPE NH1 CHARge -0.35 END
ATOM H TYPE=H CHARge= 0.25 END
ATOM CA TYPE CH1E CHARge 0.10 END
ATOM CB TYPE CH2E CHARge 0.0 END
ATOM CG TYPE CH2E CHARge 0.0 END
ATOM CD TYPE CH2E CHARge 0.0 END
ATOM CE TYPE CH2E CHARge 0.0 END
ATOM NZ TYPE NH1 CHARge -0.35 END
ATOM OH TYPE O CHARge -0.55 END
ATOM CH TYPE C CHARge 0.55 END
ATOM CH3 TYPE CH3E CHARge 0.0 END
ATOM C TYPE C CHARge 0.55 END
ATOM O TYPE O CHARge -0.55 END
BOND N CA
BOND CA C
BOND C O
BOND N H
BOND CA CB
BOND CB CG
BOND CG CD
BOND CD CE
BOND CE NZ
BOND NZ CH
BOND CH OH
BOND CH CH3
DIHEdral N CA CB CG
DIHEdral CA CB CG CD
DIHEdral CB CG CD CE
DIHEdral CG CD CE NZ
DIHEdral CD CE NZ CH
DIHEdral CE NZ CH OH ! flat ? (0 degrees = cis) 0.08
DIHEdral CE NZ CH CH3 ! flat ? (180 degrees = trans) 179.66
IMPRoper CA N C CB ! chirality or flatness improper 36.08
IMPRoper CH OH CH3 NZ ! chirality or flatness improper -0.25
END { RESIdue ALY }
```

Annexe 2

**Alignement de séquence des homologues de la famille BET
(d'après Wu, 2007)**

Annexe 3

Structures et affinités de bromodomaines

Protéine	Peptide	Technique	Kd (μM)	Référence
Gcn5	H4-K16	RMN	900	Hudson, 2000
	H4-K8	RMN	900	Hudson, 2000
	H2A-K5	RMN	900	Hudson, 2000
	H4-K16	Xtal		Owen, 2000
TAFII250	H4-K5,12	ITC	1,4	Jacobson, 2000
	H4-K8,16	ITC	5,6	Jacobson, 2000
	H4-4ac	ITC	5,3	Jacobson, 2000
	H4-K16	ITC	39	Jacobson, 2000
Bdf1	H4-4ac	ITC	8,4	Ladurner, 2003
	H3-K14,18	ITC	14	Ladurner, 2003
CBP	P53	RMN	50	Mujtabal, 2004
	H4-K20	STD-NMR	218	Zeng and Zhou, 2008
	H3-K36	STD-NMR	122	Zeng and Zhou, 2008
	p53-K382	STD-NMR	187	Zeng and Zhou, 2008
PCAF	H4-K8	RMN	346	Dhalluin, 1999
	Tat	RMN	10	Mujtaba, 2002
	Tat-K50	STD-NMR	84	Zeng and Zhou, 2008
	H3-K14	STD-NMR	128	Zeng and Zhou, 2008
	H3-K9	STD-NMR	1051	Zeng and Zhou, 2008
	H3-K36	STD-NMR	402	Zeng and Zhou, 2008
	H4-K16	STD-NMR	365	Zeng and Zhou, 2008
	H4-K20	STD-NMR	247	Zeng and Zhou, 2008
Brg	H4-K12	RMN	3600	Shen, 2007
	H4-K8	RMN	4000	Shen, 2007
	H3-K14	RMN	1200	
Brd2 Brd2-BD2	H4-K12	FC-FRET		
	H4-K12	NMR	2900	Huang, 2007
Brd4-BD1	H4-K5	STD-NMR	800	Liu,2008
	H4-K12	STD-NMR	600	Liu,2008
Brd4-BD2	H4-K5	STD-NMR	1000	Liu,2008
	H4-K12	STD-NMR	1300	Liu,2008
Brd7	H3-K9	RMN	3960	Hongbin, 2007
	H3-K14	RMN	1190	Hongbin, 2007
	H4-K8	RMN	1790	Hongbin, 2007
	H4-K12	RMN	3420	Hongbin, 2007
	H4-K16	RMN	2560	Hongbin, 2007
Pb1-BD1	H3-K4	AFES	0,39	Chandrasekaran, 2007
Pb1-BD2	H3-K9	AFES	0,36	Chandrasekaran, 2007
Pb1-BD3	H3-K9	AFES	0,71	Chandrasekaran, 2007
Pb1-BD4	H3-K23	AFES	0,12	Chandrasekaran, 2007
Pb1-BD5	H3-K14	AFES	0,79	Chandrasekaran, 2007
Pb1-BD6	H3-K23	AFES	9,7	Chandrasekaran, 2007

Figure A: Affinités de quelques bromodomaines pour des peptides acétylés

Pdb	Méthode	Espèce	Protéine	Référence
+acK peptide				
1E6I	cristallographie	levure	BD de GCN5 + H4acK16 { ¹⁶ (acK)RHK }	Owen et al., 2000
1JM4	RMN	homme	BD de PCAF + HIV-1 Tat { ⁴⁷ (acK)KRRQ ⁵⁴ }	Mujtaba et al., 2002
1JSP	RMN	homme	BD de CBP + P53 Peptide { ³⁸⁰ (acK)LMFK }	Mujtaba et al., 2004
2ROV [2R10, 2R0Y, 2R0S]	cristallographie	levure	Double BD de Rsc4,dont K25Ac { RPKYLPG(acK) ²⁵ }	VanDemark et al., 2007
2RNW	RMN	homme	PCAF/H3-acK9 {RTQTAR(acK)9STGGKAP}	Zeng et al., 2008
2RNX	RMN	homme	PCAF/H3-acK36 {RTQTAR(acK)9STGGKAP}	Zeng et al., 2008
2RNY	RMN	homme	CBP/H4-acK20 {GGAKRHR(acK)20VLRDNIQ}	Zeng et al., 2008
+ Ligand				
1N72=1B91	RMN	homme	P/CAF BD + Ac-histamine	Dhalluin et al., 1999
1WUG, 1ZS5	RMN	homme	PCAF BD + drogue, Np1	Zeng et al., 2005
2D82	RMN	homme	Cbp BD + drogue	Sachchidanand et al., 2006
Sans ligand				
1F68	RMN	homme	BD from Gcn5	Hudson et al., 2000
1EQF	cristallographie	homme	Double BD of TafII250	Jacobson et al., 2000
2F6J [2R17]	cristallographie	homme	Phd-linker-BD de Bptf + H3(1-15)K4me3	Li et al., 2006
2H60	RMN	homme	Brg1	Shen et al., 2007
2GRC	cristallographie	homme	Brg1	Singh et al., 2007
2I7K	RMN	homme	Brd7	Sun et al, 2007
1X0J	cristallographie	homme	Brd2-BD1	Nakamura et al., 2007
2I8N	RMN	homme	Brd4-BD2	Liu et al., 2008
Non publiés				
2G4A	RMN	homme	Ring3 (Brd2)	Huang H., Wu J, Shi Y
2I8N	RMN	homme	Brd4-BD2	Liu Y, Wu JH & Shi Y
2NXB	cristallographie	homme	Brd3-BD1	SGC: Filippakopoulos P , Knapp S
2O01	cristallographie	homme	Brd3-BD2	SGC: Filippakopoulos P, Knapp S
2O5S	cristallographie	homme	Brd4-BD1	SGC:Filippakopoulos P.,Knapp S
2O5U	cristallographie	homme	Brd4-BD2	SGC:Filippakopoulos P, Knapp S
2RFJ	cristallographie	homme	Brdt-BD1	SGC: Filippakopoulos P, Knapp S
2DKW	RMN	homme	BD deKiaa1240	RSGI: Sano R, Yokoyama S
2D9E	RMN	homme	BD de peregrin	RSGI: Hatta R, Yokoyama S
2DAT	RMN	homme	BD de Swi/SNF	RSGI: Yoneyama M, Yokoyama S
2DVV	cristallographie	homme	Brd2-BD2	RSGI: Padmanabhan, Yokoyama S
2E7N	RMN	homme	Brd3-BD2	RSGI: Qin XR, Yokoyama S
2DWW	cristallographie	Souris	Brd4-BD?	RSGI: Padmanabhan, Yokoyama S
2E7O	RMN	homme	BD next to Zn Finger dom.2b	RSGI: Qin XR, Yokoyama S
2YQD	RMN	mouse	BD5 de polybromo-1	RSGI: Sano R, Yokoyama S
2DVQ, 2DVR, 2DVS	cristallographie	homme	Bdr2-BD1 + H4 K12ac {KGLG-acK-GGA} Bdr2-BD1 + H4 K12ac {acKseul} Bdr2-BD1 + H4 K12ac {K12 seul}	SGC: Filippakopoulos P, Knapp S
2e3k	cristallographie	homme	Bdr2-BD2+ H4 K5K12ac {SGRG-acK-GGKGLG-acK-GGA}	SGC: Filippakopoulos P, Knapp S

Figure B: Structures de bromodomaine connues

Annexe 4

Résultats détaillés des mesures d'ITC

Explication des figures :

Panneau du haut : variations de chaleur résultant de la titration du peptide dans la cellule contenant la solution de protéine (en noir) ou le tampon seul (en rouge). Dans les cas où les isothermes se superposent, la courbe de la dilution du peptide est décalée vers le haut pour plus de clarté.

Panneau du bas : données intégrées de la dilution du peptide (en rouge) et de l'interaction entre la protéine et le peptide après la soustraction du signal dû à la dilution du peptide (en noir). La courbe théorique représentant le meilleur fit (en vert) est indiquée lorsque la détermination des paramètres N (nombre de site), K_a (constante d'association), ΔH (différence d'enthalpie) et ΔS (différence d'entropie) associés à la réaction de fixation a été possible. Dans le cas où la détermination des paramètres n'a pas été possible, les données de l'expérience (en noir) sont représentée sans soustraction du signal de la dilution du peptide pour une meilleure comparaison des deux signaux.

Table du bas : Pour chaque expérience, concentrations de peptide et de protéine utilisée, nombre de site et constante de dissociation déterminée. Pour chaque série d'expérience, valeurs moyennes des paramètres de la liaison.

