



HAL
open science

Identification et caractérisation de la protéine Atad2, un facteur du remodelage de la chromatine acétylée au cours de la spermatogenèse.

Cecile Lestrat

► To cite this version:

Cecile Lestrat. Identification et caractérisation de la protéine Atad2, un facteur du remodelage de la chromatine acétylée au cours de la spermatogenèse.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00353624

HAL Id: tel-00353624

<https://theses.hal.science/tel-00353624v1>

Submitted on 15 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 Joseph Fourier – Grenoble 1

Chimie et science du vivant

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Thèse

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Cécile LESTRAT

Le 16 octobre 2008

**Identification et caractérisation de la protéine Atad2, un
facteur du remodelage de la chromatine acétylée au cours
de la spermatogenèse.**

Jury

Dr Francesca PALLADINO
Dr Patrick LOMONTE
Dr Cécile CARON
Pr Stefan NONCHEV

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur

Thèse effectuée au sein de l'équipe "Epigénétique et signalisation"

Centre de Recherche INSERM U823

Institut Albert Bonniot

Grenoble

Université Joseph Fourier – Grenoble 1

à Alexandre,

à mes parents,

à mes deux petits quadrupèdes paresseux,

Remerciements

Je remercie le Docteur Francesca PALLADINO et le Docteur Patrick LOMONTE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Cécile Caron pour tout le temps qu'elle m'a consacré et pour la façon dont elle m'a aidé pendant ces dernières années.

Je remercie de plus le Docteur Saadi Khochbin pour son enthousiasme scientifique, son émulation intellectuelle et ses conseils.

Je remercie chaleureusement le Professeur Stefan NONCHEV pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Merci aussi au Professeur Sophie ROUSSEAUX pour sa disponibilité et le partage de son savoir sur la spermatogenèse et la reproduction médicalement assistée.

J'exprime ma plus profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la bonne marche de ces travaux, parfois par leurs seuls encouragements. Merci donc à Martine, Sandrine, Emmanuelle, Benoit, Jérôme, Nicolas et tous les autres pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie également la Région ainsi que l'ARC pour m'avoir soutenu pendant ces années de thèse

Résumé

Au cours de la maturation des gamètes mâles a lieu un événement unique : les structures classiques qui ordonnent l'ADN sont complètement bouleversées et remplacées par une nouvelle, de composition et d'agencement différents, qui permet au noyau du spermatozoïde final une compaction qui n'est retrouvée nulle part ailleurs.

Les signaux épigénétiques ainsi que les événements qui se déroulent alors au niveau moléculaire ne sont pas encore bien élucidés. C'est dans l'optique d'une meilleure compréhension de ce phénomène que la protéine Atad2 a été identifiée et caractérisée. Ce facteur, qui possède un bromodomaine ainsi qu'un domaine AAA, est retrouvé sous deux formes chez la souris. La plus courte, strictement testiculaire, est capable de se lier à la chromatine acétylée. De plus, comme les autres membres de la famille des AAA-ATPases, Atad2 est capable de se multimériser. Cette multimérisation régule son affinité à la chromatine. Des études plus poussées ont montré un rôle dans l'activité transcriptionnelle ainsi que dans la stabilité des structures basales d'ordonnement de l'information génétique, les nucléosomes. De plus, chez l'humain, Atad2 a été retrouvé exprimé de façon aberrante dans certaines tumeurs.

L'élucidation du rôle de cette protéine dans les cellules germinales et somatiques apportera ainsi des informations sur le changement complet de la nature chromatinienne au cours de la spermatogenèse, et peut-être permettra peut-être une meilleure appréhension de l'activité génomique ayant lieux dans les cellules tumorales.

Summary

During spermatogenesis, i-e maturation of spermatozoa, occurs a unique event: the classical structures organizing DNA are completely changed to new ones, with other compositions and other architectures.

Epigenetic signals and molecular process that take place during spermatogenesis are still unclear. To have a better understanding of this event, the Atad2 protein has been identified and investigated. This factor, containing a bromodomain and an AAA-ATPase domain, has two forms in mice. The shorter one, strictly testicular, has an affinity with acetylated histone 4, a component of chromatin, and is able to have a multimeric form. This multimeric configuration is able to have an impact on Atad2 affinity with chromatin. Further studies show that Atad2 have an influence on transcriptional activity and chromatin structural stability. Moreover, human Atad2 has been found in cancer cells, where its expression is abnormal.

Studying the role of Atad2 in germinal and tumoral cells can be a good way to understand the drastic chromatin remodeling occurring during spermatogenesis, and may be potential help for the apprehension of the genomic activities in cancers.

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	10
A.	Introduction générale	10
1.	Généralités sur la spermatogenèse.....	10
2.	Généralités sur la chromatine "classique", c'est-à-dire au sein des cellules somatiques	20
3.	Le cas particulier de la chromatine au sein des cellules traversant la spermiogenèse	38
B.	L'acétylation de la chromatine, un signal de remodelage	57
1.	Généralité sur l'acétylation des histones	57
2.	Les bromodomaines, motifs de liaison à la chromatine acétylée.....	60
3.	Fonctions connues de protéines à bromodomaines	63
C.	Les domaines AAA+	71
1.	Les protéines AAA+: caractérisation	71
2.	Fonctions connues de protéines à domaines AAA-ATPase	77
3.	Les AAA+ et la dynamique génomique	88
II.	OBJECTIFS ET PLAN DE TRAVAIL	93

1.	Etudes bibliographiques	93
2.	Etudes de facteurs impliqués dans la dynamique de la chromatine acétylée au cours de la spermiogenèse.....	93
3.	Identification et caractérisation du facteur Atad2.....	95
III.	MATERIEL & METHODES	97
A.	Synthèse et purification d'un anticorps reconnaissant Atad2 endogène murin et humain.	97
B.	Production et purification de la protéine recombinante His-Atad2 FL et AAA.....	98
C.	Gel filtration de la protéine recombinante His Atad2.....	99
D.	Pull-down GST-Atad2 AAA avec des constructions Atad2 et Rpt.....	99
E.	Préparation des extraits cellulaires totaux des différents tissus murins.	100
F.	Préparation des extraits cellulaires totaux de cellules de lignées cancéreuses..	101
G.	Séparation des cellules germinales par sédimentation.....	101
H.	Séparation des différents compartiments des cellules testiculaires et extractions salines.	102
I.	Séparation des protéines selon leur taille et volume par ultracentrifugation sur gradient glycérol.....	104
J.	Pull-down utilisant les queues N-terminales des histones.	104
K.	Electrophorèse sur gel non dénaturant.....	105

L.	Immunoprécipitation et Co-immunoprécipitation sur des cellules transfectées...	106
IV.	RESULTATS.....	108
A.	A la découverte d'Atad2, études préliminaires.....	108
1.	La découverte d'Atad2.....	108
2.	Conservation d'Atad2	109
3.	Les domaines d'Atad2.....	111
4.	Rôles pressentis d'Atad2, hypothèses de travail	111
B.	Caractérisation d'Atad2	115
1.	Expression dans les tissus murins et localisation cellulaire.....	115
2.	Recrutement d'Atad2 sur la chromatine acétylée	121
3.	Etude du domaine AAA+ d'Atad2	126
C.	Expression d'Atad2 dans les cellules tumorales, un nouveau venu dans le groupe des "Cancer/Testis Antigens".....	142
D.	Résultats soumis en publication	147
1.	Influence sur la rapidité de turn-over de H2A	147
2.	Influence sur l'activité transcriptionnelle de certains gènes	148
3.	Influence d'Atad2 sur l'apoptose	148
V.	DISCUSSION	197
A.	Focus sur les caractéristiques biochimiques d'Atad2, discussion des résultats .	197

1.	L'affinité d'Atad2 avec la lysine K5 acétylée de l'histone H4	197
2.	Atad2 et sa capacité de multimérisation	201
3.	Effet stabilisant d'Atad2 sur le turn-over des histones	203
4.	Atad2 impliqué dans la répression transcriptionnelle	204
5.	Interaction d'Atad2 avec les Rpt.....	205
B.	Rôle d'Atad2 au cours de la spermiogenèse, lien avec l'hyperacétylation de la chromatine des cellules en cours de spermiogenèse.....	209
1.	L'acétylation de la chromatine comme précurseur de la compaction.	209
2.	L'acétylation de la chromatine comme signal de dégradation.	211
C.	Présence d'Atad2 dans des cellules tumorales	213
1.	Atad2 est-il un CT/A ?	213
2.	Rôle au sein des cellules somatiques.	214
VI.	CONCLUSION GENERALE.....	216
VII.	BIBLIOGRAPHIE	218
	_Toc208238846VIII.....ANNEXES	
	237
	Figure 1 - Structure du testicule adulte	12
	Figure 2 - Organisation de la spermatogenèse.....	16

Figure 3 - Les stades de la spermatogenèse.....	19
Figure 4 - Les différents degrés d'organisation de la chromatine.....	21
Figure 5 - Structure des histones.....	24
Figure 6 - Structure atomique de la particule de cœur du nucléosome	27
Figure 7 - Les modification post-traductionnelles sur les histones.....	30
Figure 8 - Les variants d'histone: de nouvelles combinaisons de modifications post-traductionnelles.....	32
Figure 9 - Les principales familles de remodelage de la chromatine ATP-dépendante	37
Figure 10 - Modifications et succession des protéines composant la chromatine au cours de la spermatogenèse	39
Figure 11 - Acétylation et disparition des histones au cours de la spermiogenèse.....	56
Figure 12 - Conservation structurale des bromodomaines	61
Figure 13 - Structure des domaines AAA+	75
Figure 14 - Structure d'un oligomère AAA+	76
Figure 15 - Les principales fonctions des AAA+	79
Figure 16 - Structure de 20S.....	86
Figure 17- Conservation de la structure d'Atad2 au cours de l'évolution	110
Figure 18 - Hypothèse de travail.....	114
Figure 19- Expression des différentes formes d'Atad2 chez la souris	118

Figure 20 - Expression d'Atad2 au cours de la spermiogenèse et localisation cellulaire .	119
Figure 21 - Affinité d'Atad2 avec la chromatine acétylée	123
Figure 22 - Affinité d'Atad2 pour l'histone H4 acétylée	124
Figure 23 - Interaction in vitro et ex vivo d'Atad2 et des Rpt.....	129
Figure 24 - Interaction d'HA Atad2 et des Rpt endogènes.....	130
Figure 25 - Multimérisation d'Atad2 via le domaine AAA	135
Figure 26 - Multimérisation ATP-dépendante	140
Figure 27 - Régulation de l'affinité à la chromatine acétylée par la multimérisation d'Atad2	141
Figure 28 - Expression d'Atad2 humain dans différents types de cellules	143
Figure 29 - Expression d'Atad2 dans les tumeurs	146
Figure 30 - Arbre phylogénétique du domaine AAA.....	207

I. INTRODUCTION

A. Introduction générale

1. Généralités sur la spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus biologique de la transformation graduelle des cellules germinales en spermatozoïdes sur une période de temps étendue (environ 35 jours chez la souris, 74 chez l'homme) à l'intérieur des tubes séminifères du testicule. Ce processus comprend la prolifération cellulaire par des divisions mitotiques successives, la duplication des chromosomes, le brassage génétique par recombinaison de l'ADN (crossing-over), la réduction par méiose produisant des spermatides haploïdes et la maturation terminale des spermatides en spermatozoïdes. La spermatogenèse peut être divisée en trois phases: la prolifération ou phase pré-méiotique, la méiose et la maturation finale ou spermiogenèse.

a) Structure du testicule, lieu de la spermatogenèse

Chez les mammifères, le testicule est encapsulé dans un sac de tissu conjonctif, l'albuginée. Des parois cloisonnent le parenchyme testiculaire en lobules qui contiennent les tubes séminifères (compartiments tubulaires). Ceux-ci, séparés par du tissu interstitiel, sont le siège de la production des gamètes mâles. Ils ont une structure hélicoïdale, avec

leurs deux extrémités ouvertes dans le *rete testis* (Figure 1 - Structure du testicule adulte). Ils sont formés par l'épithélium séminifère et contiennent un lumen plein de fluide dans lequel les spermatozoïdes matures sont relâchés. L'épithélium séminifère est constitué de deux types de cellules, des cellules somatiques (les cellules de Sertoli) et des cellules germinales. Les cellules germinales sont trouvées à différents niveaux à partir de la base du tube jusqu'au lumen et sont entourées par les cellules de Sertoli, qui font office de support structurel et nutritionnel. Les cellules de Sertoli sont reliées entre elles par des jonctions spécialisées, qui établissent la barrière hémato-testiculaire. La méiose se réalise dans ce compartiment privilégié, protégé des cellules du système immunitaire. Pendant que les cellules germinales se divisent et se différencient, elles migrent de la base de la région membranaire du tube jusqu'au compartiment luminaire grâce à des complexes de jonction cellulaire avec les cellules de Sertoli adjacentes. Ce trajet permet une synchronisation de la différenciation des cellules germinales qui atteignent le lumen en tant que spermatozoïdes. Enfin, la circulation des spermatozoïdes dans les tubes séminifères est facilitée par des cellules musculaires lisses, dites péri-tubulaires myoïdes, situées au niveau de la membrane basale des tubes séminifères et qui sont responsables des contractions péristaltiques permettant le transport des spermatozoïdes des tubes séminifères jusqu'au *rete testis*. Les spermatozoïdes collectés dans le *rete testis* sont ensuite délivrés aux canaux excréteurs de l'épididyme.

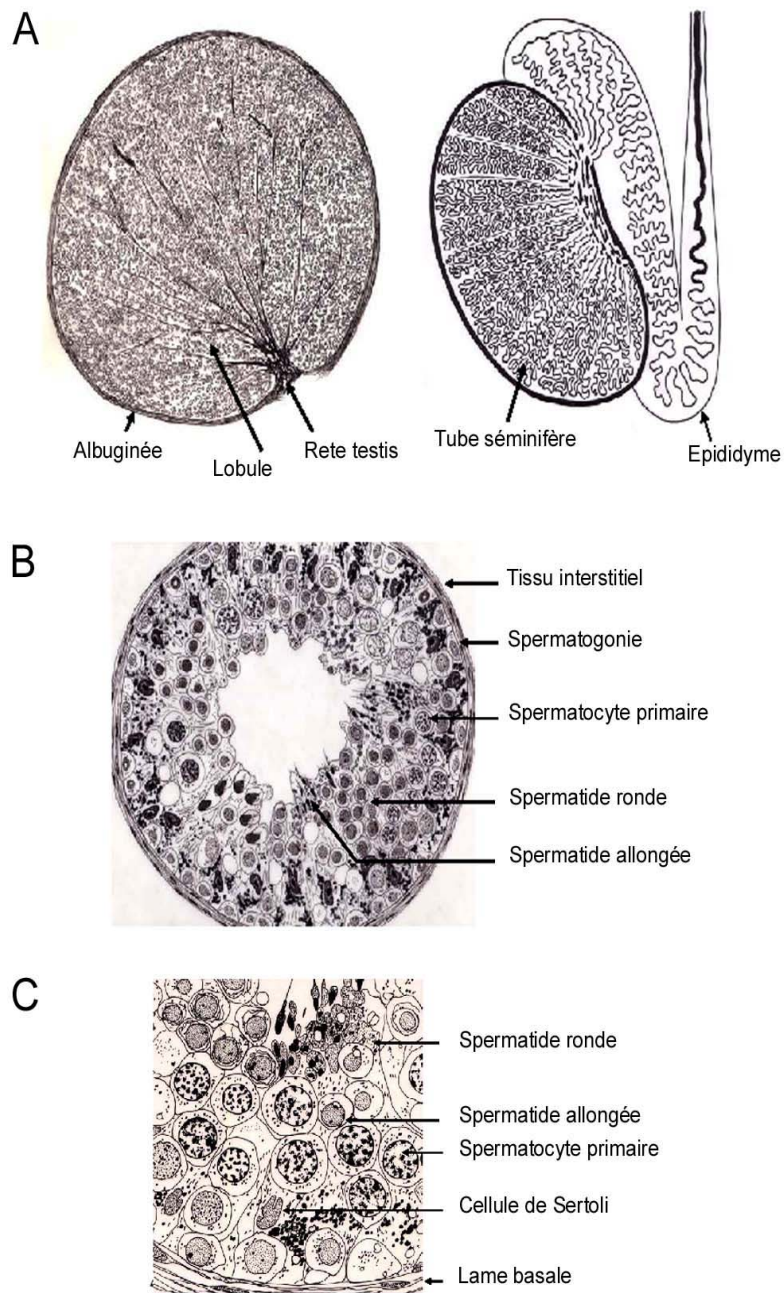


Figure 1 - Structure du testicule adulte

A) Coupe transversale d'un testicule humain. Dessin d'une coupe en paraffine x2, 5.

B) Organisation des tubes séminifères dans le testicule humain et des canaux excréteurs de l'épididyme. Dessin semi-schématique.

Portion de l'épithélium séminifère dans un tube séminifère. Dessin sur la base d'une coupe semi-fine x900.

b) Les étapes de la spermatogenèse

Chez les mammifères, la spermatogenèse comprend trois phases, pré-méiotique, méiotique et maturation, auxquelles sont associés des types de cellules germinales différents, respectivement les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatozoïdes.

(1) La phase pré-méiotique ou prolifération

Les spermatogonies de type A, qui sont les cellules germinales souches, sont les cellules les plus immatures de la spermatogenèse et sont localisées le long de la base de l'épithélium séminifère. Elles prolifèrent par divisions mitotiques et se multiplient de façon à renouveler continuellement l'épithélium germinal. Le produit de ces mitoses répétées est :

- soit de nouvelles spermatogonies de type A,
- soit des spermatogonies de type B qui vont pouvoir se différencier et migrer vers le centre du tube séminifère.

Les spermatogonies de type B, caractérisées par plusieurs nucléoles et une forte activité transcriptionnelle, sont les dernières cellules à se diviser par mitose. Cette division produit les premières cellules de la seconde phase, les spermatocytes préleptotènes, qui s'éloignent de la base du tube séminifère vers le lumen.

(2) La méiose

La division par méiose conduit une cellule diploïde à l'augmentation de sa quantité d'ADN puis à une double division qui mène à quatre cellules haploïdes individuelles (Figure 2 - Organisation de la spermatogenèse). A cette étape les spermatocytes préleptotènes vont doubler leur quantité d'ADN puis vont subir une première division méiotique, dite réductionnelle, car elle divise le stock chromosomique par deux en produisant des cellules haploïdes. La prophase de la première division méiotique (prophase I) peut durer jusqu'à trois semaines, et est subdivisée en 5 étapes successives :

- Leptotène: les chromosomes se condensent.
- Zygotène: les chromosomes s'apparient, formant le complexe synaptonémal.
- Pachytène: l'information génétique est brassée par cross-over entre les chromosomes appariés. Ces cellules montrent de plus une augmentation du taux d'ARN et de synthèse protéique en préparation des étapes suivantes.
- Diplotène: le complexe synaptonémal se sépare et les chromosomes homologues sont séparés.
- Diacinèse: l'enveloppe nucléaire disparaît.

L'anaphase et la télophase I finissent la première méiose et produisent les spermatocytes secondaires qui rentrent rapidement en méiose II. La seconde méiose est dite équationnelle car elle ne réduit pas le stock génétique et se déroule comme une mitose

classique. Elle produit de petites cellules haploïdes $1N$ appelées spermatides rondes qui entrent dans la phase suivante (différentiation).

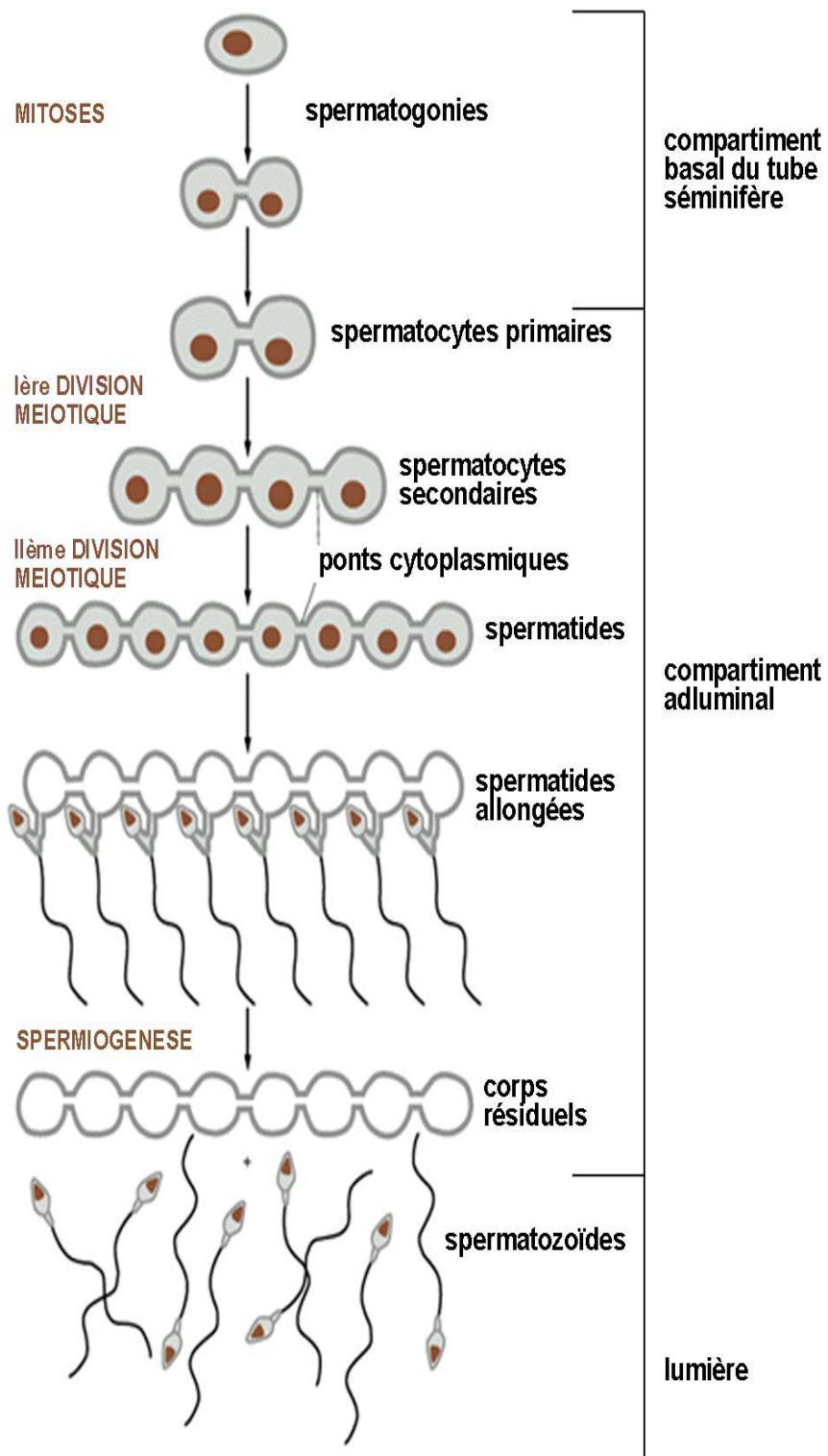


Figure 2 - Organisation de la spermatogenèse

(3) La spermiogenèse

Les cellules en phase de spermiogenèse subissent trois modifications majeures:

- Le noyau s'allonge et la chromatine se réorganise en une structure très compacte.
- L'appareil de Golgi produit des granules ayant une fonction semblable à celle des lysosomes. Ceux-ci fusionnent à côté du noyau pour former l'acrosome. Le système acrosomal contiendra notamment les enzymes d'hydrolyse requises pour l'interaction spermatozoïde/ovule et pour la fécondation.
- Les cellules fabriquent une longue queue, le flagelle, dont le mouvement est permis par l'énergie fournie par les mitochondries, localisées dans la région proximale. La maturation du flagelle est accompagnée d'une élimination de l'excès de cytoplasme, évacué sous forme de corps résiduels.

Les changements reconnaissables au cours de la spermiogenèse permettent de définir trois phases (Figure 3 - Les stades de la spermatogenèse). Chez la souris, ces phases regroupent 19 étapes de différenciation. La première phase (spermatides ronde type 1-7) montre une chromatine assez homogène ayant une activité transcriptionnelle extrêmement réduite. C'est à ce moment que se développe l'acrosome. Dans la seconde phase (spermatides rondes type 8-11) les spermatides s'allongent, la chromatine est moins homogène et commence à se compacter. L'activité transcriptionnelle est quasiment nulle. La dernière phase (type 12-16) montre la fin de la croissance du flagelle et la maturation de l'acrosome. Le noyau continue à s'allonger et la chromatine est dans sa forme la plus condensée. A la fin de cette dernière phase le spermatozoïde est formé et va

subir une maturation finale dans l'épididyme.

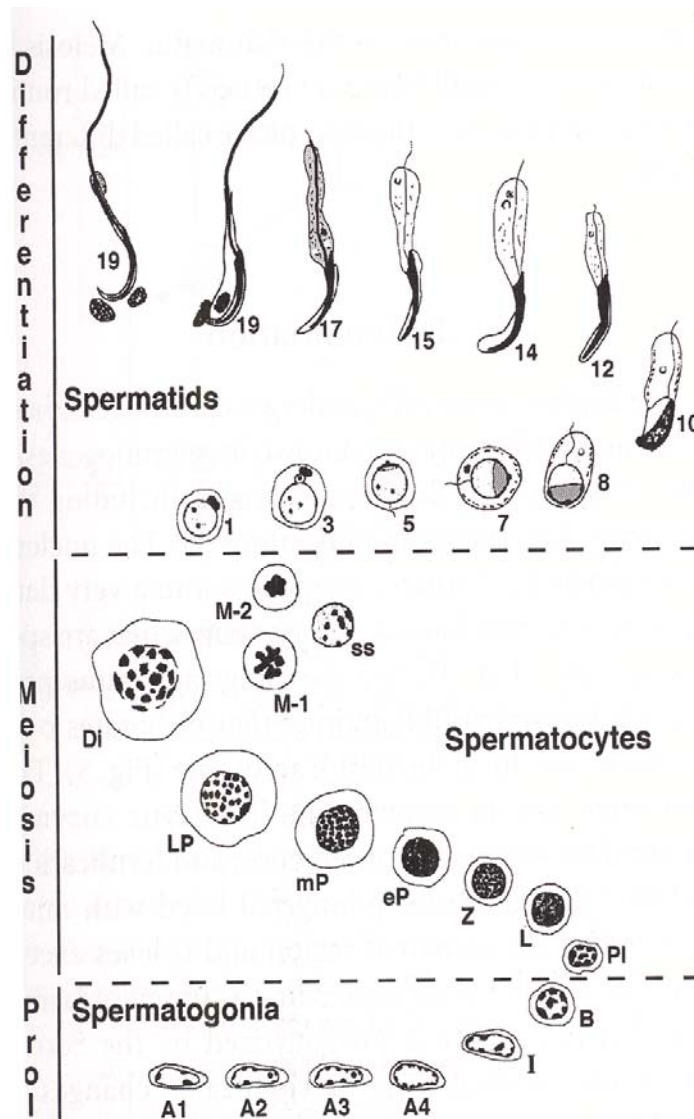


Figure 3 - Les stades de la spermatogénèse

De bas en haut: Les spermatogonies (A1 à B) se divisent par mitoses dans la première phase, la prolifération (Prol). La méiose est une phase longue et composée de plusieurs stades (PL: préleptotène, L: Leptotène, Z: Zygotène et eP, mP, LP: pachytène). Les Diplotènes (Di) entrent ensuite en méiose I, produisant les spermatocytes secondaires qui entrent à leur tour en méiose II et donnent naissance aux spermatides (cellules haploïdes). Les spermatides sont appelées rondes pendant 7 stades puis se différencient en spermatides allongées (stade 8), condensées puis en spermatozoïdes.

2. Généralités sur la chromatine "classique", c'est-à-dire au sein des cellules somatiques

L'information génétique supportée par l'ADN est la clé de la vie et de la transmission des caractères d'une espèce d'une génération à l'autre. Son intégrité et son stockage sont donc primordiaux pour les organismes. Chez les eucaryotes l'ADN est conservé dans un compartiment spécial - le noyau - au sein d'un ensemble de protéines de structure, d'enzymes et d'ARN appelé la chromatine.

L'organisation structurelle de celle-ci est extrêmement stricte. Elle permet en effet de stocker l'intégralité du génome (non mitochondrial), soit environ 2m d'ADN, dans un noyau d'un diamètre moyen de 10µm. De plus, cette structure doit être dynamique, permettant ou restreignant de ce fait l'accès à l'ADN des différentes machineries protéiques impliquées dans l'activité du génome. La chromatine connaît ainsi un ordonnancement qui s'effectue sur plusieurs niveaux.

L'ADN s'enroule autour d'un octamère de petites protéines, les histones, et va former une sorte de collier de perles. Chacune de ces perles est appelée nucléosome. Ce collier s'enroule sur lui-même dans une série de repliements puis de boucles. Celles-ci forment des fibres de 11nm puis de 30nm ainsi que d'autres niveaux d'organisation aboutissant, en dernier lieu, aux chromosomes mitotiques (Figure 4 - Les différents degrés d'organisation de la chromatine).

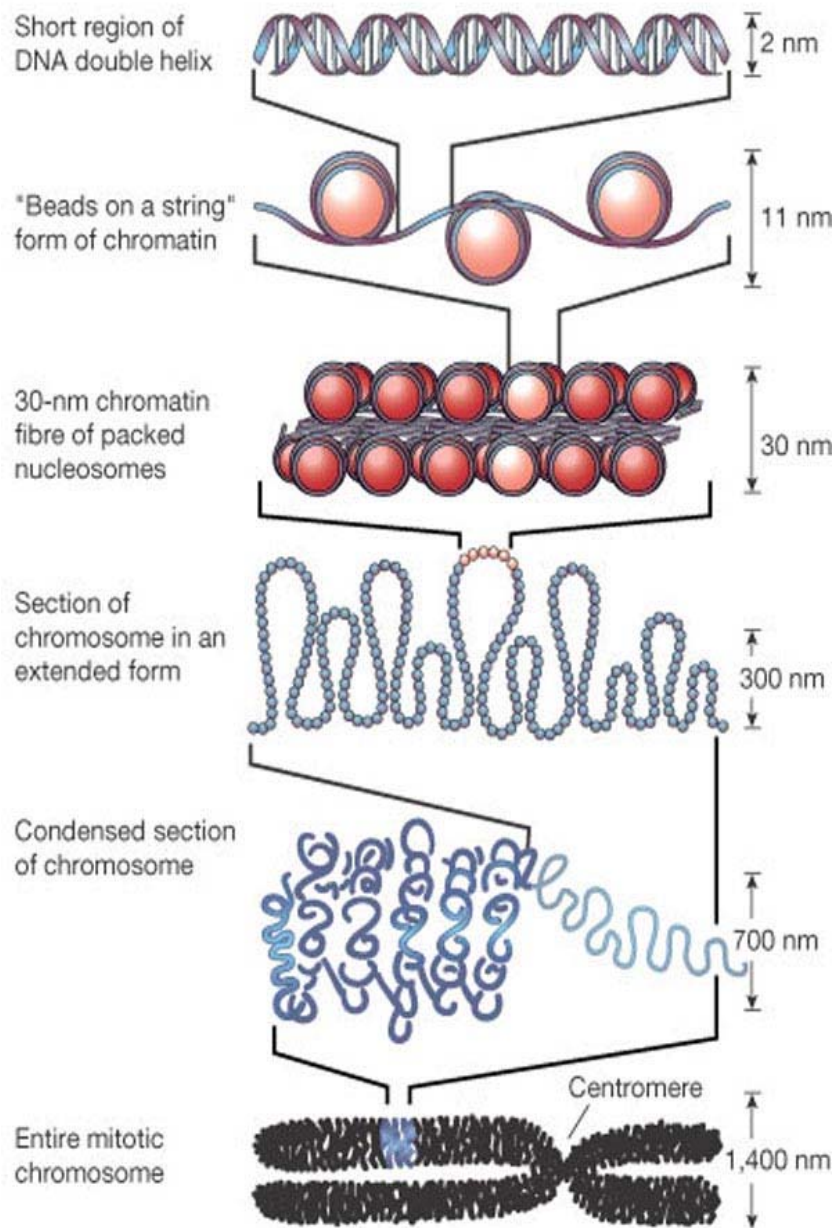


Figure 4 - Les différents degrés d'organisation de la chromatine

Le niveau d'organisation le moins élevé est le nucléosome. Celui-ci est relié au suivant par l'ADN inter-nucléosomal et l'enchaînement (fibre de 11 nm) se structure en fibre 30 nm. Cette fibre connaît plusieurs états d'ordonnement, dont le plus compacté est le chromosome mitotique (*Felsenfeld & Groudine, 2003*).

a) Les composants principaux de la chromatine

(1) Les histones

Les histones sont de petites protéines basiques découvertes il y a plus d'une centaine d'années (*Kossei, 1884*), et dont la fonction n'est pourtant pas encore complètement élucidée. Sous forme d'octamères elles sont le support structural autour duquel l'ADN est enroulé. L'ensemble forme l'élément constitutif de base de la chromatine, le nucléosome. Les histones sont classées en deux familles d'histones : les histones de cœur et les histones de liaison. Ces familles diffèrent par leurs structures et leurs fonctions au sein de la chromatine (Figure 5 - Structure des histones).

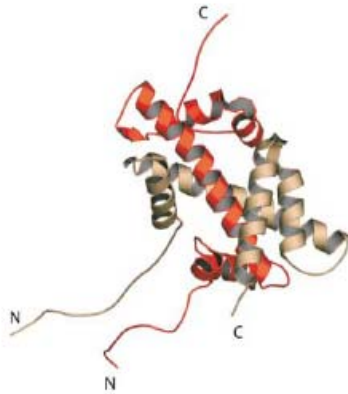
(a) Les histones de cœur

La famille des histones de cœur comprend quatre types d'histones : H2A, H2B, H3 et H4 et chaque type d'histone, à l'exception de H4, comprend des variants (*Van Holde, 1989*). La taille (11 à 15 Kda) et la structure primaire de chacune des histones sont très conservées au cours de l'évolution. Les histones de cœur possèdent une forte proportion (plus de 20%) de résidus lysine et arginine chargés positivement. Ces charges positives permettent aux histones de se lier fortement à l'ADN, chargé négativement, quelle que soit la séquence nucléotidique, grâce à des interactions électrostatiques (*Clark et al., 1990*). Chaque histone est organisée en deux domaines : i) l'extrémité N-terminale, d'une trentaine d'acides aminés, n'a pas de structure stable et compte 30 à 40 % d'acides

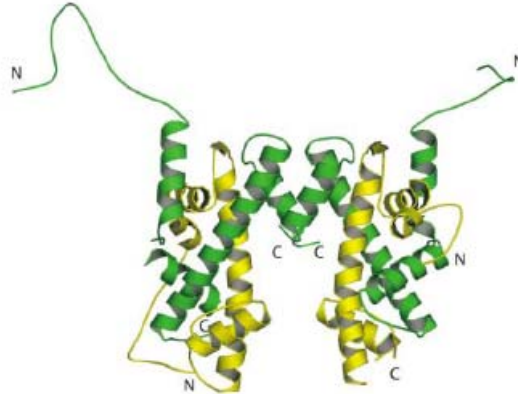
aminés arginine et lysine, ce qui la rend fortement chargée positivement ; ii) le reste de l'histone adopte une structure particulière, appelée domaine "globulaire" ou "histone fold" (*Arents et al., 1991 - Arents and Moudrianakis, 1995*). Les parties N-terminales des histones, appelées queues N-terminales, sortent du cylindre compact formé par les domaines globulaires. Elles ne présentent aucun signe particulier de structuration, excepté le fait que les queues d'H3 et H2B sortent via le sillon mineur de l'ADN.

Plusieurs variants d'histones ont été décrits pour H2A, H2B, H3. Leurs rôles structuraux et fonctionnels ne sont pas encore complètement éclaircis mais certains semblent être primordiaux pour le bon déroulement d'événements spécifiques comme la transcription ou la réparation des cassures double-brins de l'ADN. Ils se distinguent des histones canoniques (c'est-à-dire les histones non variants) par leurs variations de séquences d'acides aminés (*Malik and Henikoff, 2003*) et par le moment de leur déposition. En effet, les histones canoniques sont synthétisées durant la phase S et déposées au moment de la réplication de l'ADN. Certains variants tels que les variants d'H3 spécifiques des centromères (ou CebH3) sont incorporés de façon ADN-réplication indépendante (*Amor et al., 2004*) D'autres variants sont spécifiques à certains tissus. On retrouve notamment une grande variété de variants d'histones au cours de la spermatogenèse, qui est un événement riche en remodelages chromatinien. Ces variants testiculaires feront l'objet d'un paragraphe particulier dans le chapitre dédié à la réorganisation chromatinienne au cours de la spermatogenèse.

A dimère H2A-H2B



B Tétramère (H3-H4)₂



C histone de liaison

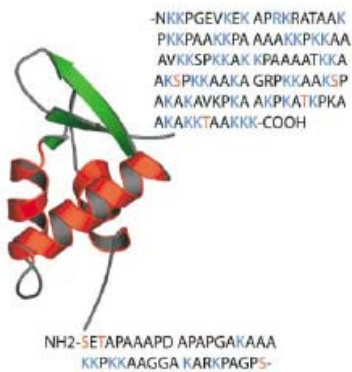


Figure 5 - Structure des histones

A) Structure d'un dimère de H2A (en rouge) et H2B (rose clair). Interaction en forme de poignée de main (rev. *Khorasanideh, 2004*).

B) Structure d'un tétramère d'H3 (en vert) et H4 (en jaune) (rev. *Khorasanideh, 2004*).

C) Histone de liaison. Ici l'histone H5 est représentée (*Ramakrishnan et al, 1993*). Les séquences des parties N-terminales et C-terminales de l'histone H1 humaine sont représentées. Le grand nombre de lysines, sérines et thréonines est mis en valeur par une coloration rouge et bleue (rev. *Khorasanideh, 2004*).

(b) Les histones de liaison

La famille des histones de liaison est représentée par l'histone H1 ou histone de liaison, dont il existe 10 isoformes (H1.1 à H1.5, H1°, H1T, H1T2, H1LS, H1oo). H1 comprend un domaine globulaire central très conservé différent de celui des histones de cœur, une extrémité N-terminale riche en lysine et une extrémité C-terminales longue et non structurée. Le domaine globulaire des histones de liaison est conservé entre variants, tandis que les régions terminales divergent par leur taille et leur séquence (*Wolffe, 1998*). D'un point de vue fonctionnel, les histones de liaison seraient positionnées à l'endroit où l'ADN entre et sort du nucléosome et n'interagissent pas avec les histones de cœur (*Zhou et al., 1998*). Les histones de liaison ont un rôle d'espacement inter-nucléosomal et pourraient moduler la compaction des structures d'ordre supérieur (fibre 30 nm, ...) en assurant une interaction entre nucléosomes adjacents. En effet, *Oudet et al* ont montré en 1975 en microscopie électronique qu'une fibre de chromatine déletée de H1 présente la conformation en "collier de perles" sous des conditions salines fortes. Si les fibres chromatiniennes possèdent l'histone H1 alors la conformation en collier de perles n'est plus observée mais on peut voir une structure fibrillaire correspondant à un degré supérieur de compaction (*Oudet et al., 1975*). Contrairement aux histones de cœur, aucune histone de liaison spécifique n'est essentielle à la survie cellulaire. L'invalidation par knock-out de plusieurs gènes codant pour des histones de liaison a révélé une redondance entre les différentes isoformes, ainsi qu'un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne (*Khochbin, 2001 ; Robinson and Rhodes, 2006*).

