THÈSE DE DOCTORAT
UNIVERSITÉ PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Epigénétique et Biologie du Développement

École doctorale : Complexité du Vivant (n°515)

Présentée par

Emmanuelle SZENKER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

ÉTUDE DES VARIANTS DE L'HISTONE H3 : H3.2 ET H3.3, AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE D'UN VERTÉBRÉ, *XENOPUS LAEVIS*

Soutenance prévue le 19 septembre 2012

Devant le jury composé de :

Dr. Geneviève Almouzni	Directrice de thèse
Dr. Sébastien Bloyer	Examinateur
Dr. Saadi Khochbin	Rapporteur
Dr. Benjamin Loppin	Rapporteur
Pr. Anne-Hélène Monsoro-Burq	Examinatrice
Pr. Muriel Umbhauer	Examinatrice

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier un grand nombre de personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'élaboration de ce manuscrit de thèse qui est l'aboutissement de ces quatre dernières années d'étude à l'Institut Curie.

Dans un premier temps, je remercie très sincèrement les membres de mon jury. Merci *Benjamin Loppin* et *Saadi Khochbin* d'avoir accepté de lire et évaluer soigneusement ce manuscrit. Aussi, je remercie *Sébastien Bloyer*, *Anne-Hélène Monsoro-Burq* et *Muriel Umbhauer* d'accepter de discuter mon travail en tant qu'examinateur. *Anne-Hélène*, un merci particulier d'avoir participé aux réunions annuelles pour le suivi de ma thèse en tant que tutrice et de m'avoir aidée pour les expériences d'hybridation *in situ* grâce à ton don de nombreux plasmides. *Muriel Umbhauer*, je vous remercie d'avoir pris de votre temps pour m'apprendre la technique minutieuse qu'est « l'expérience de la calotte animale ».

Bien évidement, je souhaite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse *Geneviève Almouzni*, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je n'ai pas fait mon stage de master 2 dans ton laboratoire, et ce fut donc un certain challenge pour toutes les deux. De plus, j'ai travaillé sur un modèle particulier qui n'est pas utilisé par la majorité des personnes de l'équipe, mais qui je sais te tiens à cœur. Je te remercie donc pour la confiance que tu m'as accordée et j'espère que je ne t'ai pas déçue. Ce ne fut pas facile tous les jours, mais j'ai conscience aujourd'hui de tout ce que tu m'as appris et je t'en remercie.

Au quotidien, j'ai eu la chance de travailler auprès de collègues qui m'ont beaucoup apporté scientifiquement et humainement. *Nicolas*, merci de m'avoir aidée tout au long de ma thèse, et particulièrement les premiers mois où tu m'as transmis ton savoir sur l'étude expérimentale du développement embryonnaire des grenouilles. Merci à tous les membres de l'équipe, la « frogteam », et en particulier aux différentes personnes avec qui j'ai eu la chance de partager l'espace du « petit bureau ». En premier lieu, *Armelle*, merci pour tes nombreux conseils et l'exemple du travail de thèse que tu as pu m'apporter avant ta soutenance. *Kelly,* merci pour ton soutien, ta lucidité, ta franchise et ta bonne humeur quotidienne. Tu as réussi à me rebooster de nombreuses fois et j'espère que j'ai pu te rendre l'appareil de temps en temps. Je te souhaite plein de bonnes choses pour l'après-thèse. *Haniya*, tu n'es restée à Paris et au laboratoire qu'un an mais je sais que nous garderons contact pendant encore de nombreuses années. Merci pour les aventures merveilleuses que nous avons vécues ensemble au Zimbabwe et à New-York. *Miguel,* merci pour ton soutien et ton écoute quotidienne, et tes nombreux conseils sur les manips sur les ARNm ! *Zack*, un énorme merci pour les relectures de mes différents manuscrits en anglais, et pour ton amitié, humour et soutien de ces derniers mois ! Merci *Sophie* pour ta sérénité, ta passion pour la recherche et expérience que tu partages, félicitations pour ton nouveau poste et je te souhaite le meilleur pour la suite. *Sebastian,* merci pour ta… bonne humeur !!! tout simplement. Une pensée toute particulière aux deux futures maman *Katia* et *Lisa*. Merci également aux thésards et post-docs présents ou passés *Paolo*, *Dan*, *Rocio*, *Adam*(s), *Salomé, Hiro, Gaston, Céline, Michal, Leanne, Elaine,* et *Aline*. Bien évidemment je remercie également les statutaires, *Delphine* et sa bonne humeur, *Jean-Pierre, Christèle, Dominique* pour nos échanges particuliers sur H3.3, *Cécile*, et *Isabelle* sans qui le laboratoire ne serait pas aussi bien organisé.

Plus largement, je tiens à remercier les membres de l'unité, l'UMR218, avec qui j'ai eu l'occasion de partager de très bons moments dans les couloirs du pavillon Pasteur ou ailleurs. En premier lieu, je tiens à remercier tendrement *Baptiste* qui a partagé mon humeur, bonne comme mauvaise, quasi quotidiennement cette dernière année. Je crois que je ne pourrai te remercier suffisamment de tout le soutien que tu m'as apporté, en particulier lors de la rédaction de ce manuscrit de thèse et ce malgré le décalage horaire avec la côte ouest américaine. *Elsa,* merci pour ta bonne humeur, ton amitié et nos soirées mémorables !!! Merci également à *Anne* pour nos conversations furtives mais sympathiques, *Laura* pour sa maturité et ses conseils, *Tanguy* et *Matthieu* pour leur humour décalé, *la petite Marion* pour son soutien et ses conseils de plus grande, *Constance* qui a su me soutenir et m'encourager toujours avec humour, *Cédric* pour ses visites régulières dans le petit bureau, *Patricia* pour sa joie de vivre et tous les autres que je ne cite pas mais qui font l'harmonie de l'unité.

Je remercie également très sincèrement *Dominique Chardonnieras* et *Marion Martin*, pour leur aide administrative inestimable. Merci à tous les chefs d'équipe de l'unité : *Angela Taddei, Valérie Borde, Nathalie Dostatni* et *Manolis Papamichos* pour leurs précieux conseils tout au long de ma thèse. Aussi, un grand merci à *John Gurdon* et *Jérôme Jullien* pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de notre collaboration.