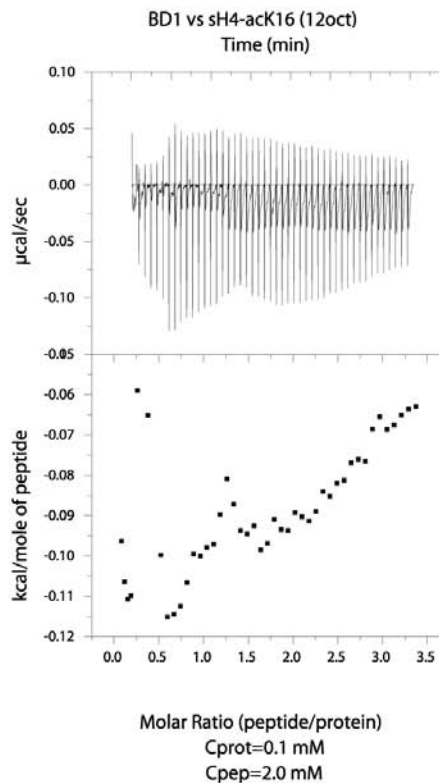
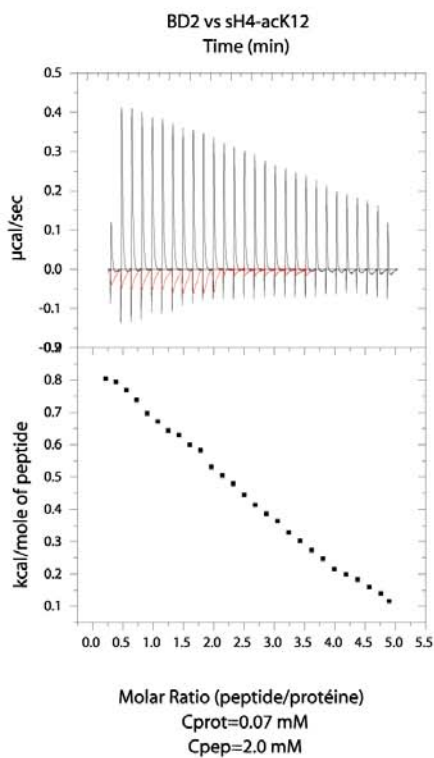
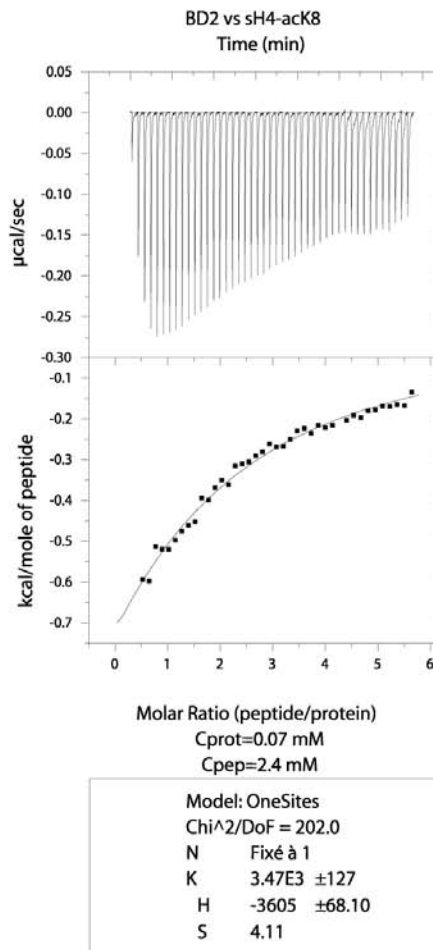
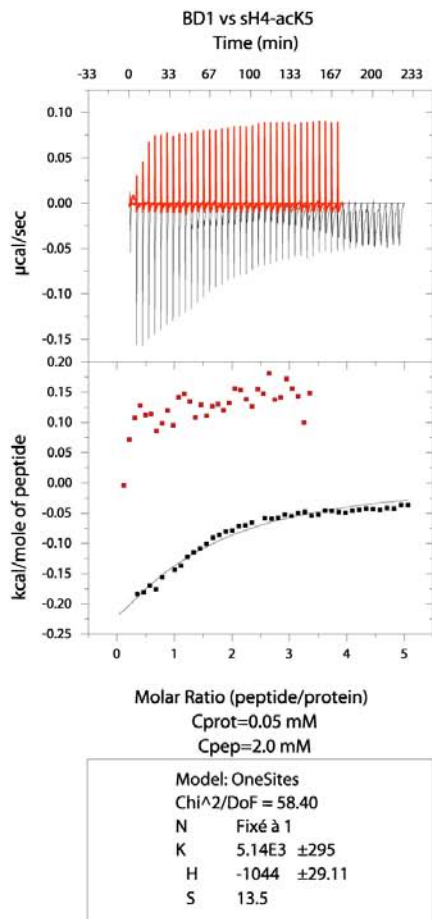


Figure A Affinités de BD1 pour les peptides sH4-K5ac, sH4-K8ac, sH4-K12ac et sH4-K16ac

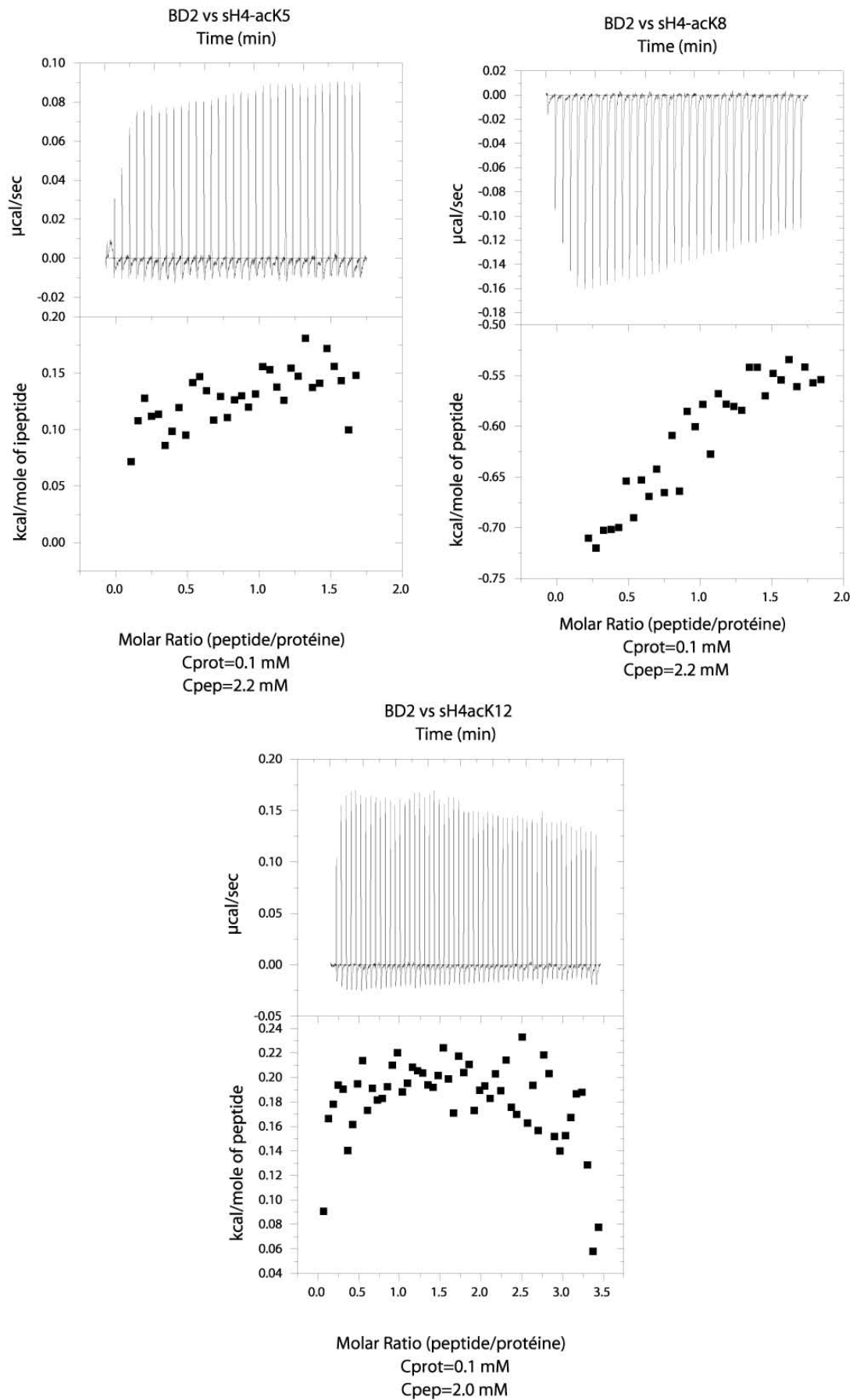
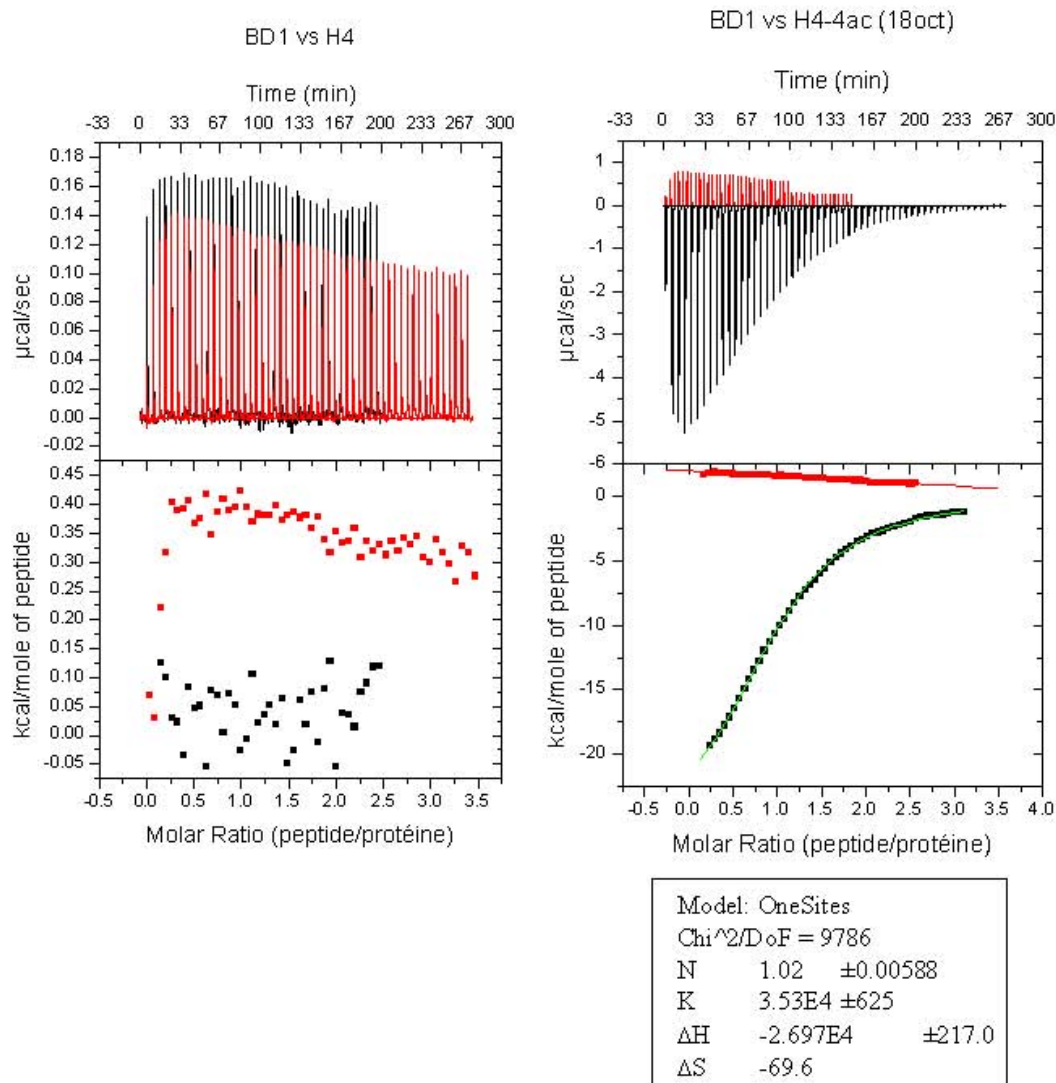
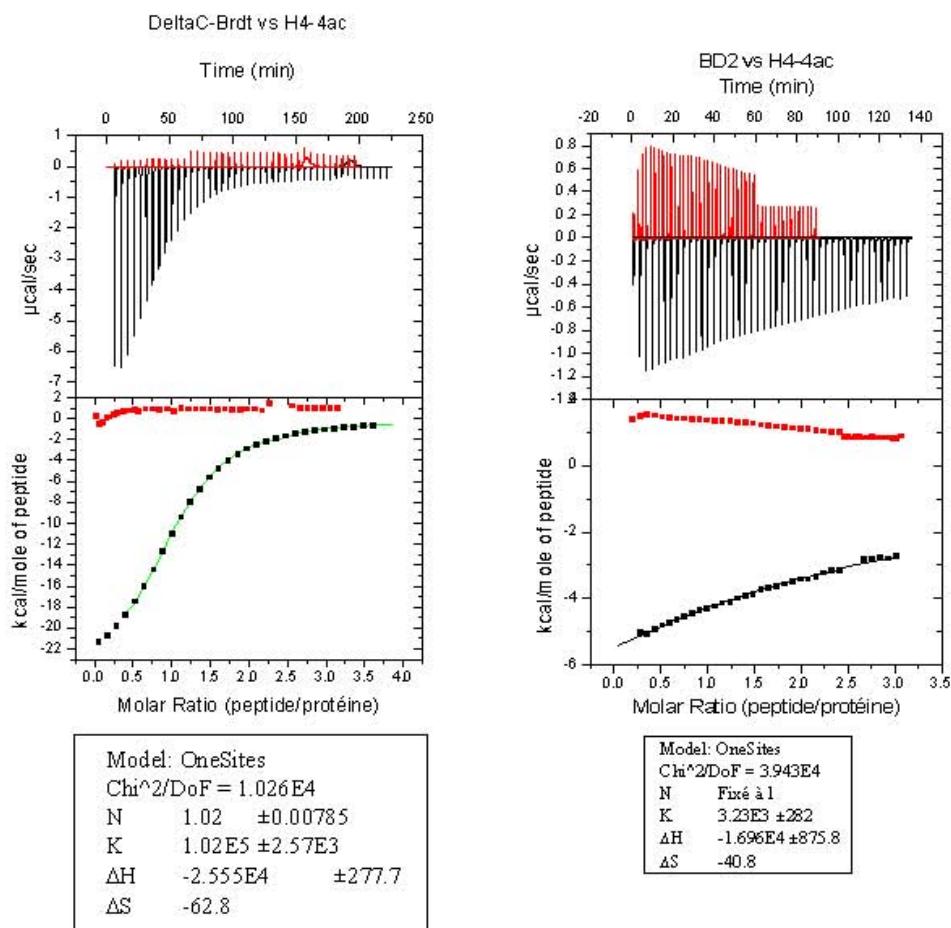


Figure B: Affinités de BD2 pour les peptides sH4-K5ac, sH4-K8ac et sH4-K12ac



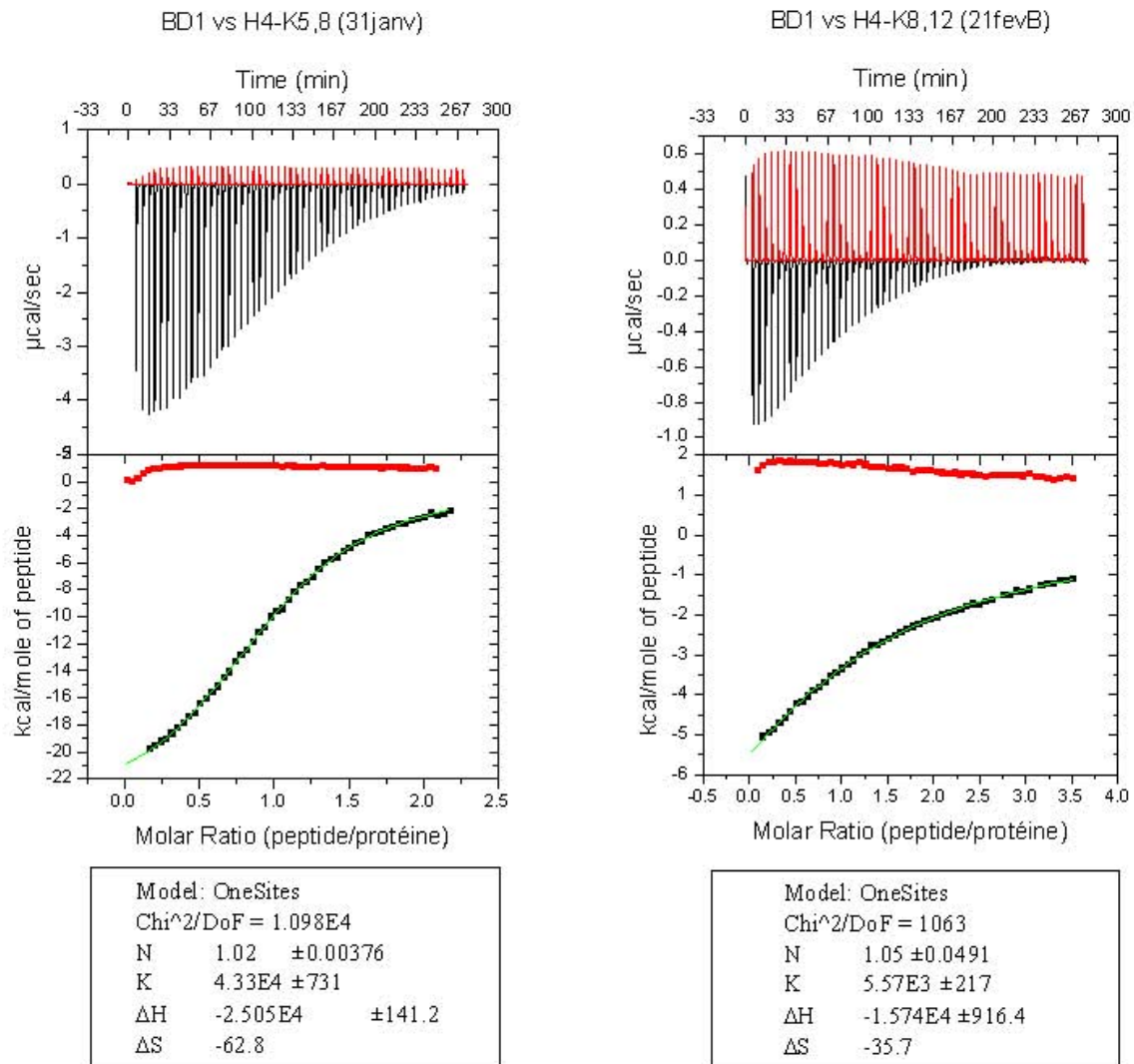
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (μM)
H4	20fev	0,103	2,00	n.d	<10 ³	>10 ³
H4-4ac	3 oct	0,090	1,84	1,02	3,71E+04	27,0
	4 oct	0,090	1,84	0,99	2,80E+04	35,7
	17 oct	0,100	1,84	1,02	3,53E+04	28,3
	25mai	0,123	2,04	1,02	4,77E+04	21,0
			<i>ave(N)</i>	1,01	<i>ave(Kd)</i>	28,0
			<i>std(N)</i>	0,02	<i>stdev</i>	6,1

Figure C: Affinités de BD1 pour les peptides H4 et H4 tétra-acétylé.



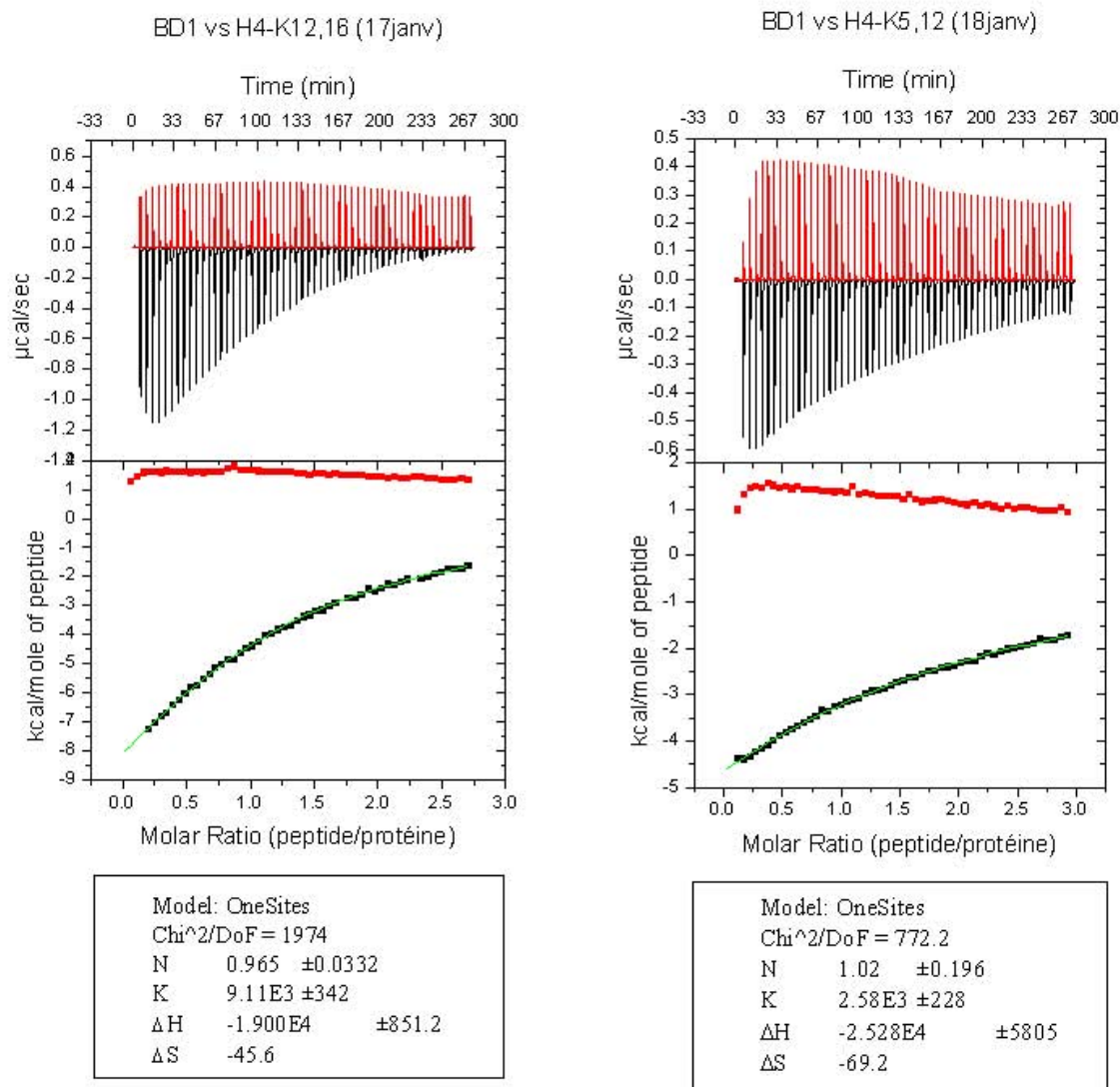
Protéine	Date	[Prot] (mM)	[Pept] (mM)	N	Ka	Kd (µM)
ΔC-Brdt	13 dec	0,05	2,00	1,02	1,02E+05	9,80
	13 dec	0,05	2,00	0,97	6,91E+04	14,47
	14 dec	0,08	2,00	1,03	8,58E+04	11,66
	15sept	0,05	1,1	1,01	1,03E+05	9,71
				<i>ave(N)</i> <i>std(N)</i>	1,01 0,03	<i>ave(Kd)</i> <i>stdev</i>