(1) Le nucléosome

Le nucléosome est le premier niveau d'empaquetage de la chromatine, et sans doute le plus fondamental (*Kornberg, 1974*). La zone globulaire centrale des histones de cœur est structurée en trois hélices α (l'histone fold) et permet la formation d'hétéro dimères H2A-H2B et H3-H4 (Figure 5 - Structure des histones). Des études *in vitro* ont montré que dans une solution saline modérée (150 mM NaCl), H3 et H4 s'associent en tétramères alors qu'H2A et H2B restent sous forme de dimères. Dans un environnement salin plus fort (2M NaCl), l'octamère d'histones se reconstitue naturellement (*Lusser and Kadonaga, 2004*). Le nucléosome est constitué de ce complexe octamérique d'histones de cœur autour duquel sont enroulées 146 paires de bases (*Luger et al., 1997 ; Kornberg and Lorch, 1999*). Les particules cœur du nucléosome sont reliées entre elles par un fragment d'ADN inter-nucléosomal, ou ADN de liaison qui interagit avec une histone H1. C'est l'ensemble particule de cœur - ADN de liaison et histone de liaison qui constitue le nucléosome proprement dit (Figure 6 - Structure atomique de la particule de cœur du nucléosome).

Sa structure a été largement étudiée par cristallographie (*Richmond et al., 1984 ; Burlingame et al., 1985 – Luger et al., 1997*), dernièrement jusqu'à une résolution de 1,9 Å par Richmond et Davey en 2003 (*Richmond and Davey, 2003*).

Les queues N-terminales sont clairement exposées à l'extérieur de la partie centrale, ce qui leur confère une grande accessibilité : ceci est à mettre en relation avec les nombreuses modifications post-traductionnelles retrouvées sur ces acides aminés.

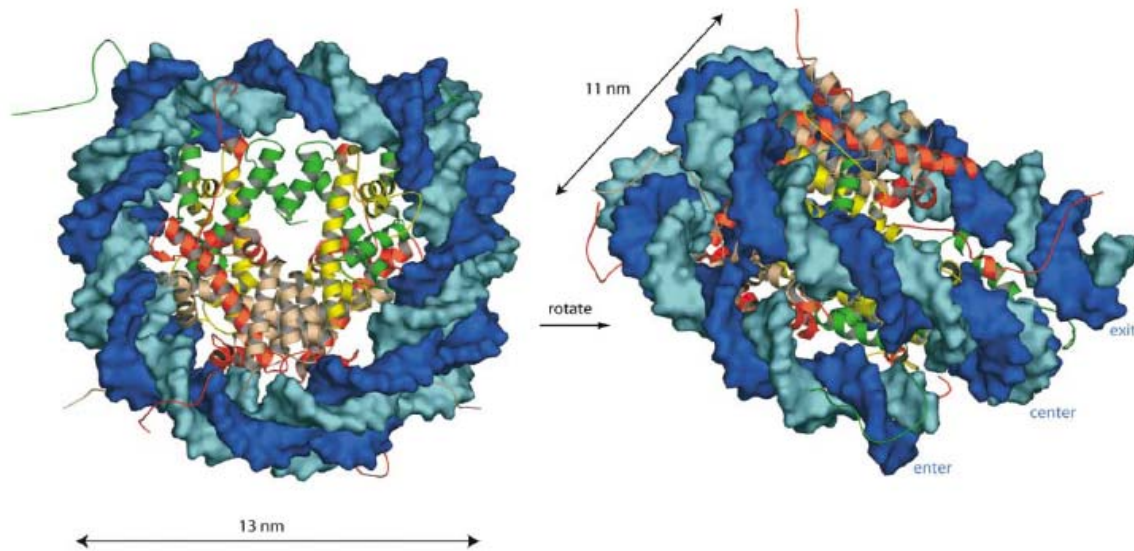


Figure 6 - Structure atomique de la particule de cœur du nucléosome

Le nucléosome adopte une structure de cylindre aplati. Les histones de cœur sont organisées en octamère (H2A en rouge, H2B en rose clair, H3 en vert et H4 en jaune). L'ADN (chaque brin modélisé dans un bleu différent) fait 1,7 fois le tour du complexe protéique, ce qui correspond à 146 paires de bases. On peut noter que les parties non globulaires des histones s'échappent hors de la structure ainsi formée. Celle-ci (ici vue sur sa face gauche et sur son côté droit) fait 13 nm de diamètre et 11 nm d'épaisseur (rev. *Khorasanideh, 2004*).

b) Dynamique de la chromatine : modifications post-traductionnelles des histones et facteurs de remodelage

Outre son ordonnancement optimal, la chromatine doit permettre un accès rapide des séquences d'ADN aux facteurs impliqués dans l'activité du génome selon les différentes phases du cycle cellulaire. De façon générale, la chromatine possède ainsi deux fonctions essentielles au sein de la cellule : compacter la molécule d'ADN pour que celle-ci puisse être contenue dans le noyau d'une cellule diploïde de mammifère et moduler l'accessibilité de facteurs de régulation à l'ADN au cours d'évènements tels que la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation. Il a été observé vers la fin des années 20 que certaines zones du noyau étaient plus denses que d'autres. C'est ainsi que les termes d'euchromatine, décrivant une structure chromatinienne assez relâchée, et hétérochromatine, pour une structure dense et compacte ont été introduits (*Heitz, 1928*). L'euchromatine a été depuis associée à un état transcriptionnel actif tandis que l'hétérochromatine coïncide avec un état silencieux de la transcription. L'hétérochromatine peut être de deux sortes: facultative et réversible, par exemple au niveau d'un gène réprimé temporairement, ou constitutive, par exemple au niveau des séquences répétées qui forment les centromères et les régions télomériques.

La différence structurale de la chromatine (euchromatine / hétérochromatine) permet une régulation de l'activité du génome en modulant l'accès du double brin d'ADN aux différents facteurs impliqués dans la transcription, la réplication, etc... Depuis quelques années, s'ajoute à la régulation structurale du génome une régulation d'ordre chimique. Les

acteurs de ce phénomène appelé remodelage sont :

- d'une part des complexes protéiques de remodelage de la chromatine, à activité ATPasique,
- d'autre part des enzymes capables d'induire des modifications post-traductionnelles notamment au niveau des queues des histones.

Cette dimension nouvelle, qui permet à deux cellules ayant un bagage génétique identique de présenter des caractéristiques différentes est appelée "épigénétique".

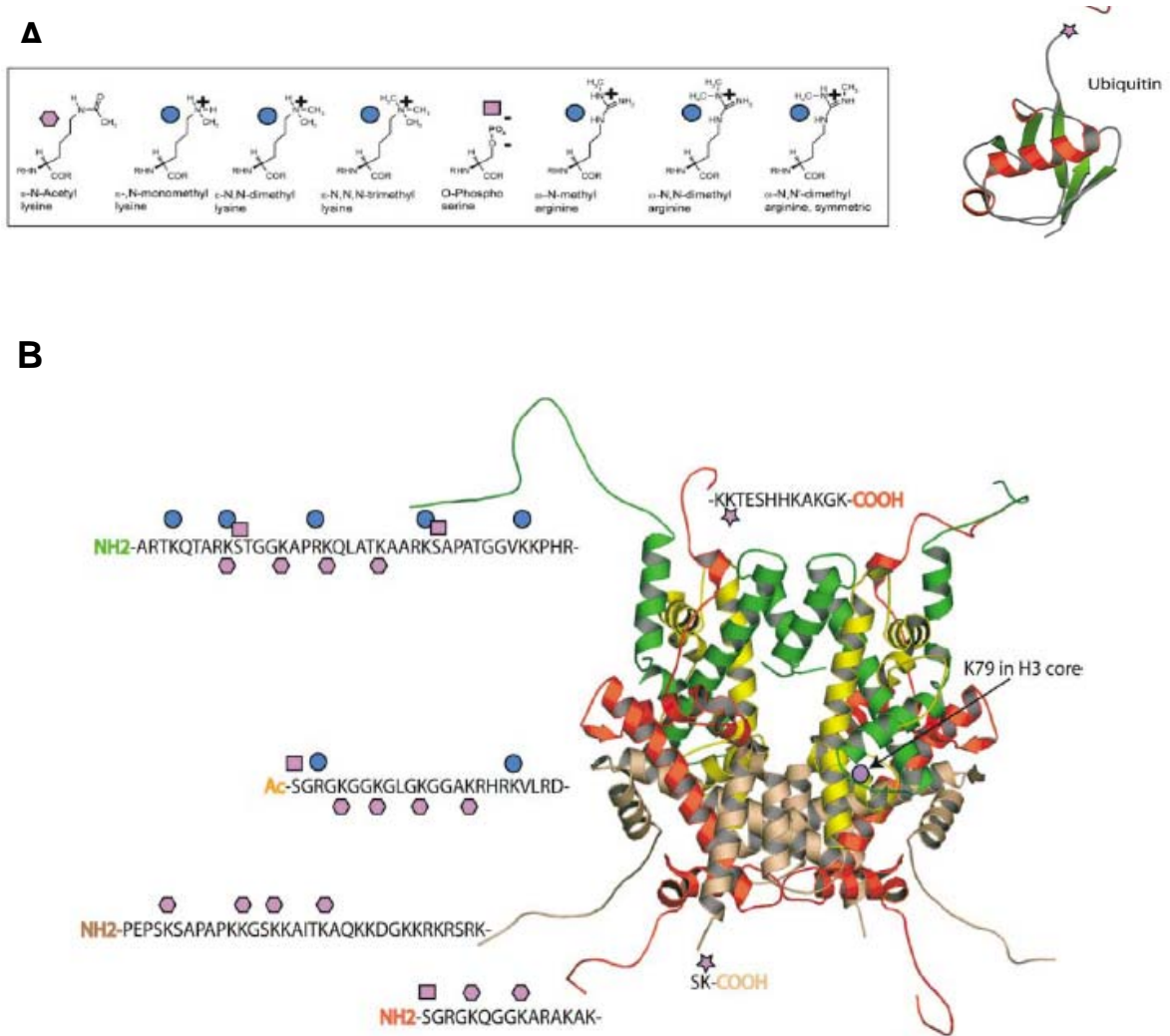


Figure 7 - Les modification post-traductionnelles sur les histones

A) Quelques exemples de modifications post-traductionnelles des acides aminés lysine, sérine et arginine et structure de la protéine ubiquitine.

B) Les sites de modifications post-traductionnelles des histones de cœur. Ici seul une copie de chaque histone est représentée (rev. *Khorasanideh, 2004*).

(1) Les modifications post-traductionnelles des histones

Epigénétique est le terme qui caractérise les modifications transmissibles et réversibles de l'activité du génome et qui ne s'accompagnent pas de changement de séquence nucléotidique. Les modifications connues jusqu'à présent sont la méthylation de l'ADN, les variants d'histones et les modifications post-traductionnelles sur les queues N-terminales des histones (Figure 7).

Ces modifications post-traductionnelles peuvent être des signaux lus par une grande variété de facteurs chromatinien. Elles ont été recensées au cours des quatre dernières décennies mais c'est seulement au cours de ces dernières années que la communauté scientifique a pris conscience de l'impact de certaines d'entre elles. Toutes les histones peuvent être modifiées post-traductionnellement surtout au niveau des extrémités N-terminales des histones de cœur. Ces modifications covalentes comprennent l'acétylation des lysines, la méthylation des lysines et arginines, la phosphorylation des sérines et thréonines, l'ubiquitinylation des lysines, la sumoïlation des lysines et l'ADP-ribosylation sur les acides glutamiques. Plus de cinquante acides aminés peuvent être modifiés sur les histones chez l'homme, ce qui représente plus de 1018 combinaisons différentes sur un seul nucléosome (Figure 8). Ces modulations possibles de signaux réversibles, que ce soit sur les histones classiques ou sur leurs variants, ont conduit à l'hypothèse du code histone (*Strahl & Allis, 2000*), qui serait comme un code apposé sur l'information génétique et décrypté par des enzymes de remodelage ou impliquées dans la conduites des différents processus génomiques comme par exemple la réplication, la réparation de l'ADN ou la transcription.

Histone modification map | Human

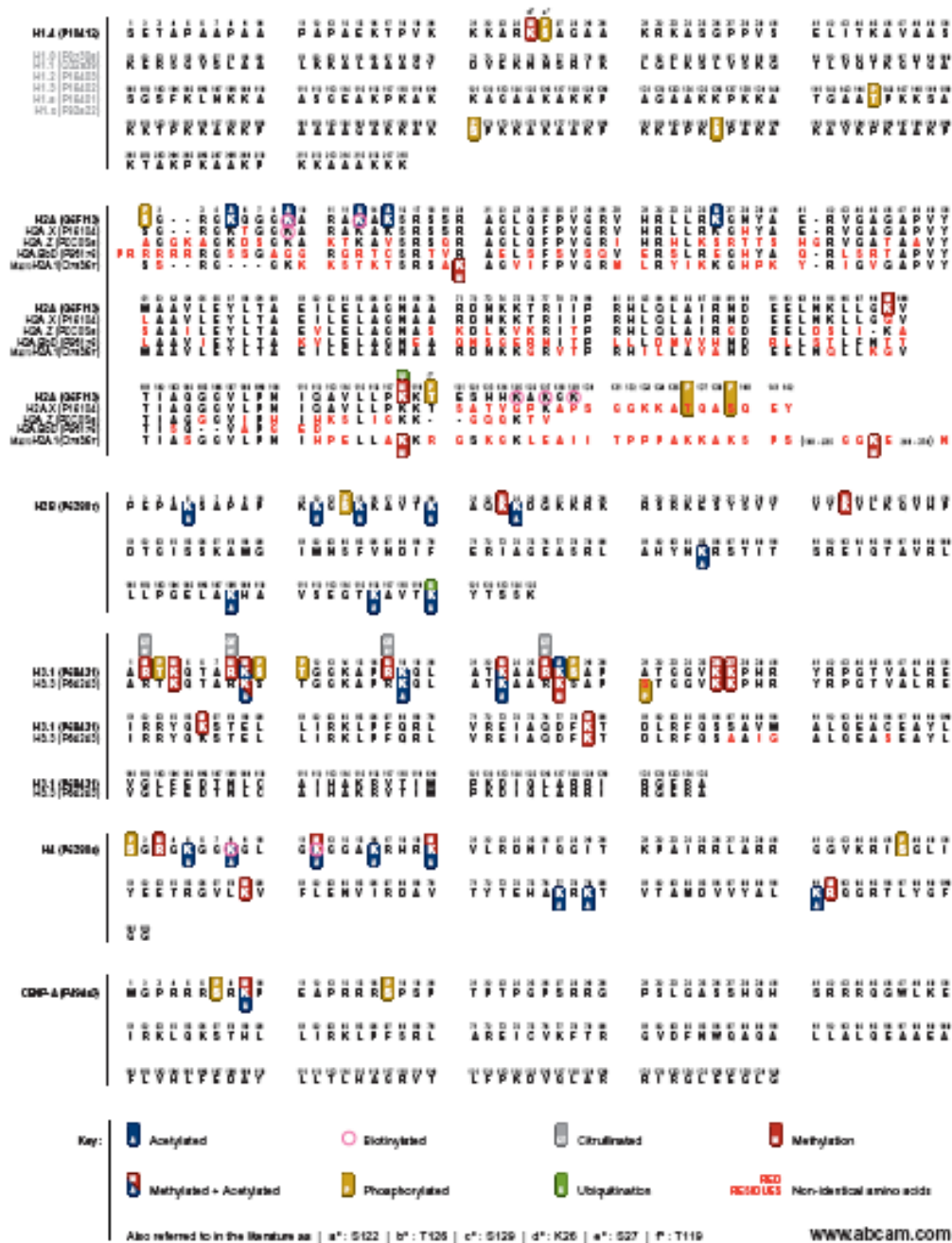


Figure 8 - Les variants d'histone: de nouvelles combinaisons de modifications post-traductionnelles

Variation de séquences des histones et sites de modifications post-traductionnelles connus chez l'homme. Ce schéma provient du site de la société abcam.

La plus grande partie des études sur les modifications post-traductionnelles des histones a été faite sur la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation. L'acétylation des histones et ses effets fonctionnels seront vus plus en détail dans un chapitre ultérieur.

La combinaison des modifications post-traductionnelles apposées sur les queues N-terminales des histones permet le recrutement différentiel de protéines comme par exemple la protéine HP1, facteur permettant l'expansion de l'hétérochromatine, qui ne se lie qu'à l'histone H3 méthylée sur la lysine 9 (*Fischle et al., 2005*) et dont l'interaction est régulée par les modifications des acides aminés adjacents (*Hirota et al., 2005*).

(2) Les facteurs de remodelage de la chromatine

Il existe deux classes d'enzymes de remodelage de la chromatine, celles qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour altérer le contact histone-ADN et celles qui modifient de façon covalente les histones. Dans ce paragraphe, nous passerons rapidement en revue les facteurs de la première catégorie.

Les nucléosomes sont une barrière très efficace à l'accès de l'ADN. Les complexes de remodelage ATP-dépendants de la chromatine, appelés SWI2/SNF2, opèrent au niveau du nucléosome et sont capables de perturber physiquement la structure de la chromatine, avec un mécanisme conservé de la levure à l'homme (*Flaus & Owen-Hughes, 2003*).

(a) Découverte des facteurs SWI2/SNF2

Le premier lien découvert entre la structure chromatinienne et les ATPases remonte à des études génétiques effectuées sur la levure et chez la drosophile. Les gènes Swi (SWItch) de levures étaient caractérisés par leur implication dans la régulation du "mating-type switching" (*Stern, Jensen & Herskowitz, 1984*), et les gènes SNF (Sucrose Non Fermenting) par leur rôle dans la fermentation du sucre (*Neigeborn & Carlson, 1984*). La similarité des phénotypes dûs aux mutations de différents gènes Swi et SNF suggéra que les protéines codées par ceux-ci fonctionnaient de façon coordonnée. Des travaux ultérieurs montrèrent que les protéines SWI2 et SNF2 étaient identiques et mirent en évidence leur fonction de co-activatrices associées à plusieurs activateurs transcriptionnels impliqués dans diverses réponses physiologiques (*Kingston et al., 1996 – Winston & Carlson, 1992*). Un criblage de supprimeurs du phénotype swi- permit d'identifier des allèles mutées des histones H3 et H4 - affectant les expressions des histones H2A et H2B- et d'allèles mutées des protéines SIN1 et SIN2 (toutes deux étant des protéines non histones associées à la chromatine) (*Kruger & Herskowitz, 1991*). Ces résultats suggérèrent que les modifications structurales de la chromatine nécessitaient l'intervention des protéines SWI2/SNF2. Leur rôle en tant que facteur de remodelage fut ensuite mis en évidence par Hirschhorn et al (*Hirschhorn et al., 1992*).

(b) Les différentes familles de facteurs de remodelage

ATP-Dépendants

Les enzymes de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes appartiennent toutes à la

famille des ATPases ADN-dépendantes SNF2, qui contiennent un domaine ATPase hélicase-like (*Bork & Koonin, 1993; Henikoff, 1993*). Le domaine SNF2 est plus précisément lié aux hélicases DEAX-box. Chez les eucaryotes les hélicases sont des protéines qui catalysent la séparation de duplexe d'ADN ou ARN en de simples brins de façon ATP-dépendante. Ces hélicases forment une famille de protéines de taille allant de 400 à 1200 résidus et dont les activités sont multiples: remodelage du nucléosome, épissage de l'ARN messager, maturation du ribosome.

Il existe un grand nombre de membres de la famille des enzymes de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes, la plupart d'entre eux étant conservés de la levure à l'homme (Figure 9). Tous ceux qui ont déjà été caractérisés forment des complexes multi-protéiques et ont un rôle dans l'assemblage de la chromatine ou son remodelage. Les remodeleurs ATP-dépendant sont groupés en sous-classes sur la base de leur possession d'autres domaines et les mieux caractérisés forment trois classes principales:

- La famille SWI/SNF qui comprend les protéines de levure Snf2 et Sth2, Brahma (BRM) chez la drosophile et le mammifère, celui-ci ayant en plus le facteur Bramha-like 1 (BRG1). Cette famille est caractérisée par la présence de bromodomaines, motifs de reconnaissance aux nucléosomes acétylés (voir chapitre B sur l'acétylation des histones et les bromodomaines).
- La famille ISWI, pour Imitation de SWI, contient le domaine SANT, motif de liaison aux histones. Il existe deux homologues d'ISWI chez la levure, Iswi1 et Iswi2 et

chez le mammifère, SNF2H et SNF2L.

- La famille CHD (pour Chromodomain and Helicase-like Domain) est caractérisée par la présence de deux chromodomaines, motif d'interaction avec les queues histones méthylées.
- A ces trois classes principales il peut être ajouté le groupe d'INO80, qui n'a pas d'autre motif connu que le domaine SNF2, celui-ci ayant sa séquence interrompue par une longue insertion.

Une famille de protéines particulières, les AAA+, présente des membres impliqués dans le remodelage de la chromatine et l'activité du génome en général. Cette classe de protéine à activité ATPasique, à laquelle appartient le facteur Atad2 étudié dans ce manuscrit, fera l'objet d'un chapitre ultérieur.

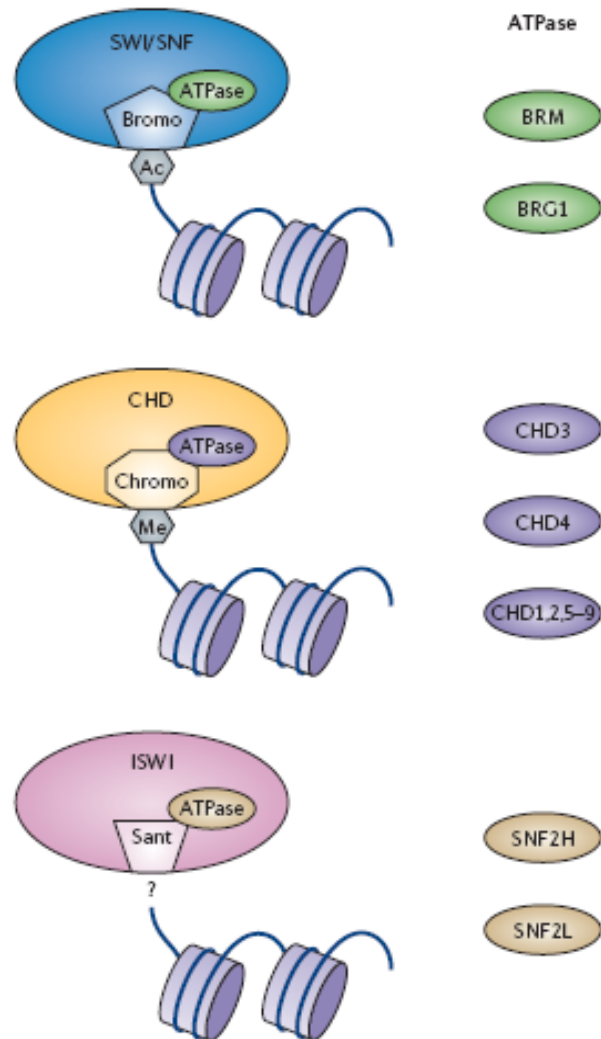


Figure 9 - Les principales familles de remodelage de la chromatine ATP-dépendante

Chaque famille contient un motif de reconnaissance à la chromatine. Les protéines humaines présentes dans chaque famille sont représentées sur la droite. Chacune d'elles forment des complexes multiprotéiques. Par exemple la protéine SNF2H est retrouvée dans différents complexes comme ACF (pour ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor) ou le complexe RSF (pour remodelling and spacing factor). *De la Serna, Ohkawa & Imbalzano, 2006.*

3. Le cas particulier de la chromatine au sein des cellules traversant la spermiogenèse

a) Chronologie d'une réorganisation complète du génome

Au cours de la spermatogenèse la structure chromatinienne va être totalement bouleversée et remodelée plusieurs fois pour conduire à une architecture si compactée que le noyau final du spermatozoïde ne représente que 5% du volume moyen d'un noyau somatique (*Wyrobek et al., 1976*) (Figure 10 - Modifications et succession des protéines composant la chromatine au cours de la spermatogenèse).

Pendant la méiose, des variants d'histones de cœur vont être intégrés aux nucléosomes. On retrouve dans la spermatogenèse tous les variants somatiques mais aussi des variants spécifiques du testicule. L'intégration de tous ces variants permet des combinaisons épigénétiques nouvelles qui peuvent influencer de façon particulière le remodelage chromatinien. En plus de ces incorporations, la chromatine va subir au cours de la méiose puis dans les stades plus tardifs de la spermiogenèse des modifications post-traductionnelles sur les histones. La quasi-totalité de ceux-ci (plus de 95% chez la souris et près de 85% chez l'homme) seront remplacés lors de la condensation des spermatides (types 9-11) au profit de petites protéines basiques d'une cinquantaine d'acides aminés, les protéines de transition. Les protéines de transitions seront enfin remplacées par les protamines, qui formeront la base architecturale sur laquelle se reposera le génome spermatique (*Caron et al., 2005*).

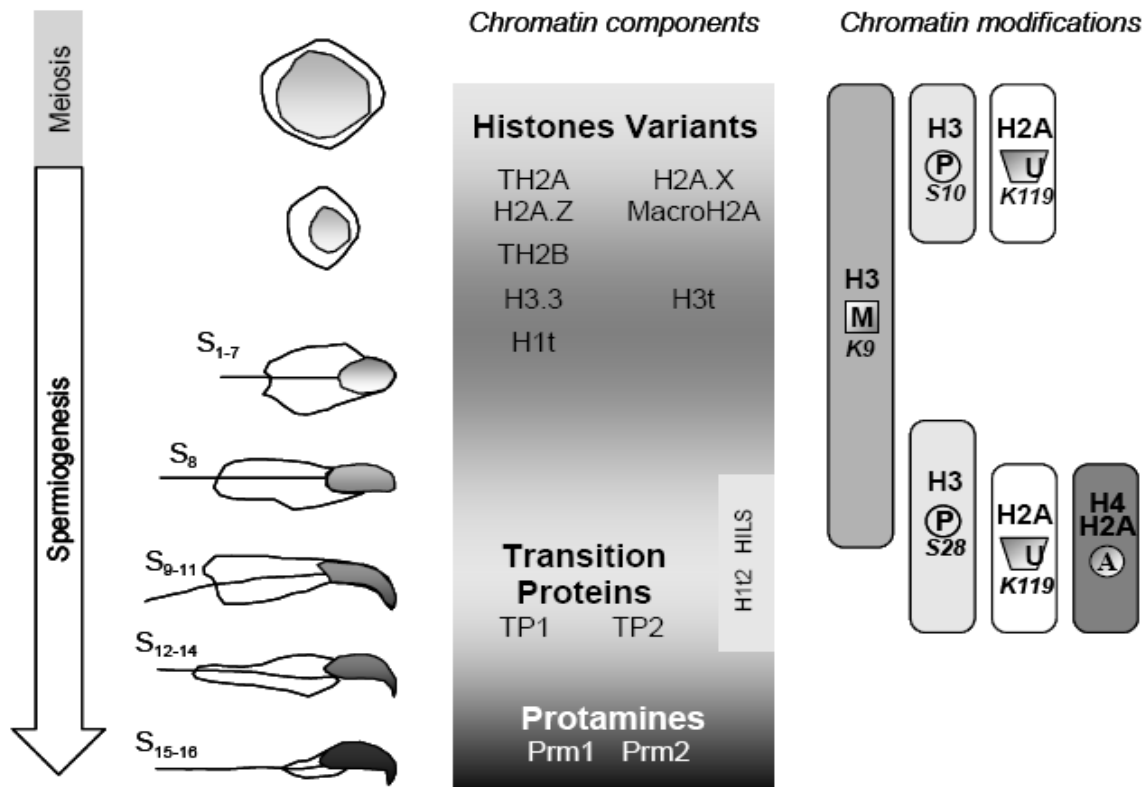


Figure 10 - Modifications et succession des protéines composant la chromatine au cours de la spermatogénèse

Les éléments structuraux principaux supportant l'information génétique sont représentés. Les variants d'histones sont pour la plupart incorporés au cours de la méiose, exception faite des protéines H1LS et deH1t2, variants d'histone de liaison qui sont incorporés plus tardivement. Les histones, classiques ou variants, subissent des modifications post-traductionnelles (représentées ici par A: acétylation, M: méthylation, U: ubiquitination et P: phosphorylation) puis la grande majorité de celles-ci va être remplacée tout d'abord par les protéines de transitions puis les protamines.

b) Composants impliqués dans la réorganisation

(1) Les histones et leurs variants

Toutes les histones classiques ainsi que leurs variants somatiques ont été détectés au cours de la spermiogenèse, que ce soit sous forme de transcrit ou de protéine. Mais il existe aussi des variants d'histones qui sont spécifiques à ce processus.

(a) Les variants d'H2A

On connaît actuellement quatre variants d'H2A strictement testiculaires.

TH2A, ne se différencie de la forme classique que par huit acides aminés au niveau du domaine globulaire structuré et des zones N et C-terminales. Sa synthèse débute précocement dans les spermatocytes (stade préleptotène), pour atteindre un maximum au début du stade pachytène et disparaître dans les spermatides rondes (*Trostle-Weige et al., 1982*). Rao et al. ont montré par une étude quantitative que ce variant constitue plus de la moitié des histones H2A à ce stade de différenciation.

Les trois autres variants ont été découverts au sein de l'équipe (*Govin et al, 2007*):

H2AL1 et H2AL2 ont été isolées par extractions acides d'histones sur des noyaux de spermatides (étapes 12-16) et identifiées par spectrométrie de masse. Ces deux variants

dérivent l'un de l'autre et présentent entre eux une similarité de séquence de 85%. Ils sont en cela plus proches l'un de l'autre que de la forme H2A canonique (similarité de 65% pour H2AL1 et 75% pour H2AL2). Il a été montré que les ARNm de ces deux variants sont enrichis dans les spermatides allongées. Un anticorps reconnaissant les deux formes a permis de mettre en évidence l'accumulation de ces deux histones sur l'hétérochromatine péricentrique au cours des étapes finales de condensation des spermatides. Cette accumulation dans les étapes tardives, contraire aux profils d'expression classiques des histones (ceux-ci disparaissent presque complètement), suggèrent un rôle particulier de H2AL1/2 dans la réorganisation de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la condensation des spermatides.

H2AL3 a été identifiée grâce à des criblages bioinformatiques d'EST testiculaires. Il a été montré que ses ARNm sont enrichis dans les spermatides allongées. Par contre la protéine n'a pas pu être détectée au cours des différentes étapes de la spermatogenèse ni dans des extraits testiculaire totaux.

Les variants somatiques d'H2A ont été étudiés en détail au cours de la spermatogenèse.

H2A.X est exprimé abondamment depuis les spermatogonies A jusqu'à la fin de la méiose (*Tadokoro et al, 2003*). *Celeste et al* ont montré que le variant H2A.X est essentiel au bon déroulement de la spermatogenèse, son invalidation conduisant à une stérilité masculine (*Celeste et al., 2002*). Les chromosomes ne s'alignent plus, les foyers de sites de

recombinaisons ne sont plus détectés, ce qui est à mettre en relation avec le rôle d'H2A.X dans la réparation des cassures double brins.

Le variant MacroH2A1.2 est enrichi dans les testicules de souris (*Pehrson et al., 1997 - Rasmussen et al., 1999*). MacroH2A est incorporé dans la vésicule sexuelle au début du stade pachytène (*Hoyer-Fender et al., 2000 ; Turner et al., 2001*). Son rôle précis au cours de la méiose n'a pas encore été complètement déterminé mais pourrait être en relation avec HP1, qui est également enrichie sur les régions pseudo-autosomales de la vésicule sexuelle. La formation de celle-ci montre des similitudes avec le mécanisme d'inactivation du chromosome X au sein des cellules somatiques femelles (*Heard, 2005*). Ce variant pourrait être ainsi impliqué dans l'inactivation des chromosomes sexuels.

Le variant H2A.Z est synthétisé au cours de la méiose, et incorporé dans les spermatocytes pachytène et les spermatides rondes. Lors de la spermiogenèse, les chromosomes sexuels sont enrichis en H2A.Z, où ce variant remplacerait macroH2A et serait impliqué dans la maintenance de ces chromosomes dans un état d'hétérochromatine facultative (*Greaves et al., 2006*).

(b) Les variants d'H2B

H2B présente plusieurs variants spécifiques du testicule.

TH2B, est exprimé abondamment dans les spermatocytes au stade pachytène et représente à ce stade environ 80% de l'ensemble des histones H2B totaux (*Meistrich, 1989*). Il est exprimé dans les spermatogonies, et son taux augmente dans les spermatides rondes avant de disparaître lors de l'allongement des spermatides (*van Roijen et al., 1998*). Des histones TH2B seraient néanmoins détectées dans les spermatozoïdes humains (*Zalensky et al., 2002*). Très conservé entre la souris, le rat et l'homme (*Hwang et Chae, 1989 ; Choi et al., 1996 ; Zalensky et al., 2002*), la plupart des différences avec H2B classique sont localisées dans la queue N terminale et dans une moindre mesure au sein du fold histone.

Le variant ssH2B, a été mis en évidence chez la souris (*Moss et al., 1989 - Unni et al., 1995*). Il est exprimé spécifiquement dans les spermatides rondes et son rôle reste inconnu.

Le variant SubH2B se localise dans la couche sub-acrosomale du spermatozoïde (*Aul and Oko, 2002*). Il pourrait participer à l'assemblage de l'acrosome, puis être impliqué dans le remodelage de la chromatine pendant la fécondation (après la fusion des pronoyaux).

Deux autres variants ont été découverts au sein de l'équipe (Govin *et al.*, 2007) :

H2BL1, identifié par extraction acide et spectrométrie de masse de la même façon que les deux variants H2AL1 et H2AL2, est très proche de SubH2B bovin. Ses ARNm sont enrichis dans les spermatides allongées et son profil d'expression protéique montre un enrichissement très net au niveau des étapes finales de condensation des spermatides. H2BL1 participe à la structure finale de la chromatine spermatique et est retrouvé dans les spermatozoïdes matures.

H2BL2 a été identifiée grâce à des criblages bioinformatiques d'EST testiculaires. Il a été montré que ses ARNm sont présents à un niveau faible tout au long de la spermatogenèse. De plus la protéine a pu être détectée dans un extrait testiculaire total mais pas au cours des différentes étapes de la spermatogenèse.

(c) Les variants d'H3

En 1984, Trostle-Weige *et al.* identifiaient chez le rat un variant testiculaire de H3, TH3 (Trostle-Weige *et al.*, 1984). Chez les mammifères aucun gène correspondant n'a été retrouvé (Witt *et al.*, 1996).

Un autre variant d'H3 testiculaire, H3t, a été isolé en 1996 chez l'homme (Albig *et al.*,

1996 ; Witt et al., 1996). Celui-ci ne diffère de H3.1 que de 4 acides aminés. L'ARN de ce variant est détecté seulement dans les spermatocytes primaires (Govin et al, 2005).

Les variants non spécifiques du testicule sont aussi présents au cours de la spermatogenèse.

Bien qu'il ne soit pas clairement établi que CENP-A soit présent au cours de la spermatogenèse, le recoupement de plusieurs études suggère sa présence. Courtens et al ont utilisé un anticorps reconnaissant plusieurs protéines centromériques, dont le variant CENP-A, en microscopie électronique et ont observé un signal au cours de la spermatogenèse (Courtens et al., 1992). De plus, CENP-A a été détectée dans les spermatozoïdes bovins (Palmer et al., 1990), suggérant une expression dans des étapes de maturation ou de différenciation antérieures. CENP-A structurerait les centromères lors de la spermatogenèse et serait impliqué dans la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la méiose.

Chez la drosophile, H3.3 est incorporé à la chromatine lors de la prophase I (Akhmanova et al., 1997) il se concentre alors au sein de régions chromatiniennes spécifiques, et disparaît en même temps que les autres histones lors de l'allongement des spermatides. Chez la souris les deux gènes codants pour H3.3 (H3.3A et H3.3B) sont exprimés (Albig et al., 1995). L'ARNm de H3.3A est détecté avant et après la méiose, tandis que celui d'H3.3B est exprimé spécifiquement lors de la prophase (Bramlage et al., 1997).

L'incorporation d'H3.3 lors de la méiose et sa présence au début de la spermatogenèse sont probablement liées à la transcription très active détectée à ces stades (*Lewis et al., 2003*). L'inactivation de H3.3A par mutation cause une létalité néonatale chez des souris homozygotes, et chez les souris survivantes, un retard de croissance, des déficiences neuromusculaires ainsi qu'une baisse de la fertilité masculine (*Couldrey et al., 1999*). L'analyse des testicules, épидидymes et éjaculats n'a pas mis en évidence de différence significative, ce qui suggère que les anomalies observées sont le résultat d'une dérégulation épigénétique.

(d) Les variants des histones de liaison

Dans les spermatogonies, le variant prédominant est l'isoforme H1.1. Il montre une expression forte au début de la spermatogenèse et diminue lors des divisions méiotiques (*Meistrich et al., 1985 - Franke et al., 1998*). Rabini et al montrent que des souris invalidées pour le gène H1.1 ne présentent pas de phénotype particulier, demeurent fertiles, et ont une spermatogenèse normale (*Rabini et al., 2000*).

Le principal variant observé dans le testicule est H1t, spécifique du testicule. Chez la souris, l'histone de liaison H1 est partiellement remplacée par H1t au stade spermatocyte pachytène. Celui-ci s'accumule pour représenter jusqu'à environ 60% des histones H1 totaux (*Grimes et al., 2003*) au niveau des spermatides en élongation. Il est alors remplacé, comme la plupart des histones, par les protéines de transition (*Drabent et al.,*

1996 - Steger et al., 1998). Le variant spécifique du testicule H1t a une séquence d'acides aminés très divergente des isoformes H1.1 à H1.5. Il adopte pourtant la structure classique des histones de liaison en trois domaines dont un domaine globulaire central. H1t a une capacité de compaction de l'ADN moins forte que les autres histones de liaison (De Lucia et al., 1994) et pourrait favoriser une structure chromatinienne plus ouverte, facilitant les recombinaisons méiotiques (Doenecke et al., 1997) ou l'accès aux facteurs de remodelage ou de transcription. Cependant des souris knock-out pour H1t gardent une spermatogenèse normale et sont toujours fertiles (Drabent et al., 2000 - Lin et al., 2000 - Fantz et al., 2001). L'absence de H1t pourrait être compensée par les autres histones de liaison (Lin et al., 2004).

Le variant HILS1 (H1-like protein in spermatid 1), trouvé chez la souris et l'homme, est exprimé dans le noyau des spermatides rondes et en élongation (types 9 à 11) (Iguchi et al., 2003 - Yan et al., 2003), ce qui indiquerait une implication dans la réorganisation chromatinienne finale des spermatides.

Enfin, la dernière histone de liaison spécifique du testicule découverte, H1T2 (Martianov et al., 2005 - Tanaka et al., 2005), contient un domaine globulaire, un motif liant l'ATP, et un domaine putatif de phosphorylation par la protéine kinase C. H1T2 est capable d'interagir avec l'ADN et la protamine 1, et a une distribution nucléaire très spécifique, sous l'acrosome.

Les souris mâles dont le gène *H1t2* a été invalidé sont stériles.

Leurs spermatides montrent un retard de condensation de la chromatine, un allongement aberrant, un détachement de l'acrosome et une fragmentation de l'ADN. De plus, le taux de protamines détectées est inférieur à celui présent dans les souris sauvages.

(e) Hypothèses actuelles sur les rôles des variants

Les variants d'histones, par leurs structures légèrement différentes des histones canoniques et leurs localisations souvent particulières peuvent avoir des rôles différents. Par exemple, ils peuvent avoir une influence sur la stabilité de la chromatine ou des nucléosomes ou mêmes définir des domaines chromatinien particuliers.