Je remercie tout particulièrement mes amis qui m'ont soutenue à leur façon tout au long de ma thèse. En particulier, les « magistèriens » avec qui j'ai partagé cette aventure de thèse : un grand merci à *Ana,* ma binôme de rédaction à la bibliothèque, notamment pour ta bonne humeur contagieuse ; un énorme merci également à *Flo*, *Pau*, *Had*, *Mag*, *Hélo* et *Mica* pour nos soirées régulières et souvenirs partagés. Un grand merci également à mon amie *Aurélie*, qui fut particulièrement présente à des moments difficiles. Une pensée particulière à celles et ceux que je ne cite pas mais qui ont été présents d'une façon ou d'une autre ces dernières années.

Enfin, c'est un plaisir pour moi d'avoir l'opportunité de remercier ma famille. Un énorme merci, donc, à mes parents *Patricia* et *Michel,* et à ma sœur *Jessica* qui m'ont tous les trois encouragée dans mes études. C'est bien évidemment grâce à eux et à leur soutien que je suis arrivée jusqu'ici, en apprenant un peu plus chaque jour sur la beauté des sciences du vivant et le développement embryonnaire. Je pense ne pas leur avoir suffisamment dit « merci » et je suis heureuse de le faire aujourd'hui. J'espère aussi que ce manuscrit vous permettra d'élucider, en partie, le mystère de mon quotidien au travail.

Aux dizaines de grenouilles, aux centaines d'heures passées à injecter, aux dizaines de milliers d'embryons et centaines de milliers d'œufs, à quatre ans de hauts et de bas, et aux inombrables bons moments.

« S'il fallait tenir compte des services rendus à la science,
la grenouille occuperait la première place. »
Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (1865)
Claude Bernard (1813-1878)

RÉSUMÉ

L'organisation en chromatine permet non seulement de compacter l'ADN génomique, mais aussi de réguler finement l'expression du génome. En effet, l'unité de base de la chromatine, le nucléosome, est une entité modulable dont la versatilité représente une source d'information pour contrôler le fonctionnement du génome. La particule cœur du nucléosome, composée d'un tétramère d'histones $(H3\text{-}H4)_2$ flanqué de deux dimères d'histones H2A-H2B autour desquels s'enroule 146pb d'ADN, peut être modulée notamment par l'incorporation de variants d'histones. Pour l'histone H3, les variants réplicatifs H3.1 et H3.2 permettent l'incorporation majeure de nouvelles histones lors de la réplication de l'ADN, tandis que le variant de remplacement H3.3 peut être incorporé tout au long du cycle cellulaire. Il paraît crucial de comprendre comment chacun de ces variants d'histones participe spécifiquement à la régulation de l'expression du génome.

Au cours de ma thèse, mon attention s'est particulièrement portée sur le variant H3.3 qui ne diffère des variants réplicatifs H3.1 et H3.2 que par respectivement cinq ou quatre acides aminés. Mon projet de recherche visait à déterminer si H3.3 était interchangeable avec ces variants réplicatifs ou, au contraire, s'il possédait un rôle spécifique et unique. Un faisceau d'arguments dans la littérature souligne un lien entre H3.3 et la transcription. Enrichi dans les régions transcriptionnellement actives, H3.3 porte au sein de la chromatine des modifications post-traductionnelles considérées comme caractéristiques des régions actives. De plus, l'incorporation d'H3.3 dépend d'une voie d'assemblage faisant intervenir le chaperon d'histone HIRA. Deux aspects étaient donc à considérer, d'une part l'importance et la fonction spécifique d'H3.3 et d'autre part son mode d'assemblage.

Le contexte du développement embryonnaire impliquant une régulation fine de l'expression spatio-temporelle de gènes clés représentait une situation très intéressante pour aborder ces questions. L'utilisation d'un modèle vertébré de choix, la grenouille *Xenopus laevis* qui, contrairement aux mammifères, ne possède qu'un variant d'H3 réplicatif : H3.2, m'a permis d'évaluer la fonction de ces variants d'histones au cours du développement. J'ai ainsi pu montrer que, malgré leur similarité, les variants H3.2 et H3.3 ne sont pas interchangeables. En effet, les défauts en l'absence d'H3.3 ne peuvent pas être compensés par une surexpression d'H3.2. De façon remarquable, une altération par diminution du niveau d'expression d'H3.3 dans les embryons ou l'interférence dans sa voie d'assemblage via son chaperon d'histone HIRA conduisent à des défauts majeurs de développement au moment de la gastrulation. Ce phénotype s'accompagne d'un défaut d'expression d'un certain nombre de gènes mésodermiques et neuroectodermiques, dont le marqueur mésodermique *Xbra*. Ces défauts peuvent être mis en parallèle avec la désorganisation globale de la chromatine observée chez ces embryons. Ainsi, ces données mettent en lumière l'importance de l'incorporation du variant d'histone H3.3 dans la chromatine au cours d'une étape clé du développement embryonnaire, la gastrulation. Ces résultats sont à discuter dans un contexte développemental où les cycles cellulaires s'allongent et où les cellules entrent en différenciation en exprimant des gènes spécifiques à leur devenir cellulaire.

Mots clés : Développement, chromatine, variant d'histones, Xenopus, gastrulation

ABSTRACT

The roles of the H3 histone variants H3.2 and H3.3 during the development of a vertebrate organism, *Xenopus laevis*

Proper packaging of eukaryotic genomic DNA into chromatin is important for proper DNA compaction and gene expression regulation. Indeed, the basic unit of chromatin, the nucleosome, is a flexible entity, which is a source of information to control the functional organization of the genome. The nucleosome core particle comprises a histone tetramer $(H3\text{-}H4)_2$ flanked by two dimers of H2A-H2B wrapped by 146bp of DNA. In particular, the nucleosome can be modulated by the incoporation of distinct histone variants. Concerning H3, the replicative histone variants H3.1 and H3.2, contribute to the new histone supply needed during DNA replication, while the replacement histone variant H3.3 is incorporated throughout the cell cycle. It is crucial to understand how these distinct histone variants specifically participate in the regulation of genome expression.