BD2	23oct	0,050	2,00	Fixé à 1	1,73E+03	578,0
	25oct	0,100	2,00	n.d	n.d	<10 ³
	18oct	0,100	2,00	Fixé à 1	3,23E+03	309,6
	7mars	0,150	4,00	n.d	n.d	<10 ³

Figure D: Affinités de DeltaC-Brdt et BD2 pour le peptide H4 tétra-acétylé



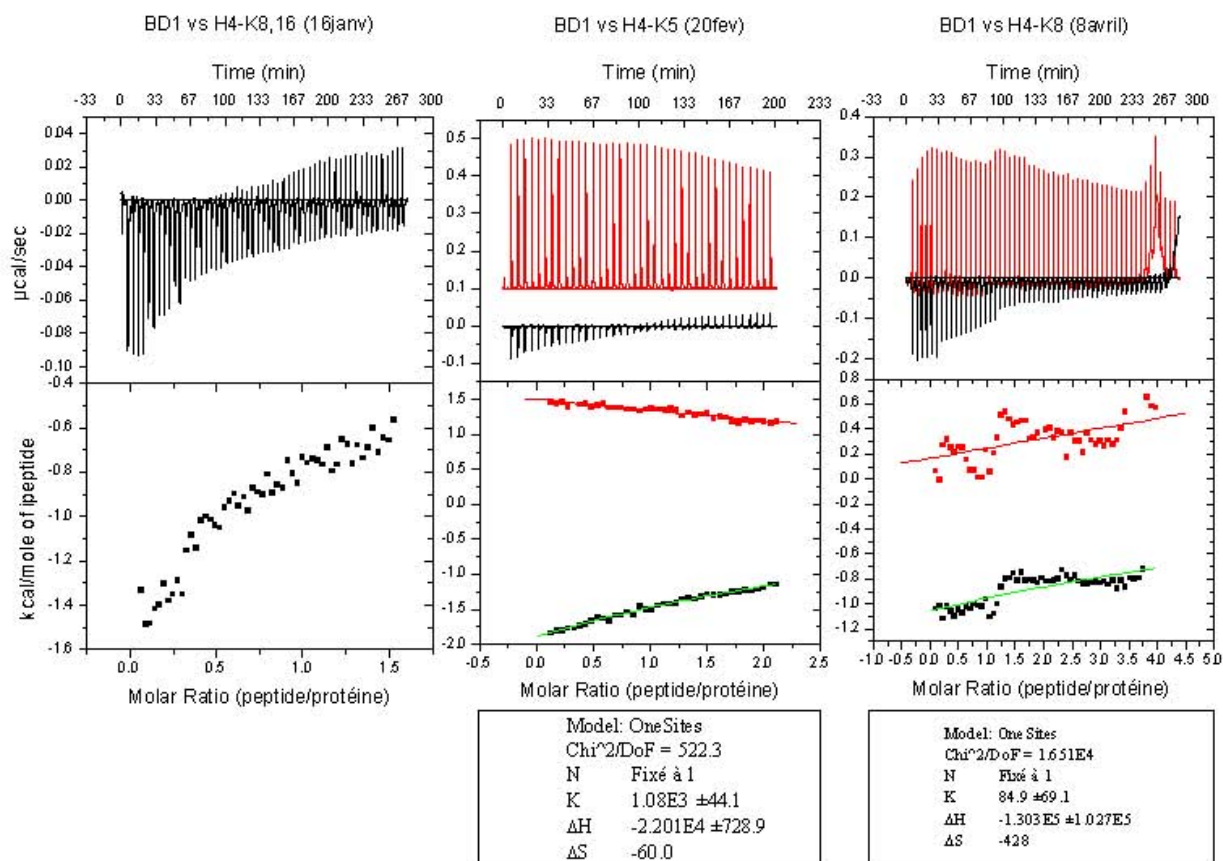
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H4-K5,8	17janv	0.080	1,45	0,98	4,84E+04	20,7
	31janv	0.115	1,45	1,02	4,33E+04	23,1
			<i>ave(N)</i>	1,00	<i>ave(Kd)</i>	21,9
			<i>std(N)</i>	0,03	<i>stdev(Kd)</i>	1,7
H4-K8,12	21fevA	0.087	1,83	1,06	4,59E+03	217,9
	21fevB	0.09	1,83	1,05	5,57E+03	179,5
	15mars	0.17	3,66	1,07	5,54E+03	180,5
			<i>ave(N)</i>	1,06	<i>ave(Kd)</i>	192,6
			<i>std(N)</i>	0,01	<i>stdev(Kd)</i>	21,9

Figure E: Affinités de BD1 pour les peptides H4-K5K8ac et H4-K8K12ac



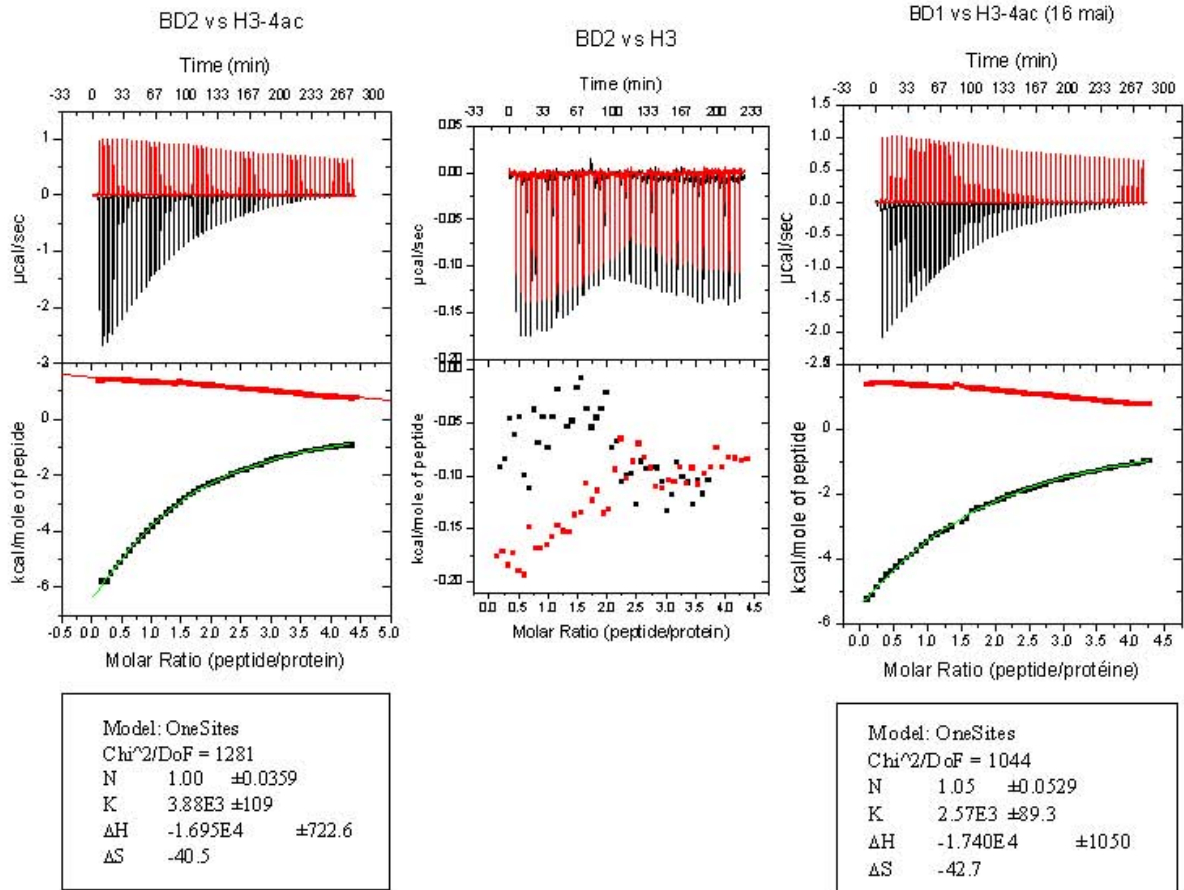
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H4-K12,16	17janv	0.083	1.29	0.97	9,11E+03	109,8
	1fev	0.12	1.29	0,96	7,04E+03	142,0
	22mai		2,60	1,03	1,01E+04	99,0
			<i>ave(N)</i>	0,99	<i>ave(Kd)</i>	116,9
			<i>std(N)</i>	0,04	<i>stdev(Kd)</i>	22,4
H4-K5,12	18janv	0.085	1.44	1,02	2,58E+03	387,6
	1fev	0.12	1.44	1,00	3,41E+03	293,3