(i) *Structure et stabilité des nucléosomes*

On peut prendre en exemple le cas du variant H2A.Z. Son incorporation permettrait une altération de la structure chromatinienne locale favorisant ainsi la transcription. En effet, des études structurales de Suto et al. ont montré que dans le nucléosome, H2A.Z remplacerait deux molécules d'H2A (*Suto et al., 2000*). Cela rendrait la présence de deux dimères H2A.Z-H2B et H2A-H2B peu probable. L'incorporation d'un dimère H2A.Z-H2B pourrait ainsi faciliter le remplacement d'un dimère non variant ou altérer la structure chromatinienne de façon à modifier le recrutement de facteurs chromatinien.

Si la structure propre des variants peut avoir une influence, les modifications post-

traductionnelles particulières de ceux-ci peuvent avoir aussi un rôle. Prenons le cas du variant H2AX. Celui-ci est détecté de façon massive au niveau des cassures doubles brins de l'ADN. De plus, il est phosphorylé au niveau de la sérine 139 (*Stiff et al, 2004*). Cette modification pourrait avoir un rôle sur l'ouverture de la chromatine, excluant les histones de liaison (*Li et al, 2005*).

(ii) *Marquage de zones particulières du génome*

Certains variants sont spécifiques de certaines régions ou de certains états du génome, qu'ils permettent de définir.

Par exemple, le variant macroH2A, associé à une forte répression de la transcription est un marqueur du chromosome X inactif (*Constanzi and Pehrson, 2001*). De plus, ce variant est détecté dans des foyers hétérochromatiques dans les cellules sénescents (*Grigoryev et al., 2004 ; Zhang et al, 2005*).

Les variants cenH3 sont indispensables à la formation des kinétochores et définissent les régions centromériques (*Henikoff and Ahmad, 2005*).

Les variants testiculaires H2AL1 et H2AL2 s'accumulent spécifiquement au sein de l'hétérochromatine péricentrique des spermatides allongées et sont présent dans les structures chromatiniennes finales des spermatozoïdes (*Govin et al., 2007*). Cela pourrait permettre la transmission d'une information épigénétique.

(2) Les protéines de transition

Entre l'étape d'enlèvement des histones et celle de l'incorporation des protamines, les protéines de transitions vont former environ 90 % des protéines de la chromatine. Chez les mammifères quatre protéines de transitions ont été actuellement découvertes: TP1, TP2, TP3 et TP4. Les deux plus abondantes, TP1 et TP2 représentent respectivement 50 et 40 % des protéines nucléaires dans les spermatides (type 12-13) (*Meistrich et al., 2003*).

TP1 est une petite protéine basique de 54 acides aminés, riche en arginines, en lysines et en sérines. Elle est bien conservée au cours de l'évolution, notamment la région 29-42 contenant une tyrosine qui pourrait stabiliser la structure chromatinienne (*Singh et Rao, 1987*).

TP2, deux fois plus grande que TP1, est moins bien conservée au cours de l'évolution. Elle contient deux domaines à doigts de zinc putatifs, et sa région carboxy-terminale est enrichie en résidus basiques (*Kimmins et Sassone-Corsi, 2005*).

Des études sur des souris homozygotes qui ont une invalidation de TP1 ou de TP2 ne montrent pas de phénotype particulier au niveau histologique sur le testicule. Mais dans les deux cas, l'étude des spermatozoïdes montre une chromatine moins compacte, malgré une déposition de protamines semblant identique. De plus, les souris TP1 *-/-* sont moitié moins fertiles que des souris sauvages (*Yu et al, 2000*) et les portées des souris TP2 *-/-* sont plus petites (*Zhao et al., 2001*). Le KO d'une des protéines de transition affecte la maturation de la protamine 2.

TP1 et TP2 peuvent avoir un rôle redondant : l'étude de souris (TP1^{-/-}; TP2^{-/-}) par Shirley *et al* et Zhao *et al* a permis de montrer que les mâles doubles KO ne sont pas fertiles et que leur spermatozoïdes ne sont pas féconds *in vitro*. Leur visualisation montre qu'un tiers de ceux-ci présentent des malformations. Les spermatides qui arrivent en fin de maturation restent dans le testicule et les rares spermatozoïdes qui sont présents dans l'épididyme sont peu mobiles (20 %) ou morts (80%) (Shirley, Hayashi, Mounsey, Yanagimachi & Meistrich, 2004 – Zhao *et al*, 2004).

TP1 et TP2 semblent impliquées dans le processus de condensation de la chromatine spermatique et la maturation des protamines.

(3) Les protamines

La plupart des mammifères ne possèdent qu'une seule protamine de 50 acides aminés, Prm1. Basique, elle possède trois régions distinctes. La région N-terminale présente un motif très conservé ARYRCC et des acides aminés particuliers capables de subir des modifications post-traductionnelles. La région centrale, très enrichie en arginine, est pressentie pour lier L'ADN (Fita *et al.*, 1983). La région C-Terminale est quand à elle beaucoup moins bien conservée au cours de l'évolution.

Certains mammifères, dont l'homme et la souris, possèdent une deuxième protamine: Prm2. Celle-ci contient de nombreuses histidines et est synthétisée sous forme d'un précurseur de 106 acides aminés qui va subir six coupures consécutives et produire la protamine mature Prm2 de 63 acides aminés (Yelick *et al*, 1987).

Les protamines sont essentielles: Cho et al ont montré que des souris hétérozygotes Prm1 $-/+$ ou Prm2 $-/+$ sont stériles (Cho et al, 2001). De plus, l'invalidation d'un allèle de Prm entraîne l'altération de la maturation des précurseurs de Prm2, protéine essentielle à la compaction et au maintien de l'intégrité de la chromatine spermatique (Cho et al, 2003).

c) Un signal particulier : Acétylation de la chromatine au cours de la spermatogenèse

L'incorporation de variants d'histones et les chamboulements dans la composition des protéines chromatinienne ne sont pas les seuls événements déterminants de la réorganisation du génome spermatique. La spermatogenèse, et notamment la spermiogenèse, est le siège d'une très importante dynamique de modifications post-traductionnelles qui affectent les histones, mais également les protéines de transition et les protamines.

L'acétylation des différentes histones a été étudiée chez plusieurs espèces comme la sauterelle (Bouvier and Chevaillier, 1976), la truite (Candido et Dixon, 1972) ou la souris (Bouvier, 1977). L'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement l'acétylation de certains résidus a permis une caractérisation précise du profil d'acétylation des histones lors de la spermatogenèse murine (Hazzouri et al., 2000 ; Khalil et al., 2004).

Les histones H2A, H2B et H4 sont acétylées dans les spermatogonies et les spermatocytes au stade préleptotène puis les histones sont hypo-acétylées de façon

globale lors de la méiose et dans les spermatides rondes (*Meistrich et al., 1992 ; Hazzouri et al., 2000*). Après ce stade l'histone H4 va subir une hyperacétylation dans les spermatides en élongation (*Grimes and Henderson 1984 - Hazzouri et al., 2000*).

Des travaux de l'équipe ont montré que cette hyperacétylation pourrait être la conséquence de la dégradation générale des Histone Déacétylases (HDAC) de classe I durant la période post-méiotique qui déséquilibrerait la balance acétylation/désacétylation des histones au profit des HAT (Caron et al., 2003). L'acétylation de H4 est détectée dans tout le noyau des spermatides au début de l'allongement puis va disparaître en suivant un axe antéro-postérieur lors de la condensation des spermatides (*Hazzouri et al., 2000*).

Cette hyperacétylation a lieu immédiatement avant le remplacement des histones par les protéines de transition, et pourrait donc être impliquée dans l'extraction des histones de la chromatine et leur échange avec les protéines de transition, voir directement dans leur dégradation. Cette hypothèse est étayée par le fait que dans les espèces où l'histone H4 n'est pas acétylée les histones ne sont pas remplacées et sont encore détectées dans le spermatozoïde mature (Kennedy and Davies, 1980 - Kennedy et Davies, 1981). Le rôle exact de cette acétylation n'est pas encore parfaitement établi. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées quand à son implication au cours de la spermiogenèse:

- L'acétylation des histones peut diminuer la capacité de compaction de la chromatine. Celle-ci neutralise les charges positives des queues N-terminales des histones et pourrait affaiblir leur interaction avec l'ADN, chargé négativement. L' hyperacétylation de l'histone

H4 rendrait alors la structure chromatinienne plus lâche, ce qui favoriserait le relargage des histones et augmenterait l'accessibilité de l'ADN aux protéines de transition.

- Seigneurin-Berny et al ont montré un lien entre l'acétylation des protéines et leur ubiquitination (*Seigneurin-Berny et al., 2001*). Cette modification post-traductionnelle intervient dans la voie de dégradation des protéines par le protéasome. L'acétylation des H4 pourrait intervenir dans la régulation de la dégradation des histones et ainsi favoriser leur remplacement par les protéines de transition.

Enfin, cette hyperacétylation pourrait être un signal de recrutement de facteurs de remodelages précis. Certaines protéines possèdent des motifs de reconnaissance aux lysines acétylées. Le bromodomaine, qui sera vu plus en détail dans le prochain chapitre, est capable de reconnaître de façon spécifique H4 quand celle-ci est acétylée. On retrouve des bromodomains chez les facteurs de remodelage ATP-dépendant SWI/SNF, chez des HAT ou certains facteurs impliqués dans la transcription. L'hyperacétylation des histones pourrait donc servir de signal de recrutement de tels complexes au niveau de la chromatine des spermatides en élongation et favoriser ainsi la mise en place d'une machinerie de remodelage permettant l'enlèvement et le remplacement des histones.

Il a été identifié récemment deux protéines testiculaires à bromodomains ayant une influence sur la structure et l'activité chromatinienne au cours de la spermiogenèse. La première, BRDT est recrutée sur la chromatine acétylée et est capable d'induire une

compaction globale de la chromatine quand celle-ci est acétylée (*Pivot- Pajot et al., 2003 ; Govin et al., 2006*). L'étude de la seconde, Atad2, est l'objet de ce manuscrit.

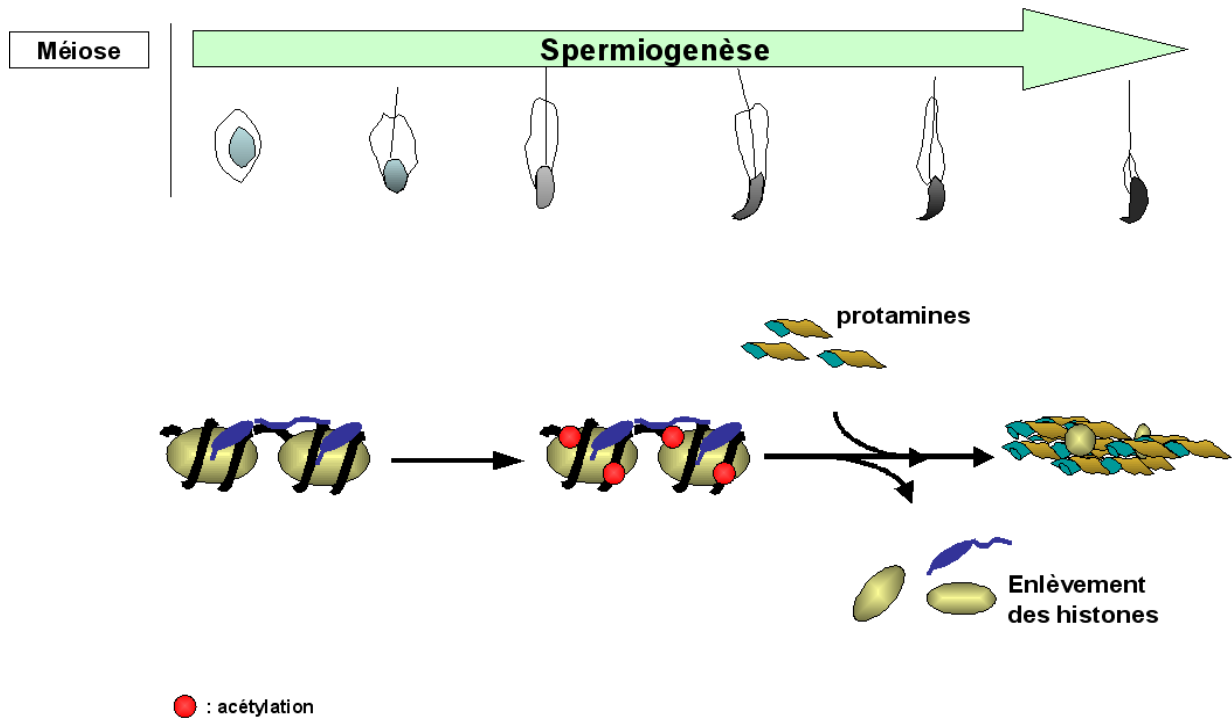


Figure 11 - Acétylation et disparition des histones au cours de la spermiogenèse

Après la méiose les histones sont hypo-acétylées. Au début de l'allongement des spermatides la chromatine va être hyperacétylée, notamment au niveau de l'histone H4. Cette hyperacétylation va être rapidement suivie par le remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines au sein de la chromatine.

B. L'acétylation de la chromatine, un signal de remodelage

1. Généralité sur l'acétylation des histones

De toutes les modifications post-traductionnelles des histones, l'acétylation est une des plus étudiées aujourd'hui. De plus, il a été vu dans le chapitre précédent que la présence d'une hyperacétylation des histones au cours de la spermiogenèse semble être un événement primordial pour le bon déroulement de la différenciation post-méiotique des cellules germinales, d'autant plus qu'il est suivi immédiatement par la disparition de la quasi-totalité des histones (Figure 11 - Acétylation et disparition des histones au cours de la spermiogenèse). C'est aussi dans la perspective de ce travail qu'il a été choisi d'aborder cette modification de façon un peu plus précise. Dans ce chapitre nous verrons quels sont les facteurs responsables de l'acétylation des histones, quels sont ceux capables de venir "lire" ce signal, et enfin quelles sont les relations entre l'acétylation des histones et la cellule.

a) Les états d'acétylation des histones

L'acétylation des histones est une modification réversible qui a lieu spécifiquement au niveau des résidus lysines de leur extrémité N-terminale. L'histone H2A peut présenter deux formes mono- ou di-acétylée, tandis que les histones H2B, H3 et H4 peuvent être mono-, di-, tri-, ou tétra-acétylées. Zhang *et al* ont observé que pour l'histone H4 la forme tétra-acétylée est sur les lysines K5, K8, K12 et K16.

b) Les effets de l'acétylation de la chromatine

Pour chercher les effets de l'acétylation des histones sur la dynamique chromatinienne, des équipes se sont penchées sur la corrélation constatée entre l'état acétylé de la chromatine et son état transcriptionnellement actif. Ces études ont montré que l'acétylation des histones augmente le taux d'occupation de l'ARN polymérase aux promoteurs des gènes (*Lee et al., 1993 – Vettese-Davey et al., 1996*) et facilitent l'assemblage de ses cofacteurs (*Ura et al., 1997 – Agalio et al., 2000*). Les premières hypothèses pour expliquer ce phénomène se sont d'abord tournées vers les charges ioniques des queues d'histones. En effet celles-ci sont chargées positivement et peuvent potentiellement interagir avec les charges négatives des phosphodiesteres du squelette de l'ADN. L'acétylation sur des résidus lysine particuliers pourrait réduire cette charge positive et ainsi baisser l'affinité des queues d'histones avec le cœur du nucléosome. Si cette hypothèse est bonne, des mutants mimant une baisse de charge électrostatique devraient avoir le même effet qu'une acétylation. L'équipe de Zhang et al montra que ce n'est pas le cas (*Zhang et al., 1998*). De plus la structure cristalline du nucléosome montre que les queues N-terminales des histones sont plutôt libres à l'extérieur de la structure et n'ont pas de contact ferme avec l'ADN. Le rôle de l'acétylation des histones se porterait plutôt sur les contacts inter-nucléosomiaux et sur des structures chromatinienne d'ordre de plus haut rang. L'acétylation des histones conduirait à un relâchement de la densité chromatinienne. Cette explication est étayée par de nombreux arguments comme la corrélation entre hypo-acétylation des histones / hétérochromatine et acétylation / euchromatine. De plus les histones acétylées peuvent être reconnues par des facteurs de

remodelages capables de décompacter localement la chromatine comme par exemple les complexes SWI/SNF (voir plus loin).

Le signal chimique en lui-même est insuffisant pour réguler le remodelage chromatinien. Le recrutement est plus subtil et passe par un pattern d'acétylation sur des lysines particulières.

Ce pattern est régulé par deux familles d'enzymes dont les activités sont contraires:

- les Histones Acétyl-Transférases (HATs), qui transfèrent un groupement acétyl $\text{CH}_3\text{-CO-}$ de l'acétylcoenzyme A (Acétyl-CoA) sur les groupements NH_3^+ de résidus lysine des histones de cœur,
- les Histones DésAcétylases (HDACs) qui catalysent la réaction inverse.

La première HAT fut identifiée chez *Tetrahymena* (*Brownell & Allis, 1995*). Elle s'avéra être un homologue de Gcn5, connu alors comme un coactivateur transcriptionnel chez la levure.

Par la suite, de nombreuses enzymes HAT ont été identifiées. Elles sont classées en 4 familles selon leurs similarités de séquence (*Kouzarides, 1999 - Marmorstein and Roth, 2001*), possèdent chacune des substrats différents ou préférentiels, et interviennent dans différents contextes.

2. Les bromodomaines, motifs de liaison à la chromatine acétylée

a) Qu'est ce qu'un bromodomaine?

Le motif bromodomaine a été identifié pour la première fois dans la protéine de drosophile Brahma, d'où vient son nom, par Tamkun *et al* en 1992 (*Tamkun et al., 1992*). La protéine Brahma, requise pour l'activation de nombreux gènes homéotiques, est l'homologue du facteur de remodelage de la chromatine SWI/SNF chez la levure (*Haynes et al., 1992*).

Ce motif est très conservé dans l'évolution et a été retrouvé depuis dans un grand nombre de protéines associées à la chromatine telles que Gcn5 ou p300/CBP, dans des facteurs de transcription, des coactivateurs ou d'autres protéines importantes pour la régulation de la transcription ou le remodelage de la chromatine et dans un grand nombre d'Histones Acétyl-Transférases (HAT) (*Jeanmougin et al., 1997*) (Figure 12 - Conservation structurale des bromodomaines).

Le bromodomaine a pour particularité de reconnaître de façon très spécifique les lysines acétylées, notamment celles des queues N-terminales des histones. Ceci a été montré d'abord par des mesures de RMN sur le bromodomaine de P/CAF (*Dhalluin al, 1999*), puis sur d'autres bromodomaines (*Hudson et al, 2000*).

A

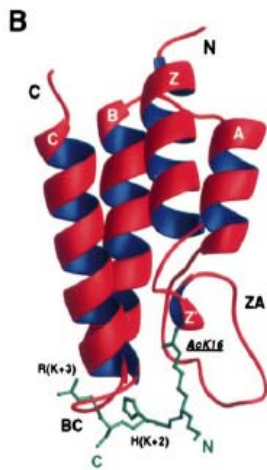
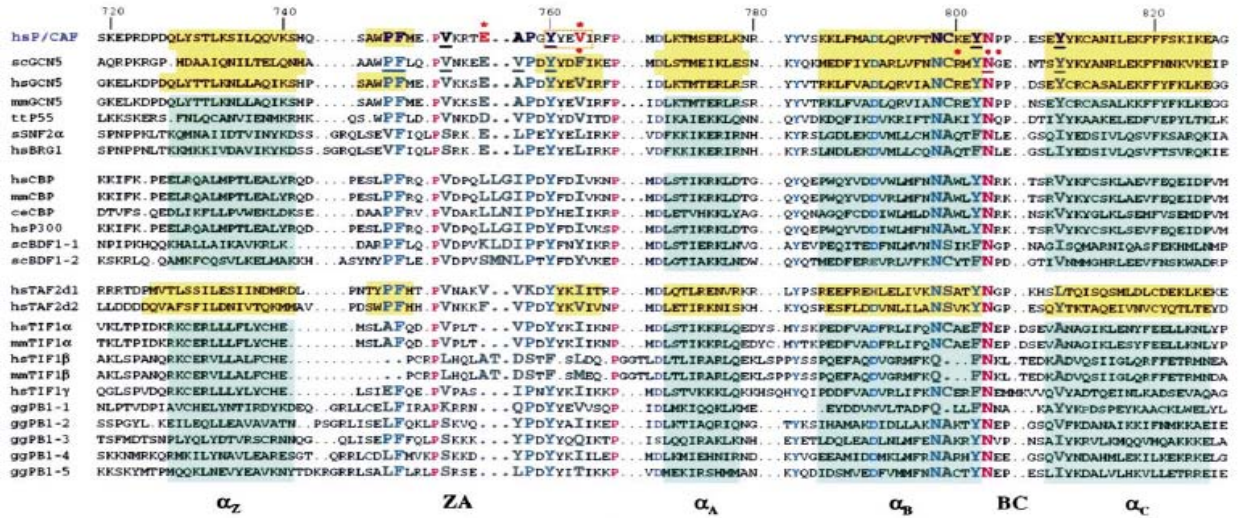


Figure 12 - Conservation structurale des bromodomaines

A) Les séquences sont alignées sur la base de la détermination structurale de cinq bromodomaines (surligné en orange). La prédiction des structures secondaires des autres bromodomaines est surlignée en vert. Sur la séquence de P/CAF, les résidus impliqués dans la liaison avec les lysines acétylées sont soulignées. Dans la séquence de scGCN5 les résidus en contact avec la lysine acétylée d'un peptide H4 sont soulignés et ceux en contact avec d'autres partie du peptides sont indiqués par une point rouge.

B) Structure cristallographique du bromodomaine de scGCN5 en complexe avec un peptide H4 acétylé sur la lysine 16 (en vert).

Figures tirées de la revue Zeng & Zhou, 2002.

b) Structure et conservation des motifs bromodomaines

Le motif bromodomaine est très conservé des levures jusqu'aux mammifères. Au moment de son identification il était décrit comme un domaine d'environ 60 acides aminés formant deux hélices alpha A et B (*Tamkun et al., 1992 - Haynes et al., 1992*). Il a par la suite été étendu à une séquence d'environ 110 acides aminés, avec deux hélices- α supplémentaires dénommées Z et C flanquant les hélices A et B (*Dhalluin et al., 1999*). Une longue boucle reliant les hélices A et Z (boucle AZ) est regroupée contre la boucle reliant les hélices B et C (boucle BC) pour former une poche hydrophobe en surface qui est localisée sur un côté du groupement formé par les quatre hélices, à l'opposé des extrémités N et C-terminales du motif.

c) Le bromodomaine reconnaît les lysines acétylées

Dalluin et al, et Hudson et al, ont montré que les bromodomaines sont capables d'une interaction faible mais très spécifique à des peptides acétylés dérivés des sites majeurs d'acétylation des histones H3 et H4 (*Dhalluin et al., 1999 ; Hudson et al., 2000*). L'analyse structurale du bromodomaine de P/CAF en complexe avec un analogue de lysine acétylée a montré que son site de liaison est localisé sur la cavité hydrophobe entre les boucles ZA et BC. Les interactions entre le bromodomaine et l'analogue sont de nature largement hydrophobes et font intervenir des résidus largement conservés. Des études de

mutagénèses dirigées sur les résidus en contact avec les lysines acétylées visualisées en cristallographie ont confirmé leur importance dans cette liaison, suggérant que le principal rôle des bromodomaines est cette reconnaissance à la lysine acétylée.

Mais il existe une régulation dans cette reconnaissance et chaque bromodomaine ne reconnaît pas toutes les lysines acétylées. On peut citer comme exemple l'étude de Mujtaba *et al* qui montre que la liaison entre le bromodomaine de P/CAF et la lysine acétylée K50 d'un peptide Tat est trente fois plus forte que celle avec un peptide H4 acétylé sur sa lysine 16 (Mujtaba *et al.*, 2002). En règle générale les différences d'affinité des bromodomaines envers différents ligand acétylés peuvent être expliquées par des différences subtiles dans les séquences primaires des différents bromodomaines.

3. Fonctions connues de protéines à bromodomaines

Par les protéines dont il est un constituant, le bromodomaine a longtemps été soupçonné comme jouant un rôle important dans le remodelage de la chromatine (Brownell & Allis, 1996 – Filetici *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été soutenue par des études plus récentes montrant l'interaction des bromodomaines avec les sites de lysines acétylées (Dhalluin *et al.*, 1999 – Jacobson *et al.*, 2000 - Owen *et al.*, 2000 – Hudson *et al.*, 2000). Cette découverte suggère un mécanisme de régulation de l'interaction protéine – protéine via l'acétylation des lysines, ce qui pourrait être le cas dans beaucoup d'événements cellulaires, incluant le remodelage de la chromatine ou l'activation de la transcription. Ce

phénomène peut permettre la grande spécificité de l'acétylation des histones en recrutant les HAT sur des sites bien établis de la chromatine ainsi que le recrutement de certains facteurs de transcription ou de remodelage chromatinien sur cette chromatine acétylée. L'action des facteurs de remodelage ainsi que des HAT permet une régulation très fine de la transcription, en ayant une influence sur l'accessibilité des histones ou sur leur nature chimique.

De plus, une famille de protéines à double bromodomaine, la famille BET, a été retrouvée impliquée dans le maintien des marques épigénétiques et dans des fonctions d'anti-silencing (*Ladurner et al, 2003*).

Les deux fonctions les plus connues, le remodelage de la chromatine et les fonctions HAT des protéines à bromodomaine feront ci-dessous l'objet d'un paragraphe.

a) Remodelage de la chromatine

Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendant contenant des bromodomains forment la famille SWI/SNF. Ces protéines font partie d'une grande variété de complexes.

(1) Le complexe SWI/SNF

La caractérisation biochimique des facteurs SWI/SNF chez la levure a mené à l'identification d'un premier complexe de 11 sous-unités appelé très simplement le complexe SWI/SNF. Celui-ci a pour moteur Swi2/Snf2 et est capable d'augmenter l'accessibilité de l'ADN nucléosomal de façon ATP-dépendante. La fonction de tous les autres membres de ce complexe n'est pas encore complètement élucidée mais certains

d'entre eux apportent malgré tout des informations très précieuses quant à l'importance du complexe SWI/SNF. La sous-unité swi1 contient par exemple un domaine ARID (pour AT-Rich Interaction Domaine) qui permet une interaction non spécifique à l'ADN (*Kortschak et al., 2000 – Quinn et al., 1996*). Snf5, sous-unité de cœur conservée chez les hauts eucaryotes, est impliquée dans l'assemblage du complexe et dans sa fonction catalytique (*Geng et al., 2001*). On retrouve de plus, que ce soit chez la levure ou les mammifères, les protéines Arp7 et Arp9 (pour Actin-Related Proteins) (*Peterson et al., 1998 – Cairns et al., 1998 – Olave et al., 2002*), ce qui pourrait suggérer un lien entre la machinerie de remodelage de la chromatine et des supports structuraux du noyau comme la matrice nucléaire. Bien que les protéines présentes dans le complexe SWI/SNF aient été découvertes à l'origine en tant qu'activatrices transcriptionnelles, des études plus globales sur le génome complet ont montré deux choses: premièrement seulement une petite fraction des gènes chez la levure requiert SWI/SNF pour leur activation transcriptionnelle et deuxièmement il existe une seconde fraction de gènes qui sont réprimés par l'action de SWI/SNF. Cette répression semble directe et non la cause de l'activation de protéines de répression (*Sudarsanam et al., 2000 – Holstege et al., 1998*). La faible proportion de gènes activés par l'action du remodelage de SWI/SNF a été expliquée par deux hypothèses.

La première, proposée par Krebs et al (*Krebs et al., 2000*) est que les gènes dont l'activation transcriptionnelle est dépendante de SWI/SNF sont dans une conformation chromatinienne condensée, ce qui va nécessiter l'action de remodelage du complexe SWI/SNF. Cette équipe montra qu'une grande proportion de gènes exprimés dans la

phase G2/M du cycle cellulaire requiert SWI/SNF et que le rôle de SWI/SNF est de recruter au niveau des promoteurs de ces gènes la protéine Gcn5 (qui est elle-même une HAT a bromodomaine). Krebs et al proposèrent que SWI/SNF est requis pour les pour les gènes exprimés au début de la mitose, au moment où la chromatine est assez condensée. L'hypothèse que l'état de répression d'un promoteur le rende dépendant de SWI/SNF pour son activation a été confirmée par d'autres équipes. Les gènes codants pour H2A et H2B sont réprimés par les corépresseurs Hir et leur activation transcriptionnelle requiert SWI/SNF. Si les gènes HIR sont délétés et que les gènes codant pour H2A et H2B sont partiellement dérprimés, leur activation transcriptionnelle devient indépendante du complexe de remodelage (*Dimova et al., 1999*).

La seconde explication au faible taux de gènes SWI/SNF-dépendant est qu'il existe d'autres facteurs qui permettent une redondance fonctionnelle. Ceux-ci impliquent d'autres activités de remodelage ATP-dépendante (*Biggar & Crabtree, 1999*) ou d'autres mécanismes de décompaction chromatinienne comme l'action de l'acétylation des histones.

Le bromodomaine des composants de SWI/SNF est primordial. En effet, il a été montré qu'une mutation du bromodomaine de la protéine humaine HBRM, cause la perte de la localisation nucléaire du complexe et diminue sa stabilité. Pour ce facteur particulier, Singh et al ont montré que la liaison du bromodomaine est assez faible (*Singh et al., 2007*). Cela peut permettre au complexe d'être assez labile et dynamique.

(2) Le complexe RSC

En 1996 un second complexe de remodelage ATP-dépendant de la chromatine chez la levure, RSC (Remodels Structure of Chromatin), a été découvert sur la base de son homologie avec le complexe SWI/SNF (*Cairns et al., 1996*). Beaucoup de ses sous-unités sont des homologues de sous-unités de SWI/SNF et RSC contient les protéines Arp7 et Arp9, trouvées aussi dans le complexe SWI/SNF. Une étude sur les gènes ciblés par l'action du complexe RSC a mis en évidence le contrôle de l'expression des protéines ribosomales ainsi que les "cell wall proteins", et des mutations dans les sous-unités montrent que RSC est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (*Angus-Hill et al., 2001*).

(3) Les complexes BAF et PBAF

Chez les haut-eucaryotes les recherches par homologie de séquences et les études biochimiques ont permis d'identifier d'autres machineries de remodelage ATP-dépendant du nucléosome. Comme chez la levure, l'homme possède deux complexes liés à SWI/SNF: BAF (complexe BRG1 (hSwi/Snf-A)) et PBAF (complexe hBRM (hSwi/Snf-B)). Les sous-unités ATPases correspondantes, BRG1 et hBRM sont toutes deux homologues entre elles et avec Snf2 de levure. Elles sont capables de remodeler les nucléosomes quand elles sont isolées et leur efficacité croit grandement quand elles sont associées aux autres composants de leurs complexes respectifs (*Phelan et al., 2000 - Phelan et al., 1999*). Bien que BRG1 et hBRM aient en commun 75 % de leur d'acides aminés, leur

fonction est différente. Alors qu'un *knot-down* de hBRM chez la souris ne semble pas critique, les souris pourvues d'un mutant dominant-négatif hétérozygote sont prédisposées aux tumeurs (*Bultman et al., 2000*) et les embryons homozygotes meurent au début du développement. L'étude des gènes cibles du complexe de BRG1 et de ses interactions a montré que PBAF a un rôle central en tant que régulateur du cycle cellulaire et suppresseur de tumeur (*Liu et al., 2001 – Zhang et al., 2001 – Shanahan et al., 1999 – Bochr et al., 2000*)

Le rôle global de BAF et PBAF a été montré avec l'étude des gènes musculaires après induction par MyoD dans les fibroblastes. De la Serna et al ont montré que l'expression de dominants négatifs de BRG1 ou BRM empêchent l'apparition du phénotype myogénique et que ce phénomène a un lien avec l'absence de remodelage au niveau des promoteurs des gènes musculaires (*De la Serna, Carlson & Imbalzano, 2001*).

(4) Le complexe Brahma

Chez la drosophile il n'existe qu'un seul homologue de Snf2, la protéine Brahma (BRM), qui agit en complexe avec les BAPs (Brahma Associated Proteins), et qui a été découverte comme régulatrice des gènes homéotiques. L'expression d'un dominant négatif de BRM cause des défauts dans le système nerveux périphérique et dans les transformations homéotiques, et décroît la viabilité. En accord avec ces données, la protéine BRM est exprimée en grande quantité au cours du développement de l'organisme (*Elfring et al, 1998*).

(5) Action des complexes de la famille SWI/SNF

Des études montrent que ces complexes désorganisent l'espacement structuré des nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes (*Boeger et al, 2003 – Martens & Winston, 2003 - Reinke & Horz, 2003*). Après acétylation des histones des promoteurs par les HAT NuA4 ou le complexe SAGA, les complexes de remodelages sont recrutés grâce aux bromodomaines de leur sous-unité ATPase (*Hassan et al, 2002 – Chandy et al, 2006*). Certaines d'entre elles possèdent plusieurs bromodomaines qui reconnaissent l'acétylation de lysines particulières sur les histones, ce qui permet une régulation très fine de leur recrutement (*Kasten et al, 2004*). Les séquences des promoteurs sont ainsi accessibles aux facteurs d'initiation de la transcription.

b) Fonction Histone Acétyl- Transférase

Les protéines à bromodomaines sont retrouvées au sein de complexes d'acétylation comme par exemple SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acétyltransferase) ou NuA4. L'interaction bromodomaine / lysine acétylée est primordiale pour ces protéines. Les Histones acétyltransférases, ou HAT, ont pour rôle d'apposer une marque d'acétylation sur des lysines spécifiques des queues N-terminales des histones. La première HAT purifiée chez *Tetrahymena* par Brownell et al (*Brownell et al, 1996*) a montré une très forte similarité avec une protéine déjà connue pour être un co-facteur transcriptionnel chez la levure, Gcn5. Par la suite, il a été montré un lien entre l'activité HAT de la protéine à bromodomaine Gcn5 et l'activité transcriptionnelle (*Wang et al., 1998*). Gcn5 est une sous-

unité primordiale d'un complexe multiprotéique de 1 800 Kda, SAGA.

Celui-ci est recruté en tant que co-activateur transcriptionnel sur les promoteurs des gènes (*Grant et al., 1997, Huisinga & Pugh, 2004*).

Par exemple, l'action acétyltransférase de SAGA permet une action de concert avec l'activité de déplacement des histones du complexe de remodelage SWI/SNF. En effet, ce complexe reconnaît de façon privilégiée les histones acétylées par SAGA (*Chandy et al, 2006*) et a donc une action de co-facteur transcriptionnel localisé au niveau des promoteurs.

Dans la levure, le complexe Histone acétyltransférase (HAT) SAGA est nécessaire à la transcription RNA pol II-dépendante de beaucoup de gènes. SAGA est recruté sur les promoteurs par une interaction avec des activateurs transcriptionnels reconnaissant des séquences spécifiques de l'ADN et facilite l'assemblage du complexe de pré-initiation de transcription (PIC).

Plusieurs équipes ont montré que la délétion ou la mutation fonctionnelle du bromodomaine des HAT peut conduire à une vaste variété de phénotypes. Par exemple la délétion du bromodomaine de l'histone acétyltransférase Gcn5 dans la levure conduit à la perte de son activité (*Georgakopoulos et al., 1995 – Syntichaki et al., 2000*).

Les complexes reconnaissant les lysines acétylées des histones ont donc des rôles importants au niveau de l'activité chromatiniennne et sont impliqués dans la régulation de la transcription par le biais de déstabilisations structurelles de la chromatine ou par le

recrutement de machineries transcriptionnelles.

C. Les domaines AAA+

1. Les protéines AAA+: caractérisation

a) Structure et conservation des domaines AAA-

ATPase

Les protéines AAA (pour ATPases Associated with various cellular Activities) sont présentes au niveau des trois domaines du vivant: Archaea, Bacteria et Eucarya. Elles partagent un domaine de liaison à l'ATP d'environ 200 à 250 acides aminés qui peut être présent en une ou deux copies et qu'on appelle les modules AAA (*Koonin et al., 1993 - Patel et Latterich, 1998 - Swaffield et al., 1995*).

Les domaines AAA sont attachés à une grande diversité d'autres domaines qui peuvent dans certains cas interagir avec ces protéines adaptatrices, générant ainsi la diversité structurale et fonctionnelle de la famille des AAA protéines. Recensés au départ sur la base d'une homologie séquentielle qui n'est pas toujours très claire, les membres de la famille AAA sont à présent caractérisés grâce à leur ressemblance structurale, ce qui a permis l'addition de plusieurs membres, formant ainsi la superfamille des AAA+ (Figure 13 - Structure des domaines AAA+).

Celle-ci regroupe un grand nombre de protéines impliquées dans diverses fonctions biologiques comme la réparation et la réplication de l'ADN (*Hishida et al., 2001*), la biogenèse des membranes (*Babst et al., 1998*), le trafic membranaire (*Meyer, 2005*), la régulation de la transcription (*Lee et al., 2003*), et le système de contrôle de qualité des protéines (*Schirmer et al., 1996*).

Les domaines ont des structures secondaires proches, définies par *Lyer et al* en 2004 (*Lyer et al, 2004*). Grâce à la résolution de leur structure par cristallographie les domaines AAA+ ont été caractérisés par deux sous domaines, N-terminal et C-terminal.

Le sous-domaine N-terminal est structuré en forme de cône et contient 5 feuillets β arrangés de façon parallèle. C'est cet arrangement qui différencie les domaines AAA+ des autres domaines de liaison nucléotidique. La diversité de la famille AAA+ vient du nombre et de la position des hélices α qui relient les cinq feuillets. Elle est aussi due en partie à des insertions de domaines spécifiques entre ces feuillets chez certaines protéines, comme par exemple le domaine hélicale I chez la protéine HslU qui permet la liaison de ses substrats (*Sousa et al, Cell 2000*).

Le sous-domaine C-terminal est composé de plusieurs hélices α qui forment un couvercle partiel au dessus du domaine de liaison nucléotidique N-terminal.

Le sous-domaine N-terminal contient plusieurs motifs remarquables:

-le site N-linker, flexible qui peut interagir avec les domaines non-AAA+ et propager les changements structuraux nucléotide dépendants aux autres régions de la protéine (*Smith,*

Contreras-Moreira, Zhang and Bates, 2004).

-le motif Walker A, (GXXGXGKT où X est n'importe quel acide aminé) impliqué dans la liaison au cofacteur Mg⁺⁺ et la formation des liaisons hydrogène avec les nucléotides.

-le motif Walker B ou « DEXD box » qui serait impliqué dans la liaison au Mg⁺⁺ et l'hydrolyse des nucléotides (*Confalonieri et al., 1995*).

- la seconde région d'homologie ou SRH, région conservée qui a permis le classement des AAA de départ, est située sur une partie de $\beta 4$ et jusque sur $\beta 5$. Cette séquence n'est pas strictement conservée dans toutes les AAA⁺ mais ses deux caractéristiques structurales, le senseur 1 et les doigts arginine, sont toujours présentes. Ogura et al ont proposé pour ces deux structures un rôle de coordination entre l'hydrolyse du nucléotide et le changement de conformation des sous-unités de la protéine (*Ogura et al, 2004*).

-la boucle Pore ou P-loop située entre Walker A et B interagit directement avec l'ATP. Le résidu lysine de sa séquence consensus (GXXXXGKT/S) est crucial car sa mutation inhibe la liaison de l'ATP et inactive la protéine AAA⁺.