During my PhD, I focused on the variant H3.3, which differs from the replicative H3.1 and H3.2 by only five or four amino acids, respectively. The aim of my research project was to determine whether H3.3 was interchangeable with the replicative forms, or conversely, whether it had a unique and specific role. Interestingly, the literature highlights a link between H3.3 and transcription. Enriched in transcriptionally active regions, chromatin bound H3.3 carries post-translational modifications considered as characteristic of active chromatin regions. Moreover, the incorporation of H3.3 depends on a specific assembly pathway that involves the histone chaperone HIRA. Two aspects were thus to be considered: the specific function of H3.3 and its dedicated mode of assembly.

To address these issues, the context of embryonic development was a very interesting situation giving that it requires the fine control of spatio-temporal expression of key genes. Using a well-established vertebrate model, the frog *Xenopus laevis*, which unlike mammals has only one replicative H3 variant: H3.2, allowed me to assess the specific function of H3.2 and H3.3 during development. I was able to show that despite their similarity these two histone variants are not interchangeable. Indeed, defects in the absence of H3.3 cannot be rescued by H3.2 overexpression. Remarkably, downregulation of H3.3 expression in embryos or interference with its assembly pathway via HIRA leads to major developmental defects at gastrulation. This phenotype is accompanied by expression defects of mesodermal and neuroectodermal genes, including the mesodermal marker *Xbra*. Moreover, these embryos show overall defects in their chromatin organization. Taken together, these data highlight the importance of H3.3 incorporation into chromatin during a key developmental transition, gastrulation. These results are discussed in a developmental context in which the cell cycle lengthens and cells enter into differentiation, expressing a number of genes specific to their cell fate.

Keywords: Development, chromatin, histone variants, Xenopus, gastrulation

LABORATOIRE D'ACCUEIL



Institut Curie – Section Recherche

Unité UMR218 sous la direction du Dr. Geneviève Almouzni

« Dynamique Nucléaire et Plasticité du Génome »

Équipe du Dr. Geneviève Almouzni

« Dynamique de la chromatine »

Bâtiment Pasteur

26 rue d'Ulm

75248 Paris Cedex 05

+33 1 56 24 67 02

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 3
RÉSUMÉ 5
ABSTRACT 6
LABORATOIRE D'ACCUEIL 7
TABLE DES MATIÈRES 8
LISTE DES FIGURES 10
ABRÉVIATIONS 12
LISTE DES PUBLICATIONS 13
PRÉAMBULE : De l'épigenèse à l'épigénétique 15
INTRODUCTION 21
I. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *XENOPUS LAEVIS* 21
1. Le modèle *Xenopus laevis* 23
2. L'ovogenèse 26
a. Les réserves endogènes 27
b. Les réserves exogènes 28
c. L'hétérogénéité des réserves 29
d. La maturation de l'ovocyte 30
3. La fécondation 33
a. La rotation d'équilibration et la prévention de la polyspermie 33
b. La rotation corticale et la redistribution des déterminants cytoplasmiques 34
c. L'amphimixie, ou la fusion des génomes 36
4. La segmentation 38
a. Les premiers cycles : rapides et synchrones 38
b. Divisions totales mais inégales 39
c. La Transition Mid-Blastuléenne (MBT) ou la reprise de la transcription zygotique 41
d. Induction du mésoderme par les blastomères végétatifs 42
e. Les facteurs responsables de l'induction mésodermique 44
5. La gastrulation 48
a. Vue générale de la gastrulation : morphologie externe 49
b. Mouvements morphogénétiques réorganisant les trois feuillets 51
c. Le marqueur mésodermique *brachyury (Xbra)* 57
6. La neurulation et l'organogenèse 60
II. L'IMPORTANCE DE L'ORGANISATION EN CHROMATINE 63
1. Structure de la chromatine 64
a. L'unité de base de la chromatine : le nucléosome 64

b. Les niveaux d'organisation supérieurs 68
c. L'hétérochromatine 70
d. Organisation en 3D au sein du noyau 71
2. Diversité et dynamique de la chromatine 73
a. La méthylation de l'ADN 73
b. Les modifications des histones (PTMs) 75
c. Les variants d'histones 80
III. LES VARIANTS D'HISTONE H3.1/H3.2 ET H3.3 87
1. Les voies d'assemblages distinctes des histones H3.1/H3.2 et H3.3 88
2. Caractéristiques et importance fonctionnelle du variant H3.3 - Revue 93
RÉSULTATS 109
1. Questions clés 109
2. Rôle d'H3.3 au cours du développement embryonnaire du Xénope 112
3. Résultats complémentaires non publiés 136
a. Quelle est l'expression des gènes H3.2 et H3.3 chez le Xénope? 136
b. Le signal d'induction mésodermique est-il affecté ? 140
c. D'autres chaperons de l'histone H3.3 sont-ils importants pour le développement embryonnaire ? 145
d. H3.3 est-il requis directement au niveau du gène Xbra ? 149
4. Rôle d'H3.3 dans la reprogrammation transcriptionnelle après transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope 152
DISCUSSION 159
ANNEXE 167
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 193