			<i>ave(N)</i>	1,01	<i>ave(Kd)</i>	340,4
			<i>std(N)</i>	0,04	<i>stdev(Kd)</i>	66,7

Figure F: Affinités de BD1 pour les peptides H4-K12K16ac et H4-K5K12ac



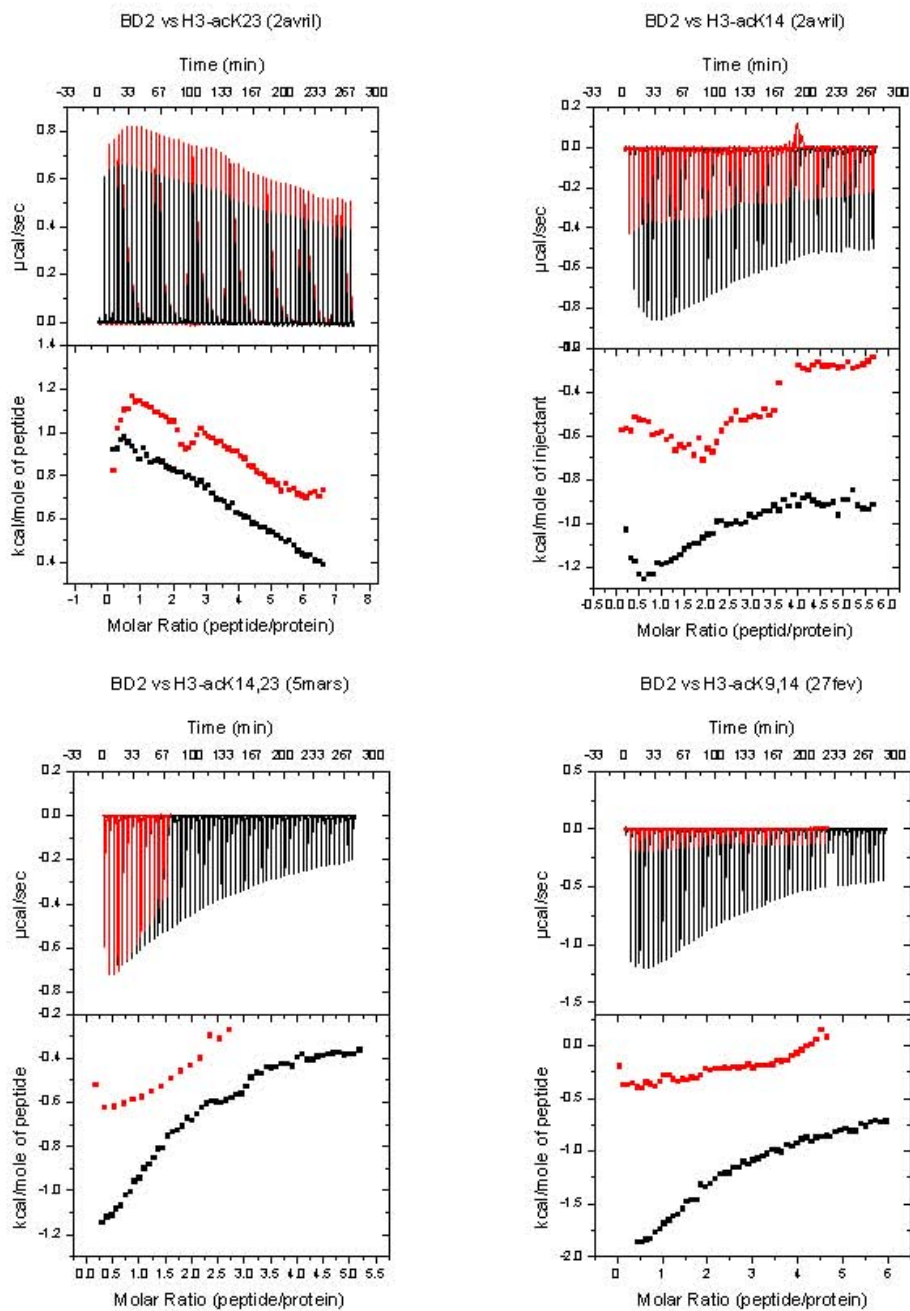
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H4-K8,16	16janv	0.085	1,30	n.d	$<10^3$	$>10^3$
	18janv	0.066	1,30	n.d	$<10^3$	$>10^3$
H4-K5	20fev	0.087	1,91	n.d	$<10^3$	$>10^3$
H4-K8	22fev	0,087	3,10	n.d	$<10^3$	$>10^3$
	5avril	0,087	3,10	n.d	$<10^3$	$>10^3$

Figure G : Affinités de BDI pour les peptides H4-K8K16ac, H4-K5ac et H4-K8ac.



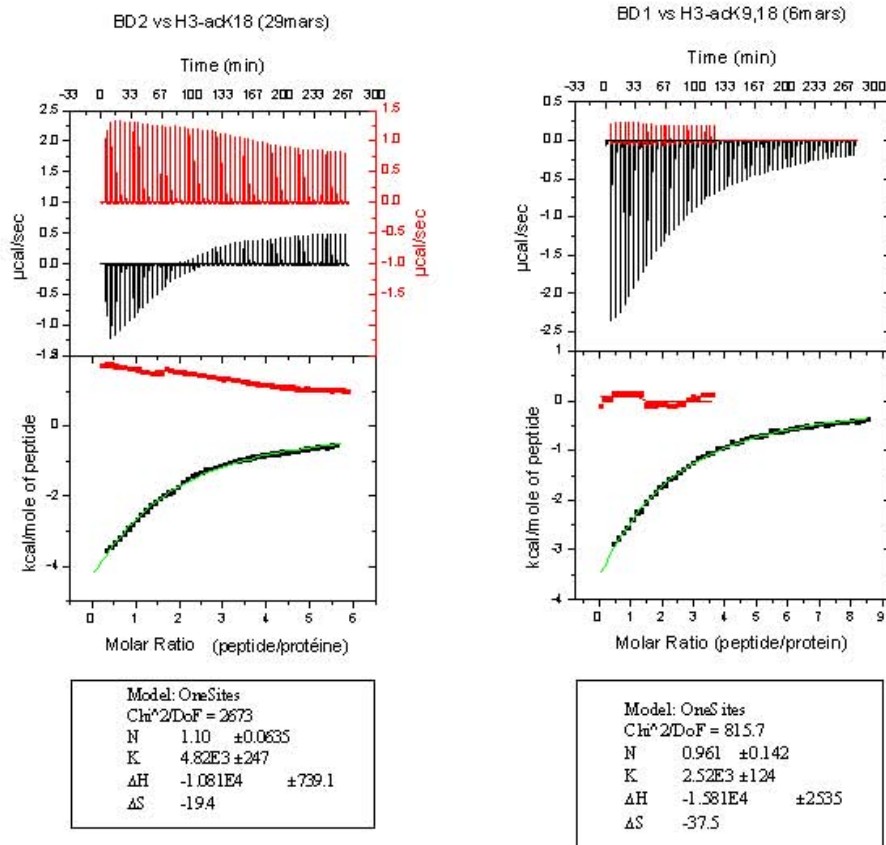
Protéine	Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)	
BD1	H3-4ac	2fev	0,123	2,00	1,00	2,35E+03	425,5	
		26mars	0,147	4,20	0,94	2,82E+03	354,6	
		16mai	0,165	4,00	1,05	2,57E+03	389,1	
					<i>ave(N)</i>	1,00	<i>ave(Kd)</i>	389,7
					<i>std(N)</i>	0,06	<i>stdev(Kd)</i>	35,5
BD2	H3-4ac	23janA	0,054	2,10	1,22	5,96E+03	167,79	
		23janB	0,054	2,20	0,95	6,03E+03	165,84	
		15mai	0,159	4,00	1,00	3,88E+03	257,73	
					<i>ave(N)</i>	1,03	<i>ave(Kd)</i>	214,0
					<i>std(N)</i>	0,11	<i>stdev(Kd)</i>	48,0
BD2	H3	26fev	0.15	6,00	n.d	<10 ³	>10 ³	

Figure H: Affinités de BD1 et BD2 pour les peptides H3 tétra-acétylé et H3.