D'autres mutations sur le sous-domaine N-terminal ont été effectuées pour comprendre le fonctionnement du domaine AAA⁺ et sont résumées dans le tableau C-I.

Tableau C-I: Effets de mutations effectuées sur les domaines AAA+

motifs	Résidus clé	Mutation usuelle	Effets	Références
Walker A	K: GXXXXGKT/S	K remplacé par A	Pas de liaison au nucléotide	Babst et al; EMBO J 1998 Matveeva et al; JBC 1997
Walker B	E: hhhhDE	E remplacé par Q	pas d'hydrolyse de l'ATP	Weibezahn et al; JBC 2003 Dalal et al; MBC 2004 Babst et al; EMBO J 1998
Sensor 1	Résidus polaire à la fin de $\beta 4$	N/T remplacé par A	pas d'hydrolyse de l'ATP	Steel et al; MBC 2000 Hattendorf et al; EMBO 2002 Karata at al; JBC 1999
Sensor 2	R: GAR au début de $\beta 7$	R remplacé par A/M	pas d'hydrolyse de l'ATP, parfois liaison du nucléotide	Ogura et al; J. Struct Biol 2004
Doigts arginine	R dans le SRH à la fin de $\alpha 4$	1) R remplacé par A 2) R remplacé par E	1) Pas d'hydrolyse chez la pluparts des AAA+ 2) Pas d'hydrolyse ni d'oligomérisation	Ogura et al; J. Struct Biol 2004
Boucle Pore	YVG entre $\beta 2$ et $\alpha 2$	1) Y remplacé par X 2) V remplacé par X 3) G remplacé par X	Pas de liaison au substrat ni activité liée. Pas d'effet sur l'hydrolyse de l'ATP ou l'oligomérisation	Song et al; PNAS 2000 Yamada-Inagawa et al; JBC 2003 Siddiqui et al; Genes Dev 2004 Lum et al; JBC 2004 Schlieker et al; Nature Struct Mol Biol 2004

Tableau tiré de l'article "AAA+ proteins : have engine, will work" (*Hanson & Whiteheart, 2005*).

Au niveau de l'extrémité de la sous-unité C-terminale se trouve le senseur 2, dont certains résidus participent eux aussi à la liaison au nucléotide, notamment l'arginine située au début de l'hélice $\alpha 7$ qui interagit directement avec le phosphate γ de l'ATP.

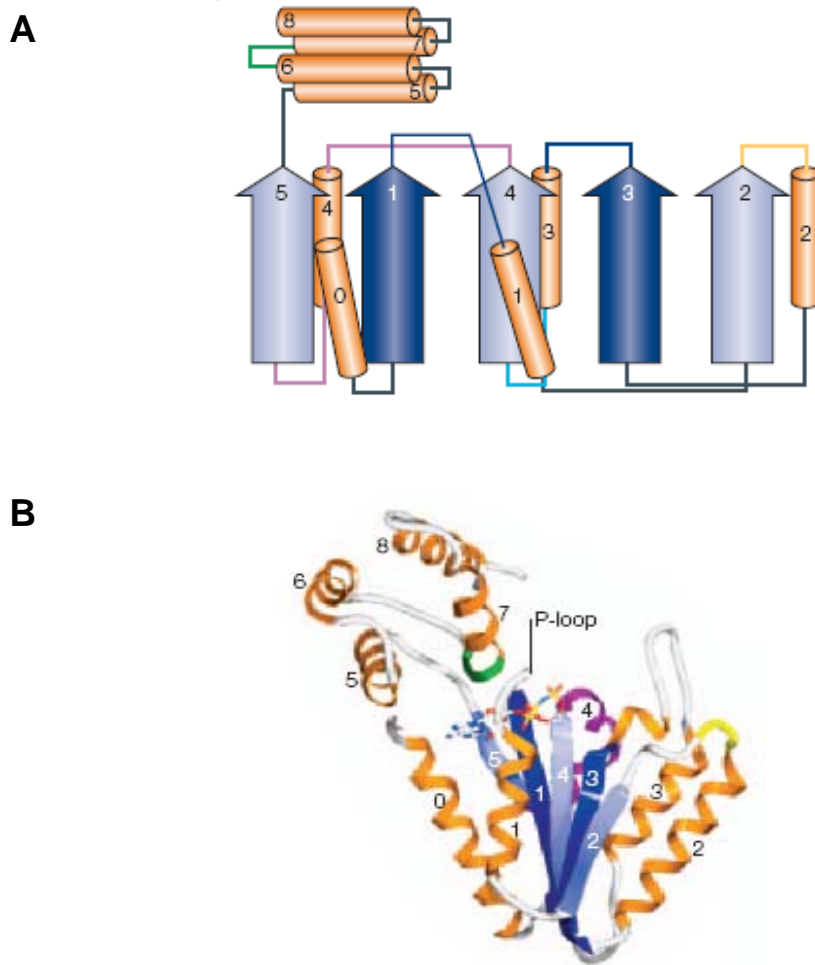


Figure 13 - Structure des domaines AAA+

A) Topologie générale d'un domaine AAA+. Les feuillet β sont indiqués sous forme de flèche et les hélices α sous forme de cylindre. Les motifs remarquables sont indiqués d'une couleur différente: en bleu sombre Walaker A ($\beta 1$) et B ($\beta 3$), en jaune la boucle Pore (ou P-loop) en bleu clair et en vert les senseurs 1 et 2 et en rose le SRH (Second Region of Homology). La numérotation des éléments structuraux est établie grâce à la publication de Lyer et al, 2004. Schéma tiré de la revue de *Hanson and Whiteheart, 2005*.

B) Structure du second domaine AAA+ de la protéine NSF. Le sous-domaine N-terminal de liaison nucléotidique est structuré en forme de cône et le sous-domaine C-terminal forme une sorte de couvercle placé au dessus du premier sous domaine. Cette structure, liée ici à l'analogue de l'ATP AMP-PNP est tiré de la publication de *Lenzen et al., 1998*.

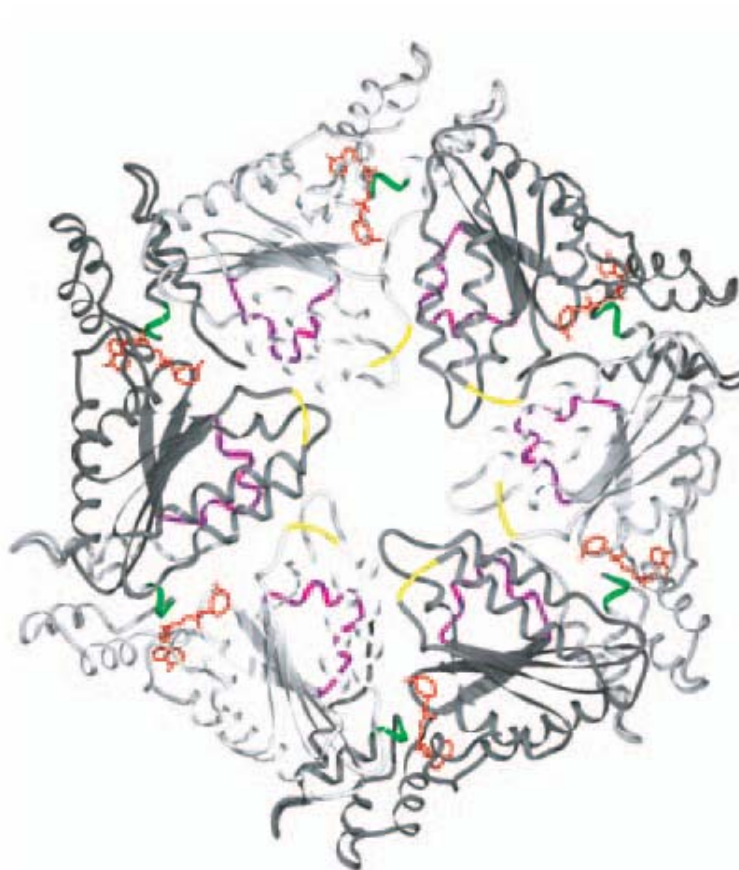


Figure 14 - Structure d'un oligomère AAA+

Arrangement hexamérique formé par le second domaine AAA+ de la protéine NSF. La position des monomères est mise en évidence par l'alternance de ton gris foncé et gris clair. Un analogue de l'ATP (ANP-PNP, ici en rouge) occupe les sites de liaison aux interfaces des sous-unités. Figure tirée de l'article de *Lenzen et al., 1998*.

b) Les protéines AAA+ sont actives sous forme oligomérique

Les enzymes AAA+ s'assemblent en oligomères, et plus généralement en hexamères (Figure 14 - Structure d'un oligomère AAA+). Cette conformation donne aux AAA+ des caractéristiques uniques dont l'une d'entre elle est de placer les sites de liaison à l'ATP au niveau des interfaces de sous-unités adjacentes. Dans les structures connues de protéines sous forme oligomérique, les doigts arginine d'une AAA+ constituent une partie du site de liaison ATP de sa voisine.

Ceci suggère que la liaison de l'ATP ou son hydrolyse contrôle la conformation de l'enzyme et probablement son activité (*Vale et al., 2000 ; Hanson et al., 2005*). La plupart des enzymes AAA+ passent par un cycle de liaison de l'ATP, hydrolyse et relâchement du produit de l'hydrolyse. Ce cycle de réactions est responsable d'une série de changements conformationnels au niveau des AAA+ et de mouvements mécaniques qui permettent d'exercer leur activité (*Sauer et al., 2004*).

2. Fonctions connues de protéines à domaines AAA-ATPase

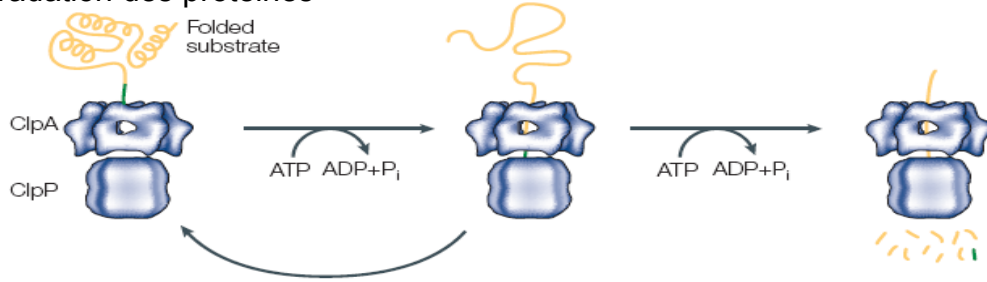
Comme indiqué plus tôt dans ce chapitre, la superfamille des AAA+ regroupe des protéines qui ont des rôles variés. Les trois réactions principales médiées par cette superfamille sont le dépliement des protéines lors de la protéolyse, le désassemblage de

protéines agrégées et le désassemblage de complexe protéiques (Figure 15 - Les principales fonctions des AAA+).

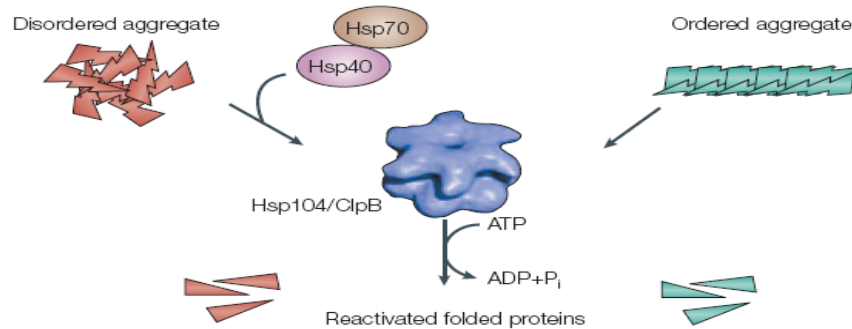
a) Dépliage des protéines et dégradation

Les protéines AAA+ ont un rôle crucial dans la protéolyse où elles déplient les substrats avant de les délivrer dans la chambre de dégradation des complexes auxquels elles appartiennent. Il existe cinq systèmes protéolytiques contenant des AAA+ chez les bactéries (ClpXP, ClpAP, HslUV, FtsH et Lon) et des systèmes équivalents chez les eucaryotes (le protéasome 26S et les systèmes 'bactérie-like' dans les organelles). Bien que chaque protéine AAA+ associée à des protéases prenne en charge des substrats différents, le mécanisme commun de ces AAA+ est de déplier leurs cibles de façon vectorielle pour les délivrer de façon ordonnée à la protéase associée. La connexion physique entre les protéines AAA+ et la chambre protéolytique permet un mécanisme efficace de couplage entre le dépliage des substrats et leur dégradation. Des études ont montré que ces AAA+ sont capables d'avoir une activité indépendamment de la protéase associée (e.g. Wickner et al ont montré que l'AAA+ ClpA, qui est connue pour agir de façon couplée avec la protéase ClpX, a une action chaperonne (*Wickner et al, 1994*)).

A) Dégradation des protéines



B) Désagrégation des protéines



C) Désassemblage de complexes protéiques

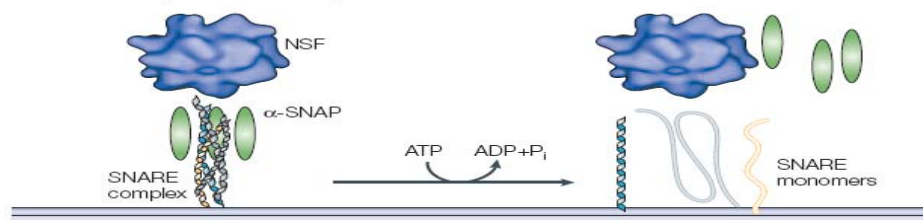


Figure 15 - Les principales fonctions des AAA+

A) Le substrat est reconnu par ClpA (AAA+) puis déplié de façon ATP-dépendante avant de passer au travers du tunnel interne jusqu'à la chambre de dégradation de ClpP. L'image de ClpAP est tirée de l'article de *Beuron et al, 1998*.

B) Différents types d'agrégats peuvent être pris en charge par l'AAA+ Hsp104 et son orthologue bactérien ClpB. Les agrégats ordonnés (formés par des prions) ou désordonnés accumulés après un stress cellulaire peuvent être désassemblés par Hsp104/ClpB et leurs composants peuvent être réactivés. L'image de ClpB est tirée de l'article de *Lee et al, 2003*.

C) Les complexes SNARE qui se forment au cours de la fusion membranaire sont très stables et ne se dissocient sans l'intervention d'autres acteurs. La protéine AAA+ NSF, en collaboration avec sa protéine adaptatrice α -SNAP, désassemble ces complexes et permet la libération de SNAREs individuelles. Celles-ci sont souvent assez peu structurées et peuvent interagir avec beaucoup d'autres protéines. Elles sont aussi capables de former de nouveaux complexes SNARE avec des SNAREs d'autres membranes, ce qui conduit à une nouvelle fusion membranaire. L'image de NSF est basée sur celle d'une protéine structuralement similaire, p97 (*Roulier et al, 2002*).

b) Contre l'agrégation des protéines

Le second type de réaction impliquant la famille AAA+ est le désassemblage des agrégats de protéines. Quand celles-ci ne sont pas bien repliées et échappent aux systèmes protéolytiques elles finissent souvent par former des agrégats qui peuvent devenir potentiellement toxiques pour la cellule. L'implication de l'AAA+ Hsp104 dans la thermotolérance des levures indique que cette protéine, ainsi que ses orthologues Hsp101 chez la plante et ClpB chez la bactérie, contribuent à la survie cellulaire en permettant l'élimination des agrégats dûs aux stress (*Sanchez et al, 1990 – Parsell et al, 1994 – Glover & Tkach, 2001*). En parallèle Hsp104 a été mis en évidence dans l'élimination des agrégats formés par les prions chez *Saccharomyces cerevisiae* (*Shorter et al, 2004*). La façon dont les AAA+ éliminent les agrégats s'appuie sur la coopération d'un autre facteur, la chaperonne Hsp70 (*Glover & Lindquist, 1998*). Plusieurs études ont mis en évidence ce système de bi-chaperonne et ont conduit à l'hypothèse que Hsp104 et ses orthologues peuvent scinder les agrégats en morceaux plus petits qui sont ensuite repliés correctement par le système Hsp70 (*Glover & Tkach, 2001 – Goloubinoff et al, 1999*).

Hsp104/ClpB contient deux domaines AAA+ et un domaine M (pour middle) positionné vers la fin du premier domaine AAA+. Les deux domaines AAA+ sont importants pour l'activité de la protéine et communiquent entre eux (*Hattendorf & Lindquist, 2002*). Quand Hsp104 est sous sa forme hexamérique les domaines M sont situés à l'extérieur de l'anneau et forment des hélices autour du périmètre du complexe.

Deux modèles d'action d'Hsp104 ont été proposés.

Dans le premier, cité un peu plus haut, les domaines M serviraient de levier pour rompre les agrégats en petits morceaux. Cette explication est soutenue par l'étude de Lee et al, qui montre que Hsp104/ClpB est inactivée quand les structures du domaine M sont immobilisées par crosslink (*Lee et al, 2003*). Un contact direct entre les domaines M et les protéines substrats n'ont pourtant pas pu être mis en évidence.

Dans le second modèle Hsp104/ClpB, toujours sous sa forme hexamérique, réduirait peu à peu les agrégats en extirpant les composants de façon individuelle et en les passant au travers de son tunnel central (*Glover & Tkach, 2001*). Plusieurs études soutiennent ce modèle en montrant que la boucle conservée entre $\beta 2$ et $\alpha 2$ est importante pour l'activité de désagrégation de Hsp104/ClpB.

c) Désassemblage de complexes protéiques

La troisième réaction catalysée par les AAA+ est le désassemblage de complexes protéiques. Bien que cette fonction semble éloignée du dépliement des protéines comme pour la dégradation ou la désagrégation, les mécanismes sont pourtant similaires. Le désassemblage de complexes stables par les AAA+ passe par la dénaturation de leurs composants.

Plusieurs exemples illustrent cette idée:

- Le virus Mu réplique son génome par transposition de l'ADN. Le noyau du transposome est la MuA transposase qui forme un homotétramère et permet la transposition par coupure de l'ADN et recombinaison sur les sites cibles. Le

transposome devient de plus en plus stable au cours de la réaction et reste lié à l'ADN, ce qui inhibe la réplication. Il faut donc que le brin soit libéré. La protéine ClpX est responsable de cette libération en déstabilisant le complexe tetramérique (Levchenko *et al*, 1995). En effet, ClpX se lie aux dix résidus C-terminaux de MuA et déplie les sous-unités (Burton *et al*, 2001). Ce dépliement coïncide avec la libération de MuA monomérique venant du transposome (Burton & Baker, 2003).

- Un autre exemple est le désassemblage du complexe SNARE par NSF. Les complexes SNAREs sont connus pour leur implication dans la fusion membranaire. Ils sont extrêmement stables et dépendent de la protéine AAA+ NSF et de son cofacteur α -SNAP pour être désassemblés en SNARE indépendants (Whiteheart *et al*, 2001). Comme les autres protéines contenant des domaines AAA+, les NSF forment un complexe cylindrique où deux hexamères sont posés l'un sur l'autre. Dans les modèles actuels, trois α -SNAP entourent le complexe SNARE et permettent le recrutement de NSF. Quand le cylindre AAA+ est lié, α -SNAP stimule l'activité ATPasique de NSF pour désassembler le complexe SNARE (Hohl *et al*, 1998).

d) Un complexe d'AAA-ATPases particulières, le protéasome et son rôle classique

Alors que la cellule est en perpétuelle reconstruction, la dégradation des protéines est nécessaire au maintien de l'homéostasie. Tout d'abord par l'élimination des protéines mal

repliées qui peuvent être dues à des mutations ou à des agressions extérieures comme les stress oxydatifs ou thermiques. En plus de ce rôle de maintenance, la dégradation des protéines est un moyen très efficace de contrôle d'activités enzymatiques de certains processus ou de facteurs de transcriptions par la régulation de leur temps de vie. De plus le système immunitaire nécessite la génération de peptides immunocompétents générés par la dégradation d'antigènes étrangers. De fait, la dégradation des protéines est un événement qui doit être régulé dans l'espace et dans le temps afin de prévenir l'élimination de protéines qui n'y sont pas destinées. La protéolyse est effectuée de trois façons connues:

- Autodestruction de la cellule entière par la voie des caspases (phénomène d'apoptose).
- Au sein des cellules, les protéines sont amenées par des voies spécifiques et compartimentées dans le lysosome,
- les protéines destinées à la dégradation passent par le chemin ubiquitine et sont dégradées par le protéasome (ou des protéasomes, désignés parfois au pluriel du fait de la variabilité de sa composition).

Les protéasomes ont une grande variété de cibles différentes comme:

- les facteurs de transcription (ce qui les implique dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du génome),
- les cyclines qui doivent être détruites pour la préparation du cycle cellulaire suivant,

- les protéines mal repliées à cause d'erreurs de traduction, d'altérations de leur séquences codantes ou après avoir été endommagées par d'autres molécules endogènes ou à la suite de stress cellulaire.

Les protéasomes sont de larges complexes constitués d'une partie catalytique centrale en forme de tonneau, appelée particule 20S ou particule de cœur (CP), et de sous-unités activatrices qui peuvent se fixer aux extrémités de la particule 20S et permettent de déterminer la spécificité des protéines à dégrader (Figure 16). Le protéasome est le plus souvent présent sous sa forme "classique", c'est-à-dire avec la particule activatrice (PA) 19S. Cette particule contient les protéines AAA+ appelées Rpt, qui seront souvent citées dans cette étude. Il existe en plus de 19S trois autres Particules Activatrices chez les mammifères (PA28 alpha/bêta, PA28 gamma, et PA200). Ces particules ont toutes des caractéristiques différentes, qui peuvent conférer au protéasome des propriétés qui vont varier selon leurs compositions.

(1) La particule de cœur 20S, activité catalytique

La particule centrale du protéasome est restée très conservée au cours de l'évolution. Chez les archaebactéries, elle est constituée de deux protéines de séquences peptidiques proches, alpha et bêta, copiées 14 fois chacune. Chez les eucaryotes elle est constituée de 14 protéines dont les séquences peptidiques permettent un classement en deux groupes, alpha-type et bêta-type, copiées 2 fois chacune.

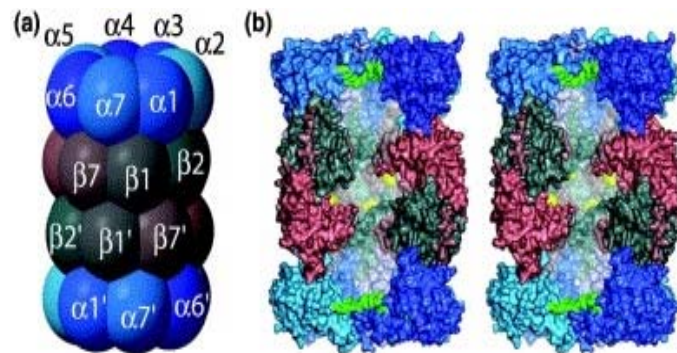
Ces sous-unités sont arrangées de façon à ce que les protéines alpha forment deux

anneaux heptamériques encadrant deux anneaux heptamériques bêta. L'ensemble est un complexe cylindrique creux d'environ 15 nm de long et 11 nm de diamètre, contenant trois cavités internes d'environ 5 nm de diamètre et reliées par d'étroits boyaux. Les deux antichambres externes sont formées par l'interaction des anneaux alpha et bêta, et la chambre centrale par les deux anneaux bêta.

Cette cavité centrale, où se trouve l'activité catalytique, a un volume d'environ 84 nm³, ce qui ne lui permet d'accepter qu'une seule séquence d'acides aminés à la fois (maximum théorique 70 Kda). La dégradation complète d'un peptide est nécessaire à la dégradation du suivant (*Akopian, Kisselev & Goldberg, 1997*).

La particule 20S a une activité peptidase qui a trois fonctions majoritaires: une activité chymotrypsine-like qui permet une coupure après les résidus hydrophobes, une activité trypsin-like qui permet une coupure après les résidus basiques et une activité peptidyl-glutamyl peptide hydrolase qui coupe après les résidus acides. Chez le mammifère deux activités supplémentaires ont été découvertes, une coupure après les résidus qui ont une chaîne peptidique branchée et une coupure entre les petits acides aminés neutres.

L'activité catalytique est localisée au niveau de la paroi interne du 20S grâce aux sites spécifiques des sous-unités bêta.



Rechsteiner & Hill, 2005

Figure 16 - Structure de 20S

Structure en cylindre de 20S, le double anneau des protéines bêta est cerné par un anneau de protéines alpha à chaque extrémité.

Les anneaux alpha ont une fonction de "cerbère", adoptant une conformation très étroite qui empêche l'entrée des protéines à l'intérieur du tonneau 20S. L'ouverture des extrémités alpha est régulée par les particules activatrices qui vont permettre aux protéines spécifiques reconnues par ces particules de passer dans le conduit 20S après avoir été dépliées.

Les produits de dégradation du protéasome ont une taille variable avec une moyenne de 7 à 9 résidus ce qui correspond approximativement à la distance séparant deux sites actifs (hypothèse de l' "intrinsic molecular ruler", *Wenzel & Baumeister, 1995*).

(2) La particule activatrice PA700/19S

La particule activatrice la plus connue actuellement est la particule 19S (ou PA700 pour proteasome activator MW 700 ou regulatory complex RC), très conservée de la levure à l'homme, et actuellement la seule particule identifiée pour stimuler la dégradation des protéines, généralement ubiquitinyllées, et de façon ATP dépendante.

Elle reconnaît les protéines ubiquitinyllées et permet leur dépliement pour leur passage dans les cavités de la particule 20S. Son interaction avec la particule 20S est ATP-dépendante et lâche, ce qui lui permet d'être d'abord assez labile pour être inter-changée de façon efficace avec une autre PA si besoin et deuxièmement d'avoir une certaine

amplitude de mouvement (~5nm) dans le contexte du complexe 26S

La particule 19S est constituée d'une base et d'un couvercle. La base, appelée aussi l'APIS, est formée par un anneau hexamérique de six protéines de la famille AAATPase, les Rpt (regulatory particule ATPases), et de deux protéines non ATPases. Elle constitue une plateforme d'interaction entre 20S et les autres sous-unités de 19S. Celles-ci, qui constituent le couvercle sont appelées les Rpn (regulatory particule non-ATPases).

Les Rpt ont montré, outre leur rôle connu au sein du complexe de dégradation, des fonctions liées à l'activité chromatinienne.

3. Les AAA+ et la dynamique génomique

a) Activité des Rpt

Le premier lien entre le protéasome et l'activité génomique a été observé par l'équipe de Johnston en 1992. Celle-ci étudiait des levures ayant une mutation dans le domaine d'activation de la protéine Gal4 (gal4D), protéine qui permet l'activation de la transcription des gènes régulés par le galactose (GAL). Malgré cette mutation, certaines levures prolifèrent dans un milieu galactose. Elles possédaient donc un facteur capable de rétablir la transcription des GAL. L'un de ses facteurs fut identifié par l'équipe de Johnston comme Sug1-1, forme mutée de SUG1. Son modèle de travail plaçait SUG1 et ses homologues comme un nouveau facteur de transcription agissant sur l'activité transcriptionnelle des GAL par interaction avec Gal4 au niveau de sa région interne et de

son domaine d'activation C-terminal. Sug1-1, n'interagissant qu'avec la région interne de Gal4, permettait le recrutement de la machinerie transcriptionnelle malgré une délétion de Gal4D dans sa zone activatrice et par ce biais pouvait rétablir l'activation transcriptionnelle des GAL (*Swaffield, Bromberg & Johnston, 1992*).

Ce nouveau cofacteur transcriptionnel, SUG1, s'avéra être l'homologue de Rpt6, une des AAA-ATPase de l'APIS du protéasome. En utilisant le même concept de rétablissement de la transcription des GAL dans les levure Gal4D, cinq des six AAA-ATPases de l' APIS ont été ensuite liées à l'activité transcriptionnelle (*Melcher & Johnston, 1995 – Chang, Gonzalez, Rothermel, Sun, Johnston & Kodadek, 2001 – Ferdous, Gonzales, Sun, Kodadek & Johnston, 2001*). Les premiers liens entre les composants du protéasome et l'activité génomiques étaient introduits.

Des études plus récentes ont ensuite montré l'implication de la particule 19S ou du complexe 26 S dans différents événements de la dynamique chromatinienne comme les différentes étapes de la transcription, la réponse au stress, la réparation des dommages à l'ADN, le recrutement de certains facteurs de transcription, le turn-over par protéolyse des facteurs de transcription ou les modifications post-traductionnelles des histones.

(1) Implication dans la réponse au stress

Une publication récente a montré que certains composants de 19S sont nécessaires à une réponse efficace aux stress thermiques ou oxydatifs dans les levures (*Sulahian, Johnston,*

Kodadek, 2006). En effet une délétion de Sug1/Rpt6 ou de Sug2/Rpt4 dans les levures entraîne une très forte baisse de transcription des gènes codant pour les hsp (étude sur HSP26 et HSP104), protéines chaperonnes intervenant dans la survie cellulaire lors de choc thermique des cellules. La particule 20S ne semble par contre pas avoir d'effet notable sur la transcription des hsp lors de leur activation par choc thermique. Des résultats similaires ont été observés sur l'activation de la transcription de gènes régulés par stress oxydatif (dans l'étude de Sulahian *et al*/ observation de GAD1 et PDR5).

Le fait que seuls les composants de la particule 19S soient impliqués dans le bon déroulement de la transcription induite par stress montre un rôle non catalytique de ce fragment du protéasome. De plus, cette étude montre une interaction physique entre les promoteurs des gènes activés par stress et les AAA-ATPases Sug1/Rpt6, Sug2/Rpt4 et Cim5/Rpt1 - mais pas de la particule 20S - quelques minutes après induction par stress. Ce recrutement préférentiel de certains composants de 19S a déjà été observé par Gonzalez *et al* sur les sites de gènes actifs transcriptionnellement (*Gonzales et al., 2002*).

(2) Implication dans les étapes de la transcription

La participation du protéasome ou de ses composants ne se limite pas à la l'activation transcriptionnelle des facteurs de survie aux stress cellulaires. Plusieurs publications montrent un recrutement de l' APIS au niveau des gènes activés, notamment Gonzalez *et al* qui observent dans les levures le recrutement Gal4-dépendant de Sug1/Rpt6 et Yta1/Rpt5 sur le promoteur GAL1-10 sous induction galactose, mais pas de la particule

20S ni même de Rpn9, protéine du couvercle de 19S. De même, seul l'APIS interagit physiquement avec l'activateur transcriptionnel Gal4 (*Gonzales et al., 2002 – Melcher & Johnston, 1995*). Cela permet de supposer que le rôle des Rpt est indépendant du complexe catalytique 20S et que c'est un APIS indépendant physiquement du reste de 19S qui est impliqué dans l'activation de la transcription au niveau des promoteurs.

Pour d'autres acteurs de l'activation comme le complexe SAGA, les Rpt du protéasome sont primordiales. Comme il a été vu dans un chapitre précédent, SAGA est recruté sur les promoteurs de certains gènes et facilite l'assemblage du complexe de pré-initiation de transcription.

L'équipe de Workman montre que les AAA-ATPases de 19S sont requises dans l'interaction SAGA/activateurs et stimulent le recrutement de SAGA sur les promoteurs (*Lee et al., 2005*). La conséquence d'une inhibition des Rpt est une baisse de l'activité enzymatique du complexe SAGA et de son recrutement au niveau des sites actifs de transcription.

Après l'activation, les Rpt sont impliquées dans la bonne marche de l'élongation. *Ferdous et al* montre que des levures délétées de Sug1/Rpt6 ou Sug2/Rpt4 présentent des défauts d'élongation (*Ferdous et al., 2001*). *In vitro* la transcription peut être inhibée par des anticorps contre Rpt6 ou par inactivation de mutants thermosensibles de Sug1/Rpt6 ou Sug2/Rpt4, puis restaurée par addition de la particule 19S immunopurifiée. De plus l'APIS peut interagir avec le facteur d'élongation Cdc68.

La particule 20S, quand à elle, est détectée le long du gène transcrit au cours de

l'élongation et sur le site de terminaison de la transcription (*Gillette et al., 2004*). En comparant le temps d'apparition de l'ARN complètement transcrit de GAL1 avec le pic de recrutement de 20S ainsi que de l'ARN polymérase II au niveau du site 3' de terminaison de ce même gène, Gillette et al ont établi que la particule centrale du protéasome, probablement dans le contexte de 26S est activement impliquée dans la terminaison de la transcription et semble interagir avec l'ARN polIII. L'hypothèse la plus envisagée actuellement est que le complexe 26S est recruté au niveau des sites de pause de transcription, et donc du site de terminaison, et permet la dégradation de l'ARN polIII et/ou de ses partenaires, libérant ainsi le site de blocage, et l'ARN nouvellement transcrit.

La fonction protéolytique du protéasome complet est aussi observée dans le turn-over de gal4 et d'autres facteurs de transcription (*Muratani et al., 2005*). Leur stabilité baisse en même temps qu'augmente leur activité (*Bastien & Rochette-Egly, 2004*).

Ces études montrent que l'implication du protéasome, et plus particulièrement des Rpt, ne se limite pas à la seule dégradation des protéines au cours de la voie ubiquitine. De façon directe ou indirecte, par la diversité de leurs membres et de leurs partenaires, les Rpt ont une influence claire sur la dynamique chromatinienne et sur son activité.

II. OBJECTIFS ET PLAN DE TRAVAIL

1. Etudes bibliographiques

Ma thèse a été jalonnée par ma participation à des études bibliographiques. Celles-ci seront décrites de façon volontairement courte car elles reprennent en partie ce qui est déjà décrit au cours l'introduction. Ces publications seront présentées en annexes, accompagnées de leur résumé.

Dans la revue publiée dans *Eur J Biochem.* (2004), l'accent est mis sur le rôle fonctionnel des variants d'histones lors de la spermatogenèse. Cette revue est présentée dans l'annexe I.

Les revues suivantes (*Gynecol Obstet Fertil.* 2004 et 2006, *Gene* 2005) décrivent la réorganisation de la chromatine et la mise en place de l'information épigénétique du spermatozoïde. Ces revues sont présentées dans les annexes II, III et IV.

2. Etudes de facteurs impliqués dans la dynamique de la chromatine acétylée au cours de la spermiogenèse.

Très peu de données moléculaires détaillent les mécanismes de remodelage de la

chromatine au cours de la spermatogénèse. Avant de me focaliser sur l'étude d'Atad2 mon travail a été d'approfondir la caractérisation de deux autres facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogénèse, Brdt et Cdyl.

a) Etude de la compaction de la chromatine acétylée au cours de la spermiogénèse par le cas du facteur Brdt.

Brdt est un facteur de la famille BET retrouvé de façon strictement testiculaire, ainsi que dans certaines cellules tumorales.

Il est recruté sur la chromatine acétylée grâce à ses deux bromodomains, et possède la propriété entièrement nouvelle d'induire une forte compaction de celle-ci. Sont étude a permis une publication dans Mol Cell Biol. avant mon arrivée au laboratoire (*Pivot-Pajot et coll, 2003*). Mon rôle ensuite a été de déterminer une interaction entre Brdt et Rpn10, un composant non ATPase de la particule 19S du protéasome (données non publiées).

b) Etude de l'établissement de l'hyperacétylation de la chromatine au cours de la spermiogénèse par le cas du facteur Cdyl.

Cdyl est un facteur exprimé faiblement de façon ubiquitaire et surexprimé dans les testicules. Il possède un chromodomaine lui permettant de se lier à la chromatine

méthylée et le plaçant à proximité de certains de ses partenaires, HDAC1 et HDAC2.

L'étude fonctionnelle de CDYL a permis d'établir qu'il participerait à l'importante répression transcriptionnelle qui se met en place au début de la spermiogenèse, puis à l'hyperacétylation des histones dans les étapes plus tardives. L'étude de Cdy1 a donné naissance à une publication dans EMBO Journal en 2003. Cette publication est présentée avec son résumé dans l'annexe V.

Ma participation a porté sur la mise en évidence de l'interaction entre Cdy1 et les HDAC1 et 2 endogènes.

3. Identification et caractérisation du facteur Atad2

L'essentiel de mon travail de thèse a été la caractérisation d'Atad2. Ce facteur, contenant un bromodomaine et un domaine AAA, a été identifié tout d'abord par des criblages bioinformatiques de banques d'ADNc. Mon travail a montré que ce facteur, qui possède une forme chez l'humain et deux chez la souris, est exprimé à un niveau basal de façon ubiquitaire et très fortement dans les testicules, à des étapes tardives de la spermiogenèse. La forme courte, n'existant que chez la souris, n'est exprimée que dans les testicules. C'est une des raisons qui m'a poussée à focaliser mes travaux sur cette forme.

Les résultats qui seront montrés dans le chapitre suivant montrent que le bromodomaine

est fonctionnel et permet un recrutement à la chromatine acétylée. Cette affinité est régulée par la capacité de multimérisation d'Atad2, multimérisation passant par l'intégrité de son domaine AAA. Atad2 est de plus capable d'interagir faiblement avec les Rpt de la particule 19S et permettrait ainsi un recrutement de la fonction chaperonne de l'APIS et/ou de la fonction protéolytique du protéasome complet au niveau des histones acétylées.

Il sera montré de plus qu'Atad2 est aussi retrouvé dans des lignées cellulaires cancéreuses et dans des tumeurs pulmonaires.

Une partie de ses expériences ainsi que des travaux menés en parallèle au sein de l'équipe ont donné lieu à une publication (*MCB*, soumise), présentée à la fin de la partie Résultats. Ces travaux, mentionnés ultérieurement montrent :

- Un effet d'Atad2 sur l'activité transcriptionnelle de certains gènes,
- Un rôle d'Atad2 pour stabiliser les histones incorporées à la chromatine (turn-over),
- Un effet anti-apoptotique d'Atad2.

III. MATERIEL & METHODES

Les méthodes utilisées pour concevoir les expériences montrées dans les figures de la partie RESULTATS sont résumées dans ce chapitre. Comme certaines figures utilisent le même principe, leurs protocoles seront regroupés.

A. Synthèse et purification d'un anticorps reconnaissant Atad2 endogène murin et humain.

L'anticorps dirigé contre Atad2 a été généré chez des lapins par trois injections de 200 µg de protéines recombinantes (les 117 premiers acides aminés de la partie N-terminale, tag His) produites chez E. coli et purifiées sur colonne de Nickel-agarose. L'anticorps a été purifié sur une colonne de résine CNBr contenant l'antigène pour reconnaître spécifiquement la protéine injectée. Son efficacité a été testée par western-blot sur la protéine recombinante puis sur des protéines surexprimées par transfection, et enfin sur la protéine endogène.

Cet anticorps est utilisé en western-blot dans la Figure 19 B), Figure 20, Figure 21B), Figure 22 , Figure 23 C) et D), Figure 27 B) et la Figure 29 A).

B. Production et purification de la protéine recombinante His-Atad2

FL et AAA

La protéine recombinante est introduite dans des bactéries E.Coli par transformation avec un plasmide pET28 puis produite par induction à l'IPTG. Les bactéries sont culottées puis reprises dans un tampon de lyse (PBS 1X, NaCl 300 mM, NP 40 0,5 %, Imidazole 10 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoethanol 15 μ M) et soniquées à 400W dans la glace. Après centrifugation 10 minutes à 12000 rpm (4°C) le surnageant est récupéré puis passé sur une colonne de Nickel préalablement lavée avec du tampon de lyse. La colonne est ensuite lavée avec un tampon de lavage (tampon de lyse, imidazole 20 mM) puis la protéine purifiée est éluée avec un tampon d'éluion (tampon de lyse, 250 mM imidazole). L'éluât est recueilli sous forme de fractions. Celles qui contiennent la protéine recombinante en plus grande quantité et purifiée de façon plus efficaces sont visualisées par gel Coomassie et conservée à -80°C.