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentatif de la théorie du préformationnisme 15
Figure 2 : Planche de Haeckel en 1874 16
Figure 3 : Schématisation de la mitose par W. Flemming 17
Figure 4 : Le « paysage épigénétique » de Waddington 18
Figure 5 : Représentation de marques potentiellement épigénétiques portées par la chromatine 20
Figure 6 : La grenouille *Xenopus laevis* 22
Figure 7 : Développement précoce du *Xenopus laevis* 22
Figure 8 : Principe du clonage par transfert nucléaire chez *X. laevis* 24
Figure 9 : Les différents stades de la vitellogenèse 27
Figure 10 : Représentation schématique de la structure hétérogène de l'ovocyte 29
Figure 11 : La maturation de l'ovocyte de Xénope 32
Figure 12 : La rotation corticale et l'établissement de l'axe dorso-ventral 34
Figure 13 : De la fécondation à l'amphimixie 37
Figure 14 : Les cycles cellulaires au cours du développement précoce 39
Figure 15 : Démonstration de l'équivalence des noyaux par H. Spemann 40
Figure 16 : Segmentation d'un embryon de Xénope 40
Figure 17 : L'endoderme est responsable de l'induction mésodermique 43
Figure 18 : Modèle de l'induction mésodermique et de l'organisateur dorsal 46
Figure 19 : Induction de l'organisateur dorsal par le centre de Nieuwkoop 47
Figure 20 : Carte des territoires présomptifs au début de la gastrulation 48
Figure 21 : Formation du blastopore et mouvements morphogénétiques 50
Figure 22 : Cellules en bouteilles et mouvement de rotation de l'endoderme 51
Figure 23 : Induction d'un axe secondaire par la lèvre dorsale du blastopore 52
Figure 24 : Vues en coupe sagittales du processus de gastrulation 53
Figure 25 : Différenciation de l'ectoderme en épiderme ou neuroectoderme 55
Figure 26 : Mouvements de convergence et d'extension 56
Figure 27 : Patron d'expression du marqueur mésodermique Xbra 58
Figure 28 : Le rôle central de Xbra au cours de la gastrulation 59
Figure 29 : Représentation schématique de la neurulation 61
Figure 30 : Du stade bourgeon caudal au têtard 62
Figure 31 : Les origines de la découverte du nucléosome 64
Figure 32 : La particule cœur nucléosomale 66
Figure 33 : Du chromosome au nucléosome 67
Figure 34 : Les deux modèles de la fibre de 30nm 69
Figure 35 : Visualisation de l'hétérochromatine dans un noyau de mammifère 70
Figure 36 : Identification des territoires chromosomiques 72
Figure 37 : Méthylation de l'ADN chez des jumeaux monozygotes 74

Figure 38 : Modifications post-traductionnelles des histones _____ 76
Figure 39 : Variants de l'histone H2A chez l'Homme _____ 82
Figure 40 : Variants de l'histone H2B chez l'Homme _____ 84
Figure 41 : Variants de l'histone H3 chez l'Homme _____ 85
Figure 42 : Étapes de l'assemblage du nucléosome_____ 88
Figure 43 : Assemblages de la chromatine dépendant et indépendant de la synthèse d'ADN_____ 89
Figure 44 : Modèle revisité des deux voies d'assemblage des histones H3_____ 90
Figure 45 : Dynamique des variants d'histones H2A et H3 en réponse aux dommages à l'ADN____ 92
Figure 46 : Schéma représentant les résultats principaux _____ 115
Figure 47 : Comparaison des gènes histones H3 chez l'Homme et le Xénope _____ 136
Figure 48 : Expression des ARNm H3.2 et H3.3 au cours du développement _____ 138
Figure 49 : Analyse des formes activées de Smad1, Smad2 et ERK1/2 _____ 141
Figure 50 : Expérience de conjugaisons calotte animale / cellules végétatives _____ 143
Figure 51 : Étude du facteur CHD1 au cours du développement _____ 146
Figure 52 : Étude des facteurs DAXX et ATRX au cours du développement _____ 147
Figure 53 : Immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps H3.3 _____ 150
Figure 54 : Étude du ratio entre H3.3 et H3.2 solubles dans les ovocytes _____ 155
Figure 55 : Niveau d'expression des protéines H3.2 et H3.3 étiquetées HA ou GFP après injection dans des ovocytes _____ 156
Figure 56 : Test d'assemblage en chromatine d'ADN plasmidique injecté dans des vésicules germinatives avec ou sans anticorps anti-HIRA_____ 157

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ASF-1 : Anti-silencing function 1
ATRX : alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome protein
AV : Axe pôle animal – pôle végétatif
BRDT : Bromodomain Testis-specific protein
Cabin1 : Calcineurin Binding Protein 1
CAF-1 : Chromatin Assembly Factor 1
CHD1 : Chromodain Helicase DNA binding protein 1
CENP-A : Centromeric Protein A
CSF : Facteur Cytostatique
DAXX : death domain-associated protein
DDR : DNA Damage Response
DNMT : DNA MéthylTransférase
DSB : DNA Double Strand Break
Dsh : Dishevelled
DV : Axe dorso-ventral
ERK : Extracellular signal Regulated Kinases
ES : Cellules souches embryonnaires
FGF : Fibroblast Growth Factor
FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence
GBP : GSK-3-binding protein
GVBD : Germinative Vesicle BreakDown
GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3
HAT : Histone AcetylTransferase
HDAC : Histone Desacetylase
HDMT : Histone DeMethylTransferase
hCG : Gonadotropine Chorionique humaine
HIRA : HIstone Regulator A
HMT : Histone MethylTransferase
HP1 : Heterochromatin Protein 1
MBT : Transition Mid-Blastuléenne
MCM : MiniChromosome Maintenance
MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2
MPF : M-phase Promoting Factor ou Maturation Promoting Factor
Myf5 : Myogenic factor 5
MyoD : Myogenic Determination gene
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
Plk1 : Polo-like kinase 1
Otx2 : Orthodenticle homeobox 2
pb : paires de bases
SEP : Sperm Entry Point
VG : Vésicule Germinative
VLDLR : Very Low Density Lipoproteins Receptor
SIP1 : Smad-Interacting Protein 1
Sox2 : SRY (sex determining region Y)-box 2
SP : Sperm-specific Protein
TGF : Transforming Growth Factor
TSS : Transcription Start Site
UBN1 : ubinuclein 1
WDR5 : WD-Repeat protein 5
Xnrs : Xenopus Nodal Related

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication majeure :

Szenker E, Lacoste N and Almouzni G (2012). A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. **Cell Reports** *1*, 730–740, DOI : 10.1016/j.celrep.2012.05.006

Collaboration :

Jullien J*, Astrand C*, Szenker E, Garrett N, Almouzni G and Gurdon JB. HIRA-dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes.
**Contribution équivalente*
En révision à Epigenetics & Chromatin

Revues :

Szenker E, Ray-Gallet D and Almouzni G (2011). The double face of the histone variant H3.3. **Cell Research** *21*, 421-434, DOI : 10.1038/cr.2011.14

Lacoste N, Szenker E and Almouzni G. Histone variants in development. **Trends in Genetics**
En préparation