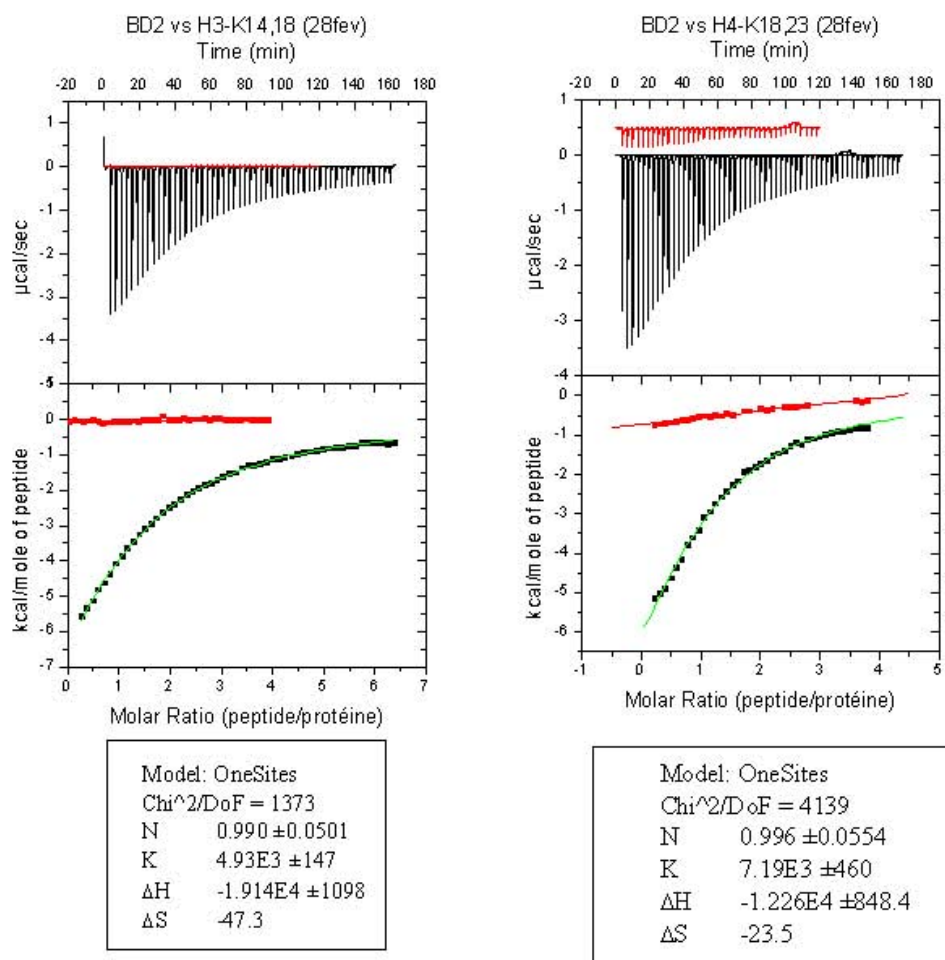
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (μM)
H3-K14	3 avril	0.127	4,17	n.d	$<10^3$	$>10^3$
H3-K23	2 avril	0.105	4,08	n.d	$<10^3$	$>10^3$
H3-K14,23	5 mars	0.15	4,42	n.d	$<10^3$	$>10^3$
H3-K9,14	27 fev	0.118	3,93	n.d	$<10^3$	$>10^3$

Figure I: Affinités de BD2 pour les peptides H3-K14ac, H3-K23ac, H3-K14K23ac et H3-K9K14ac



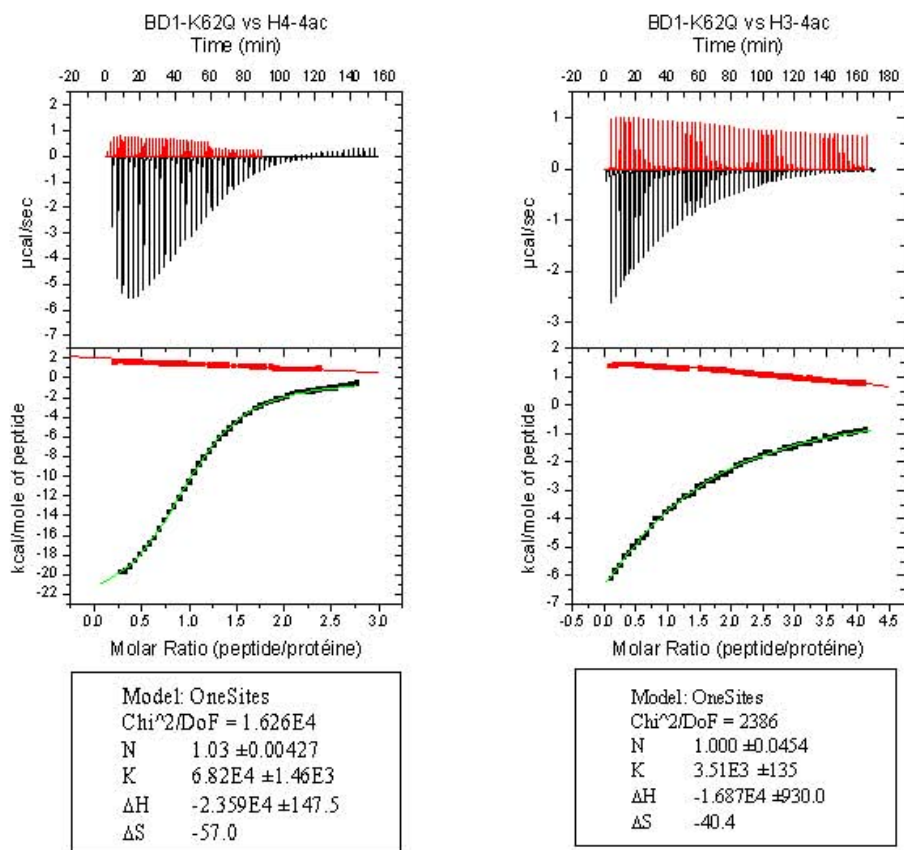
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H3-K18	28mars	0.13	4,40	0,95	3,39E+03	295,0
	29mars	0.13	4,40	1,10	4,82E+03	207,5
			<i>ave(N)</i>	1,03	<i>ave(Ka)</i>	251,2
			<i>std(N)</i>	0,11	<i>stdev(Ka)</i>	61,9
H3-K9,18	6mars	0,116	5,63	0,96	2,52E+03	396,8
	15mars	0,146	5,63	Fixé à 1	1,56E+03	641,0
			<i>ave(N)</i>	0,98	<i>ave(Ka)</i>	518,9
			<i>std(N)</i>	0,04	<i>stdev(Ka)</i>	172,7

Figure J: Affinités de BD2 pour les peptides H3-K18ac et H3-K9K18ac.



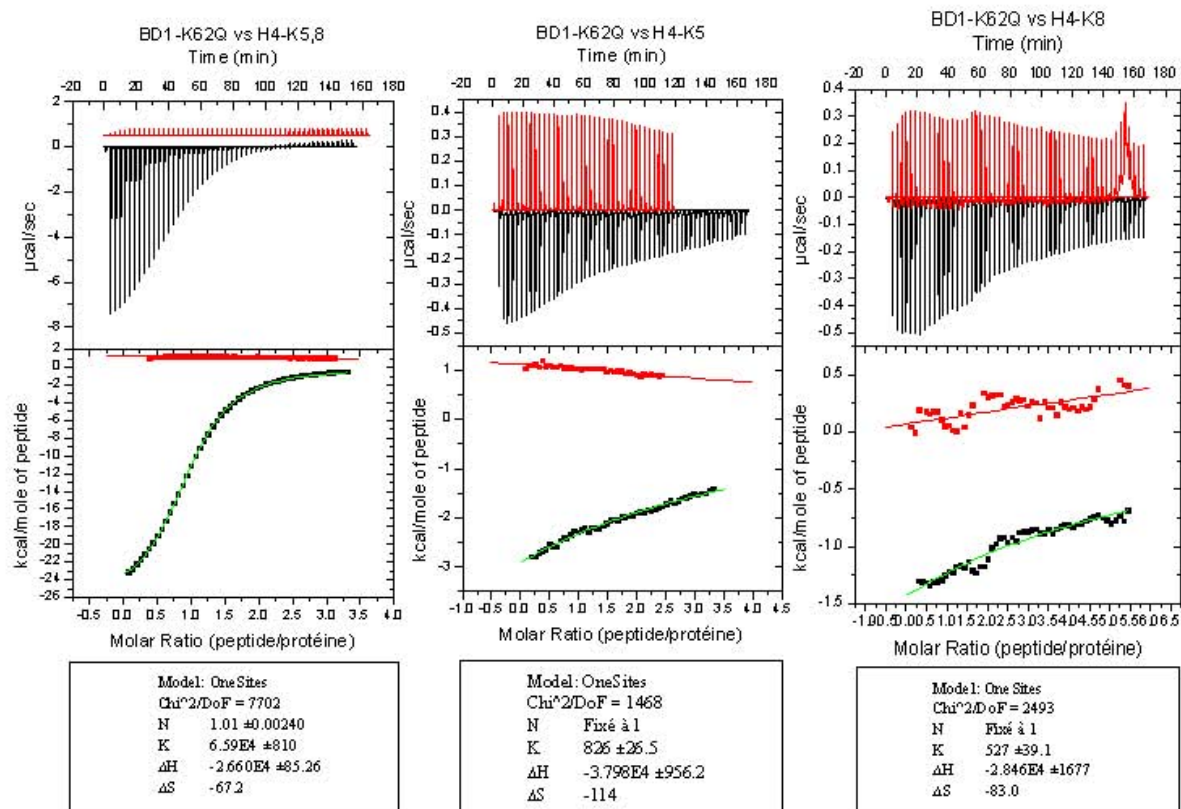
Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H3-K14,18	28fev	0.10	3,77	1,00	4,93E+03	202,8
	14mars	0,146	3,77	Fixé à 1	4,34E+03	230,4
			<i>ave(N)</i>	1,00	<i>ave(Kd)</i>	216,6
			<i>std(N)</i>	0,05	<i>stdev(Kd)</i>	19,5
H3-K18,23	28fev	0,13	4,26	0,98	7,18E+03	139,3
	14mars	0.146	4,26	1,02	4,69E+03	213,2
			<i>ave(N)</i>	1,00	<i>ave(Kd)</i>	176,2
			<i>std(N)</i>	0,03	<i>stdev(Kd)</i>	52,3

Figure K: Affinités de BD2 pour les peptides H3-K14K18ac et H3-K18K23ac



H4-4ac	28mars	0.12	2,04	1,03	6,82E+04	14,7
	29mars	0.105	2,04	1,02	5,95E+04	16,8
			<i>ave(N)</i>	1,03	<i>ave(Kd)</i>	15,7
			<i>std(N)</i>	0,01	<i>stdev</i>	1,5
H3-4ac	27mars	0,130	4,00	0,95	4,63E+03	216,0
	16maiA	0.167	4,00	1,00	3,51E+03	284,9
	16maiB	0.15	4,00	0,98	3,39E+03	295,0
			<i>ave(N)</i>	0,98	<i>ave(Kd)</i>	275,2
			<i>std(N)</i>	0,02	<i>stdev</i>	33,5

Figure L: Affinités de BD1-K62Q pour les peptides H4 tétra-acétylés et H3 tétra-acétylés



Peptide	Date	[prot](mM)	[pept](mM)	N	Ka (M)	Kd (µM)
H4-K5,8	13mars	0.115	2,18	1,02	6,80E+04	14,7
	13mars	0.107	2,18	1,01	6,59E+04	15,2
			<i>ave(N)</i> <i>std(N)</i>	1,02 0,01	<i>ave(Kd)</i> <i>stdev</i>	14,9 0,3
H4-K5	4avril	0.10	1,91	n.d	<10 ³	>10 ³
H4-K8	4avril	0.105	3,10	n.d	<10 ³	>10 ³

Figure M: Affinités de BD1-K62Q pour les peptides H4-K5K8ac, H4-K5ac et H4-K8ac.