Cette méthode a été utilisée pour produire His-Atad2 AAA utilisé pour la synthèse et la purification de l'anticorps dirigé contre Atad2 et la protéine His-Atad2 FL utilisée dans la Figure 23 C) et D)

C. Gel filtration de la protéine recombinante His Atad2

La protéine recombinante est passée sur une colonne Superdex HR 200 à 4°C et éluée dans du tampon de lavage utilisé pour la purification sur colonne Nickel. L'éluât est recueilli sous forme de fractions qui sont ensuite analysées avec un gel argent et comparées à des marqueurs de tailles passés eux aussi sur la colonne de gel filtration dans les mêmes conditions.

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 23 D).

D. Pull-down GST-Atad2 AAA avec des constructions Atad2 et Rpt

La matrice GST-Atad2 AAA (Glutathione Sepharose Tm 4B, Amersham) est lavée dans du tampon d'incubation (25 mM Hepes pH 7,6, 12,5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0,1% NP40, 20% glycérol). Après centrifugation 2 min à 2000 rpm, le surnageant est retiré. Les sites de liaison protéiques non spécifiques sont bloqués par incubation 20 min à 4°C dans du tampon d'incubation en présence de BSA (1 mg/ml).

Les billes sont alors incubées dans du tampon d'incubation en présence de protéines recombinantes radioactives synthétisées *in vitro* (Système EasyExpress de chez Qiagen) et de BSA.

Les matrices GST-Atad2 sont alors lavées dans du tampon de lavage (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40, 20 mM Tris pH 8,0). L'éluion des protéines des billes de

sépharose est réalisée par ajout de tampon de charge 4X (Tris-HCl 200 mM pH 6,8, glycérol 40%, DTT 100 mM, SDS 4%, Bleu bromophénol 4 mg). L'interaction protéines d'intérêt avec la partie AAA d'Atad2 est visualisée par électrophorèse SDS-PAGE 10% grâce à sa radioactivité.

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 25 A) et la Figure 23 A).

E. Préparation des extraits cellulaires totaux des différents tissus murins.

Une souris est disséquée immédiatement après son sacrifice. Les différents tissus d'intérêts sont collectés, coupés en fin morceaux et mis dans un tube dans de l'azote liquide. Ces morceaux congelés sont ensuite broyés sur de la glace et récupérés dans un tampon contenant de l'urée à 6M. La solution très visqueuse est soniquée à 4°C à 400W dans la glace. Après une centrifugation à 12000 rpm à 4°C, le surnageant est récupéré et sa concentration protéique est dosée avec la méthode de Bradford. Pour vérifier que l'urée n'a pas interféré avec le dosage, une même quantité de protéines de chaque tissu est passée sur un gel de poly-acrylamide et visualisée par coloration au Coomassie. Le dosage est exact quand les tapis protéiques ont une coloration similaire.

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 19 B).

F. Préparation des extraits cellulaires totaux de cellules de lignées cancéreuses

Des cellules issues de lignées cellulaires tumorales sont cultivées puis récupérées dans un tampon PBS. Elles sont lavées de leur milieu de cultures par centrifugation douce (1000 rpm) à 4°C et resuspension dans du PBS. Cette opération est répétée 3 fois. Les culots de cellules sont ensuite repris dans un tampon contenant de l'urée à 6M. Le protocole utilisé ensuite est similaire à celui de la préparation des extraits cellulaires totaux des différents tissus murins (voir ci-dessus).

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 29 A).

G. Séparation des cellules germinales par sédimentation

La séparation des cellules germinales est obtenue par sédimentation sur gradient linéaire de BSA (Bellve, 1993, Romrell, 1976) et permet l'obtention de populations cellulaires enrichies en des types de cellules testiculaires à des stades différents de leur maturation. La vitesse de sédimentation de chaque type de cellule est fonction de son volume et de sa densité.

Immédiatement après son sacrifice, les testicules d'une souris sont prélevés. Une fois l'albuginée retirée, les testicules sont incubés dans du milieu Krebs-Ringer bicarbonate

(EKRB) contenant 1 mg/ml de collagénase, pendant 30 min 37°C, puis dans du EKRB contenant 2 mg/ml de trypsine pendant 5 à 15 min. à 37°C. La suspension est ensuite filtrée et centrifugée à 850 g pendant 10 min. Les cellules sont alors reprises dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0,5% de BSA et 1 µg/ml de DNase.

Cette suspension cellulaire est déposée sur un gradient linéaire de BSA (2-4%), contenu dans une chambre de sédimentation. La sédimentation a lieu pendant 70 min. à 4°C. Trente six fractions sont ensuite collectées, numérotées de 1 à 36 en partant du haut du gradient. Chaque fraction est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min, resuspendue dans du PBS et examinée par microscopie à contraste de phase, permettant ainsi l'identification cellulaire. Les spermatides condensées et les spermatozoïdes sont retrouvées dans les fractions 5-6, les spermatides rondes et en élongation sont présentes dans la fraction 10, et les spermatocytes au stade pachytène sont obtenus en poolant les fractions 22 et 23.

Cette méthode a fourni les cellules de la Figure 20 A).

H. Séparation des différents compartiments des cellules testiculaires et extractions salines.

Immédiatement après son sacrifice, les testicules d'une souris sont prélevés. Une fois l'albuginée retirée, les testicules sont incubés dans du milieu Krebs-Ringer bicarbonate (EKRB) contenant 1 mg/ml de collagénase, pendant 30 min 37°C, puis dans du EKRB

contenant 2 mg/ml de trypsine pendant 5 à 15 min. à 37°C. La suspension est ensuite filtrée et centrifugée à 850 g pendant 10 min.

Le culot de cellules est ensuite suspendu à 4°C dans un tampon de lyse cytoplasmique (Saccharose 340 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, Tris pH 7,4 15 mM, Spermidine 0,65 mM, EDTA 2 mM, EGTA 0,5 mM, DTT 1 mM, cocktail anti-protéase). Après centrifugation douce (1000 rpm 10 minutes 4°C) le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est retiré. Les noyaux sont lavés en les resuspendant sur un faible volume de tampon de lyse cytoplasmique déposé ensuite sur un volume beaucoup plus important et centrifugés. Le culot de noyaux lavés est ensuite suspendu dans un tampon d'extraction saline (Glycérol 20 %, MgCl₂ 3 mM, Hepes pH7,9 50 mM, NP40 0,05 %, DTT 1 mM, cocktail anti-protéases, NaCl variable) qui va permettre de récupérer les cellules nucléaires solubles, labiles ou ayant une affinité à la chromatine réduite. Après centrifugation douce, le surnageant contenant les protéines nucléo-solubles (Sol) est récupéré. Le culot est à nouveau suspendu dans le même tampon puis la suspension est soniquée à 400W sur glace. Les fibres d'ADN les plus relâchées sont alors libérées dans la suspension. Celle-ci est à nouveau centrifugée pour permettre la séparation entre le surnageant contenant les protéines liées à la chromatine lâche (Son) et le culot (C) contenant la chromatine inaccessible à la sonication et les protéines à forte affinité chromatinienne. Le culot est repris dans du tampon de charge dénaturant et soniqué à 400W sur glace.

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 20 B et C).

I. Séparation des protéines selon leur taille et volume par ultracentrifugation sur gradient glycérol

Un extrait nucléo-soluble de testicule (Glycérol 20 %, MgCl₂ 3 mM, Hepes pH7,9 50 mM, NP40 0,05 %, DTT 1 mM, cocktail anti-protéases, NaCl 200mM) est déposé sur un tube d'ultracentrifugation contenant un gradient de glycérol allant de 20 à 40% (composition du gradient identique à celui du tampon utilisé pour l'extrait nucléo-soluble, excepté pour la concentration du glycérol). La centrifugation dure 16h à 4°C et à une vitesse de rotation de 50 000 rpm. Après centrifugation le gradient est récupéré en 30 fractions, les premières correspondant à une concentration glycérol faible et les dernières à une concentration élevée. Le tampon n'étant pas dénaturant, les protéines sont séparées en fonction de la taille des complexes auxquelles elles appartiennent. Les populations d'Atad2 et de Rpt1 sont visualisées ensuite par western blot.

Cette méthode a été utilisée pour la Figure 27 B).

J. Pull-down utilisant les queues N-terminales des histones.

Pour les pull-downs, des peptides mimant les queues N-terminales des histones sont biotynilés par couplage avec de la biotine HPDP (couplage sulfo-biotine 90 minutes à température ambiante). Des billes streptavidine agarose sont incubées avec ces peptides,

qui sont éventuellement acétylés, à 4°C pendant vingt minutes. Les peptides sont alors couplés aux billes via l'interaction biotine-streptavidine. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS et une fois avec le tampon de lyse (glycérol 20%; MgCl₂ 6mM, Hepes pH 7,9 50 mM; NP 40 0,1 %, TSA 50ng/mL; ATP 2mM; cocktail inhibiteur de protéases) pour éliminer l'excédant de peptides, puis elles sont reprises avec un extrait nucléoplasmique de testicule de souris (tampon de lyse) et incubées pendant deux heures à 4°C. Les complexes de protéines ayant une affinité avec le peptide vont alors se coller aux billes. Celles-ci sont ensuite lavées 5 fois avec du tampon de lyse et reprises dans du tampon de charge dénaturant. Les protéines d'intérêt sont visualisées par western blot sur gel poly-acrylamide.

Cette méthode a été utilisée avec les peptides de H4 et des extraits testiculaires nucléo-solubles pour la figure Figure 19 B); avec les peptides de H2A, H2B, H3 et H4 et des extraits testiculaires nucléo-solubles pour la Figure 20 A); avec les peptides de H4 acétylés sur les lysines 5, 8, 12 et 16 et des extraits testiculaires nucléo-solubles pour la figure Figure 20 B) et enfin avec le peptide de H4 tétra-acétylé et des extraits testiculaires nucléo-solubles passés en ultracentrifugation sur un gradient de glycérol 20-40% pour la Figure 27 B).

K. Electrophorèse sur gel non dénaturant

Le gel poly-acrylamide non dénaturant a la même composition qu'un gel dénaturant

classique, excepté qu'il ne contient pas de SDS (acrylamide en gradient de 6-12%, tris pH 8,8 375 mM, glycérol 5%, APS 0,0625%, TEMED 0,075%).

Le tampon de migration est composé de Tris pH 8,8 50 mM et glycine 195 mM.

Les échantillons sont chargés dans du bleu de charge non dénaturant et centrifugés 15 minutes à 4°C pour éliminer les agrégats qui ne rentreront pas dans le gel natif. Ils sont ensuite déposés sur le gel amené préalablement à une température de 4°C. La migration s'effectue à 4°C environ 2h à 20 mA.

Cette méthode a été utilisée pour le western-blot de la Figure 25 C).

L. Immunoprécipitation et Co-immunoprécipitation sur des cellules transfectées

Des cellules COS7 sont transfectées avec des plasmides contenant les constructions codant pour les protéines d'intérêt (Rpt 1 à 6, différents mutants d'Atad2) taguées soit *HA* soit *Flag*. Les extraits cellulaires sont ensuite incubés sous agitation à 4°C soit avec l'anticorps anti *HA* pendant une heure puis avec des billes d'agarose une heure supplémentaire; soit avec des billes *Flag*-M2 (l'anticorps anti *Flag* est couplé au billes d'agarose de façon covalente) pendant deux heures. Les billes sont récupérées par centrifugations et lavées plusieurs fois dans un tampon de lavage. Les protéines ou complexes immunoprécipités sont ensuite élués avec du tampon de charge dénaturant.

Cette méthode a été utilisée avec *HA Atad2 1-822* sur un extrait cellulaire soniqué dans la Figure 21 A); avec *HA Atad2 FL / Flag Atad2 1-822* et *292-822 (Bromo)* dans la Figure 25 B); avec *HA Atad2 FL, 1-822* et *1-822 mtATP / Flag Atad2 1-822* dans la Figure 26; avec *HA Atad2 1-822* et *Bromo / Flag Rpt1* et *Rpt3* dans la Figure 23 B); et enfin avec *Flag Rpt3* et *HA Atad2 FL* dans la Figure 24.

IV. RESULTATS

A. *A la découverte d'Atad2, études préliminaires*

1. La découverte d'Atad2

Un des axes de recherche de l'équipe porte sur l'identification et l'étude fonctionnelle de facteurs susceptibles de contrôler le remplacement des histones lors de la spermiogenèse chez la souris. Les données de la littérature, confirmées dans l'équipe, montrent qu'au cours de la spermiogenèse, les histones subissent une hyperacétylation rapidement suivie par leur disparition au profit des protamines (*Grimes and Handerson, 1984; Hazzouri et al 2000; Caron et al, 2004*). L'hypothèse qui en découle est que cette acétylation sert de signal de recrutement de complexes de remodelage particuliers qui vont extraire les histones de la chromatine et induire leur dégradation. Ces complexes protéiques auraient donc un rôle majeur dans le bon déroulement de la maturation des cellules germinales en ce qui concerne la compaction de l'information génétique dans le futur spermatozoïde.

Pour identifier de tels facteurs, il a été cherché dans des banques d'ADNc testiculaires (EST) des séquences codant pour des protéines possédant un bromodomaine, capable de lier les histones acétylées (*Zeng and Zhou, 2002*), et ayant une signature enzymatique potentielle qui leur confère une influence sur la structure chromatinienne. Cette recherche a conduit à l'identification de deux protéines inconnues, BRDT et Atad2. Les travaux antérieurs de l'équipe sur BRDT ont établi que ce facteur est recruté sur la chromatine

acétylée grâce à ses deux bromodomains, et possède la propriété entièrement nouvelle d'induire une forte compaction de celle-ci (*Pivot-Pajot et al, 2003*). Quand j'ai débuté mon travail de thèse, nous ne possédions aucune information sur Atad2.

2. Conservation d'Atad2

La structure d'Atad2 est conservée au cours de l'évolution, ce qui indiquerait un rôle important (Figure 17- Conservation de la structure d'Atad2 au cours de l'évolution).

Très peu de données existent dans la littérature sur le rôle d'Atad2. Son implication dans l'établissement ou le maintien des structures chromatinienne est étayée par le rôle supposé de son homologue Yta7 chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet Tackett *et al* ont recherché des complexes permettant de définir ou de contribuer au maintien de la frontière qui sépare une zone chromatinienne active d'une zone proche silencieuse. Ces complexes contiennent une quinzaine de protéines, incluant des facteurs de remodelage comme Isw2-Itc1 et notamment la protéine Yta7 (*Tackett et al, 2005*).

Une seconde étude publiée plus récemment indique un lien très clair entre l'expression d'Atad2 et les dérégulations de l'activité chromatinienne qui ont lieu dans les cancers du sein (*Zou et al., 2007*).

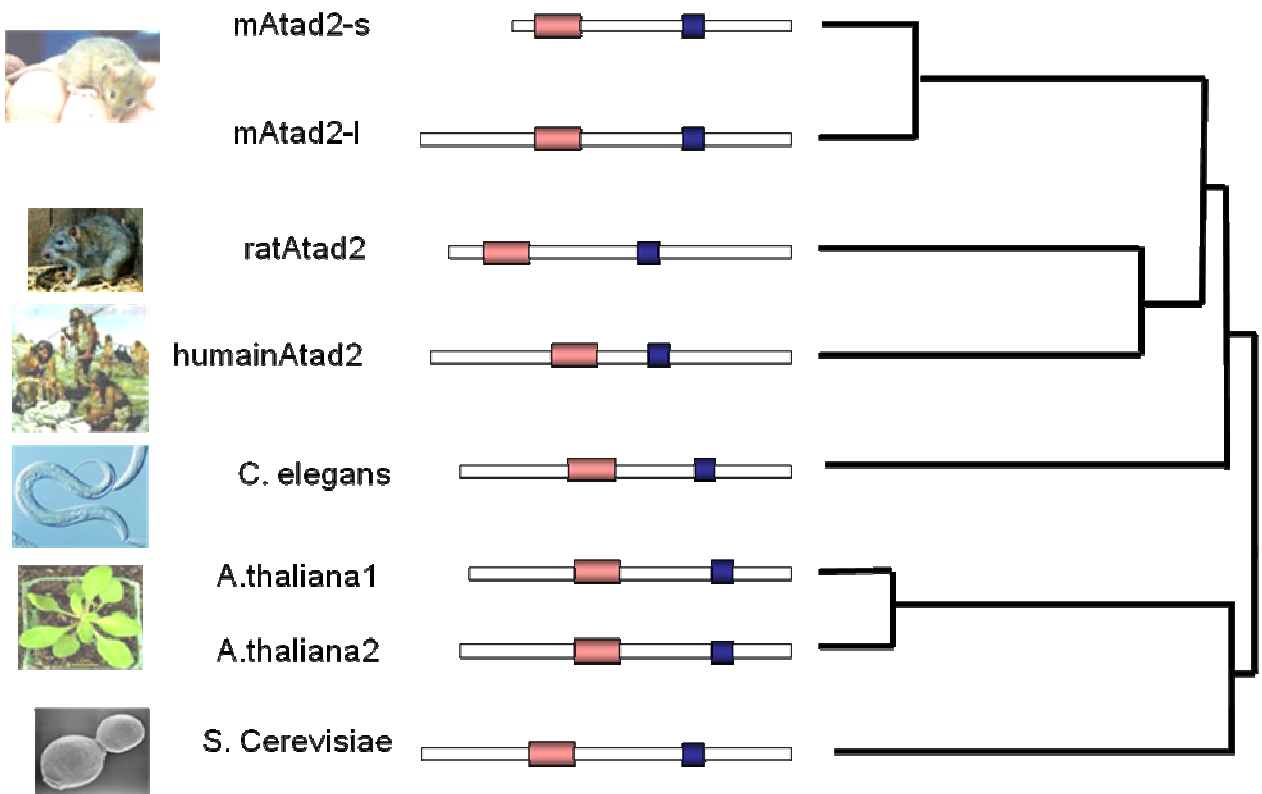


Figure 17- Conservation de la structure d'Atad2 au cours de l'évolution

En rose: domaine AAA; en bleu: bromodomaine

3. Les domaines d'Atad2

Atad2 possède un bromodomaine associé à un domaine très homologue aux protéines AAATPases, en particulier les sous-unités Rpt du protéasome. Ce complexe de dégradation des protéines est composé d'un cylindre central de protéases, la particule 20S, encadré de deux particules régulatrices (ou "19S") qui reconnaissent les protéines à dégrader (en particulier les protéines ubiquitinyllées) (*Glickman and Ciechanover, 2002*) . Les Rpt sont des constituants de la particule 19S qui appartiennent à la famille des "AAATPases" (ATPases Associées à une large variété d'Activités cellulaires), des protéines intervenant de manière prépondérante dans des processus de dépliement ou repliement des protéines, ainsi que dans l'assemblage ou la dissociation de machineries cellulaires (*Ogura and Wilkinson, 2001*). Leur activité ATPase est supposée fournir l'énergie nécessaire à ces processus. Dans le protéasome, les Rpt participent ainsi au dépliement des protéines à dégrader pour les rendre accessibles aux protéases du cylindre central.

4. Rôles pressentis d'Atad2, hypothèses de travail

L'association, au sein d'Atad2, d'un bromodomaine et d'une activité de type AAATPase suggère que ce facteur a pour rôle d'apporter sur la chromatine acétylée une activité chaperonne de dépliement de complexes multi-protéiques. Une première hypothèse est qu'Atad2, recruté sur la chromatine acétylée, fournirait l'énergie et l'activité chaperonne nécessaires à un remodelage particulier de la chromatine. Dans le cas de la

spermiogenèse, il pourrait permettre l'extraction des histones, qui seraient ensuite remplacées par les protamines. Etant donnée la forte homologie d'Atad2 avec une classe particulière de AAATPases, les sous-unités Rpt du protéasome, on peut également envisager qu'Atad2 soit une sorte de sous-unité Rpt spécialisée du protéasome, chargée de recruter celui-ci sur la chromatine pour dégrader directement les histones acétylées au cours de la spermiogenèse (Figure 18 - Hypothèse de travail).

L'analyse de banques de données informatiques nous a fourni des arguments en faveur d'un lien fonctionnel entre une autre sous-unité de la particule 19S du protéasome, Rpn10, et le facteur BRDT. Ce lien a été confirmé par la mise en évidence d'une interaction entre ces deux protéines au sein des cellules (nos données non publiées). L'ensemble de ces observations est en faveur d'un rôle tout à fait inédit du protéasome dans le remodelage de la chromatine acétylée au cours de la spermiogenèse.

Dans d'autres contextes cellulaires, Atad2 pourrait plutôt permettre une stabilisation de la structure chromatinienne par son action chaperonne, régulant le maintien de l'hétérochromatine. Cette hypothèse peut être envisagée grâce à la publication de Tackett et al sur l'homologue Yta7 d'Atad2 et son implication dans le maintien des frontières hétérochromatine/euchromatine.

Dans la suite de ce chapitre j'expliquerai quelles sont les caractéristiques d'Atad2, en décortiquant tout d'abord son profil d'expression, les caractéristiques fonctionnelles de chacun de ses domaines, puis je montrerai ses liens avec les composants du protéasome. Dans un dernier temps, il sera vu qu'Atad2 est aussi présent de façon illégitime dans certaines cellules tumorales et retrouvé dans des tissus de cancer du poumon, faisant

ainsi entrer ce facteur dans la catégorie des "CTA" ou "Cancer Testis Antigenes".

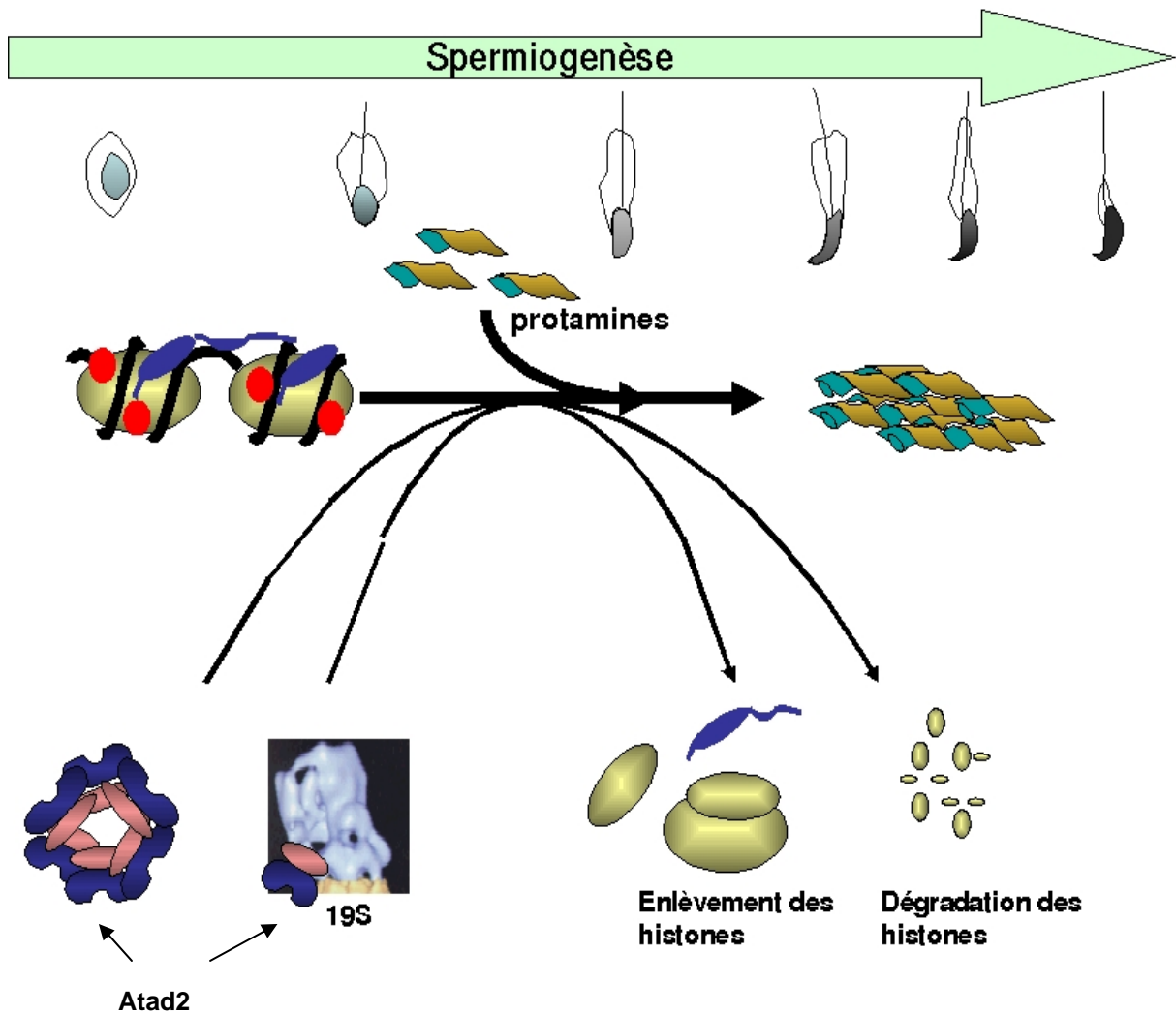


Figure 18 - Hypothèse de travail

Au cours de la spermiogenèse, Atad2 est recruté sur la chromatine acétylée et apporte ainsi:

- soit une activité chaperonne qui va permettre le dépliement des histones et leur enlèvement,
- soit une activité protéolytique via une interaction avec le protéasome. Les histones ciblées sont directement dégradées.

Dans les deux hypothèses, la disparition des histones incorporées à la chromatine permet d'introduire l'étape suivante, c'est à dire l'incorporation des protéines de transition et des protamines.

B. Caractérisation d'Atad2

1. Expression dans les tissus murins et localisation cellulaire

Les banques de données bioinformatiques présentent deux formes d'Atad2 chez la souris, issues d'un épissage alternatif. Outre leur différence de taille, ces deux formes varient au niveau des premiers acides aminés N-terminaux de la forme courte :

```
mAtad2 longue      MVVLRSSLELHSRSTTSSATDSLDSSEFLSLQDSGRRPRLRRAGRKST
mAtad2 courte     -----
                   ASKAAGDGFVTKGAETYHNTRSLRSLRNQAQTESSSESSFDKNVDRTEKYS
                   -----
                   NGRHFTRQFARQQADKKKEECKEDKVIPVIRSLRNRNIAPTAEHLHEQSGD
                   -----
                   VEVRRSCRIRSRYSTMNQSVLFDKLI TNTAEAVLQKMDDMKMRRQRMKK
                   -----
                   LEDLGVFNETEESNL TMYTRGK LKAI QRADEETTDN QDGSVESSEEGEEQ
                   -----
                   EDDEDEEEGEEEDNQKRYL RQRKTTVYYQSPLESKPRHQKPNMFYSGPA
                   -----
                   SPARPRFRLSSTGPRSPYCKRMSFRRHAIHSSDSTSSSSSEDDCFERRTK
                   -----MSLLKMRRHAIHSSDSTSSSSSEDDCFERRTK
                   RNRNRRAINRCLPLNFRKDEIRGIYKDRMKIGASLADVDPMLDTSVRFDS
                   RNRNRRAINRCLPLNFRKDEIRGIYKDRMKIGASLADVDPMLDTSVRFDS
                   VGGLSSHIAALKEMVVFPLLYPEVF EKFKIQPPRGCLFYGPPGTGKTLVA
                   VGGLSSHIAALKEMVVFPLLYPEVF EKFKIQPPRGCLFYGPPGTGKTLVA
                   RALANEC SRGDKRVAFFMRKGADCLSKWVGESERQLRLLFDQAYQMRPAI
                   RALANEC SRGDKRVAFFMRKGADCLSKWVGESERQLRLLFDQAYQMRPAI
                   IFFDEIDGLAPVRSSRQDQIHSSIVSTLLALMDGLDSRGEIVVIGATNRL
                   IFFDEIDGLAPVRSSRQDQIHSSIVSTLLALMDGLDSRGEIVVIGATNRL
                   DSIDPALRRPGRFDREFLFLSLPKNARKEILKIHTRDWNPKPVDMFLEEL
                   DSIDPALRRPGRFDREFLFLSLPKNARKEILKIHTRDWNPKPVDMFLEEL
                   AEHCVGYCGADIKSICAEAAALCALRRRYPQIYTTSEKLQDLSSITISAK
                   AEHCVGYCGADIKSICAEAAALCALRRRYPQIYTTSEKLQDLSSITISAK
                   DFEAALQKIRPASQRAVTS PGQALS AIVKPLLQNTVHRILDALQKVFPVH
                   DFEAALQKIRPASQRAVTS PGQALS AIVKPLLQNTVHRILDALQKVFPVH
                   EVGTNKS LNSDVSCPFL ESDLAYSDDDTPSVYENGLSQKENLNFHLNRN
                   EVGTNKS LNSDVSCPFL ESDLAYSDDDTPSVYENGLSQKENLNFHLNRN
                   ACYQPMSFRPRL LIVGEPGF GQSSHLAPAVIHALEKFTVYTLDIPVLFGI
                   ACYQPMSFRPRL LIVGEPGF GQSSHLAPAVIHALEKFTVYTLDIPVLFGI
                   STTSPEEACSQMIREAKRTAP SIVYVPHIHLWWEIVGPTLKATFTTLLQT
                   STTSPEEACSQMIREAKRTAP SIVYVPHIHLWWEIVGPTLKATFTTLLQT
```

```

IPSFAPVLLLATSEKPYSALPEEVQELFTHDYGEIFNVQLPDKEERTKFF
IPSFAPVLLLATSEKPYSALPEEVQELFTHDYGEIFNVQLPDKEERTKFF
EDLILKQASKPPVSQKKAVLQALEVLPVAPPPEPRPLTAEVVKRLEEQEE
EDLILKQASKPPVSQKKAVLQALEVLPVAPPPEPRPLTAEVVKRLEEQEE
DTFRELRIFLRNVTHRLAIDKRFRVFTKPVDPEVDPDYVTVIKQPMDLSS
DTFRELRIFLRNVTHRLAIDKRFRVFTKPVDPEVDPDYVTVIKQPMDLSS
VISKIDLHKYLTVKDYLKDIDLICSNALEYNPDRDPGDRLIRHRACALRD
VISKIDLHKYLTVKDYLKDIDLICSNALEYNPDRDPGDRLIRHRACALRD
TAYAIIKEELDEDFEQLCEEIQESRKKKRGCSSSKYAPSYHVMPKQNSPP
TAYAIIKEELDEDFEQLCEEIQESRKKKRGCSSSKYAPSYHVMPKQNSPP
VGDKKPDQEONEKLVKVPCTPVACSTPAQLKRRKFHKKSKWHVGTIKRRKI
VGDKKPDQEONEKLVKVPCTPVACSTPAQLKRRKFHKKSKWHVGTIKRRKI
SQAKDNSLNAMESSSRSDTEDSQHTHAEHTEPGNTDESSVEESDKQNRLE
SQAKDNSLNAMESSSRSDTEDSQHTHAEHTEPGNTDESSVEESDKQNRLE
SNIDLKNNSSSSNIENELEEPKETTEGTELKDRIVCRGDASASQVTDIP
SNIDLKNNSSSSNIENELEEPKETTEGTELKDRIVCRGDASASQVTDIP
EDSEKEMDFLRMTLARGSQVEQQELISMEQALAILSQPTPSLVLDHKQL
EDSEKEMDFLRMTLARGSQVEQQELISMEQALAILSQPTPSLVLDHKQL
TNILKTVVKKSQKYNIFQLENLYAVISQCIYEHRRDYDKTALVQKMEQAV
TNILKTVVKKSQKYNIFQLENLYAVISQCIYEHRRDYDKTALVQKMEQAV
ENFNCSRS1
ENFNCSRS1

```

Pour vérifier l'existence réelle des deux formes d'Atad2, des premières expériences de RT-PCR ont d'abord été menées. Pour cela des amorces spécifiques à chaque forme ont été utilisées (pour plus de détails, voir la publication jointe en dernière partie du chapitre), criblant des banques d'ADN issues de différents tissus murins (Figure 19A).

Ces premiers tests ont permis tout d'abord de vérifier l'existence des deux formes d'Atad2. De plus, leur expression varie fortement.

L'ARN de la forme longue, qui possède 300 acides aminés supplémentaires en partie N-terminale, est faiblement représenté dans plusieurs tissus, et est surexprimé dans les testicules.

L'ARN de la forme courte n'est quant à lui retrouvé que dans les tissus testiculaires.

Pour vérifier les expressions des protéines Atad2 dans les différents tissus, un anticorps anti-Atad2 dirigé contre la partie N-terminale commune aux deux formes a été synthétisé et purifié. Celui-ci a ensuite été utilisé en western blot sur des extraits protéiques des différents tissus murins (Figure 19B).

Le western blot montre une faible expression de la forme longue (d'une taille correspondant à environ 180 KDa) dans les poumons, le foie, le cerveau ainsi qu'une très forte expression au niveau des tissus testiculaires.

La forme courte n'est quant à elle détectée que dans les tissus testiculaires, conformément à ce qui a été montré par les RT-PCR.

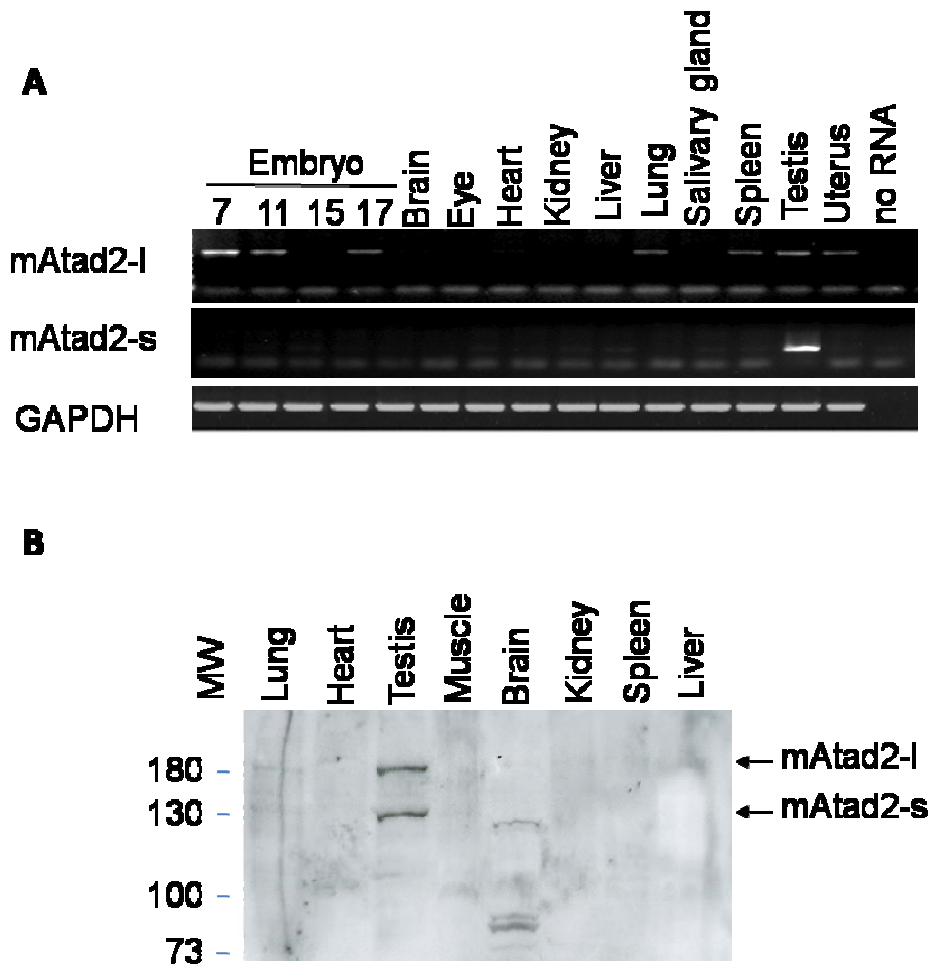


Figure 19- Expression des différentes formes d'Atad2 chez la souris

A) Analyse par RT-PCR sur des banques d'ARN de différents tissus murins. Pour cette expérience des amorces spécifiques à chaque forme d'Atad2 ont été utilisées.

B) Analyse par Western-blot de différents tissus murins. Pour cette expérience, un anticorps dirigés contre les deux formes d'Atad2 a été utilisé.

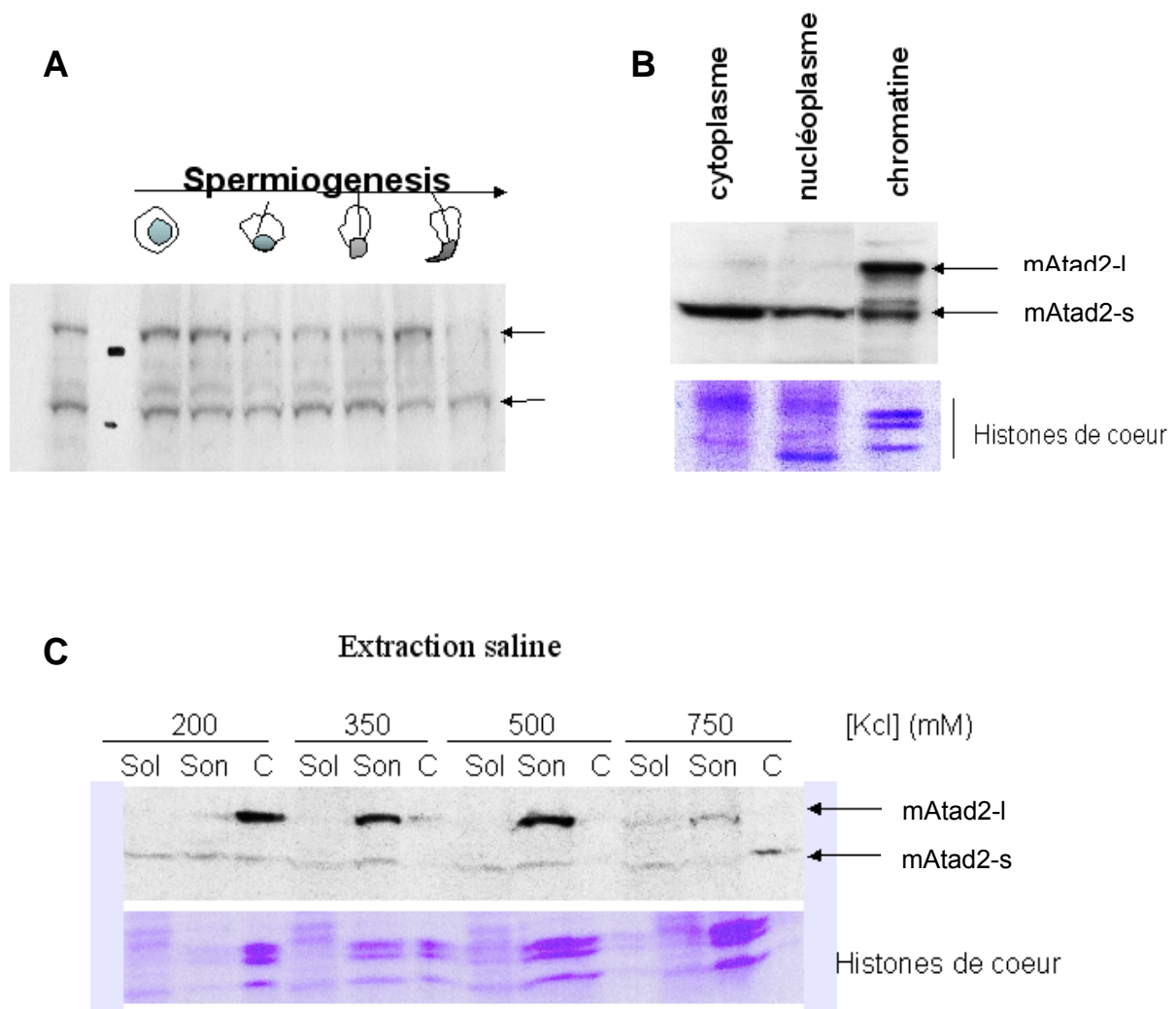


Figure 20 - Expression d'Atad2 au cours de la spermiogénèse et localisation cellulaire

A) Analyse par Western-blot de spermatides à différentes étapes de la spermiogénèse.