Chapitre de livre :

Boyarchuk E*, Szenker E* and Almouzni G. Roles and functions of histone variants. **Fundamentals of chromatin.** Editeur : Dr Jerry L. Workman
**Contribution équivalente*
En préparation

PRÉAMBULE : De l'épigenèse à l'épigénétique

L'épigenèse, théorie déjà formulée par Aristote en 384 avant notre ère dans son œuvre *De Generatione Animalium* (Aristote, 343AD), puis plus formellement décrite en 1651 par William Harvey (Harvey, 1651), stipule qu'un embryon se développe progressivement en devenant de plus en plus complexe. Cette théorie s'oppose à la théorie de la préformation qui considère que l'ovule (selon les ovistes) ou le spermatozoïde (selon les animalculistes) renferme un être vivant miniature (l'homunculus) dont tous les organes sont déjà formés (Figure 1). En effet, les partisans de cette théorie soutenaient que, pour chaque espèce, la spécificité du développement s'explique par l'existence d'un minuscule être préformé dans les gamètes, une sorte de modèle de l'adulte mais si petit et transparent qu'il en est invisible. Ainsi, le développement de l'individu n'était autre qu'une croissance en taille de ce modèle réduit, dont les tissus devenaient alors plus denses, donc visibles.

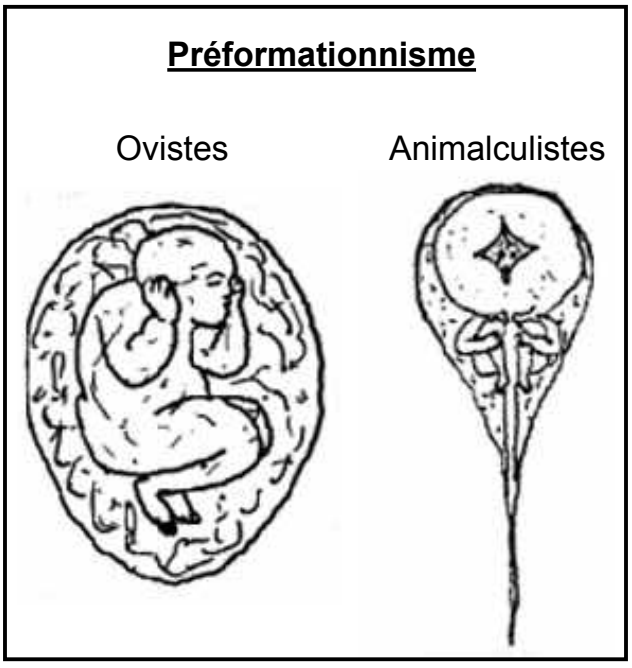


Figure 1 : Schéma représentatif de la théorie du préformationnisme
Schématisation d'un petit être vivant déjà présent dans un ovule, selon les ovistes, ou dans un spermatozoïde, l'homunculus, selon les animalculistes, contenant les structures préformées des différents organes de l'individu adulte. *(Image modifiée d'après http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/images/Pagee144.jpeg)*

La préformation fut la théorie dominante jusqu'à la fin du 18ème siècle mais elle ne permettait pas d'expliquer pourquoi deux parents étaient nécessaires pour la reproduction, ni les variations, monstruosités et métissages parfois observés chez les nouveau-nés. Ainsi, par opposition à la théorie de la préexistence du modèle miniaturisé, les partisans de la théorie de l'épigenèse pensaient que l'œuf était amorphe et que les organes de l'adulte se différenciaient graduellement. C'est Caspar Friedrich Wolff qui remit au goût du jour cette théorie dans son manuscrit de thèse en 1759 (Wolff, 1759). En effet, en observant les

premiers stades du développement embryonnaire du poulet, il constata l'absence de certaines parties de l'animal adulte, contrairement à ce qu'il attendait d'un animal préformé. Il développa alors le concept selon lequel la forme apparaît progressivement au cours du développement. Karl Ernst von Baer consolide ce concept en 1828 en affirmant que les embryons de vertébrés présentent des structures comparables avec un plan d'organisation commun, et que ces structures deviennent caractéristiques de l'ordre, de la famille et de l'espèce au cours du développement (Baer, 1828). Cette similitude a été vulgarisée en 1874 dans le cas des vertébrés par les fameuses planches de Ernest Haeckel (Haeckel, 1874) (Figure 2).

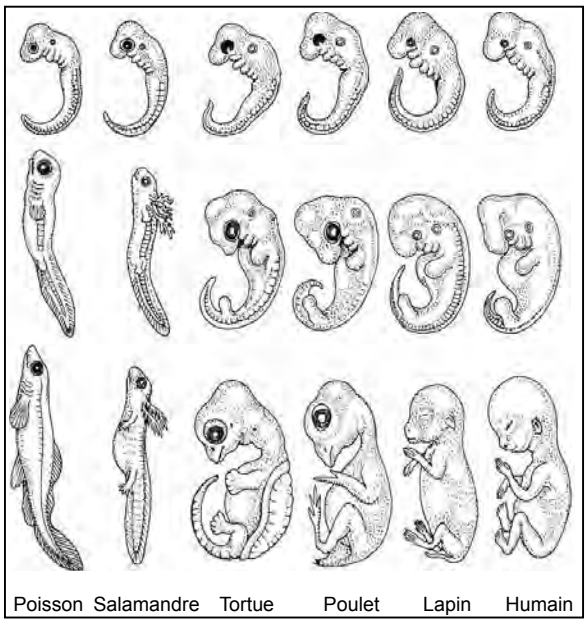


Figure 2 : Planche de Haeckel en 1874
K.E. von Bear (1828): « Je possède, conservés dans l'alcool, deux petits embryons dont j'ai omis d'inscrire le nom ; il me serait tout à fait impossible de dire à quelle classe ils appartiennent. »
Les planches de E. Haeckel (1874) illustrent la similitude entre des embryons de différentes espèces de vertébrés. Ces images dessinées, bien que pertinentes, ont fait l'objet de critiques quant à la modification des observations pour mettre en évidence les similitudes. *(Image modifiée d'après http://www.starlarvae.org/SL_graphics/embryo_comparisons.jpg)*

Ce n'est qu'au cours du 19ème siècle que la polémique entre épigenèse et préformation prit fin. Tout d'abord, lorsque l'on découvrit que l'œuf est en fait issu de la fusion des noyaux de l'ovule et du spermatozoïde, notamment grâce aux travaux de Gustave Thuret en 1854 sur l'algue *Fucus* (Thuret, 1854), puis ceux d'Oscar Hertwig en 1875 qui validèrent cette théorie chez l'oursin (Hertwig, 1891). Ainsi, l'œuf fécondé ne contient non pas un embryon préformé mais le matériel nécessaire à la formation de l'embryon qui se développe par multiplication et différenciation cellulaire progressive. Mais par quel mécanisme ?