Annexe 5

Article soumis : La mutation K61Q de Brdt et l'infertilité masculine

Bromodomain-dependent male infertility

Sophie Rousseaux ^{1,2*}, Julien Thevenon ^{1,2,3}, Cécile Caron ^{1,2}, Edwige Col ^{1,2}, Anne-Laure Vitte ^{1,2}, Sandrine Curtet ^{1,2}, Jonathan Gaucher ^{1,2}, Sylviane Hennebicq ^{1,2,3}, Anne-Karen Faure ^{1,2,3}, Joel Lunardi ^{2,3}, Pierre-Simon Jouk ^{2,3}, Pierre F. Ray ^{2,3}, Christine Cans ^{2,4}, Rachel Levy ⁵, Isabelle Aknin-Seifer ⁵, Celia Ravel ⁶, Jean-Pierre Siffroi ⁶, Ken Mc Elreavey ⁷, Hervé Lejeune ⁸, Clément Jimenez ⁹, Jeanne Morinière ¹⁰, Christoph Muller ¹⁰, Debra J. Wolgemuth ¹¹, Saadi Khochbin ^{1,2*}

1- INSERM, U823, Grenoble, F-38706 France.

2- Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38706 France

3- Genetics and Procreation Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

4 – Service d’Information et d’Informatique Médicale, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

5 – Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Service de Génétique Moléculaire, CHU-Hopital Nord, Saint Etienne, France ; RL new address: Reproductive Biology lab, Hopital Jean Verdier, 93 143 Bondy, France

6- Université Pierre et Marie Curie Paris-6, EA1533, AP-HP, Hopital Tenon, Paris, France ; JPS new address: Trousseau Hospital, 75 571 Paris Cedex 12, France

7- Reproduction, Fertility and Populations, Institut Pasteur, Paris, France.

8- Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron, F-69677 France

9- Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Dijon University Hospital, Dijon, F-21000 France

10- EMBL, 69012 Heidelberg, Germany

11 - Dept. of Genetics and Development and Obstetrics and Gynecology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA

* Corresponding authors:

Mail : sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr; khochbin@ujf-grenoble.fr

Tel : (33) 4 76 54 95 82/83 ; Fax : (33) 4 76 54 95 95

A deleterious single amino acid change in the first bromodomain of testis-specific double bromodomain factor, BRDT, a critical regulator of post-meiotic acetylation-dependent genome organization, causes human male infertility.

Abstract

BRDT (“BRomodomain Testis-Specific”) is a double bromodomain-containing protein specifically expressed in male germ cells. Functional and mouse genetic studies show that it plays a critical role in the post-meiotic genome organization that follows the massive histone acetylation in elongating spermatids, and that its first bromodomain (BD1) is crucial for this function, since its deletion in mice induces male infertility with severe post-meiotic defects.

Here, a systematic screening of the entire *BRDT* coding sequence in infertile males revealed that a specific sequence polymorphism (A->C), affecting a conserved lysine localized in BD1 (K62Q), was homozygous only in infertile males and not in men with proven fertility.

Functional studies showed that the replacement of the critical K in BD1 by a Q affects the stability of BRDT binding to acetylated chromatin. This is the first recessive autosomal genetic defect found in infertile men, which directly alters the function of an important post-meiotic chromatin re-organizer.

Text

About one in six couples attempting pregnancy encounter fertility problems, and defective sperm parameters demonstrate a male contribution in half of them. However, a specific cause is often not found, and so far only very few genes were proven directly involved in male infertility ((1-4), for review see (5-8)).

During spermiogenesis, post-meiotic male germ cells undergo a formidable re-organisation of their genome, where most histones are globally acetylated and then replaced by sperm-specific basic proteins that compact the genome into the highly structured sperm nucleus (9-11).

Despite the fundamental nature of this process, almost nothing is known about the regulatory factors and the underlying mechanisms. Assuming a critical role in genome reorganization for the massive post-meiotic histone acetylation, we focused our attention on testis specific bromodomain-containing proteins as candidate factors mediating the acetylation-dependent events. Accordingly, the testis-specific double bromodomain factor, Brdt, was selected for further studies (12). Brdt belongs to the BET (“Bromodomain Extra-Terminal”) family of double bromodomain-containing factors (13), which in the mouse includes Brd2, Brd3 and Brd4, all expressed in the testis, but of which Brdt is the only testis-specific member (14, 15). Our functional studies have demonstrated that Brdt, via its bromodomains, can bind acetylated histones, is co-detected with acetylated chromatin in male germinal post-meiotic cells, and possesses the unique property of re-organizing acetylated chromatin when expressed in somatic cells and in vitro on purified nuclei (12, 16).

These observations pointed to Brdt as an important factor controlling the male post-meiotic acetylation-dependent genome re-organization. This hypothesis is now strongly supported by the recent data obtained by Wolgemuth and collaborators, who produced a mouse deleted for the first bromodomain (BD1) of *Brdt* (*ABD1* mice) (17).

Spermatogenesis in these mice appears to be normal in pre-meiotic and meiotic stages but elongating and condensing spermatids are profoundly aberrant ((17) and unpublished data).

Together these data suggested that BRDT is a key factor involved in the post-meiotic maturation of male germ cells and that BD1 is a particularly important functional domain of this protein.

Variations in the coding sequence of the *BRDT* gene (localised on chromosome 1) were systematically searched for in 94 infertile males with defective spermatogenesis, combining denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC) and sequencing of all variations.

This initial screening led to the discovery of an infertile man with a homozygous variation (A->C), designated as the “C” allele, which produces a change in the amino-acid sequence (K62->Q) within BD1 (Fig. 1a; Table 1).

To extend these investigations and assess the genetic status of the K62->Q polymorphism in additional individuals, two genetic tests were then developed. The first was based on the specific PCR amplification of either the common or the variant allelic form of the gene. The second test took advantage of the appearance of a restriction site (Bfm I) specifically in the sequence of the C allele.

The allele-specific PCR approach was used to study the genotype of the family of the homozygous C/C patient, showing that this infertile man had inherited the C allele from his heterozygous A/C parents, that his two fertile brothers were A/A and his fertile sister was homozygous C/C (Fig. 1b). These genetic data not only confirmed that the two fertile

brothers did not have a C/C genotype, but also suggested that the C/C genotype was not associated with female infertility. The latter observation is in agreement with the phenotype of the *ΔBDI* mice, in which the females are fertile (17).

The genetic study specifically targeting the specific A->C (K62->Q) genetic alteration was then extended to two other populations of infertile men, of French and North African origin respectively, and their matching fertile controls. Allele-specific amplifications were performed and the results were confirmed either by sequencing or restriction analysis.

The data (Table 2) revealed that the homozygous variant genotype (C/C) was present in several infertile patients, whereas this genotype was absent from fertile males. Indeed, five additional men (1/96 French, and 4/189 North African infertile patients) were found to be homozygous C/C among this new series of 283 infertile men, bringing the total frequency of the homozygous polymorphism among infertile men to 1.6% (6/377), whereas none of the 438 fertile men were identified with the homozygous genotype C/C ($p < 0.03$).

All infertile men included in the study presented spermatogenesis defects with various degrees of severity. More detailed clinical and biological parameters were available for five of the six infertile C/C males. One was azoospermic with high FSH levels. The other four patients were oligozoospermic with respective sperm counts of 0.4, 1.6, 3.1 and $11.5 \times 10^6/\text{ml}$. Their sperm parameters also revealed a moderate (3 patients) to severe (1 patient) asthenozoospermia, as well as teratozoospermia in three of the patients (respective atypical morphology rates of 77%, 95% and 96%). Moreover, in the latter two

patients, malformed acrosomes and abnormal sperm head shapes (mainly macrocephaly) were noticed.

Therefore, this mutation could be considered as a potential cause of infertility in the studied populations.

We then wondered what molecular impact the K62Q mutation could have on the function of the protein. K62 is a conserved residue in the first bromodomain of BRDT proteins from human, mouse and rat (corresponding to K61 in the mouse), which is absent from the second bromodomain. Additionally, this particular lysine also seems to distinguish the testis-specific members of the BET family, since neither BRD2, nor BRD3, or BRD4 possesses a lysine at this position (see supplementary Fig.1 online), and may confer a specific conserved function to the BD1 of BRDT. Accordingly the post-meiotic functions of Brdt BD1 are unique, since despite the expression of other members of BET family in testis (15), none of them can compensate for defects in Brdt function (17).

A series of experiments were therefore designed to reveal the function of this specific residue in the activities of the first bromodomain of Brdt.

Brdt specifically interacts with acetylated histones and co-localizes with acetylated chromatin in somatic cells ectopically expressing Brdt treated by the histone deacetylase inhibitor Trichostatine A (TSA), or during spermiogenesis (12, 16). In order to evaluate the functional impact of K->Q replacement we compared the stability of in vivo association of WT or Q61Brdt with chromatin, using fluorescence recovery after photo bleaching (FRAP), after their ectopic expression in Cos cells, left untreated or after TSA treatment. For these experiments a truncated version of Brdt, (called ∂ C-sBrdt, lacking a

portion of its C-terminal region) with stronger *in vivo* action on acetylated chromatin (12), fused to GFP was used.

In the absence of TSA treatment, it was not possible to distinguish between the *in vivo* turnover of the 61K and 61Q versions of Brdt (Fig. 2 left panels). After TSA treatment, while the recovery time increased for both Brdts demonstrating their mobilization by acetylated chromatin, that of 61Q Brdt was significantly faster (Fig. 2, right panels), showing that the association of the mutant protein (Q61) with acetylated chromatin was significantly less stable than that of the wt protein (K61).

In the context of spermatogenesis, the stage-specific and genome-wide histone acetylation induces an efficient recruitment of Brdt to chromatin followed by the global re-organization of the haploid genome (12, 16). It is therefore very likely that an unstable association of BRDT with acetylated chromatin jeopardizes its subsequent activities such as the recruitment of additional factors and hence may dramatically hinder chromatin acetylation-dependent events in elongating spermatids.

Combining our genetic and functional data, we propose that the spermatogenesis defects observed in the mutated males could result from a dysfunction of BRDT BD1 which could severely impair the events following the general histone acetylation in elongating spermatids. In agreement with this hypothesis, in ΔBDI mice, although the initial increase of histone acetylation seems to take place, the number of condensed spermatids dramatically decreases and their morphology is severely altered ((17) and data not shown).

This is the first time that a recessive autosomal genetic defect found in infertile men is demonstrated to directly alter the function of a factor important in post-meiotic chromatin remodelling.

References

1. T. Kuroda-Kawaguchi *et al.*, *Nat Genet* **29**, 279-86 (2001).
2. T. Miyamoto *et al.*, *Lancet* **362**, 1714-9 (2003).
3. A. H. Dam *et al.*, *Am J Hum Genet* **81**, 813-20 (2007).
4. K. Dieterich *et al.*, *Nat Genet* **39**, 661-5 (2007).
5. C. Foresta, E. Moro, A. Ferlin, *Endocr Rev* **22**, 226-39. (2001).
6. M. M. Matzuk, D. J. Lamb, *Nat Cell Biol* **4**, s41-9. (2002).
7. Y. Nishimune, H. Tanaka, *J Androl* **27**, 326-34 (2006).
8. C. Krausz, C. Giachini, *Arch Androl* **53**, 125-33 (2007).
9. J. Govin, C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux, S. Khochbin, *Eur J Biochem* **271**, 3459-69 (2004).