B/C) Analyse de la localisation cellulaire des deux formes d'Atad2 sur des extraits testiculaires. Le western blot B) montre la population cytoplasmique, la population nucléosoluble et celle attachée à la chromatine. Le western blot C) montre les résultats d'une extraction saline sur des noyaux testiculaires. La fraction soluble (sol) est d'abord extraite puis le culot insoluble est soniqué pour extraire les zones de chromatine lâche (son) et le culot de chromatine compacte est ensuite dénaturé et soniqué (C).

Des gamètes mâles à différentes étapes de maturation ont été extraits et purifiés par sédimentation à partir de testicules murins. L'anticorps anti Atad2 a ensuite été utilisé en western blot sur les extraits protéiques de ces populations de gamètes (Figure 20 - Expression d'Atad2 au cours de la spermiogenèse et localisation cellulaire A).

Les résultats de cette expérience montrent que contrairement à une grande majorité des protéines testiculaires, les deux formes d'Atad2 peuvent être détectées jusqu'à des stades tardifs de la spermatogenèse.

Outre leurs différences de profil d'expression, les deux formes ont un comportement différent au niveau subcellulaire. En utilisant à nouveau des extraits protéiques de testicules, une analyse par western blot montre que la forme longue est strictement nucléaire et qu'elle présente une forte affinité avec la chromatine. Une extraction à forte salinité n'est pas suffisante pour la séparer de la fraction chromatinienne. La forme courte a une localisation nucléaire mais aussi cytoplasmique (B).

L'affinité des deux formes d'Atad2 pour la chromatine a ensuite été testée par des expériences d'extraction saline (C). Les noyaux des cellules testiculaires ont été isolés et purifiés. La partie nucléo-soluble a été récupérée à des taux salins variables. La chromatine la moins condensée a ensuite été séparée de la chromatine la plus compacte par sonication et centrifugation. Un western blot anti Atad2 sur ces différents extraits montre que la forme courte est plus labile que la longue, celle-ci restant très liée à la chromatine.

Ce comportement différent peut être expliqué par la différence de taille des protéines et

par la nature de la séquence supplémentaire que possède la forme longue, ainsi que par des partenaires différents.

2. Recrutement d'Atad2 sur la chromatine acétylée

a) Fonctionnalité du bromodomaine

Il a été vu dans l'introduction que les bromodomains sont capables de lier les lysines acétylées des histones, notamment de l'histone H4. Atad2 possédant un motif bromodomaine dans sa séquence peptidique, la fonctionnalité de celui-ci a été vérifiée en testant sa capacité à se lier à ces lysines.

Pour cela, différentes constructions mutées d'Atad2 ont été taguées et utilisées en expression transitoire dans des cellules COS. Les protéines chimériques ainsi surexprimées ont ensuite été immunoprécipitées des extraits cellulaires totaux, en présence ou non de TSA (Trichostatin A), connue pour inhiber les facteurs HDAC et donc maintenir l'état d'acétylation des histones pendant la durée de l'immuno-précipitation. L'immuno-précipitat passé sur gel poly-acrylamide et traité à l'argent montre qu'Atad2 interagit avec la chromatine quand l'état d'acétylation de celle-ci est maintenu par addition de TSA (Figure 21A). Si son bromodomaine est altéré, la chromatine, même acétylée, n'est plus co-précipitée avec Atad2. Cela est montré par le même test d'immunoprécipitation que précédemment, mais cette fois avec une construction d'Atad2 où une mutation ponctuelle a été effectuée sur un résidu conservé.

Le bromodomaine d'Atad2 permet bien une reconnaissance spécifique à la chromatine acétylée. Ce fait est confirmé sur la protéine endogène par un test de pull-down utilisant un peptide mimant la queue N-terminale de l'histone H4 et des extraits testiculaires (B).

En effet, la forme courte endogène nucléo-soluble n'est détectée en western blot que sur la plage correspondant au pull down utilisant le peptide H4 acétylé.

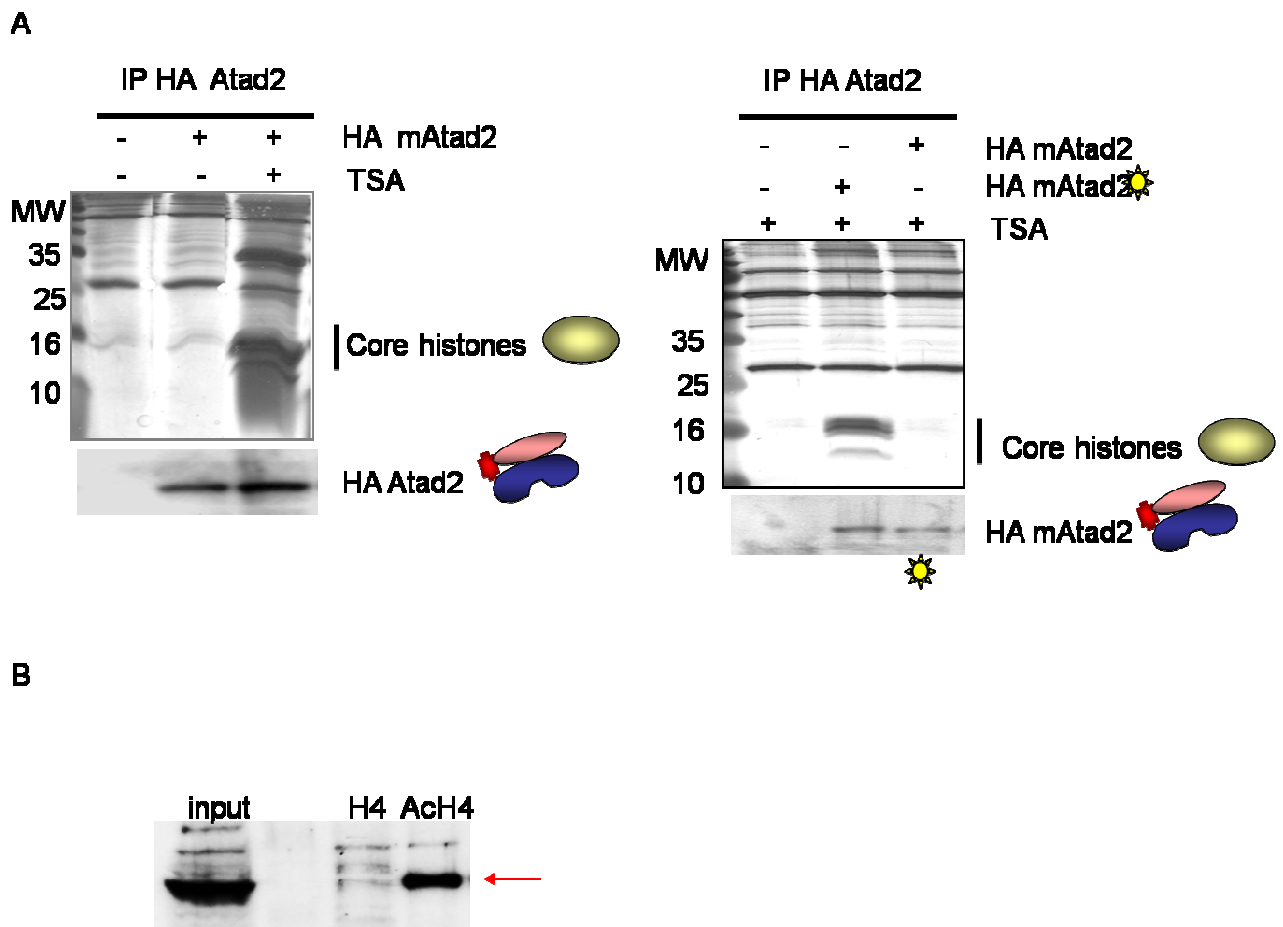


Figure 21 - Affinité d'Atad2 avec la chromatine acétylée

A) Révélation à l'argent sur des immunoprécipitations d'HA-Atad2 surexprimée dans des cellules COS. Un traitement à la Trichostatine A (TSA) a été ajouté pour induire l'hyperacétylation des histones. Une seconde construction d'Atad2 a été utilisée (étoile jaune). Elle a été mutée sur un acide aminé conservé dans le motif du bromodomaine et connu pour altérer ses propriétés d'affinité avec les histones acétylées.

B) Western blot sur un test de pull-down. Les peptides utilisés miment la queue N-terminale de l'histone H4, sans acétylation ou tétra-acétylée. L'extrait utilisé est testiculaire.

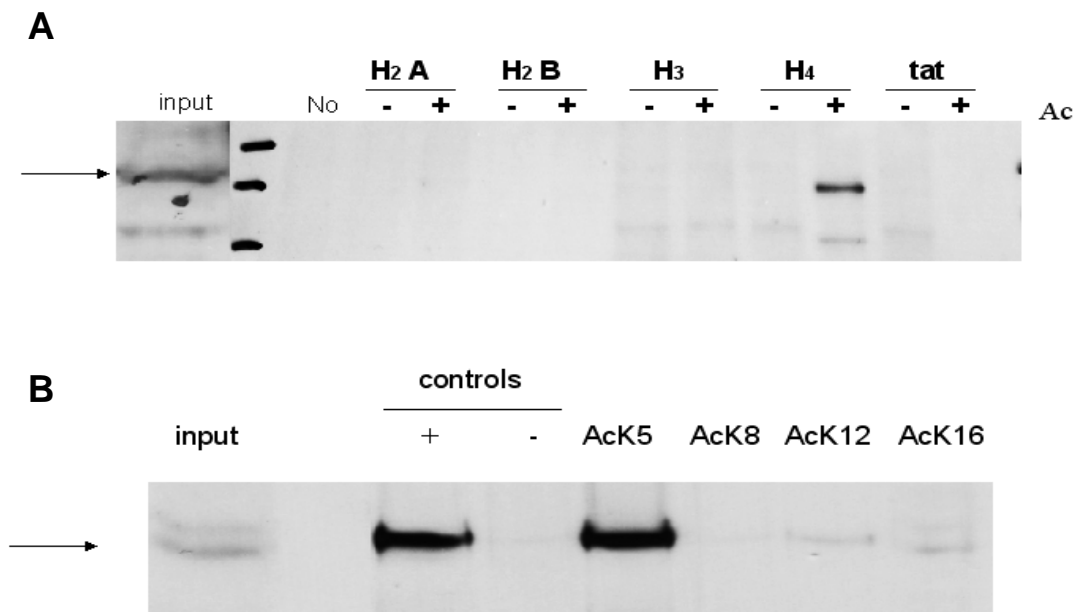


Figure 22 - Affinité d'Atad2 pour l'histone H4 acétylée

A) Un extrait nucléaire soluble est incubé avec des peptides mimant les queues N-terminales des histones H2A, H2B, H3 et H4 non acétylées ou acétylées ainsi qu'avec un contrôle négatif (tat) couplés à des billes d'agarose.

B) Un extrait nucléaire soluble est incubé avec des peptides mimant la queue N-terminales de l'histone tétra-acétylée (contrôle +) ou mono-acétylée sur les lysines 5, 8, 12 ou 16.

b) Reconnaissance spécifique du bromodomaine d'Atad2

Il a été montré en introduction que les bromodomains ont des affinités spécifiques avec certaines histones acétylées et notamment avec des résidus lysine différents. Ces affinités changent selon le bromodomaine concerné et la structure de la protéine à laquelle il appartient.

Pour connaître quelle est la caractéristique du bromodomaine d'Atad2 en termes d'affinité à la chromatine, des tests de pull-down ont été réalisés. Tout d'abord des extraits nucléaires solubles contenant la forme courte endogène d'Atad2 ont été incubés avec des peptides biotinylés mimant les queues N-Terminales des différentes histones canoniques. Ceux-ci ont été récupérés sur des billes de streptavidine agarose. Le pull-down résultant passé sur gel poly-acrylamide et traité en western blot anti Atad2, montre qu'Atad2 reconnaît de façon spécifique l'histone H4 quand celle-ci est acétylée (Figure 22 A). Des expériences plus poussées montrent que c'est l'acétylation de la Lysine K5 qui est en grande majorité responsable de cette reconnaissance (B).

Au cours de la spermiogenèse, l'acétylation de l'histone H4, et notamment sur la lysine 5 est l'une des plus importantes modifications du pattern épigénétique apposé sur les histones (Govin *et al.*, 2007). Le fait qu'Atad2 soit présent au même endroit, au même moment et reconnaisse cette modification particulière est un argument fort en faveur de son implication dans le processus de remodelage qui suit l'hyperacétylation des histones.

Pendant la caractérisation de l'affinité d'Atad2 avec la chromatine acétylée, il est apparu que la partie contenant le domaine AAA, si elle n'est pas responsable de la liaison à la chromatine, est un moyen de régulation. Un test de pull down utilisant le peptide H4 acétylé montre que l'altération du domaine AAA altère aussi l'interaction d'Atad2 avec H4 (Figure 27).

La découverte de cette caractéristique, qui sera approfondie un peu plus loin, a mené à l'hypothèse d'une activation d'Atad2 via son domaine AAA. D'après les connaissances assemblées sur les autres membres de la superfamille AAA+, l'hypothèse de base a été une régulation des propriétés d'Atad2 via ses changements conformationnels, notamment via de potentielles multimérisations.

3. Etude du domaine AAA+ d'Atad2

Il a été vu dans l'introduction que les domaines AAA+ sont généralement responsables de la multimérisation des protéines qui les possèdent. En effet, la plupart d'entre elles forment des anneaux hexamériques ou heptamériques, correspondant à leur état activé. Pour certains facteurs comme par exemple VCP, le multimère est un mono-hexamère. Pour d'autres facteurs, tels les Rpt, le multimère est un anneau d'hétéro-hexamères constitué des 6 membres de la classe Rpt.

Comme Atad2 possède lui aussi le domaine AAA et que de plus il a une séquence proche des Rpt, deux hypothèses ont été vérifiées :

- Soit Atad2 peut s'insérer au sein de l'anneau Rpt grâce à son domaine AAA. Dans

ce cas, il pourrait alors être impliqué dans les fonctions non catalytiques des membres de l'APIS, ou pourrait interagir avec le protéasome complet en entrant au sein d'un des couvercles de la partie centrale.

- Soit Atad2 n'interagit pas avec les Rpt mais est capable de former un multimère indépendant ayant sa fonction propre.

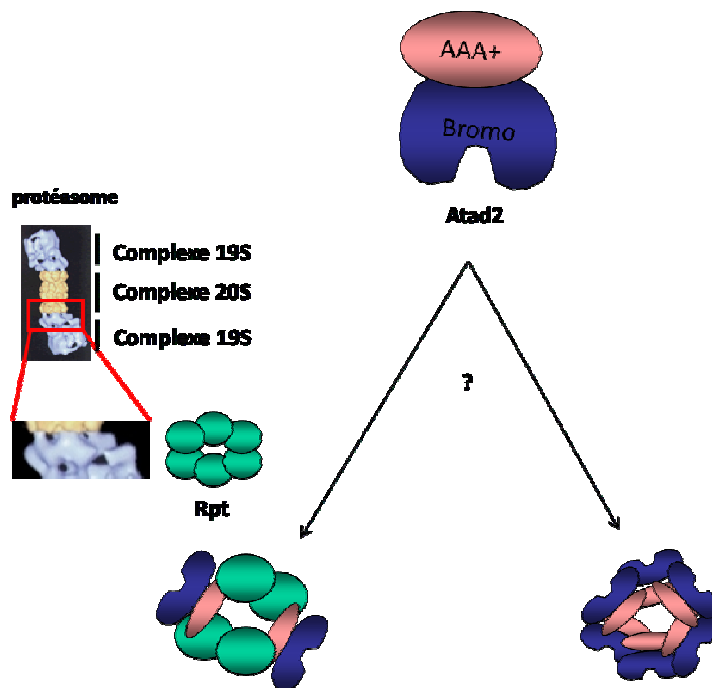


Schéma 1 – Hypothèses de comportement d'Atad2

Via son domaine AAA, Atad2 aura-t-il une affinité avec les Rpt, composant du protéasome? Ou adoptera-t-il une structure multimérique ?

a) Atad2 partenaire du protéasome ?

La séquence AAA d'Atad2 est proche de celle des Rpt de la particule 19S du protéasome,

notamment de Rpt3. Ces protéines forment un hexamère qui sera à l'interface de la particule 20S. L'hypothèse qui a conduit à la rédaction de ce chapitre est que les domaines AAA d'Atad2 et des Rpt sont suffisamment proches pour permettre une interaction. De plus, les Rpt semblent impliquées dans la régulation de l'activité chromatinienne ou son remodelage (voir le chapitre de l'introduction dédié au Rpt)

(1) Etude *in vitro* et *ex vivo* de l'interaction d'Atad2 avec les Rpt

Pour rechercher une éventuelle interaction entre Atad2 et les Rpt des premiers tests ont été initiés par pull-down en utilisant une construction composée du domaine AAA d'Atad2 fusionné à la GST à des billes de sépharose. La Figure 23 (A) montre que des extraits de Rpt synthétisés *in vitro* sont retenus par Atad2. En effet, quand le domaine AAA d'Atad2 est présent, certaines protéines Rpt (Rpt 2, 3, 4 et 6) sont capables d'interagir avec Atad2 de façon individuelle, ce qui pourrait permettre une interaction d'Atad2 avec l'APIS complet.

Ces résultats sont confirmés par des expériences de co-immunoprécipitation de constructions d'Atad2 et des différentes Rpt taguées et exprimées de façon ectopique dans des cellules COS (B). Sur cette figure, *Flag* Rpt1 et *Flag* Rpt3 sont co-immunoprécipitées avec une construction d'Atad2 pourvue de son domaine AAA, mais ne le sont pas quand celui-ci est délété.

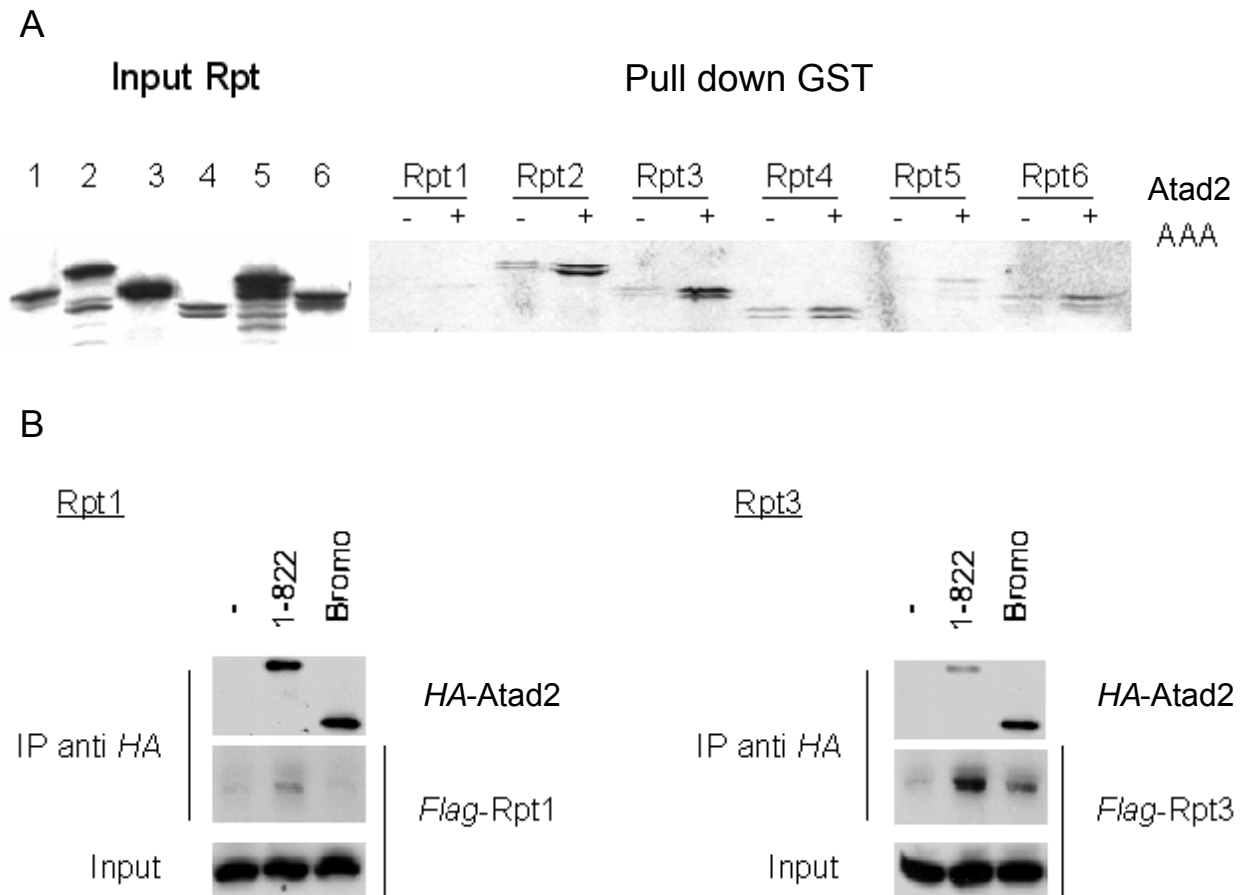


Figure 23 - Interaction in vitro et ex vivo d'Atad2 et des Rpt

A) Des billes d'agarose sont couplées au domaine AAA d'Atad2 par un tag GST. Elles sont ensuite incubées avec des constructions *Flag-Rpt1* à 6 synthétisées in vitro.

B) Les constructions *HA-Atad2* 1-822 et Bromo sont surexprimées dans des cellules COS avec les constructions *Flag-Rpt1* et 3. Après immunoprécipitation anti *HA*, les Rpt sont détectées par western blot anti-*flag*. Rpt1 et Rpt3 sont co-immunoprécipitées avec Atad2 quand son domaine AAA est présent.

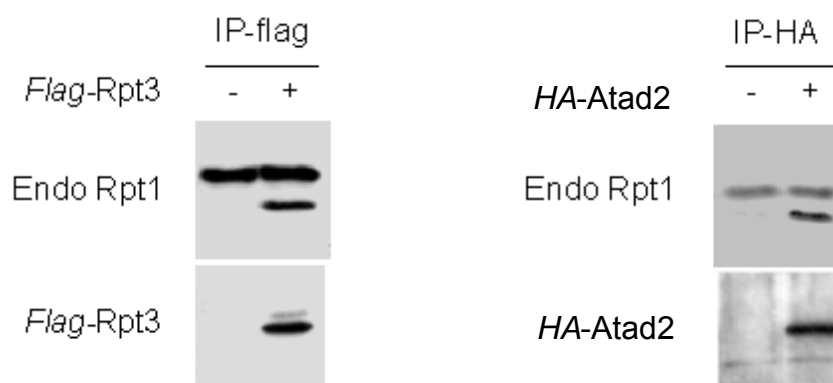


Figure 24 - Interaction d'HA Atad2 et des Rpt endogènes

Les constructions *HA-Atad2* et *Flag-Rpt3* sont surexprimées dans des cellules COS. Après immunoprécipitation anti *HA* ou *Flag*, Rpt1 endogène est détecté par western blot.

(2) Etude des interactions endogènes

Pour approfondir l'analyse de la liaison effective entre Atad2 et les Rpt d'autres tests complémentaires ont été effectués. Des extraits testiculaires nucléo-solubles ont été fractionnés par ultracentrifugation sur gradients glycérol puis les complexes liant la chromatine acétylée ont été purifiés avec un pull-down d'H4 acétylée agarose. La Figure 27 (B) montre les deux populations d'Atad2 après ultracentrifugation puis la population multimérique / complexée retenue sur les billes. De même les populations de Rpt1 sont étalées tout au long du tube d'ultracentrifugation, et les complexes les plus lourds sont retenus sur les billes de pull-down. Celui-ci met en évidence un chevauchement d'Atad2 et des Rpt, c'est à dire qu'ils sont présents dans des complexes de tailles proches et retenus par les billes du pull-down.

Cette similarité de comportement d'Atad2 et des Rpt n'étant pas suffisante pour conclure à une interaction, une autre approche a été mise en place. Des cellules COS ont été transfectées avec une construction HA Atad2 sauvage (ou avec le contrôle positif Flag Rpt3) de sorte de surexprimer la protéine taguée. Celle-ci a été immunoprécipitée. L'immuno-précipitat obtenu a ensuite été passé sur gel de poly-acrylamide pour une détection en western blot avec les anticorps de contrôle anti HA (Atad2) ou anti Flag (Rpt3) et l'anticorps anti Rpt1 pour détecter la protéine endogène. L'interaction d'Atad2 avec une faible quantité de Rpt1 a ainsi pu être mise en évidence (Figure 24 - Interaction d'HA Atad2 et des Rpt endogènes).

Des tests de détection d'autres composants des particules 19S et 20S du protéasome

après immunoprécipitation d'Atad2 n'ont pas été concluants, soit car il n'existe pas de telles interactions, soit car les anticorps utilisés ont un seuil de détection trop élevé.

La liaison entre Atad2 et les Rpt, établie avec la protéine Rpt1, permettrait le recrutement sur la chromatine acétylée

- soit de l'anneau Rpt seul, apportant alors une machinerie d'hydrolyse de l'ATP et de dépliement,
- soit de la particule 19S complète, apportant en plus d'autres facteurs de reconnaissance et formant le début d'une plateforme complexe ancrée sur la chromatine,
- soit enfin le protéasome complet, apportant directement une activité protéolytique au niveau des histones à disparaître.

Les résultats de l'interaction endogène des Rpt avec Atad2 sont à moduler. En effet, jusqu'à présent seule l'interaction avec Rpt1 a pu être mise clairement en évidence. De plus, cette interaction implique une quantité extrêmement faible de Rpt1. L'analyse de cette interaction est rendue difficile par un problème de seuil de détection de l'anticorps anti Rpt1.

De ce fait, la seconde hypothèse, c'est-à-dire de sa multimérisation a été largement étudiée.

b) Forme multimérique d'Atad2

(1) *Existence du multimère d'Atad2*

La plupart des membres de la famille des AAA ont la capacité de former des oligomères, formes sous lesquelles elles sont actives (voir le chapitre C de l'introduction).

Pour vérifier que le domaine AAA d'Atad2 adopte les mêmes caractéristiques, il a été effectué une étude de sa capacité de multimérisation. Pour cela, il a d'abord été fait des tests GST-pull-down pour voir si Atad2 peut interagir avec lui-même, et par quel(s) domaine(s). Ces tests consistent à produire en bactéries le domaine AAA-ATPase d'Atad2 fusionné avec la Glutathion-S-transférase (GST). Cette protéine est retenue sur des billes de glutathion-agarose qui sont ensuite incubées avec différentes constructions d'Atad2 traduites in vitro. Les premiers résultats ont montré que le domaine AAA permet une multimérisation (Figure 25A).

Des expériences de co-immunoprécipitation sur des extraits de cellules COS surexprimant différentes constructions d'Atad2 ont ensuite été initiées pour confirmer les tests GST. La Figure 25 B montre un western blot permettant de détecter une co-immunoprécipitation des mutants Atad2 contenant les deux domaines (1-822) ou délétés du domaine AAA (292-822) avec une construction native. Ici seul le mutant contenant le domaine AAA est co-immunoprécipité.

L'ensemble de ces expériences a mis en évidence la capacité du domaine AAATPase à interagir avec lui-même, et donc une possibilité pour la protéine de se multimériser (B).

Pour vérifier l'existence de complexes multimériques d'Atad2 des électrophorèses en gel natif de la protéine Atad2 recombinante ont ensuite été effectuées (C). La protéine recombinante purifiée a été détectée à un niveau de haut poids moléculaire. Elle se présente ici sous une forme multimérisée, formant une structure de plus de 700 Kda. Cela montre que le multimère est formé de six membres ou plus. Pour vérifier le nombre de sous-unités d'Atad2 par multimère, la protéine recombinante a de nouveau été utilisée. Purifiée, celle-ci a été passée sur une colonne de gel filtration, calibrée au préalable avec des marqueurs de poids moléculaire: la Figure 25 D montre qu'Atad2 est présente dans deux pics, l'un correspondant au monomère (environ 120 KDa), et l'autre à un multimère formé de 6 ou 7 sous-unités.

Cela correspond aux comportements classiques des membres de la famille AAA, caractérisés généralement par des hexamères et des heptamères.

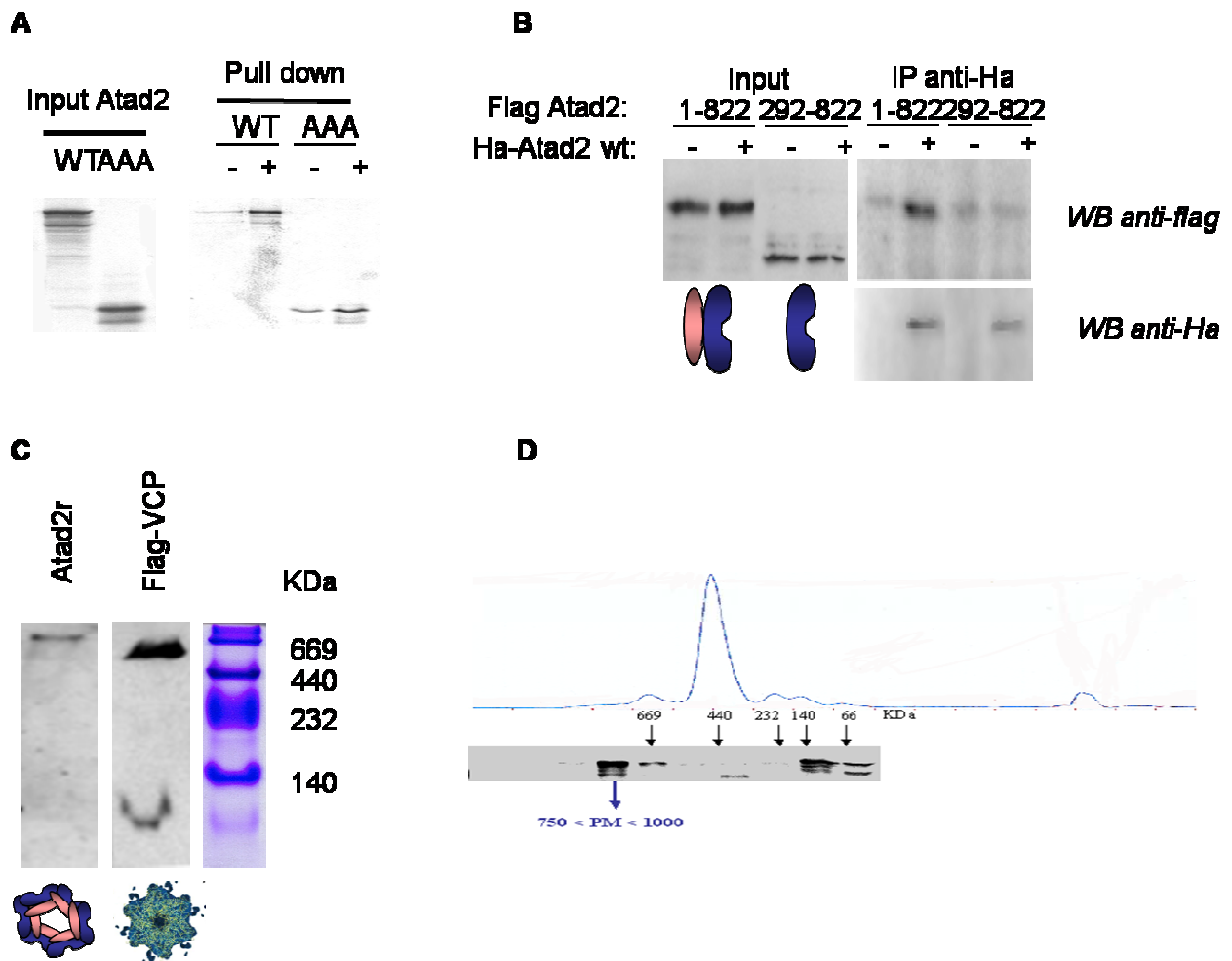


Figure 25 - Multimérisation d'Atad2 via le domaine AAA

A) Des billes d'agarose sont couplées au domaine AAA d'Atad2 par un tag GST. Elles sont ensuite incubées avec Atad2 WT ou son domaine AAA synthétisés in vitro.

B) HA Atad2 surexprimé dans des COS est immunoprécipité en compagnie de constructions contenant le domaine AAA (1-822) ou délété de celui-ci (292-822). Seule la forme contenant le domaine AAA est co-immunoprécipité.

C) La protéine Atad2 recombinante est passée sur gel d'électrophorèse natif. Elle est ici visible sous forme multimérisée. La piste suivante représente le facteur VCP, membre de la famille des AAATPases et capable de se multimériser.

D) La protéine Atad2 recombinante est passée sur colonne de gel filtration. Les fractions recueillies sont passées sur gel argent. Atad2 se répartit sur deux spots de fractions. Le premier correspond à une taille de 100 à 140 KDa, c'est la forme monomérique; le second correspond à une taille de 750 à 1000 KDa, c'est le complexe multimérique d'Atad2. Celui-ci est constitué de 6 ou 7 membres.

**(2) La multimérisation d'Atad2 est dépendante de
l'intégrité de son domaine de reconnaissance de l'ATP**

Depuis plusieurs années, la littérature suggère que la liaison de l'ATP ou son hydrolyse contrôle la conformation des membres de la famille des AAA+ (Vale et al., 2000 ; Hanson et al., 2005). La plupart des enzymes AAA+ passent par un cycle de liaison de l'ATP, son hydrolyse puis le relâchement du produit d'hydrolyse. Suivant cette logique, une altération du domaine de reconnaissance ou d'hydrolyse de l'ATP devrait empêcher Atad2 de s'oligomériser. Cette hypothèse est testée des expériences de co-immunoprécipitation utilisant plusieurs jeux de constructions taguées d'Atad2 (Figure 26 - Multimérisation ATP-dépendante). Pour cela des constructions d'Atad2 taguées HA sont surexprimés de façon transitoire dans des cellules COS, en compagnie d'une construction d'Atad2 marquée d'un autre tag et contenant les deux domaines bromo et AAA (1-822). Les constructions HA correspondent respectivement à la protéine sauvage (FL pour full length), à une construction possédant les deux domaines identifiés d'Atad2 (1-822) ou le domaine AAA muté au niveau d'un résidu impliqué dans la reconnaissance à l'ATP. Les constructions HA sont immunoprécipitées.

Les résultats de cette expérience montrent deux faits :

- Un mutant qui n'est pas capable de reconnaître l'ATP ne peut pas se multimériser.
- En revanche, si de l'ATP non hydrolysable est ajouté dans l'extrait lors de l'immunoprécipitation, la multimérisation est possible.

Cela suggère que la fixation d'ATP est nécessaire à la formation du multimère, mais pas

dans le maintien de cette conformation.

En effet, on peut imaginer ici que le mutant du domaine AAA a été incapable de faire intervenir l'ATP dans l'établissement de sa conformation et est donc resté sous forme monomérique. La construction d'Atad2 ayant un domaine AAA intègre a pu reconnaître l'analogue non hydrolysable de l'ATP pour former le multimère. La seconde hypothèse est qu'Atad2 intègre ait pu avoir accès à de l'ATP endogène avant les extractions cellulaires pratiquées pour les expériences et que le multimère se soit formé dès lors. L'addition d'un analogue non hydrolysable de l'ATP n'a alors eu aucun effet, le multimère restant suffisamment stable pour être observé à la fin de l'expérience.

Cette dernière explication semble la plus probable car le contrôle positif de multimérisation, c'est-à-dire l'utilisation d'une construction ayant un domaine AAA non altéré, est effectuée sans addition d'ATP au cours de l'expérience.

La possibilité d'Atad2 à former des hexamères (ou heptamères) existe donc grâce à la conformation particulière que prend ce facteur quand celui-ci est sous sa forme enzyme-substrat.

Une telle caractéristique permet donc une régulation rapide de la population des Atad2 présents dans les cellules (monomère/multimère) et pourrait de même permettre une régulation de ses activités, notamment sa capacité à lier la chromatine acétylée.

Par rapport à l'hypothèse de l'insertion d'Atad2 au sein de l'APIS via ses interactions avec

les Rpt, l'hypothèse d'une multimérisation indépendante d'Atad2 est beaucoup plus probable. En effet, contrairement aux expériences d'interaction endogène avec les Rpt qui n'impliquaient qu'une très faible quantité de celles-ci, les résultats de multimérisation ont toujours été très reproductibles et montrent qu'une large quantité de la protéine taguée est impliquée dans la multimérisation.

(3) Régulation de l'affinité chromatinienne par la multimérisation

Nous avons ensuite voulu tester si l'état mono ou multimérique d'Atad2 pouvait influencer son activité de liaison à la chromatine. (Figure 27).

La première expérience a été effectuée en utilisant des constructions d'Atad2 taguées HA et exprimées transitoirement dans des cellules COS. Ces constructions sont respectivement :

- La protéine mutée au niveau de son domaine AAA (mtATP), donc incapable de se multimériser,
- La protéine complète et intègre (HA Atad2 FL, contrôle positif),
- La protéine mutée au niveau de son bromodomaine (mtBd), donc incapable de lier les histones acétylées (contrôle négatif).

Les extraits contenant ces protéines ont été incubés avec le peptide mimant la queue N-terminale de l'histone H4 acétylée.

Il est intéressant de noter que la construction contenant un bromodomaine intègre et un domaine altéré (mtATP) présente une affinité avec le peptide très amoindrie (Figure 27 A).

Comme il n'a pas été ajouté d'ATP au cours de l'expérience (qui se fait à 4°C), il est peu probable que ce soit l'activité ATPase elle-même qui est nécessaire à l'interaction d'Atad2 avec la chromatine acétylée. En revanche, l'état multimérique pourrait être impliqué, puisque le mutant mtATP est incapable de se multimériser.

Cette hypothèse est confirmée par l'expérience montrée dans la Figure 27 (B). Un extrait nucléaire soluble de cellules testiculaires est fractionné par ultracentrifugation sur un gradient de densité glycérol. La protéine endogène détectée est présente sous deux formes: monomérique et multimérique/complexée. Chaque fraction subit ensuite un test de pull down utilisant un peptide H4 acétylé. Il est visible sur le western blot de détection anti Atad2 que seule la population multimérique/complexée est retenue sur des billes d'Acétyl-H4 agarose.