C'est vers 1865, que Gregor Mendel, un moine botaniste autrichien, réalise des expériences sur les pois, qui seront à la base de la génétique formelle, permettant de dégager des lois de transmission des caractères héréditaires (Mendel, 1866). Les chromosomes sont ensuite découverts en 1879 par le cytologiste allemand Walther Flemming qui les décrit au cours de la division cellulaire grâce à l'amélioration des colorants cellulaires, sans pour autant expliquer leur rôle (Flemming, 1882) (Figure 3).

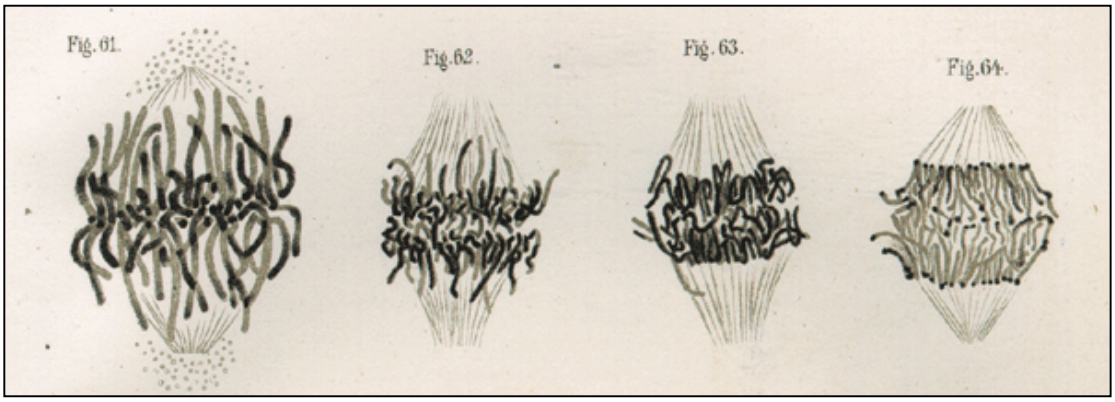


Figure 3 : Schématisation de la mitose par W. Flemming
Illustration du comportement des chromosomes pendant la mitose, par W. Flemming en 1882. *D'après* (Paweletz, 2001).

Parallèlement, August Weismann travaille sur l'embryogenèse des œufs d'oursin chez lesquels il observe également diverses formes de la division cellulaire. En 1883, il propose la théorie du germe-plasme qui offrait un modèle mécanique de la différenciation. Selon lui, tous les "déterminants" d'un chromosome donné ne sont pas distribués équitablement dans toutes les cellules de l'embryon, permettant d'expliquer la spécialisation des cellules lors de la différenciation, mais contredisant la théorie de l'hérédité (Weissman, 1892). Wilhelm Roux, l'un des fondateurs de l'embryologie expérimentale, s'efforça lui aussi de découvrir comment les organes et tissus se trouvaient déterminés dès la fécondation. En 1888, il brûla une cellule, ou blastomère, d'un embryon de grenouille au stade 2 cellules. Le blastomère restant se développa en ce qui semblait n'être qu'un demi-embryon (Roux, 1890), confirmant alors la théorie du germe-plasme. Il propose la théorie du développement en mosaïque : la cellule fécondable contient des déterminants distincts, répartis dans des cellules distinctes. En 1891, Hans Driesch réalisa une expérience similaire mais en dissociant physiquement deux blastomères d'oursin. Contrairement aux observations de W. Roux chez la grenouille, chacun des blastomères isolés d'oursin se développa en larves complètes, contredisant la théorie du développement en mosaïque et supportant l'épigenèse (Driesh, 1894). Ces résultats seront d'ailleurs confirmés chez la grenouille en 1910 par Jesse Francis McClendon, l'observation de W. Roux s'expliquant par le fait que le blastomère brulé (et non séparé) continuait à informer le blastomère survivant de son existence. En 1892, Hans Driesch procède à une autre expérience capitale : il comprime les embryons d'oursin au stade quatre cellules, si bien que le troisième plan de clivage est anormal et que les noyaux, déplacés, se distribuent anarchiquement dans l'embryon (Driesh, 1894). Or, les larves obtenues seront parfaitement normales, ce qui signifie que tous les noyaux sont équivalents, chacun renfermant tous les gènes. Malgré ses croyances en une « force vitale » pour expliquer le développement progressif, Driesch a donc, par ses découvertes, fait faire à l'embryologie un grand bond en avant.

C'est au cours du 20ème siècle que les découvertes scientifiques ont pu expliquer le phénomène sous-jacent du développement progressif. En 1902, Walter Sutton fut interpellé par le parallélisme entre la transmission des caractères et le comportement des chromosomes lors de la formation des gamètes. Il décrit alors l'hypothèse selon laquelle les facteurs déterminant les caractères héréditaires sont localisés au niveau des chromosomes (Sutton, 1902). En 1910, Thomas Hunt Morgan confirme cette hypothèse grâce à ses travaux sur la Drosophile (Morgan, 1911). Ce n'est pourtant qu'avec les travaux d'Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty en 1944 sur la transformation bactérienne, qu'il fut démontré que le support de l'information génétique portée par les chromosomes est l'acide désoxyribonucléique (ou ADN) (Avery et al., 1944), dont la structure en double hélice sera établie en 1953 par James Watson et Francis Crick (Watson and Crick, 1953).