10. C. Caron, J. Govin, S. Rousseaux, S. Khochbin, *Prog Mol Subcell Biol* **38**, 65-89 (2005).
11. S. Rousseaux *et al.*, *Gene* **345**, 139-53 (2005).
12. C. Pivot-Pajot *et al.*, *Mol Cell Biol* **23**, 5354-65 (2003).
13. B. Florence, D. V. Faller, *Front Biosci* **6**, D1008-18. (2001).
14. M. H. Jones, M. Numata, M. Shimane, *Genomics* **45**, 529-34 (1997).
15. E. Shang *et al.*, *Gene Expr Patterns* **4**, 513-9 (2004).
16. J. Govin *et al.*, in *The Histone Code and Beyond* S. L. Berger, O. Nakanishi, B. Haendler, Eds. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006) pp. 155-172.
17. E. Shang, H. D. Nickerson, D. Wen, X. Wang, D. J. Wolgemuth, *Development* **134**, 3507-15 (2007).
18. The authors wish to thank C. Petosa (EMBL, Grenoble France) and Karin Sadoul (UJF, Grenoble, France) for useful discussions and C. DeRobertis for technical assistance, and acknowledge the help of A. Grichine (microscopy platform, Albert Bonniot Institute, Grenoble). A large part of this work was performed within Grenoble EPIMED platform of U823 INSERM. We gratefully acknowledge support from PHRC (Clinical research project "Infertilité et microdélétion du chromosome Y", coordinator R. Levy, CHU St Etienne France), from Grenoble DRC (Clinical Research program, Grenoble CHU, France) funding, Organon (FARO program), Agence Nationale de la Recherche (ANR, "Regulome" & "Episperm" programs) and Région Rhone Alpes ("CIBLE" program).

Table 1

Nature of the coding sequence variations within *BRDT* identified in our populations of 94 infertile males and 94 fertile matched controls. The consensus and variant forms of each codon and corresponding amino-acid (AA) are shown. Note that variations in exons 2, 6 and 8 are known polymorphisms.

Exon	position	consensus		variant	
		codon	AA	codon	AA
2	62	AAG	K	CAG	Q
6	238	AAA	K	AAC	N
8	410	AAC	N	AAG	K
17	804	GCA	A	GTA	V

Table 2- Frequencies of rs10783071 genotypes in the fertile control and infertile males within the populations of the present study

* The significance of the differences in genotype frequencies between the total populations of fertile versus infertile males was tested using Pearson's chi-squared distribution, $p=0,02968849$ (two-tailed, testing the distributions of all genotypes A/A, A/C and C/C); $p=0,00804907$ (one-tailed, testing the distributions of C/C genotypes and other genotypes).

Control	A/A	A/C	C/C	TOTAL	
First population (mix of French and North African males)					
nb	82	12	0	94	
%	87%	13%	0%	100%	
French males					
nb	189	59	0	248	
%	76%	24%	0%	100%	
North African males					
nb	70	26	0	96	
%	73%	27%	0%	100%	
TOTAL					
nb	341	97	0	438	p<0.03*
%	78%	22%	0%	100%	
Infertile	A/A	A/C	C/C		
First population (mix of French and North African males)					
nb	81	12	1	94	
%	86%	13%	1%	100%	
French males					
nb	72	21	1	94	
%	77%	22%	1%	100%	
North African males					
nb	137	48	4	189	
%	72%	25%	2%	100%	
TOTAL					
nb	290	81	6	377	p<0.03*
%	77%	21%	2%	100%	

Figure legends

Fig. 1 Four variations/polymorphisms were detected within the BRDT gene

1a- Schematic representation of the encoded sequence of the BRDT protein, with its exons (from 2 to 19) and its bromodomains (BD1 and BD2 = respectively first and second bromodomains). Grey arrows represent the positions of known polymorphisms, which were not found in our populations. Black arrowheads indicate the four variations of the amino-acid sequence found in our population. The numbers of individuals of each genotype in the two populations of 94 infertile and 94 fertile control men are given on the left. Empty boxes represent consensus sequences, dashed boxes heterozygous and black boxes homozygous genotypes for the respective variations.

*This man also presented a homozygous genotype for the variation in exon 6 (A->C, resulting in K238->N). Since K238 is not a conserved amino-acid and does not lie within a known functional domain of the protein, we considered that it was unlikely to have a functional impact.

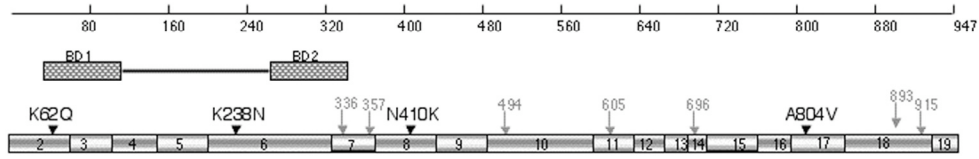
1b- Genotyping (by allele-specific PCR) of the family members of the infertile man with a CC genotype resulting in the K62Q mutation. The A allele is the common one, whereas the C allele is the variant.

Fig. 2 FRAP experiments showing that the association of BrdtQ61 with acetylated chromatin is not as strong as that of wt Brdt.

Upper panels: GFP fluorescence of cos cells transfected with *GFP-ΔC-sBrdt* (WT) or *GFP-ΔC-sBrdtQ61* (Q61), untreated (-TSA, upper left panel) or treated with TSA (+TSA, upper right panel) for 6 hours, before photobleaching (t_0 = bleach) and at several time-points after photobleaching (shown in seconds). Middle panels: magnification of the series of photos of the upper panel. Lower panels: fluorescence intensity recovery in the same cells untreated (TSA-, lower left) treated with TSA (TSA+, lower right panel). The blue curve is that of cos cells transfected with *GFP-ΔC-sBrdt* (WT) and the pink curve corresponds to *GFP-ΔC-sBrdtQ61* (Q61) transfected cells. Deviations were calculated from 5 individual measurements.

Figures

Fig. 1a



Genotypes (94 infertile / 94 control)

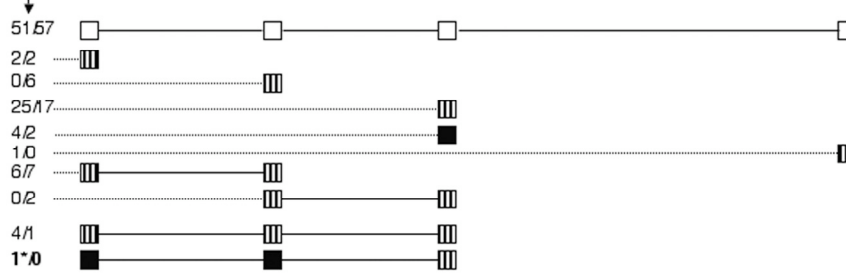


Fig. 1b

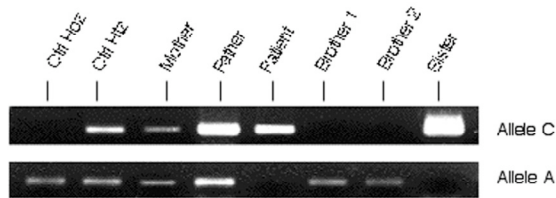
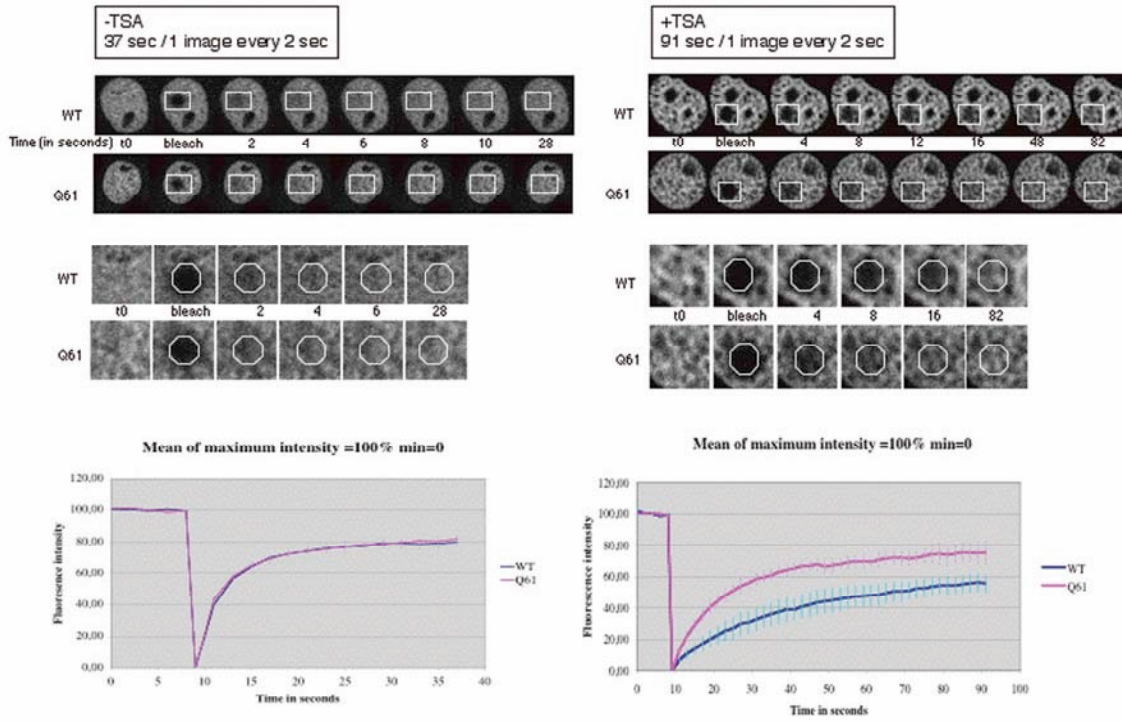
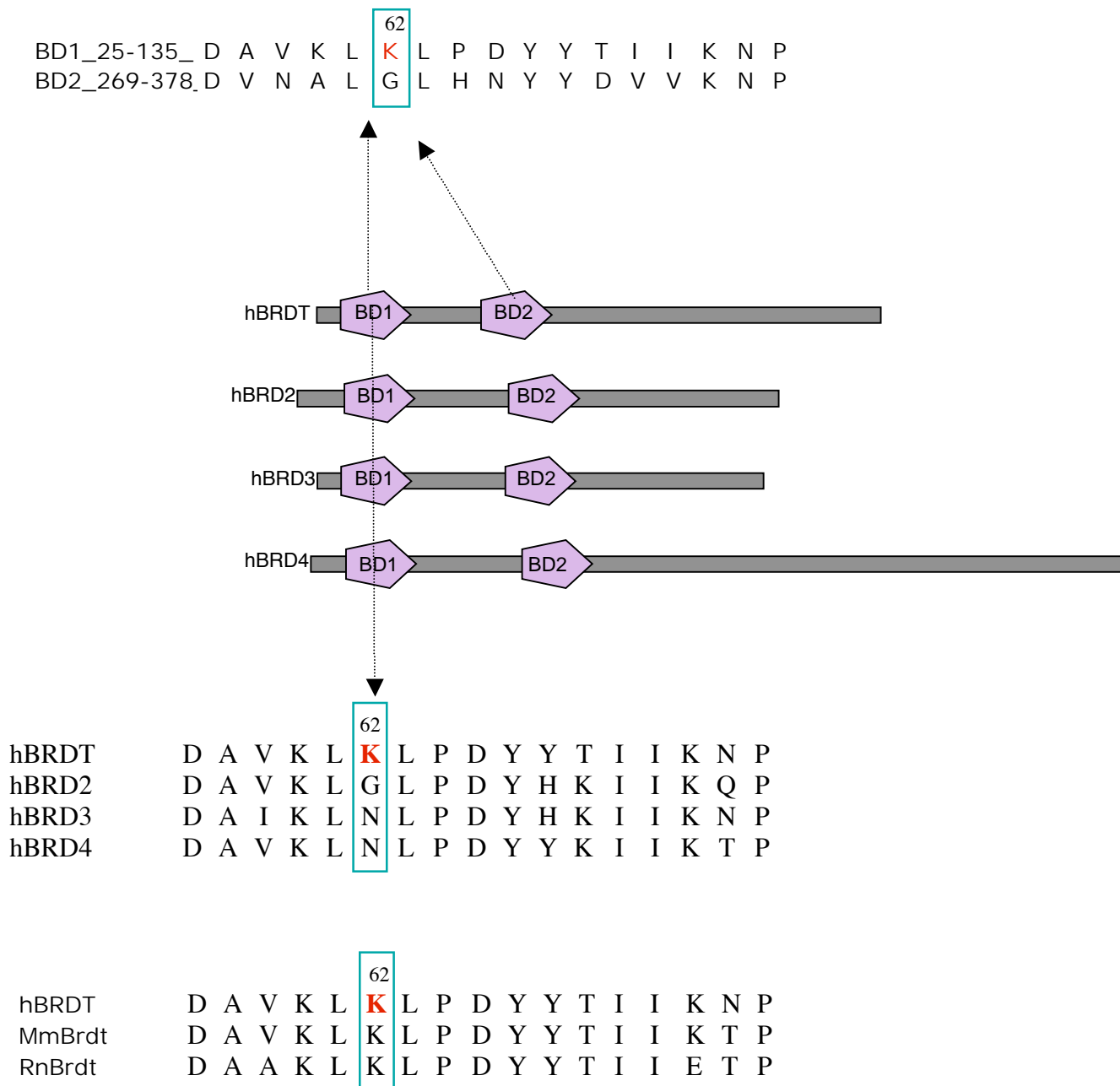


Fig. 2



Supplementary Fig.1: K62 in hBRDT is an aminoacid which is specific to BRDT and conserved in the rat and mouse Brdt proteins.