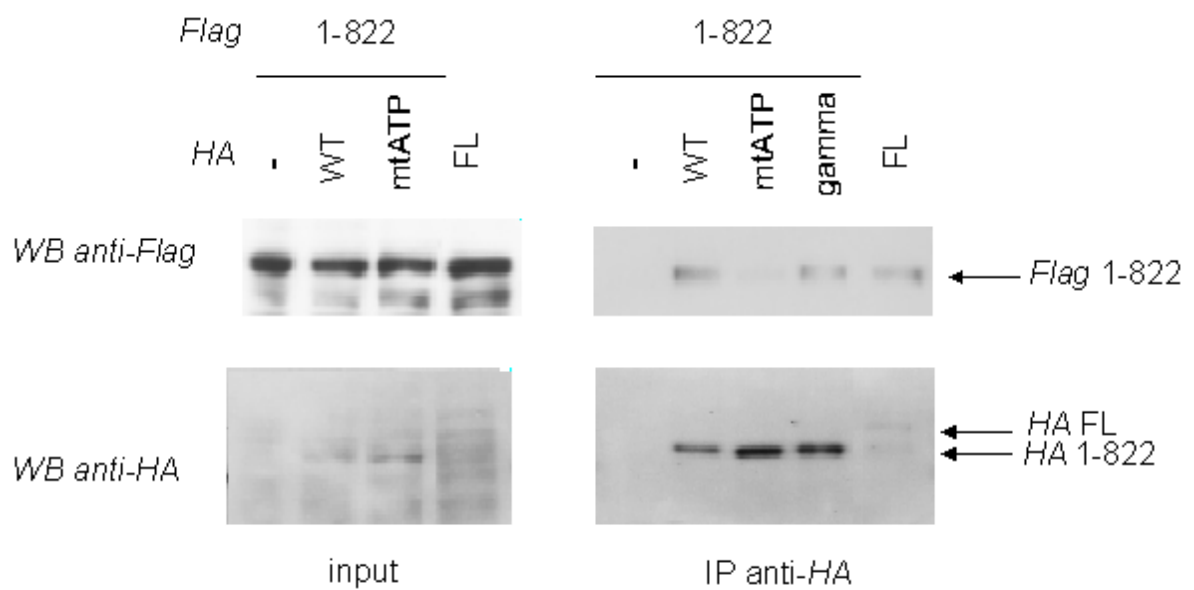


Figure 26 - Multimérisation ATP-dépendante

Une construction *Flag Atad2* (1-822) est surexprimée dans des cellules COS en compagnie de différentes constructions taguée *HA*. Celles-ci (Full length (FL), 1-822 et 1-822mtATP, où le site de reconnaissance à l'ATP du domaine AAA est muté de façon ponctuelle) sont immunoprécipitées en présence ou absence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, l'ATP gamma. *Flag* 1-822 co-immunoprécipité est détecté par western-blot avec les constructions dont le site de reconnaissance de l'ATP est intact.

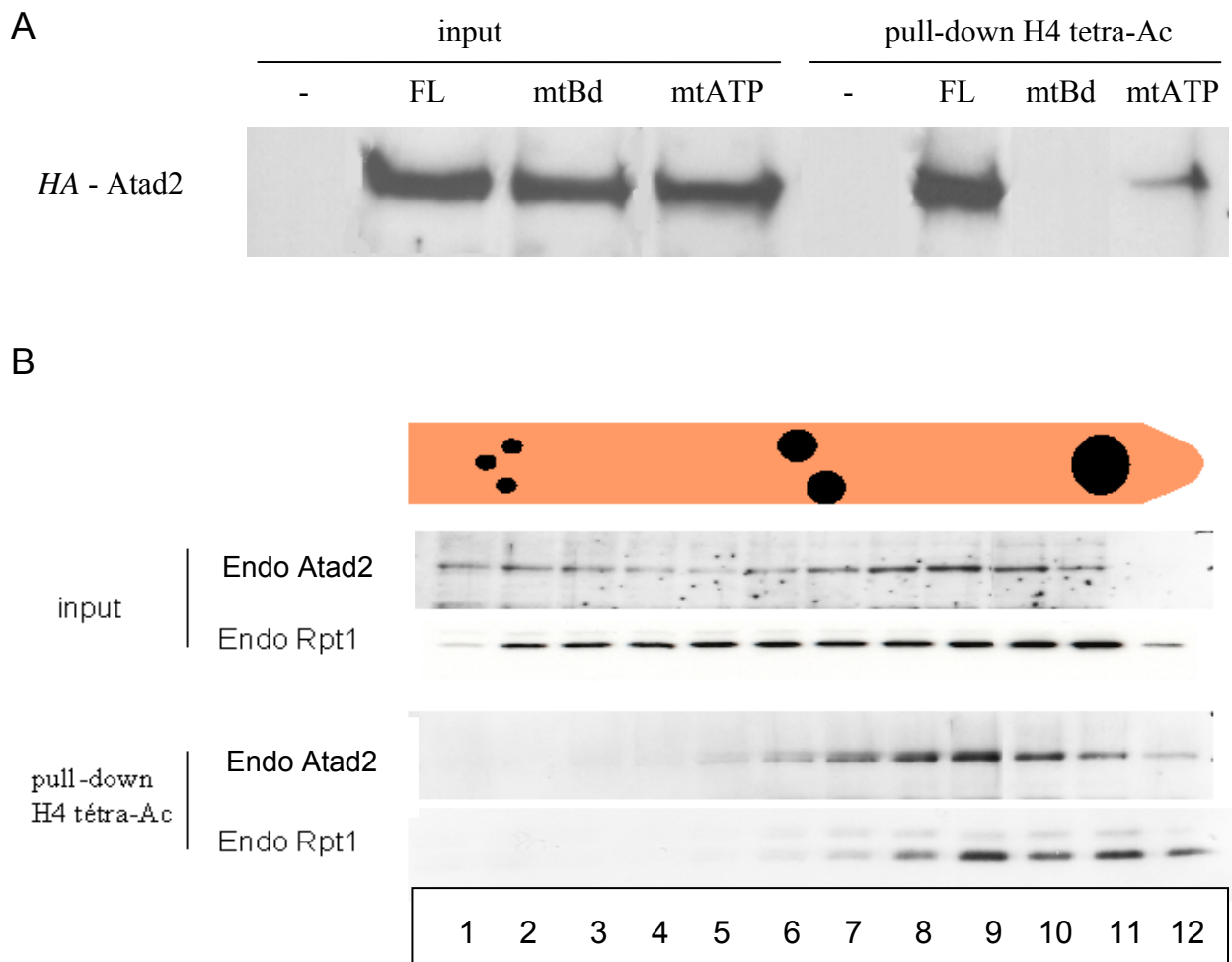


Figure 27 - Régulation de l'affinité à la chromatine acétylée par la multimérisation d'Atad2

- A) Différentes constructions d'Atad2 taguées *HA* sont exprimées de façon ectopique dans des cellules COS. Un pull-down H4 tétra-acétylée est pratiqué sur les extraits cellulaires. Les constructions utilisées représentent la protéine complète, soit native (WT), soit mutée sur son bromodomaine (mtBd) soit sur le domaine AAA (mtATP). Un western-blot anti-*HA* est pratiqué sur le pull-down. Seules les constructions possédant le bromodomaine ainsi que le domaine AAA intact sont retenues sur les billes.
- B) Un extrait nucléaire soluble de testicule est passé sur un gradient de densité glycérol qui permet de séparer les complexes protéiques selon leur taille. Les différentes fractions (input 1 à 12) sont ensuite passées en Ach4 pull down. Un Western-blot anti-Atad2 sur les fractions montre que la protéine est présente sous deux populations différentes. Seule la population correspondant à une forme complexée présente une affinité avec l'histone H4 acétylée. Un western blot anti Rpt1 montre un profil de pull-down similaire.

C. Expression d'Atad2 dans les cellules tumorales, un nouveau venu dans le groupe des "Cancer/Testis Antigens"

Au niveau de l'espèce humaine, des études bioinformatiques suggèrent qu'Atad2, en plus d'être exprimé au niveau des cellules humaines testiculaires, est présent de façon élevée dans des cancers pulmonaires humains (comparaison de banques de cDNA par *Pietroziello et al, 2004*).

La compilation Gene Atlas de l'ensemble des résultats de micro-array utilisant le gène ATAD2 sur différents tissus montre une forte expression dans les lignées de cellules leucémiques et tumorales (Figure 28).

Ces données ont lancé l'étude du profil d'expression d'Atad2 dans diverses lignées cancéreuses tout d'abord, puis chez des patients atteints de tumeurs broncho-pulmonaires.

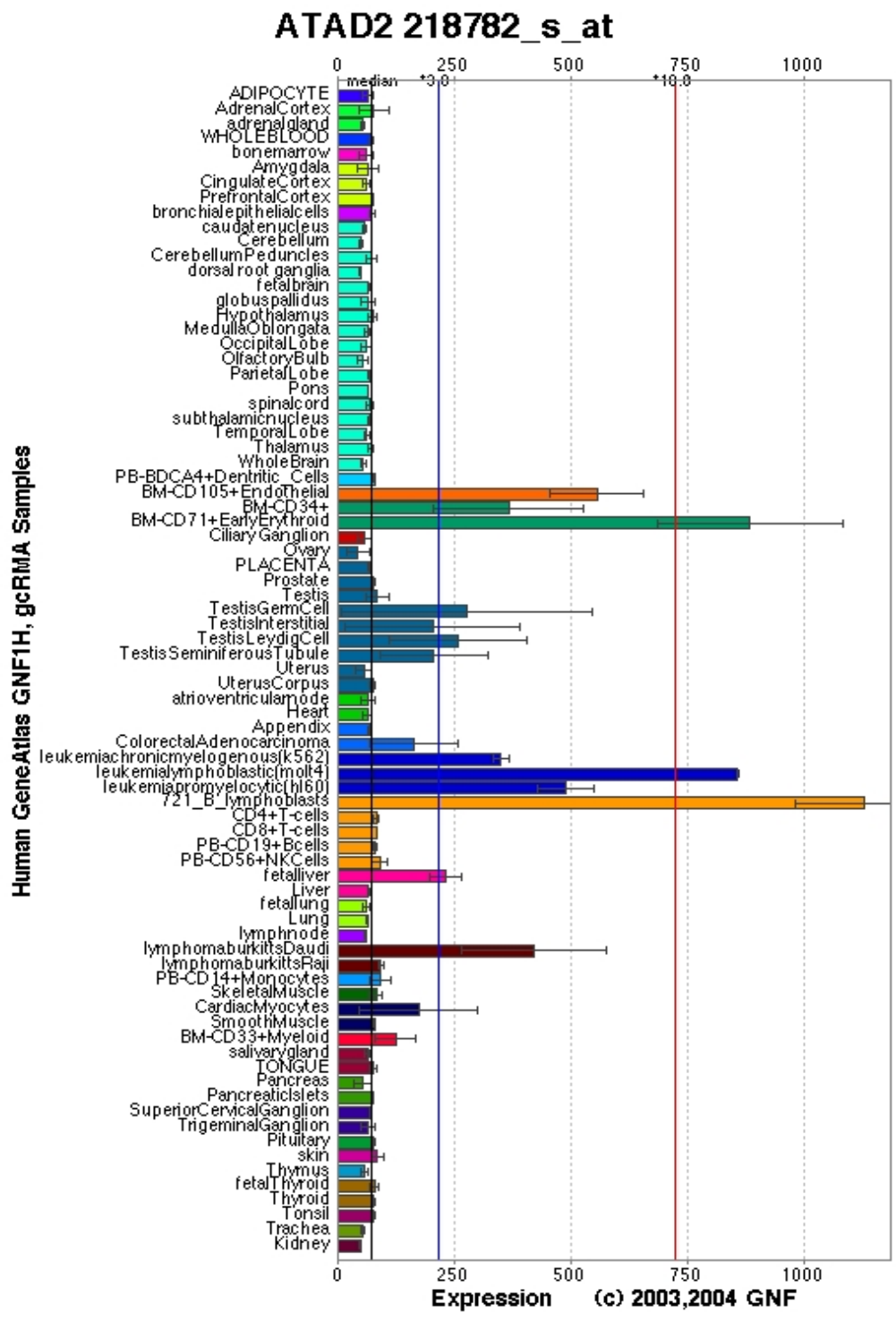


Figure 28 - Expression d'Atad2 humain dans différents types de cellules

Tirée de SymAtlas

L'expression d'Atad2 a d'abord été étudiée grâce à des western blots contre la forme endogène dans des lignées cancéreuses humaines (Figure 29 A). On peut observer sur les différents type de cellules cancéreuses (les Daudi représentant les lymphomes, les Jurkat, Molt et HL60 représentant les leucémies et les lignées A549 et H1299 représentant les cancers du poumon) qu'Atad2 est fortement exprimé.

Ceci suggère soit un rôle ubiquitaire de cette protéine, soit sa participation au processus d'immortalisation des cellules. Ce dernier point est en accord avec des données de la littérature décrivant l'expression illégitime de facteurs spécifiques du testicule dans des cellules tumorales, aussi appelés CT antigènes (*Karpf, 2006 ; Simpson et al., 2005*).

Des travaux effectués au sein de l'équipe montrent de plus que la diminution de l'expression d'Atad2 par RNA interférence dans des lignées dérivées de tumeurs broncho-pulmonaires et de lymphomes entraîne une très forte augmentation de la réponse apoptotique de ces cellules à un stress génotoxique (Travaux effectués par S. Benitski, voir publication jointe à la fin du chapitre). Une expression élevée d'Atad2 semble ainsi protéger les cellules de l'apoptose induite par des lésions de l'ADN, et pourrait donc participer au processus de tumorigenèse.

L'ensemble de ces données a conduit l'équipe, en collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Biologie de la Reproduction/CECOS du CHU de Grenoble, à étendre l'étude de la présence d'Atad2 dans des tumeurs.

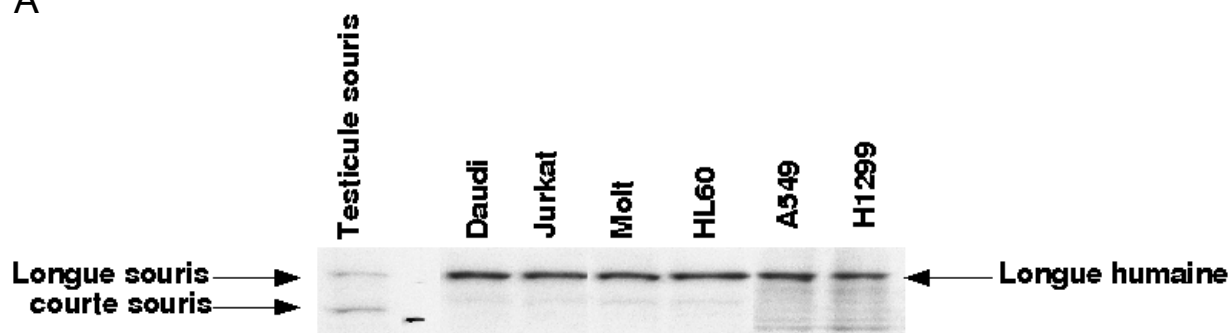
Une expression anormale d'Atad2 a été recherchée par RT-qPCR dans des extraits de

biopsie de patients atteints de tumeurs du poumon fournis par l'unité 576. Ici, 17 biopsies de tissus sains et 35 tissus tumoraux ont servi de base à la RT-qPCR (Figure 29). Les résultats montrent tout d'abord une expression basale dans les cellules saines, en accord avec les données précédentes (voir SymAtlas).

Par contre on peut voir de façon tout à fait significative un pic d'expression dans certains échantillons cancéreux.

Ces résultats, indiquent qu'Atad2 peut être classé dans le groupe des Cancer/Testis Antigènes, ces facteurs testiculaires exprimés dans certains cancers.

A



B

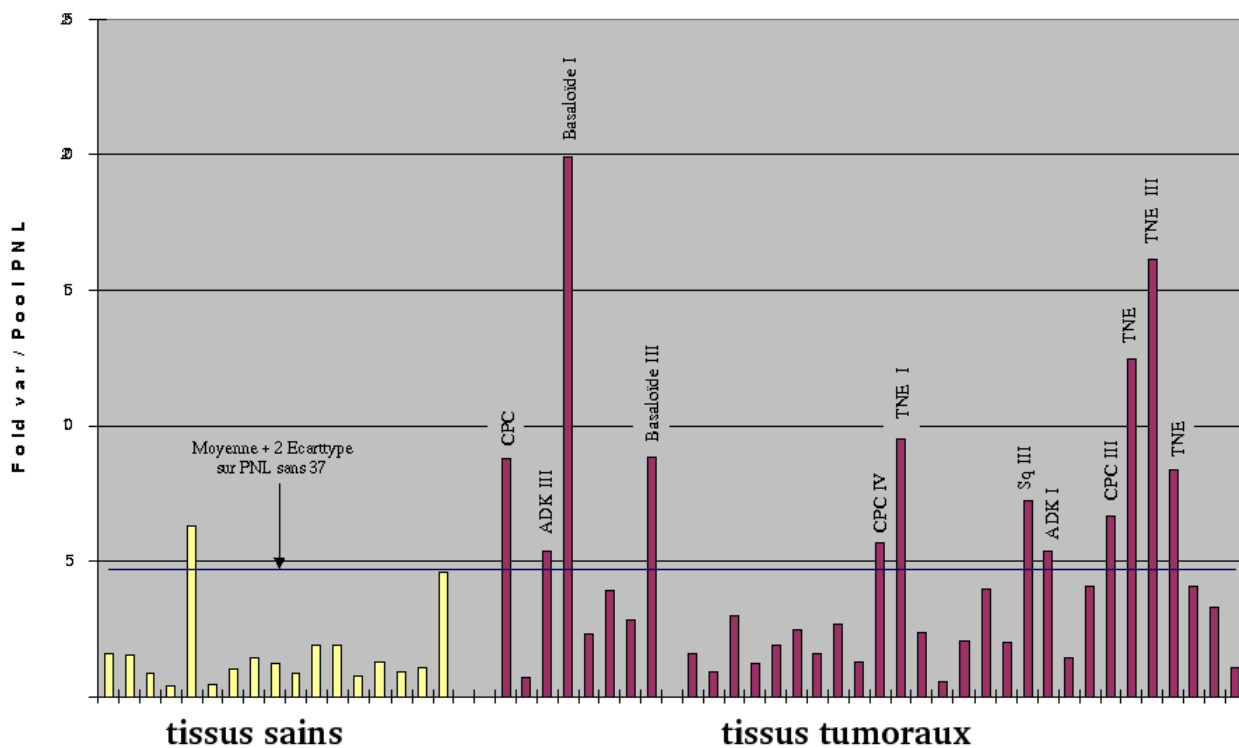


Figure 29 - Expression d'Atad2 dans les tumeurs

A) Expression de la protéine dans des lignées cancéreuses humaines. 20 microgrammes d'extrait totaux ont été déposés dans chaque ligne. L'analyse du taux d'Atad2 a été effectuée par Western blot.

B) Expression d'Atad2 chez des patients atteints de cancer du poumon. RT-qPCR effectuées sur des ARNm issus de tissus pulmonaires de sujets sains ou de patients atteints de cancers de divers stades.

D. Résultats soumis en publication

Une partie des travaux montrés dans les paragraphes précédents ainsi que des travaux effectués par d'autres membres de l'équipe ont donné lieu à une publication soumise actuellement à *Mol. Cell. Biol.*, jointe ci-dessous.

Ce chapitre a pour objet de résumer brièvement les tests décrits dans la publication.

1. Influence sur la rapidité de turn-over de H2A

L'hypothèse de l'implication d'Atad2 dans l'activité transcriptionnelle par son influence sur le remodelage chromatinien a été investiguée par des expériences de FRAP. Les histones, représentées par H2A observée dans cette expérience, montrent un turn-over variable sur la chromatine selon que le facteur Atad2 soit présent ou délété dans les cellules.

Il a pu être mis en évidence que la présence d'Atad2 a une influence sur la dynamique d'incorporation et de libération de H2A de la chromatine. En effet, la diminution d'Atad2 accélère cette dynamique. L'effet stabilisant d'Atad2 sur les histones incorporées peut être dû à une activité chaperonne impliquant son domaine AAA.

2. Influence sur l'activité transcriptionnelle de certains gènes

Une observation de l'activité transcriptionnelle d'une grande quantité de gènes a été effectuée par analyse sur puces transcriptomiques. Trois types de lignées humaines ont été utilisées, soit n'ayant reçu aucun traitement, soit après suppression d'Atad2 par ARN interférence.

Les résultats montrent un changement dans l'activité transcriptionnelle du génome, plus précisément une activation globale de la transcription après l'élimination d'Atad2. Celui-ci aurait donc une influence sur la transcription des gènes,

- soit en tant que facteur transcriptionnel direct,
- soit en étant impliqué dans le remodelage de la chromatine de façon locale au niveau de certains promoteur, faisant varier l'accessibilité de l'ADN aux machineries transcriptionnelles.

Les deux hypothèses sont à envisager, au vu des connaissances acquises sur les autres membres de la famille AAA+.

3. Influence d'Atad2 sur l'apoptose

Outre les effets d'Atad2 sur la transcription, l'équipe a montré que le traitement de lignées cellulaires contenant Atad2 avec les inducteurs apoptotiques mène à une disparition rapide d'Atad2. Cette disparition serait plus précoce que l'événement du clivage de la protéine PARP, signal classique d'apoptose.

En partant de l'hypothèse que, de la même façon que PARP, l'élimination d'Atad2 facilite l'action des facteurs d'apoptose sur la chromatine, des tests ont été réalisés avec des lignées cellulaires traitées avec des siARN Atad2. Les résultats montrent que l'élimination d'Atad2 induit fortement l'apoptose.

Publi p1

Publi p2

Publi p3

Publi p4

Publi p5

Publi p6

Publi p7

Publi p8

Publi p9

Publi p10

Publi p11

Publi p12

Publi p13

Publi p14

Publi p15

Publi p16

Publi p17

Publi p18

Publi p19

Publi 20

Publi p21

Publi p22

Publi p23

Publi p24

Publi p25

Publi p26

Publi p27

Publi p28

Publi p29

Publi p30

Publi p31

Publi p32

Publi p33

Publi p34

Publi p35

Publi p36

Publi p37

Publi p38

Publi p39

Publi p40

Publi p41

Publi p42

Publi p43

Publi p44

Publi p45

Publi p46

Le chapitre discussion sera réparti en plusieurs chapitres qui permettront des considérations de plus en plus générales.

Dans les premiers temps les caractéristiques biochimiques d'Atad2 seront discutées, notamment au niveau de son affinité à la chromatine, de sa capacité de multimérisation et de ses interactions avec le groupement des Rpt. Cela permettra de déduire dans un premier temps son ou ses rôles fonctionnels.

Enfin, il sera discuté de la différence potentielle de l'action d'Atad2 dans les cellules germinales, où le facteur est présent de façon naturelle, et dans les cellules somatiques, où sa présence en forte concentration est illégitime.

V. DISCUSSION

A. *Focus sur les caractéristiques biochimiques d'Atad2, discussion des résultats*

Ce petit paragraphe sera volontairement succinct et permettra avant tout de résumer les résultats montrés dans le chapitre précédent. La discussion sera axée sur les caractéristiques d'Atad2 non seulement en tant que capacités fonctionnelles, mais aussi sur leurs implications dans le rôle d'Atad2 dans les cellules.

1. **L'affinité d'Atad2 avec la lysine K5 acétylée de l'histone H4**

Parmi tous les motifs connus pour lier la chromatine [le domaine methyl-CpG-binding (*Berger et Bird 2005*), les domaines chromo, Tudor et MBT (*Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001*), le domaine PHD (*Li et al., 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006; Wysocka et al., 2006*)...] les bromodomaines sont les seuls motifs connus capables de lier les lysines acétylées des histones. De là, les protéines contenant des bromodomaines sont capables d'être recrutées sur la chromatine acétylée, selon des états d'acétylation spécifiques et particuliers des résidus lysines des histones.

De même que les autres protéines contenant un ou des bromodomaines, Atad2 peut se lier à la chromatine. Il a été vu dans le chapitre précédent que, chez la souris, la forme

longue est fortement liée à la chromatine (voir Figure 20 C). La forme courte est beaucoup plus labile mais présente une affinité indéniable avec la chromatine. Les études décrites dans le chapitre Résultat montrent que cette forme présente tout d'abord une affinité avec la chromatine quand celle-ci est acétylée, rejoignant en cela les protéines à bromodomaine connues, ensuite que cette affinité est sélective. En effet, Atad2 est recruté majoritairement sur l'histone acétylée H4 au niveau de sa lysine K5. Outre que cette situation permet un recrutement différencié d'Atad2 selon l'état épigénétique de la chromatine, elle ouvre la voie à plusieurs fonctions originales possibles d'Atad2. Celui-ci est en effet le seul facteur connu à ce jour à posséder la faculté de reconnaître de façon spécifique la lysine K5 acétylée.

Cette marque épigénétique est particulière et apparait au cours d'événements différents :

a) L'acétylation de la lysine K5 au cours de la spermiogenèse

Il a été montré que les histones sont hyperacétylées au cours de la spermiogenèse et que parmi les lysines acétylées de l'histone H4, les résidus 5 et 12 présentent la plus grande variation d'acétylation (*Govin et al., 2007*).

Atad2 peut donc être recruté à un moment très précis de la spermatogenèse. Ce recrutement peut de plus être régulé par la présence locale d'ATP disponible.

b) Acétylation de la lysine K5 dans les cellules somatiques

L'implication probable d'Atad2 dans la désorganisation de l'activité chromatinienne des cellules tumorales peut être reliée à sa reconnaissance spécifique du marquage AcK5.

Le ou les rôles d'AcK5 dans les cellules somatiques sont malgré tout encore mal connus. En effet, en étudiant les états d'acétylation d'H4, Zhang et al ont observé que pour l'histone H4 la forme tétra-acétylée est sur les lysines K5, K8, K12 et K16 ; La forme tri-acétylée est sur les résidus K8, K12 et K16; la forme di-acétylée inclus les lysines 12 et 16 et enfin la forme mono-acétylée est sur K16 (*Zhang et al, 2002*). Cela leur a donné l'idée du "zip modèle" où l'acétylation se propagerait de K16 à K5. Une acétylation de la lysine 5 serait alors une indication de tétra-acétylation de l'histone H4. Ce modèle est malgré tout controversé car l'acétylation de la lysine 16 peut être suivie de celle de la lysine 12 ou 8 (*Thorne et al., 1990 - O'Neill and Turner, 1995*).

Quoiqu'il en soit, il est admis que l'acétylation de la lysine 5 de l'histone H4, reflétant un état d' hyperacétylation, serait fortement corrélée à un statut actif des gènes dans les cellules somatiques (*Turner, 1998*).

Pourtant, le signal induit par l'acétylation de la lysine 5 de l'histone H4 est une caractéristique qui est aussi retrouvée que dans des situations particulières, certaines étant complètement à l'opposé de la tendance générale qui implique un état relâché de la

chromatine corrélé à une acétylation. L'une de ces situations est la division mitotique. L'équipe de Fukui a étudié le pattern d'acétylation des résidus K5 et K16 au cours de cet événement (*Wako et al, 2007*). Les résultats de ces observations montrent que pendant l'interphase la lysine 5 est acétylée au niveau des régions centromériques, où est distribuée l'hétérochromatine. La lysine 16 acétylée est associée aux régions télomériques riches en gènes. Au cours du cycle, le pattern d'acétylation d'AcK5 H4 varie de façon très dynamique. Pendant la prométaphase l'acétylation au niveau des centromères décroît très fortement tandis que l'acétylation de la lysine 5 augmente dans les régions d'organisation nucléolaires. L'inverse est observé pendant la télophase. Par rapport à l'acétylation de la lysine 16, qui varie en quantité et en localisation. De plus sa distribution est corrélée avec les régions potentiellement transcriptionnellement active. L'acétylation spécifique du résidu K5 de l'histone H4 est associée à une forte compaction chromatinienne.

Des expériences récentes de Hartl et al ont montré un pattern particulier de cette modification post-traductionnelle (ainsi que K8, et K12) pendant la réplication de cellules folliculaire de *Drosophile* (*Hartl et al., 2007*). En effet ces modifications sont observées au niveau du point d'origine de réplication. Cette acétylation persiste à cet endroit bien après que la fourche de réplication soit passée, indiquant qu'elle est associée spécifiquement à la régulation de ce point et non à l'incorporation des nouvelles histones au niveau de la fourche de réplication.

2. Atad2 et sa capacité de multimérisation

Les résultats montrent que chez la souris la forme courte d'Atad2 peut être retrouvée dans deux conformations différentes, sous une forme monomérique et sous une forme complexée, peut-être homo-hexamérique, comme les protéines de la famille AAA.

En effet, les membres de la famille AAA sont généralement connus pour former des oligomères, plus généralement des hexamères. Les facteurs ne comprenant qu'un seul domaine AAA, par exemple VPS4 (*Babst et al., 1998*) et le facteur katanin (*Hartman & Vale 1998*), existent dans les cellules sous un équilibre entre monomères et multimères. Dans le cas de la katanin, l'oligomère en question est un anneau hexamérique. Pour ces protéines la multimérisation peut être induite *in vitro* par l'utilisation d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, qui permet un cumul des protéines sous leur conformation Enzyme-Ligand, ou par addition des substrats cibles (des microtubules dans le cas de la Katanin).

Il existe aussi un second type de protéines AAA. Celles-ci contiennent deux domaines AAA au sein de leurs séquences peptidiques et peuvent former des doubles anneaux hexamériques empilés l'un sur l'autre. C'est le cas par exemple de la protéine CDC48 (VCP).

Dans le cas d'Atad2, qui possède un seul domaine AAA, il est très probable que la structure multimérique corresponde à un anneau d'hexamères.

La conformation mono ou multimérique des AAA détermine leur niveau d'activité.

La littérature montre que la configuration des domaines AAA, déterminée par leur liaison à l'ATP, est liée à leur affinité avec leurs protéines cibles. Bien que certaines exceptions aient été trouvées (Porter and Johnson, 1983), la plupart des protéines AAA lient leurs cibles fortement quand elles sont sous leur état associé à l'ATP et beaucoup plus faiblement quand elles sont dans leur état associé à l'ADP. Plusieurs équipes l'ont démontré grâce à l'utilisation d'un analogue non hydrolysable de l'ATP ou par une mutation ponctuelle au niveau de la séquence peptidique impliquée dans son hydrolyse (remplacement du résidu E par Q dans le motif Walker B). Ces expériences ont été effectuées sur les protéines NSF (*Whiteheart et al, 1994*), katanin (*Hartman and Vale, 1999*), VPS4 (*Babst et al., 1998*), ClpA (*Pak et al., 1999; Singh et al., 1999*) et Yta 10-2 (*Arlt et al, 1996*) avec leurs cibles respectives.

Dans le cas d'Atad2, le fait est similaire si on considère sa forme active comme celle pouvant reconnaître la chromatine acétylée. Ainsi, la population monomérique présente une affinité nulle ou faible avec la chromatine acétylée tandis que la population sous forme multimérique peut y être recrutée.

Ceci peut être expliqué de plusieurs façons:

- la forme multimérique présente une affinité globale plus élevée grâce au regroupement des six bromodomains généré par la multimérisation de la protéine;
- la forme multimérique présente une configuration spatiale plus favorable à l'interaction entre les bromodomains et la chromatine acétylée;
- ou alors Atad2 sous sa forme monomérique a des partenaires qui empêchent

l'interaction à la chromatine acétylée soit par une gêne stérique, soit en entraînant la protéine dans des processus indépendants.

De plus, le fait que la multimérisation d'Atad2 soit fonction de sa liaison avec l'ATP, et donc du taux d'ATP disponible localement, est un moyen subtil de réguler son affinité avec la chromatine acétylée et donc son activité dans le remodelage chromatinien.

3. Effet stabilisant d'Atad2 sur le turn-over des histones

Il a pu être mis en évidence que la présence d'Atad2 a une influence sur le turn-over d'incorporation et de libération de H2A de la chromatine. En effet, la diminution d'Atad2 accélère ce turn-over. L'effet stabilisant d'Atad2 sur les histones incorporées peut être dû à une activité chaperonne impliquant son domaine AAA.

En plus de son implication dans la stabilité structurale de la chromatine, Atad2 pourrait être impliqué dans le turn-over des facteurs de transcription et des machineries transcriptionnelles. Cette hypothèse peut être corrélée avec d'autres données sur les AAA, notamment les Rpt et le protéasome. En effet, celui-ci a une influence sur le turn-over de Gal4 et d'autres facteurs de transcription (*Muratani, Kung, Shokat & Tansey, 2005*).

Outre les Rpt, d'autres exemples de déstabilisation de complexes protéiques par des facteurs AAA ont déjà été étudiés. On peut prendre comme exemple la protéine ClpX qui est capable de déstabiliser le transposome de MuA Transposase (voir chapitre

d'Introduction).

4. Atad2 impliqué dans la répression transcriptionnelle

D'après les expériences montrées dans la partie Résultats, Atad2 est impliqué dans l'activité transcriptionnelle. Ces résultats sont cohérents avec les connaissances établies sur certains membres de la famille des AAA, impliqués eux aussi dans ce processus.

En effet, plusieurs études chez la levure ont montré que les Rpt sont impliquées dans la transcription à plusieurs niveaux.

Tout d'abord il a été montré que l'homologue de Rpt6 Sug1, ainsi que quatre autres Rpt, permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle malgré une délétion de Gal4D dans sa zone activatrice.

De plus il a été montré que certains composants de 19S sont nécessaires à une réponse efficace aux stress thermiques ou oxydatifs dans les levures (*Sulahian, Johnston, Kodadek, 2006*). La délétion des protéines Sug1/Rpt6 ou de Sug2/Rpt4 dans les levures entraîne une très forte diminution de la transcription des gènes codant pour les hsp HSP26 et HSP104, ainsi que pour les gènes régulés par stress oxydatif GAD1 et PDR5. Cela montre un rôle des Rpt indépendant du protéasome.

De même, la protéine Atad2, montrée successivement comme recrutée sur la chromatine acétylée, interagissant avec les Rpt ou ayant une activité ATPasique indépendante de par sa capacité de multimérisation, peut être impliquée de façon intime dans la régulation de

la transcription de certains gènes. Cet effet semble toutefois se situer au niveau d'une répression transcriptionnelle. Cela est en accord avec l'effet stabilisant d'Atad2 sur les histones incorporées (voir publication de la partie Résultats). En effet la dynamique des histones au niveau des promoteurs est fortement corrélée à la transcription.

5. Interaction d'Atad2 avec les Rpt

Parmi les membres de la famille AAA, il existe des protéines capables d'interagir avec d'autres membres pour former des complexes hétéro-oligomériques. Par exemple Arlt et al ont montré une interaction entre les deux polypeptides protéases Yta10 et 12 (Arlt et al, 1996). De même les six protéines Rpt de la particule régulatrice du protéasome forment un anneau hexamérique (Rubin et al, 1998). Ces protéines agissent en coopération. Inactiver le domaine AAA de l'une d'entre elles diminue fortement l'activité du complexe entier.

Le domaine AAA d'Atad2 est proche de celui de CDC48 (VCP) dans l'arbre phylogénétique (voir la branche Yta7, homologue d'Atad2 chez *Saccharomyces Cerevisiae*, Figure 30). Or, Atad2, contrairement à CDC48 ne possède qu'un seul domaine AAA et pourrait alors adopter un comportement beaucoup plus similaire à celui des domaines les plus proches après ceux de VCP/CDC48, c'est-à-dire des domaines AAA des Rpt.

De même que les Rpt sont capables d'interagir entre elles pour former un anneau hexamérique qui sera la base de l'APIS et de la particule 19S du protéasome, Atad2

pourrait interagir avec les Rpt.

Les expériences montrées dans la partie Résultats indiquent qu'Atad2 est capable de se lier très faiblement avec les Rpt du protéasome. Bien qu'une interaction claire avec le protéasome 26S complet n'ait pas pu être mise en évidence actuellement, cela permet d'établir quelques suggestions sur l'un des mécanismes d'action d'Atad2.

Une fois recruté sur la chromatine acétylée, il pourrait tout d'abord agir sur le repliement des histones incorporées grâce à son domaine AAA, caractéristique de cette fonction. En effet, toutes les protéines AAA connues ont soit une action de chaperonne (contre l'agrégation, désassemblage de complexes protéiques) soit une implication dans le dépliement des protéines avant leur dégradation.

Son action serait soutenue par son interaction avec l'APIS, qui, en plus d'être l'acteur du dépliement des protéines à dégrader quand il est en complexe avec le protéasome, est aussi un fournisseur d'énergie grâce à sa capacité ATPasique. Atad2 pourrait aussi interagir avec le protéasome 26S complet et permettre un recrutement direct de cette usine de dégradation efficace sur les histones acétylées incorporées.

B

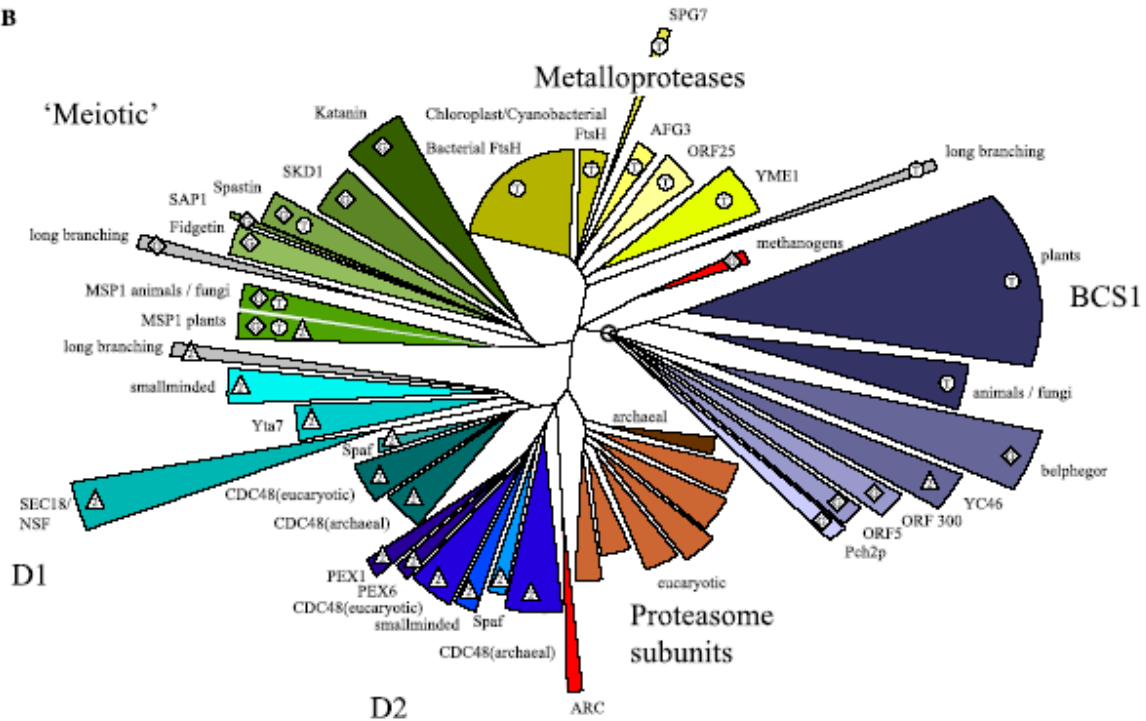


Figure 30 - Arbre phylogénétique du domaine AAA

Cet arbre est formé de plusieurs sous arborescences calculées selon divers scénarios.

La longueur et l'angle de chaque branche sont déterminés par la longueur maximale et le nombre de sous-branches appartenant à chaque groupe phylogénétique.

La racine présumée de l'arbre est marquée par un cercle noir, les branches longues mineures dont la monophylégénicité est non sûre sont colorés en gris.

Tiré d'une figure de Frickey and Lupas, 2004.

Atad2 serait alors le premier facteur identifié faisant un lien direct avec les composants de la chromatine que sont les histones et les activités de chaperonne ou de dégradation liées aux membres de la famille des AAA.

Ce rôle semble malgré tout peu important au vue de la très faible interaction trouvée avec les Rpt.

En ce qui concerne une interaction avec la particule 20S, elle semble très improbable. En effet, soit, Atad2 devrait être intégré à l'APIS, ce qui semble incertain, soit Atad2 se lierait directement avec la particule 20S en formant un homohexamère qui ferait office de particule activatrice ou d'adaptateur. Cette hypothèse s'avère très improbable. En effet, il a été montré récemment que l'interaction entre les Rpt et 20S est due à une séquence particulière d'acides aminés que ne possède pas Atad2, et nos propres expériences n'ont pas pu mettre en évidence une telle interaction.