En partant du principe selon lequel le génotype détermine le phénotype, la génétique seule ne peut aborder le problème du développement embryonnaire et les différents types cellulaires autrement qu'à partir d'une position préformationniste. L'embryologiste Conrad Waddington apporte alors une toute autre explication. En effet, il considéra dès 1942 que le développement de l'embryon était un processus « épigénétique », par lequel le génotype construit le phénotype (Waddington, 1942). Son invention du terme « épigénétique » (contraction de « épigènese » + « génétique »), permettait ainsi de nommer « la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype ». Ainsi, dans ce système développemental imaginé par Waddington, la prédétermination par les gènes coexiste avec le pouvoir d'autonomie, via l'influence de contraintes externes qui peuvent influencer le processus (Figure 4).

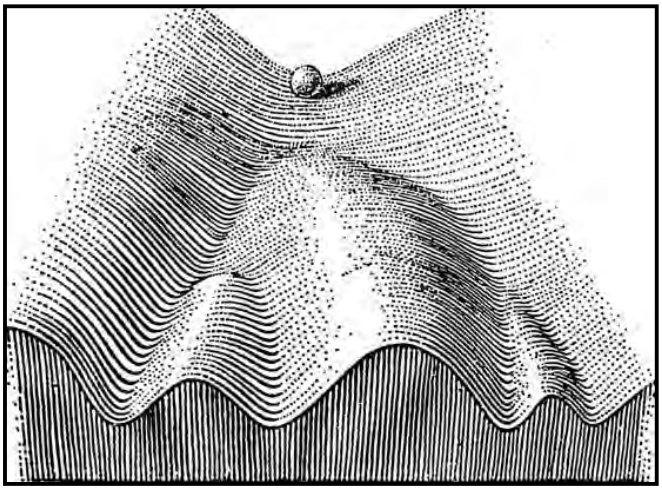


Figure 4 : Le « paysage épigénétique » de Waddington
Le concept de « paysage épigénétique » proposé par Waddington en 1957 constitue une métaphore visuelle du processus de développement. Les gènes dessinent un paysage que la cellule, représentée par une boule, parcourt lorsqu'elle se différencie : elle peut prendre différents chemins aboutissant à des états différenciés distincts. *(Image : http://placementmodule.files.wordpress.com/2012/01/epigenetic_landscape.jpg)*

En effet, une question essentielle était de comprendre comment la diversité cellulaire des organismes multicellulaires peut-elle être mise en place à partir d'une cellule unique, lorsque toutes les cellules contiennent le même génome ? La différenciation cellulaire est le résultat de l'expression différentielle des gènes. Au cours des divisions mitotiques, les cellules filles héritent généralement non seulement des gènes, mais aussi de leur état d'activité, qui lui n'est pas codé par la séquence d'ADN identique dans toutes les cellules. Il semble alors nécessaire de faire intervenir des facteurs extra-génomiques pour expliquer l'expression différentielle des gènes qui est, entre autres, à l'origine du processus de différenciation au cours du développement embryonnaire. L'étude de ces mécanismes constitue le domaine de l'épigénétique, qu'Holliday associa en 1987 aux situations où des changements dans l'activité des gènes résultaient de différences dans la méthylation de l'ADN (Holliday, 1987). La définition communément utilisée de nos jours fait référence à « l'étude des changements héritables dans l'expression des gènes qui n'impliquent pas de changement de la séquence d'ADN » (Riggs and Russo, 1996). Le concept d'héritabilité permet de bien distinguer l'épigénétique des changements temporaires d'expression des gènes issus de la signalisation cellulaire. Ces modifications sont principalement, bien que pas exclusivement, des modifications dans l'organisation de la chromatine, substance de base des chromosomes (Flemming, 1882). Les modifications de la chromatine, connues pour leur potentielle influence sur l'expression des gènes, font en particulier intervenir la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones, composants protéiques majeurs de la chromatine, la présence de variants de ces histones dans la chromatine ou même la position dans le noyau (Figure 5). Le domaine de l'épigénétique permet notamment d'expliquer le développement embryonnaire via une régulation de l'expression des gènes dans les différents tissus, mais également les différences phénotypiques observées suite à des stimuli environnementaux chez certains jumeaux monozygotes, qui pourtant possèdent un génome identique.

L'étude de la chromatine constitue un enjeu central pour notre compréhension de l'expression différentielle des gènes et le maintien de leur expression, en particulier au cours du développement embryonnaire. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse au cours duquel j'ai cherché à comprendre l'importance de variants protéiques d'un composant majeur de la chromatine : l'histone H3. Ces variants, tels H3.2 et H3.3, qui ne possèdent que quatre acides aminés de différences, sont-ils interchangeables ? Ou ont-ils chacun un rôle et une importance fondamentale au cours du développement ?