Partial alignments of a stretch of amino-acids in the region including K62 in the first bromodomain (BD1) of hBRDT with the corresponding stretches of amino-acids of 1a/the second bromodomain of hBRDT (BD2), 1b/ the different human BET proteins (hBRD2, hBRD3 and hBRD4, also shown in a schematic representation showing the positions of their bromodomains), and 1c/ the mouse and rat Brdt proteins.



Supplementary Methods

Infertile patients and control fertile men

A total of 377 infertile patients presenting a non-obstructive severe oligozoospermia or azoospermia were recruited in clinical research projects on male infertility: 94 were recruited from a National Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) coordinated by the CHU of Saint Etienne, and the other 283 patients were treated for infertility at Tenon Hospital in Paris. A control population was constituted of 438 men with proven fertility, unrelated to one another. Relatives of one of the mutated patient also took part of the present study. All patients signed an informed consent for molecular investigation, and ethical approval was given by the relevant local ethics committees in France. For each individual, a 10 ml blood sample was collected, from which the DNA was extracted using a standard protocol, then stored at -20°C.

Mutation screening of the *BRDT* gene by dHPLC and sequencing

A systematic screening for mutations/variations was undertaken in the *BRDT* gene of 94 infertile men and 94 fertile males.

Exon amplifications:

Each one of the 19 exons of *BRDT* was amplified independently. In a final volume of 50µL, 50ng of matrix is mixed with the PCR TaqGOLD buffer (Roche®), 1,5mM of MgCl₂, 10pmol of each primer (primer sequences, amplifications and DHPLC conditions are detailed in supplementary table 1 online), 10mM dNTP and 5µL Taq GOLD (Roche®). After 10 minutes at 95°C, a 35 cycle program comprising 5'' at 94°C, 30'' at hybridizing temperature and 1'30 of elongation allowed the amplification of each exon. Each PCR product was then checked and semi-quantified on a 2% agarose gel.

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC):

In order to allow the formation of heteroduplexes, the amplified fragments were denatured by heat for 10' at 95°C, then slowly re-annealed by decreasing the temperature by 1°C every 30''. In each reaction the DNA samples were coupled 2 by 2 in identical amounts, so that homozygous variations could be detected. For each exon, the optimal column temperature and acetonitrile gradient were calculated by the software given by Transgenomics®. When heteroduplexes were found, their identification required a second analysis of each of the two DNA with a control DNA, homozygous for the wild-type sequence. The heterozygous frequencies suggested that the chances of pooling two homozygous mutated DNA were very low.

Sequencing:

All the variations detected by dHPLC approach were then identified by the automatic sequencing machine ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems®) and the previously used primers.

Screening for the exon 2 A->C mutation by allele-specific PCR amplification

Another 283 infertile patients and 344 fertile males were screened specifically for the exon 2 A->C mutation, by allele-specific PCR amplification and sequencing.

Primers were designed (3' [common]: ACAGCTATTATTGTTAACCC, 5' [wild-type]: GACATACATACAGGCAAGTT, 5'[variant]: GACATACATACAGGCAAGTG). PCR reactions were performed in 50 μ L with 50ng matrix DNA, PCR TaqGOLD Buffer (Roche®), 1,5mM MgCl₂, 10pmol of each primer, 2mM dNTP and 5 μ L Taq GOLD (Roche®). After 10 minutes at 95°C, a 35 cycle program including 5'' at 94°C, 30'' at 55°C and 30'' at elongation temperature (72°C), allowed the specific amplification of the A (wild-type) or C (variant) allele, depending on the chosen 5' primer. Les PCR products were checked on 2% agarose gels. Unclear results and all variant alleles were all sequenced.

Screening for the exon 2 A->C mutation by restriction analysis

Exon 2 was amplified from approximately 200 ng of matrix DNA in a final volume of 30 μ l using the same primers as for dHPLC (sequence in supplementary file) and the "Fast start Taq DNA polymerase" kit from Roche®. The PCR conditions were as follow 8 minutes at 95°C, a 45 cycle program including 30'' at 95°C, 30'' at 56°C and 1' at elongation temperature (72°C), followed by a final extension at 72°C for 7 minutes.

3 μ l of the PCR product (1/10e) were then digested overnight at 37°C by 2.5 units of BfmI in a final volume of 5 μ l of Tango Buffer (1x final).

The digested DNA was then visualized on a 1% Agarose gel.

Functional characterization of the corresponding K61Q Brdt mutant in the mouse

Mouse *Brdt* wt and mutants:

The *Mm brdt* construct GFP- ∂ C-sBRDT was available in the lab (12) *GFP- ∂ C-sBRDTK61Q* was created by mutagenesis using a Stratagene® Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit.

Acetylated chromatin remodelling assay and FRAP experiments:

Cos 7 cells grown on labtek glass coverslips, were transfected with 2 μ g of *GFP- ∂ C-sBRDT* or *GFP- ∂ C-sBRDTK61Q* using lipofectamine and then treated with 50 ng/ml of TSA and incubated at 37C 5%CO₂. Cells were submitted to Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments six hours after TSA (or mock) treatment.

For this purpose, GFP intensity was measured before and every 2 seconds after photobleaching during 37 (cells without TSA) or 91 seconds (cells with TSA).

Ref

Supplementary Table 1: List of primers and conditions of PCR amplification and DHPLC

Primers	amplicon (bp)	Hybridiz. temp.	DHPLC temp(in °C)	Tm (in °C)
F:GCATTTTAAGAATCATAATAGTTCA				62
exon 1 R:CTAAAACCTCCCCTTACACTAAGA	128	56°C	53 - 55,3	64
F:CCTAAAGTGCTTCTGAAGTACTC				66
exon 2 R : TTTTTTGAAACTAACATAGTTGAA	303	56°C	56.6 - 57.1	58
F:TTTAGAATTTGTTCAAACCATA				56
exon 3 R : GGCAAAGAATTAGCAAGTATAA	200	56°C	52.5 - 54	58
F:ATTTAAAACATTTGGTACAGTGA				58
exon 4 R : CCTTTGAGGGATTTACACA	263	52 °C	53-56-57	54
F:ATATTTGATTCTGGCTCATACTT				58
exon 5 R : GCAATGATTTAAAACTACAACA	232	52 °C	57.5 - 60	58
F:ATATTTTTTGTGTTGAATTGTTT				56
exon 6 R : AGTTCTTCCTTTTAAGGCAA	409	52 °C	56-56.8	54
F : TGAACTATTTGTGAATCCTGTAG			54.5 - 56.8 -	62
exon 7 R : GTTCAGAGGAAAAACACCTT	195	56°C	59	56
F:CAGAAAACCATAACAACTAATTT				58
exon 8 F : AGCAGCTCATAGATTATCAAAA	268	56°C	56.9 - 58.8	58
F:GACATGAATGTTTACAGATTTT				56
exon 9 R : TATTGTCTTAATAAGCTATCATAATAA	188	52°C	56 - 56.8	64
exon 10 F:AGACAATAACGATAAGTTGGACTA				64
R:CAACATAAATACCAAACCGAT	378	52°C	55.2 - 56.5	56
exon 11 F:GTTGGTTTTTGGTTATACTACT			53 - 56.5 -	62
R:CAAGACCCTGTCTCTACATACAT	221	50°C	58.3	66
exon 12 F:CTTCTGGCATTTTAATATGTTTC				60
R:CAACAGAGGTACATTTAAGGG	159	58°C	52.5 - 55	60
exon 13 F:ATGGAAAAATTATAACTTGGTATT				58
R:AAAGCTACTACTATACCCATGAGT	202	57°C	53 - 54.5	66
exon 14 F:TGGTTAAGAGATAATATGATTAATG				62
R:CCCTGTTCTTTAAAACACAT	133	54°C	53 - 55	54
exon 15 F:TGGTTAAAACCTAAGTGATAACTTTG			53 - 55.5 -	64
R:TTCTCAATAACAGTTGTTTACTTGT	247	57°C	58.3	64
exon 16 F:CAAATTCTGGGTAAGTAGGATGA			51.7 - 54.3 -	64
R:CACTTCCAAACCCAATTTC	226	56°C	58.8	54
exon 17 F:TGTAGACATAGACTGAACCAAAT			53.3 - 55.8 -	62
R:CCAAACCCTCCTTTAATC	271	56°C	57.5	52
exon 18 F:AACCTACTTTGAGCTATACTTTT				60
R:TCCCTTGTTAAATTAGATTTAGT	257	54°C	54.8 - 58.5	58

exon	F:AGTAATATTA AAAATTTTCTGCTTTT				58
19	R:CCTTTGAATTATGTCGTTTA	294	54°C	53.7 - 54.9	52

Résumé

Les modifications post-transcriptionnelles qui régulent la structure et la fonction de la chromatine sont reconnues par de multiples modules protéiques, dont les bromodomains. Alors que la reconnaissance de modifications individuelles des histones par ces modules est bien caractérisée, la reconnaissance d'histones portant plusieurs modifications est mal connue. Nous avons étudié comment Brdt s'associe à la chromatine acétylée par l'intermédiaire de ses deux bromodomains (BD1 et BD2) pour induire sa compaction au cours des dernières étapes de la spermatogenèse. Nous avons également étudié l'effet de la mutation K61Q du premier bromodomaine de Brdt, impliquée dans certains cas d'infertilité masculine. BD1, bien que présentant une structure de bromodomaine classique, se montre sélectif pour des formes di-acétylées de la queue N terminale de l'histone H4 avec une préférence pour le peptide H4-K5/K8ac et ne montre pas d'affinité pour les peptides mono-acétylés H4-K5ac, H4-K8ac et H4-K12ac. Au contraire, BD2 présente une spécificité pour l'histone H3 mono-acétylée sur K18. La structure cristallographique du complexe Brdt-BD1/H4-K5/K8ac révèle que les deux lysines acétylées se placent ensemble dans la cavité hydrophobe du bromodomaine. Ces observations mettent en évidence un nouveau mode de lecture du code histone par lequel un bromodomaine reconnaît spécifiquement le motif formé par l'acétylation de deux lysines adjacentes.

Mots clefs

spermatogenèse, BRDT, bromodomaine, acétylation, histone, cristallographie aux rayons X, ITC.

Summary

Post-translational histone modifications that regulate chromatin structure and function are recognized by diverse protein modules, including bromodomains. While the recognition of individual histone marks by such modules is well characterized, the recognition of histones bearing multiple modifications is only poorly understood. Here we investigate how Brdt, a testis-specific member of the BET family of nuclear proteins, associates with hyperacetylated histones through its two bromodomains (BD1 and BD2) to mediate chromatin remodelling during spermiogenesis. Unlike canonical bromodomains, BD1 fails to bind singly acetylated histone tails but has the remarkable ability to recognize histone tails bearing two or more acetyl-lysine marks, with preference for a histone H4 tail dually acetylated on lysines 5 and 8. In contrast, BD2 selectively associates with a histone H3 tail acetylated on lysine 18 but cannot discriminate mono-, di- and tetra-acetylated tails. High-resolution crystal structures of BD1 and BD2 bound to their cognate substrates reveal the basis of this specificity. Selectivity of BD1 for a di-acetylated tail is due to a widened binding pocket that essentially accommodates the two acetyllysine residues as a single epitope. Our findings highlight the complexity of the histone code by exemplifying a mode for the combinatorial readout of histone modifications in which two distinct post-translational marks on a histone tail are simultaneously recognized by a single chromatin-interaction module.

Keywords

spermatogenesis, BRDT, bromodomain, acetylation, histone, X ray crystallography, ITC.