Les résultats observés ainsi que les connaissances déjà acquises sur le comportement des protéines AAA et des protéines à bromodomaine favorisent l'hypothèse d'un facteur ayant plusieurs rôles distincts, tels que la stabilisation de la structure chromatinienne pouvant induire une répression transcriptionnelle, une fonction anti-apoptotique ou une fonction de chaperonne. Ces rôles peuvent avoir des conséquences différentes selon le contexte cellulaire. En effet, l'action qui peut être bénéfique à la spermiogenèse, peut s'avérer désastreuse si elle se trouve dans des cellules somatiques. Nous verrons plus loin l'exemple des cellules tumorales.

B. Rôle d'Atad2 au cours de la spermiogenèse, lien avec l'hyperacétylation de la chromatine des cellules en cours de spermiogenèse.

Comme il a déjà été discuté dans l'introduction, l'hyperacétylation de la chromatine semble être étroitement associée au remplacement des histones. De plus cette modification post-traductionnelle intervient, dans le temps, très précisément avant que la protéine de transition TP2 ne soit détectée. Il semble donc y avoir une étroite relation entre l'hyperacétylation des histones, leur remplacement et la condensation de la chromatine. Néanmoins, il existe encore peu de données qui permettent d'expliquer les conséquences directes de cette acétylation. C'est là que les caractéristiques d'Atad2 ainsi que son ou ses rôles probables permettent un éclaircissement.

1. L'acétylation de la chromatine comme précurseur de la compaction.

Le remodelage post-méiotique de la chromatine est marqué par une hyperacétylation des histones au stade VIII. Dans les cellules somatiques, l'acétylation des histones est une marque globalement associée à l'activation de la transcription, dans un contexte de chromatine ouverte et décompactée. Or ce contexte chromatinien est totalement opposé à la structure compacte et répressive mise en place au sein des spermatides.

L'hyperacétylation des histones marque très certainement les premières étapes de la

réorganisation finale du génome. L'extraction de l'ensemble des histones nécessite l'intervention de complexes spécifiques. C'est là que peut intervenir le facteur Atad2. Recruté sur la chromatine acétylée par le biais de la lysine 5 de l'histone H4, lysine qui montre le plus fort taux d'acétylation au cours de la phase d'hyperacétylation qui a lieu au cours de la spermiogenèse, Atad2 est présente sous sa forme multimérique, ce qui correspond à une forme active chez les membres de la famille auquel il appartient, les AAA+. Suivant le rôle le plus classique de cette famille, Atad2 permettrait un dépliement des protéines proches, les histones et faciliterait leur enlèvement de la chromatine. L'ADN ainsi libéré serait libre pour l'incorporation des protamines. Le signal de recrutement d'Atad2 n'interviendrait pas par hasard. Au cours de la spermatogenèse, ce profil d'acétylation correspondrait fortement à l'arrêt de la transcription et au début de la condensation du noyau. Atad2 recruté sur ce signal spécifique serait une voie d'accès aux machineries de remodelage de la chromatine car il pourrait soit déplier directement les histones incorporées à la chromatine, soient recruter des facteurs de dégradation via son interaction avec les Rpt. Une fois son action effectuée grâce à l'ATP présent localement, Atad2 perdrait sa structure oligomérique et se séparerait de la chromatine, laissant ainsi le champ libre aux machineries d'incorporation des protéines de transition ou des protamines.

Une autre hypothèse est qu'Atad2, au lieu de dégrader les histones acétylées de façon globale, soit plutôt recruté de façon très locale sur des zones de chromatine très denses et permette le maintien de ces structures au cours de la spermiogenèse. De plus, étant

présent au moment où l'activité transcriptionnelle s'arrête, il pourrait être l'un des facteurs favorisant cet événement. L'équipe a en effet montré un rôle de répression de l'activité transcriptionnelle d'Atad2. Ce facteur permet de ce fait de lier les concepts généralement contradictoires d'acétylation chromatinienne et de répression transcriptionnelle de la même façon que l'équipe a pu lier les concepts d'acétylation chromatinienne et de compaction grâce à l'étude de Brdt. Celui-ci est détecté au moment où les histones sont hyperacétylées, suit exactement le profil de leur distribution et est capable d'éjecter les histones de liaison de la chromatine, favorisant ainsi leur échange avec les variants d'histone de liaison H1t2 et HILS1, qui sont incorporés à la chromatine dans les spermatides allongées (*Pivot-Pajot et al, 2003*).

La chromatine pourrait ainsi être compactée globalement, et de façon différente localement par l'action des différents facteurs impliqués dans ce processus.

2. L'acétylation de la chromatine comme signal de dégradation.

Le processus de dégradation des histones dans des cellules est encore mal connu mais il doit exister un équilibre subtil entre le taux d'histones incorporés et le taux d'histones libres et qui permet le dynamisme qu'on observe au niveau de la chromatine. Pour que cet équilibre soit observé, la dégradation des histones doit être régulée et efficace. Le contexte de la spermatogénèse constitue bel et bien un exemple unique de dégradation massive des histones, mettant en jeu des mécanismes encore inconnus.

De façon générale les protéines sont dégradées soit par les lysosomes, soit par la voie du protéasome. Pour cette dernière voie, les protéines sont d'abord poly-ubiquitinylées, ce qui permet un ciblage par certains composants de la particule 19S. Une telle marque apposée aux histones aux cours de la spermiogenèse n'a jamais été détectée.

Il est intéressant de voir que l'acétylation de celles-ci est rapidement suivie de leur dégradation. Cette constatation entraîne l'hypothèse de l'acétylation des histones en tant que signal direct de dégradation. La protéine Atad2 donne un argument en faveur de cette idée puisqu'elle semble capable d'interagir avec la chromatine acétylée et les Rpt du protéasome. Elle permettrait soit un recrutement direct du protéasome sur les histones incorporées acétylées, ce qui entrainerait une dégradation de ceux-ci directement au niveau de la chromatine; soit de rapprocher le protéasome et sa cible non ubiquitinylée (les histones) juste après leur extraction de la chromatine. La protéine Brdt, dont il a déjà été discuté, peut elle aussi participer au processus de dégradation car elle présente une affinité avec la chromatine acétylée et peut interagir avec le composant Rpn10 de la particule 19S du protéasome.

Pour résumer ce qui a été postulé précédemment, l'action d'Atad2 au cours de la spermiogenèse pourrait se situer

- soit au niveau de la disparition des histones hyperacétylées incorporées. Son recrutement serait régulé de façon temporelle et spatiale puisqu'Atad2, qui n'est surexprimé normalement que dans le testicule, lie de façon spécifique la lysine 5

acétylée de l'histone H4. Pour cela il doit être sous sa forme multimérique. Sa propriété AAA et son interaction avec l'APIS indiquent une activité de dépliement et dégradation des histones hyperacétylées. Dans le cas de la spermiogenèse, cette disparition n'est pas traduite par un relâchement de la structure chromatinienne et par une augmentation de l'activité transcriptionnelle, mais par une incorporation plus aisée des protéines de transition et des protamines; celles-ci n'étant plus gênées par l'encombrement stérique dû aux histones.

- Soit au niveau de l'arrêt de la transcription et au maintien ou à la création de zones chromatinienne très compactées.

C. Présence d'Atad2 dans des cellules tumorales

1. Atad2 est-il un CT/A ?

Nombre d'études ont été faites sur l'identification des protéines exprimées de façon singulières dans les cellules cancéreuses. L'identification de celles-ci a révélé qu'un grand nombre d'entre elles est exprimé normalement exclusivement dans les cellules germinales, au cours de la spermatogenèse. Elles ont été appelées « cancer testis antigens » (antigènes CT). Il existe des arguments en faveur de l'hypothèse d'une implication active des antigènes CT au cours de la tumorigenèse. Certains antigènes CT sont spécifiques des spermatocytes et des spermatides, de façon plus générale, des cellules germinales subissant l'étape de la spermiogenèse. Comme il a déjà été décrit plus

haut, ces cellules sont le siège de réorganisations quasi-complètes de leur génome, sans équivalent dans les cellules somatiques.

Les études présentées dans le chapitre résultat montrent qu'Atad2 humain, qui n'est exprimé de façon élevée que dans les testicules chez des personnes saines, et retrouvé exprimé de façon au moins aussi élevée dans des cellules tumorales de patients.

Atad2 présente tous les critères d'un antigène CT de par sa sur-expression illégitime au sein des cellules cancéreuses et par son implication ou son influence sur la dynamique de la chromatine.

2. Rôle au sein des cellules somatiques.

L'expression illégitime, dans les cellules somatiques, des protéines testiculaires impliquées dans le remodelage de la chromatine peut avoir des conséquences dramatiques sur l'organisation et les fonctions du génome et de l'épigénome, et participer ainsi à la transformation cellulaire. Par exemple, l'antigène CT9, autre nom pour le facteur Brdt, est capable de compacter la chromatine acétylée. Ainsi, une expression anormale de Brdt pourrait fortement perturber les fonctions génomiques impliquant l'acétylation des histones, en particulier la transcription des gènes.

De la même façon, Atad2 pourrait contribuer au dérèglement de l'activité transcriptionnelle grâce à son action sur l'état de la chromatine.

Par exemple il pourrait permettre la protection de certaines structures chromatiniennes et empêcher la transcription de certains gènes clés de l'apoptose ou de la réaction anti-tumorale. L'action anti-apoptotique d'Atad2 montrée par l'équipe pourrait dans le cas des cellules cancéreuses surexprimant ce facteur être l'une des causes du processus d'immortalisation.

VI. CONCLUSION GENERALE

L'étude de la protéine Atad2 a été nécessaire à une meilleure compréhension de la réorganisation chromatinienne qui se déroule au cours de la spermiogenèse. Cette meilleure appréhension de ce phénomène est utile pour l'évaluation des risques encourus par la descendance dans des cas de Procréation Médicalement Assistée par exemple.

En effet, Atad2 est actuellement le seul facteur identifié liant directement la reconnaissance de la chromatine acétylée via un bromodomaine et une activité AAA.

De plus, les données obtenues sur la fonction d'Atad2 pourraient permettre dans un avenir plus ou moins proche de lutter contre l'établissement ou la pérennité des cellules cancéreuses.

En effet, les facteurs testiculaires ayant une influence sur la chromatine des cellules germinales pourraient constituer une nouvelle classe d'antigènes CT. Une meilleure compréhension de leur rôle au cours de la spermatogénèse aiderait à mieux appréhender leur rôle dans la transformation et la tumorigénèse. L'identification et la caractérisation de nouveaux antigènes CT pourraient être utilisées pour le dépistage et le diagnostic précoce en cancérologie: par exemple il serait utile d'approfondir les études de dérégulation d'Atad2 et Brdt dans les cancers et d'en faire des marqueurs de dépistage si les résultats

sont concluants.

De même, d'un point de vue thérapeutique, trouver un moyen de se servir de la propriété des CT/A, c'est à dire de n'être présents que dans les testicules, serait un excellent moyen de ciblage des cellules cancéreuses et permettrait de réduire les effets secondaires des traitements actuels.

En effet, qui sait si dans un futur proche, l'utilisation d'inhibiteurs d'Atad2 ne permettra pas de rendre les cellules cancéreuses sensibles à l'apoptose ?

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D.** (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*. **103**(4):667-78.
- Akopian TN, Kisselev AF, Goldberg AL.**(1997) Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem*. **272**(3):1791-8.
- Albig W., Bramlage B., Gruber K., Klobeck H. G., Kunz J., Doenecke D.** (1995) The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). *Genomics* **30**(2): 264-272.
- Albig W., Ebentheuer J., Klobeck G., Kunz J., Doenecke D.** (1996) A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum Genet* **97**(4): 486-491.
- Amor D. J., Kalitsis P., Sumer H., Choo K. H.** (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-68.
- Angus-Hill ML, Schlichter A, Roberts D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cairns BR.** (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell*. **7**(4):741-51.
- Arents and Moudrianakis.** (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**(24):11170-4.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, 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 USA*. **88**(22):10148-52.
- Arlt, H., R. Tauer, H. Feldmann, W. Neupert, T. Langer.** (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*. **85**:875–885.
- Aul R. B., Oko R. J.** (2001) The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev Biol* **239**(2): 376-87.
- Babst, M., B. Wendland, E.J. Estepa, and S.D. Emr.** (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal

endosome function. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **17**:2982–2993.

Bastien J, Rochette-Egly C. (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*. **328**:1-16.

Bellvé AR. (1993) Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol.* **225**:84-113.

Berger J, Bird A. (2005) Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis. *Biochem Soc Trans.* **33**(Pt 6):1537-40.

Beuron F, Maurizi MR, Belnap DM, Kocsis E, Booy FP, Kessel M, Steven AC. (1998) At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J Struct Biol.* **123**(3):248-59.

Biggar & Crabtree. (1999) Continuous and widespread roles for the Swi-Snf complex in transcription. *EMBO J.* **18**(8):2254-64.

Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell.* **102**(2):257-65.

Bork P, Koonin EV. (1993) An expanding family of helicases within the 'DEAD/H' superfamily. *Nucleic Acids Res.* **21**(3):751-2.

Bouvier, D., and Chevallier, P. (1976). A correlation between histone acetylation and chromatin changes in spermatids of locust (*Locust migratoris*). *Cytobiologie.* **12**: 287-304.

Bouvier, D. (1977). "Chemical aspects of histone acetylation and replacement in mouse spermatids at different stages of maturation." *Cytobiologie* **15**(3): 420-37.

Bramlage B., Kosciessa U., Doenecke D. (1997) Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* **62**(1): 13-20.

Brownell JE, Allis CD. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(14):6364-8.

Brownell JE, Allis CD. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev.* **6**(2):176-84.

- Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis** (1996). "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation." *Cell* **84**(6): 843-51.
- Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, Randazzo F, Metzger D, Chambon P, Crabtree G, Magnuson T.** (2000) A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell.* **6**(6):1287-95.
- Burton, R. E., Siddiqui, S. M., Kim, Y. I., Baker, T. A. & Sauer, R. T.** (2001) Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *EMBO J.* **20**, 3092–3100.
- Burton, B. M. & Baker, T. A.** (2003) Mu transpososome architecture ensures that unfolding by ClpX or proteolysis by ClpXP remodels but does not destroy the complex. *Chem. Biol.* **10**, 463–472.
- Burlingame R. W., Love W. E., Wang B. C., Hamlin R., Nguyen H. X., Moudrianakis E. N.** (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* **228**(4699): 546-53.
- Cairns BR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Winston F, Kornberg RD.** (1998) Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol Cell.* **2**(5):639-51.
- Cairns BR, Lorch Y, Li Y, Zhang M, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Du J, Laurent B, Kornberg RD.** (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell.* **87**(7):1249-60.
- Candido E. P., Dixon G. H.** (1972) Amino-terminal sequences and sites of in vivo acetylation of trout-testis histones 3 and IIb 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2015-9.
- Caron C., Govin J., Rousseaux S., Khochbin S.** (2005) How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* **38**: 65-89.
- Caron C., Pivot-Pajot C., van Grunsven L. A., Col E., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2003) Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep* **4**(9): 877-82.
- Celeste A., Petersen S., Romanienko P. J., Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Sedelnikova O. A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M. J., Redon C., Pilch D. R., Olaru A., Eckhaus M., Camerini-Otero R. D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W. M., Nussenzweig M. C., Nussenzweig A.** (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**(5569): 922-927.

- Chandy M, Gutiérrez JL, Prochasson P, Workman JL.** (2006) SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell.* **5**(10):1738-47.
- Cho C., Willis W. D., Goulding E. H., Jung-Ha H., Choi Y. C., Hecht N. B., Eddy E. M.** (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**(1): 82-86.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM.** (2003) Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod.* **69**(1):211-7.
- Choi Y. C., Gu W., Hecht N. B., Feinberg A. P., Chae C. B.** (1996) Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island. *DNA Cell Biol* **15**(6): 495-504.
- Clark, D. J. and T. Kimura.** (1990) Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J Mol Biol.* **211**(4):883-96.
- Couldrey C., Carlton M. B., Nolan P. M., Colledge W. H., Evans M. J.** (1999) A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **8**(13): 2489-95.
- Courtens J. L., Biggiogera M., Rothfield N. F., Burnier M., Fakan S.** (1992) Migration of centromere proteins in rabbit spermatids. *Mol Reprod Dev* **32**(4): 369-77.
- De la Serna IL, Carlson KA, Imbalzano AN.** (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet.* **27**(2):187-90.
- De la Serna IL, Ohkawa Y, Imbalzano AN.** (2006) Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodelers. *Nat Rev Genet.* **7**(6):461-73.
- De Lucia F., Faraone-Mennella M. R., D'Erme M., Quesada P., Caiafa P., Farina B.** (1994) Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* **198**(1): 32-39.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM.** (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491–496.
- Dimova, Nackerdien, Fugeson, Eguchi & Osley.** (1999) A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell.* **4**(1):75-83.
- Doenecke, D., B. Drabent, C. Bode, B. Bramlage, K. Franke, K. Gavenis, U. Kosciessa and O. Witt** (1997). "Histone gene expression and chromatin structure

during spermatogenesis." *Adv Exp Med Biol* **424**: 37-48.

- Drabent B., Bode C., Bramlage B., Doenecke D.** (1996) Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochemistry Cell Biol* **106**(2): 247-251.
- Elfring LK, Daniel C, Papoulas O, Deuring R, Sarte M, Moseley S, Beek SJ, Waldrip WR, Daubresse G, DePace A, Kennison JA, Tamkun JW.** (1998) Genetic analysis of brahma: the Drosophila homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics*. **148**(1):251-65.
- Fantz D. A., Hatfield W. R., Horvath G., Kistler M. K., Kistler W. S.** (2001) Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod* **64**(2): 425-431.
- Felsenfeld G., Groudine M.** (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**(6921): 448-53.
- Ferdous, Gonzalez, Sun, Kodadek & Johnston.** (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*. **7**(5):981-91.
- Filetici P, Aranda C, González A, Ballario P.** (1998) GCN5, a yeast transcriptional coactivator, induces chromatin reconfiguration of HIS3 promoter in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. **242**(1):84-7.
- Fischle W., Tseng B. S., Dormann H. L., Ueberheide B. M., Garcia B. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Funabiki H., Allis C. D.** (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**(7071): 1116-22.
- Fita I., Campos J. L., Puigjaner L. C., Subirana J. A.** (1983) X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *J Mol Biol* **167**(1): 157-77.
- Flaus A, Owen-Hughes T.** (2003) Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol Cell Biol*. **23**(21):7767-79.
- Franke K., Drabent B., Doenecke D.** (1998) Testicular expression of the mouse histone H1.1 gene. *Histochem Cell Biol* **109**(4): 383-390.
- Frickey T, Lupas AN.** (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol*. **146**(1-2):2-10.
- Geng F, Cao Y, Laurent BC.** (2001) Essential roles of Snf5p in Snf-Swi chromatin

remodeling in vivo. *Mol Cell Biol.* **21**(13):4311-20.

- Georgakopoulos T, Gounalaki N, Thireos G.** (1995). Genetic evidence for the interaction of the yeast transcriptional coactivator proteins GCN5 and ADA2. *Mol Gen Genet* **246**:723–728.
- Gillette TG, Gonzalez F, Delahodde A, Johnston SA, Kodadek T.** (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(16):5904-9.
- Glickman MH, Ciechanover A.** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**(2):373-428. Review.
- Glover JR, Lindquist S.** (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.* **94**(1):73-82.
- Glover JR, Tkach JM.** (2001) Crowbars and ratchets: hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochem Cell Biol.* **79**(5):557-68. Review.
- Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B.** (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(24):13732-7.
- Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA.** (2002) Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science.* **296**(5567):548-50.
- Govin J., Caron C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2005) Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci* **30**(7): 357-9.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C.** (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol.* **176**(3):283-94.
- Govin J., Lestrat C., Caron C., Pivot-Pajot C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2006) Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*(57): 155-72.
- Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL.** (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**(13):1640-50.

- Greaves I. K., Rangasamy D., Devoy M., Marshall Graves J. A., Tremethick D. J.** (2006) The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5394-405.
- Grigoryev S. A., Nikitina T., Pehrson J. R., Singh P. B., Woodcock C. L.** (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6153-62.
- Grimes, S. R., Jr. and N. Henderson** (1984). "Acetylation of rat testis histones H2B and TH2B." *Dev Biol* **101**(2): 516-21.
- Grimes, S. R., D. C. Wilkerson, K. R. Noss and S. A. Wolfe** (2003). "Transcriptional control of the testis-specific histone H1t gene." *Gene* **304**: 13-21.
- Hanson P. I., Whiteheart S.W.**(2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(7):519-29.
- Hartl T, Boswell C, Orr-Weaver TL, Bosco G.** (2007) Developmentally regulated histone modifications in Drosophila follicle cells: initiation of gene amplification is associated with histone H3 and H4 hyperacetylation and H1 phosphorylation. *Chromosoma.* **116**(2):197-214.
- Hartman, J.J., J. Mahr, K. McNally, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Thomas, S. Cheesman, J. Heuser, R.D. Vale, and F.J. McNally.** (1998) Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell.* **93**:277–287.
- Hartman, J.J., and R.D. Vale.** (1999) Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science.* **286**:782–785.
- Hattendorf DA, Lindquist SL.** (2002) Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.* **21**(1-2):12-21
- Haynes, S. R., C. Dollard, F. Winston, S. Beck, J. Trowsdale and I. B. Dawid** (1992). "The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins." *Nucleic Acids Res* **20**(10): 2603.
- Hazzouri M., Pivot-Pajot C., Faure A. K., Usson Y., Pelletier R., Sele B., Khochbin S., Rousseaux S.** (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**(12): 950-960.
- Heard E.** (2005) Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of

the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* **15**(5): 482-9.

- Heitz, E.** (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jb. Wiss. Bot.* **69**: 728–818.
- Henikoff S.** (1993) Transcriptional activator components and poxvirus DNA-dependent ATPases comprise a single family. *Trends Biochem Sci.* **18**(8):291-2. Review.
- Henikoff S., Ahmad K.** (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 133-53
- Hirota T., Lipp J. J., Toh B. H., Peters J. M.** (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**(7071): 1176-80.
- Hirschhorn JN, Brown SA, Clark CD, Winston F.** (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* **6**(12A):2288-98.
- Hishida T, Iwasaki H, Ohno T, Morishita T, Shinagawa H.** (2001) A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(15):8283-9.
- Hohl, T.M., F. Parlati, C. Wimmer, J.E. Rothman, T.H. Sollner, and H. Engelhardt.** (1998) Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol. Cell.* **2**:539–548.
- Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA.** (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell.* **95**(5):717-28.
- Hoyer-Fender S., Costanzi C., Pehrson J. R.** (2000) Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res* **258**(2): 254-260.
- Hudson, B. P., M. A. Martinez-Yamout, H. J. Dyson and P. E. Wright** (2000). "Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain." *J Mol Biol* **304**(3): 355-70.
- Huisinga KL, Pugh BF.** (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* **13**(4):573-85.
- Hwang I., Chae C. B.** (1989) S-phase-specific transcription regulatory elements are present in a replication-independent testis-specific H2B histone gene. *Mol Cell Biol* **9**(3):

1005-1013.

Iguchi N., Tanaka H., Yomogida K., Nishimune Y. (2003) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* **26**(6): 354-365.

Jacobson R. H., Ladurner A. G., King D. S., Tjian R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**(5470): 1422-5.

Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* **22**: 151–153.

Karpf A. R. (2006) A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy. *Epigenetics*. **1**(3):116-20.

Kasten M., Szerlong H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Werner M., Cairns B. R. (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J* **23**(6): 1348-59.

Kennedy B. P., Davies P. L. (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* **255**(6): 2533-2539.

Kennedy B. P., Davies P. L. (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* **256**(17): 9254-9259.

Khalil A. M., Boyar F. Z., Driscoll D. J. (2004) Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16583-7.

Khochbin S. (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**(1): 1-12.

Khorasanizadeh S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**(2): 259-72.

Kimmins S., Sassone-Corsi P. (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**(7033): 583-9.

Kingston RE, Bunker CA, Imbalzano AN. (1996) Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* **10**(8):905-20.

Koonin EV, Gorbalenya AE. (1992) The superfamily of UvrA-related ATPases includes

three more subunits of putative ATP-dependent nucleases. *Protein Seq Data Anal.* **5**(1):43-5.

Kornberg R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**(139): 868-71.

Kornberg, R. D. and Y. L. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." *Cell* **98**(3): 285-294.

Kortschak RD, Tucker PW, Saint R. (2000) ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci.* **25**(6):294-9. Review.

Kossel, A. (1884). Ueber einen peptoartigen bestandheil des zellkerns *Z. Physiol. Chem.* **8**, 511-515.

Krebs, J. E., C. J. Fry, M. L. Samuels and C. L. Peterson (2000). "Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression." *Cell* **102**(5): 587-98.

Kruger W, Herskowitz I. (1991) A negative regulator of HO transcription, SIN1 (SPT2), is a nonspecific DNA-binding protein related to HMG1. *Mol Cell Biol.* **11**(8):4135-46.

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.(2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116–120.

Ladurner A. G., Inouye C., Jain R., Tjian R. (2003) Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**(2): 365-76.

Lee, S. et al. (2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**, 229–240.

Lee D, Ezhkova E, Li B, Pattenden SG, Tansey WP, Workman JL.(2005) The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell.* **123**(3):423-36.

Lenzen, C.U., D. Steinmann, S.W. Whiteheart, and W.I. Weis. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell.* **94**:525–536.

Levchenko, I., Luo, L. & Baker, T. A. (1995) Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.* **9**, 2399–2408.

Lewis J. D., Song Y., de Jong M. E., Bagha S. M., Ausio J. (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**(8): 473-482.

- Li A., Eirin-Lopez J. M., Ausio J.** (2005) H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol* **83**(4): 505-15.
- Lin Q., Inselman A., Han X., Xu H., Zhang W., Handel M. A., Skoultchi A. I.** (2004) Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J Biol Chem*.
- Lin Q., Sirotkin A., Skoultchi A. I.** (2000) Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* **20**(6): 2122-2128.
- Liu R, Liu H, Chen X, Kirby M, Brown PO, Zhao K.** (2001) Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*. **106**(3):309-18.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J.** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Lusser A., Kadonaga J. T.** (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods* **1**(1): 19-26.
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V. & Aravind, L.** (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* **146**, 11–31 (2004).
- Malik H. S., Henikoff S.** (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-91.
- Marmorstein R., Roth S. Y.** (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 155-61.
- Martens J. A., Winston F.** (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* **13**(2): 136-42.
- Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., 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**(8): 2808-13.
- Meistrich M. L., Bucci L. R., Trostle-Weige P. K., Brock W. A.** (1985) Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol* **112**(1): 230-340.
- Meistrich M. L., Mohapatra B., Shirley C. R., Zhao M.** (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**(8): 483-488.
- Meistrich M. L., Trostle-Weige P. K., Lin R., Bhatnagar Y. M., Allis C. D.** (1992) Highly

acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* **31**(3): 170-181.

- Meistrich, M.L.** (1989). Histone and basic nuclear proteins transitions in mammalian spermatogenesis. In Histones and other basic nuclear proteins. S.G. In *Hnilica LS, Stein JL*, editor. CRC Press, Boca Raton. 165-182.
- Melcher K, Johnston SA.** (1995) GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol.* **15**(5):2839-48.
- Meyer HH.** (2005) Gogoy reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitine family. *Biochim Biophys Acta.* **1744**(3):481-96.
- Mujtaba S, He Y, Zeng L, Farooq A, Carlson JE, Ott M, Verdin E, Zhou MM.** (2002) Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell.* **9**(3):575-86.
- Muratani M, Kung C, Shokat KM, Tansey WP.** (2005) The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell.* **120**(6):887-99.
- Neigeborn L, Carlson M.** (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **108**(4):845-58.
- O'Neill LP, Turner BM.** (1995) Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *EMBO J.* **14**(16):3946-57.
- Ogura, T. & Wilkinson, A. J.** (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure — diverse function. *Genes Cells.* **6**, 575–597.
- Ogura, T., Whiteheart, S. W. & Wilkinson, A. J.** (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotidesensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* **146**, 106–112.
- Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR.** (2001) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem.* **71**:755-81.
- Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P.** (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**(4): 281-300.
- Owen, D. J., P. Ornaghi, J. C. Yang, N. Lowe, P. R. Evans, P. Ballario, D. Neuhaus, P. Filetici and A. A. Travers** (2000). "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p." *Embo J* **19**(22):

6141-9.

- Pak, M., J.R. Hoskins, S.K. Singh, M.R. Maurizi, and S. Wickner.** (1999) Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. *J. Biol. Chem.*274:19316–19322.
- Palmer D. K., O'Day K., Margolis R. L.** (1990) The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* **100**(1): 32-6.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S.** (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475–478.
- Patel, S., and M. Latterich.** (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**:65–71.
- Pehrson J. R., Costanzi C., Dharia C.** (1997) Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* **65**(1): 107-113.
- Peterson CL, Zhao Y, Chait BT.** (1998) Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23641-4.
- Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE.** (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell.* **3**(2):247-53.
- Phelan ML, Schnitzler GR, Kingston RE.** (2000) Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI-SNF and its isolated ATPases. *Mol Cell Biol.* **20**(17):6380-9.
- Petroziello J, Yamane A, Westendorf L, Thompson M, McDonagh C, Cervený C, Law CL, Wahl A, Carter P.** (2004) Suppression subtractive hybridization and expression profiling identifies a unique set of genes overexpressed in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* **23**(46):7734-45.
- Pivot-Pajot C., Caron C., Govin J., Vion A., Rousseaux S., Khochbin S.** (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5354-65.
- Porter, M.E., and K.A. Johnson.** (1983) Transient state kinetic analysis of the ATP-induced dissociation of the dynein-microtubule complex. *J. Biol. Chem.*258:6582–6587.
- Quinn J, Fyrberg AM, Ganster RW, Schmidt MC, Peterson CL.** (1996) DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature.* 1996 Feb 29;379(6568):844-7.

- Rabini S., Franke K., Saftig P., Bode C., Doenecke D., Drabent B.** (2000) Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp Cell Res* **255**(1): 114-124.
- Ramakrishnan V., Finch J. T., Graziano V., Lee P. L., Sweet R. M.** (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* **362**(6417): 219-23.
- Rao B. J., Brahmachari S. K., Rao M. R.** (1983) Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem* **258**(22): 13478-85.
- Rasmussen T. P., Huang T., Mastrangelo M. A., Loring J., Panning B., Jaenisch R.** (1999) Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **27**(18): 3685-3689.
- Richmond T. J., Davey C. A.** (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**(6936): 145-50.
- Richmond T. J., Finch J. T., Rushton B., Rhodes D., Klug A.** (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**(5986): 532-7.
- Robinson P. J., Rhodes D.** (2006) Structure of the '30nm' chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*.
- Romrell, L. J., A. R. Bellve and D. W. Fawcett** (1976). "Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization." *Dev Biol* **49**(1): 119-31.
- Rouiller, I. et al.** (2002) Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nature Struct. Biol.* **9**, 950–957.
- Rubin, D.M., M.H. Glickman, C.N. Larsen, S. Dhruvakumar, and D. Finley.**(1998) Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **17**:4909–4919.
- Sanchez, Y. & Lindquist, S. L.** (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112–1115.
- Sauer, R. T. et al.** (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9–18.
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S.** (1996) HSP100/Cip proteins: a

common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **21**(8):289-96. Review.

- Seigneurin-Berny D., Verdel A., Curtet S., Lemercier C., Garin J., Rousseaux S., Khochbin S.** (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**(23): 8035-44.
- Simpson A. J., Caballero O. L., Jungbluth A., Chen Y. T., Old L. J.** (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-25.
- Shirley C. R., Hayashi S., Mounsey S., Yanagimachi R., Meistrich M. L.** (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* **71**(4): 1220-9.
- Shorter, J. & Lindquist, S.** (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35. *Science.* 304(5678):1793-7.
- Singh, S.K., F. Guo, and M.R. Maurizi.**(1999) ClpA and ClpP remain associated during multiple rounds of ATP-dependent protein degradation by ClpAP protease. *Biochemistry.* 38:14906–14915.
- Singh J., Rao M. R.** (1987) Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J Biol Chem* **262**(2): 734-740.
- Singh M, Popowicz GM, Krajewski M, Holak TA.** (2007) Structural ramification for acetyl-lysine recognition by the bromodomain of human BRG1 protein, a central ATPase of the SWI/SNF remodeling complex. *Chembiochem.* **8**(11):1308-16.
- Smith, G. R., Contreras-Moreira, B., Zhang, X. & Bates, P. A.** (2004) A link between sequence conservation and domain motion within the AAA+ family. *J. Struct. Biol.* **146**, 189–204.
- Sousa, M. C. et al.** (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease–chaperone complex. *Cell* 103, 633–643.
- Steger K., Klonisch T., Gavenis K., Drabent B., Doenecke D., Bergmann M.** (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* **4**(10): 939-945.
- Stern M, Jensen R, Herskowitz I.** Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol.* 1984 Oct 5;178(4):853-68.

- Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lobrich M., Jeggo P. A.** (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**(7): 2390-6.
- Strahl B. D., Allis C. D.** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F.** (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(7):3364-9.
- Sulahian R, Sikder D, Johnston SA, Kodadek T.** (2006) The proteasomal ATPase complex is required for stress-induced transcription in yeast. *Nucleic Acids Res.* **34**(5):1351-7
- Swaffield JC, Melcher K, Johnston SA.**(1995) A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature.* **374**(6517):88-91.
- Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA.** (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature.* **357**(6380):698-700.
- Syntichaki P, Topalidou I, Thireos G.** (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* **404**: 414-417.
- Tackett AJ, Dilworth DJ, Davey MJ, O'Donnell M, Aitchison JD, Rout MP, Chait BT.** (2005) Proteomic and genomic characterization of chromatin complexes at a boundary. *J Cell Biol.* **169**(1):35-47.
- Tadokoro, Y., K. Yomogida, Y. Yagura, S. Yamada, M. Okabe and Y. Nishimune** (2003). "Characterization of Histone H2A.X Expression in Testis and Specific Labeling of Germ Cells at the Commitment Stage of Meiosis with Histone H2A.X Promoter-Enhanced Green Fluorescent Protein Transgene." *Biol Reprod* **11**: 11.
- Tamkun, J. W., R. Deuring, M. P. Scott, M. Kissinger, A. M. Pattatucci, T. C. Kaufman and J. A. Kennison** (1992). "brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2." *Cell* **68**(3): 561-72.
- Tanaka H., Iguchi N., Isotani A., Kitamura K., Toyama Y., Matsuoka Y., Onishi M., Masai K., Maekawa M., Toshimori K., Okabe M., Nishimune Y.** (2005) HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol* **25**(16): 7107-19.

- Thorne, A. W., D. Kmiciek, K. Mitchelson, P. Sautiere and C. Crane-Robinson** (1990). "Patterns of histone acetylation." *Eur J Biochem* **193**(3): 701-13.
- Trostle-Weige, P. K., M. L. Meistrich, W. A. Brock, K. Nishioka and J. W. Bremer** (1982). "Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis." *J Biol Chem* **257**(10): 5560-7.
- Trostle-Weige P. K., Meistrich M. L., Brock W. A., Nishioka K.** (1984) Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J Biol Chem* **259**(14): 8769-8776.
- Turner J. M., Burgoyne P. S., Singh P. B.** (2001) M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci* **114**(Pt 18): 3367-3375.
- Turner, B. M.** (1998). "Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence." *Cell Mol Life Sci* **54**(1): 21-31.
- Unni, E., Y. Zhang, M. Kangasniemi, W. Saperstein, S. B. Moss and M. L. Meistrich** (1995). "Stage-specific distribution of the spermatid-specific histone 2B in the rat testis." *Biol Reprod* **53**(4): 820-6.
- Vale, R.D., and R.M. Milligan.** (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*. 288:88–95.
- Van Holde, K.E.** (1989). Chromatin. *Springler-Verlag*, New York.
- van Roijen HJ, Ooms MP, Spaargaren MC, Baarends WM, Weber RF, Grootegoed JA, Vreeburg JT.** (1998) Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod*. **13**(6):1559-66.
- Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane- Robinson C, Allis CD, Workman JL.** (1996) Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J*. **15**(10):2508-18.
- Wako T, Murakami Y, Fukui K.** (2005) Comprehensive analysis of dynamics of histone H4 acetylation in mitotic barley cells. *Genes Genet Syst*. **80**(4):269-76.
- Wang L, Liu L, Berger SL.** (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev*. **12**(5):640-53.
- Wenzel T, Baumeister W.** (1995) Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol*. **2**(3):199-204.

- Whiteheart, S.W., K. Rossnagel, S.A. Buhrow, M. Brunner, R. Jaenicke, and J.E. Rothman.** (1994) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* **126**:945–954.
- Whiteheart, S. W., Schraw, T. & Matveeva, E. A.** (2001) N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int. Rev. Cytol.* **207**, 71–112.
- Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR.** (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *PNAS.* **91**(25):12218-22.
- Winston F, Carlson M.** (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.* **8**(11):387-91. Review.
- Witt O., Albig W., Doenecke D.** (1996) Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* **229**(2): 301-306.
- Wolffe, A.P.** (1998). Chromatin Structure and Function. 3rd edition, Academic press.
- Wyrobek A. J., Meistrich M. L., Furrer R., Bruce W. R.** (1976) Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J* **16**(7): 811-25.
- Wysocka J., Allis C. D., Coonrod S.** (2006) Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci* **11**: 344-55.
- Yan W., Ma L., Burns K. H., Matzuk M. M.** (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.
- Yelick P. C., Balhorn R., Johnson P. A., Corzett M., Mazrimas J. A., Kleene K. C., Hecht N. B.** (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* **7**(6): 2173-9.
- Yu Y. E., Zhang Y., Unni E., Shirley C. R., Deng J. M., Russell L. D., Weil M. M., Behringer R. R., Meistrich M. L.** (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein I-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci Usa* **97**(9): 4683-4688.
- Zalensky A. O., Siino J. S., Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Tomilin N. V., Yau P., Bradbury E. M.** (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* **277**(45): 43474-43480.
- Zeng L, Zhou MM.** (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**: 124–128.

- Zhang, K., K. E. Williams, L. Huang, P. Yau, J. S. Siino, E. M. Bradbury, P. R. Jones, M. J. Minch and A. L. Burlingame (2002). "Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* **1**(7): 500-8.
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY. (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J.* **17**(11):3155-67.
- Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC (2000) Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* **101**(1):79-89.
- Zhang R., Poustovoitov M. V., Ye X., Santos H. A., Chen W., Daganzo S. M., Erzberger J. P., Serebriiskii I. G., Canutescu A. A., Dunbrack R. L., Pehrson J. R., Berger J. M., Kaufman P. D., Adams P. D. (2005) Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**(1): 19-30
- Zhao M., Shirley C. R., Mounsey S., Meistrich M. L. (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod* **71**(3): 1016-25.
- Zhao M., Shirley C. R., Yu Y. E., Mohapatra B., Zhang Y., Unni E., Deng J. M., Arango N. A., Terry N. H., Weil M. M., Russell L. D., Behringer R. R., Meistrich M. L. (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* **21**(21): 7243-7255.
- Zhou Y. B., Gerchman S. E., Ramakrishnan V., Travers A., Muylldermans S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* **395**(6700): 402-5.
- Zou JX, Revenko AS, Li LB, Gemo AT, Chen HW. (2007) ANCCA, an estrogen-regulated AAA+ ATPase coactivator for ERalpha, is required for coregulator occupancy and chromatin modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(46):18067-72. Epub 2007 Nov 12.

VIII. ANNEXES