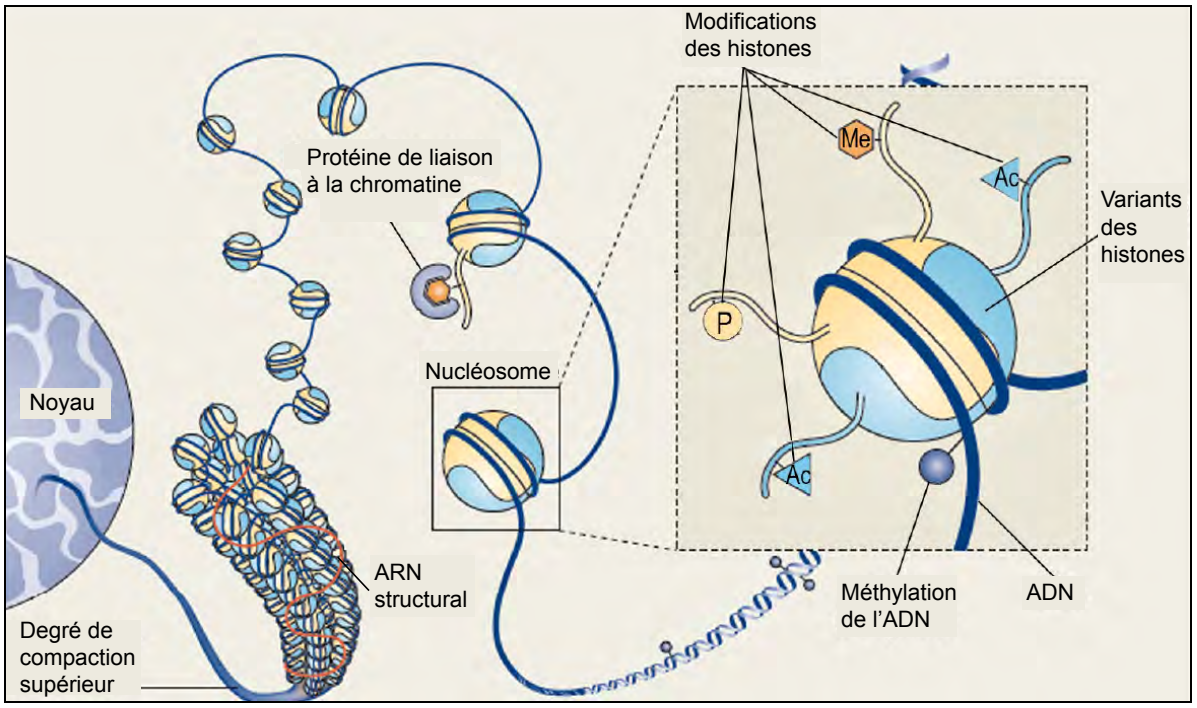


Figure 5 : Représentation de marques potentiellement épigénétiques portées par la chromatine
A tous les niveaux d'organisation de la chromatine, de l'ADN au nucléosome jusqu'à la position dans le noyau, les marques portées par l'organisation en chromatine contribuent à réguler l'expression des gènes via l'accessibilité et la dynamique du génome. *Image modifiée d'après* (Probst et al., 2009).

Ainsi, dans mon manuscrit de thèse, je décrirai dans un premier temps le développement embryonnaire de l'amphibien *Xenopus laevis* qui fut un animal modèle de choix au cours de mon doctorat. Je m'attacherai dans une deuxième partie à introduire la chromatine comme vecteur d'information potentiellement épigénétique dont la régulation est importante au cours du développement. Dans une troisième partie, je décrirai plus en détail l'histone H3, ses variants et différentes voies d'assemblages, afin d'introduire de façon précise les protéines auxquelles je me suis particulièrement intéressée tout au long de ma thèse. Ainsi, je vous présenterai mes résultats concernant l'importance de ces variants d'histone et leur incorporation au cours du développement vertébré chez le Xénope. Je discuterai finalement mes résultats en lumière des connaissances actuelles sur le domaine de la chromatine et leur importance au cours du développement.

INTRODUCTION

I. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *XENOPUS LAEVIS*

Les acquis de la biologie du développement sont associés à des études expérimentales réalisées sur des embryons de différentes espèces modèles. Il s'agit notamment du nématode *C. elegans*, de la drosophile *D. melanogaster*, de l'oursin *P. lividus*, du poisson zèbre *D. rerio*, de l'amphibien *X. laevis*, du poulet *G. gallus* ou encore de la souris *M. musculus*. Depuis le début du 20ème siècle, les études d'embryologie expérimentale ainsi que l'essor de la microscopie et des méthodes génétiques et biochimiques ont permis une analyse plus fine des processus cellulaires gouvernant le développement embryonnaire. Ces années de recherche soulignent notamment que, du nématode à l'homme, ces processus reposent sur des activités fondamentales conservées.

Dans ce premier chapitre, je m'appliquerai à présenter les données actuelles concernant le développement embryonnaire vertébré grâce à un modèle amphibien de choix, *Xenopus laevis*, espèce modèle que je présenterai brièvement dans une première sous partie. Je présenterai par la suite l'ovogenèse, puis les cinq étapes clés du développement embryonnaire : la fécondation, la segmentation, la gastrulation, et enfin la neurogenèse / organogenèse.

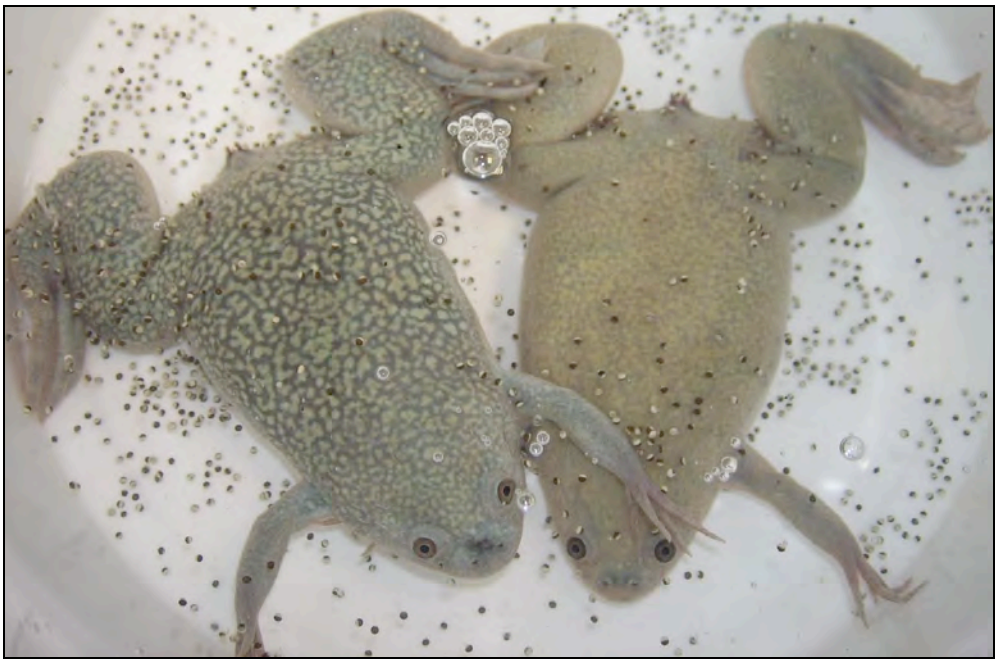


Figure 6 : La grenouille *Xenopus laevis*
Photo de deux femelles *Xenopus laevis* en train de pondre des centaines d'œufs après stimulation de la ponte par injection hormonale. *Photo prise par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

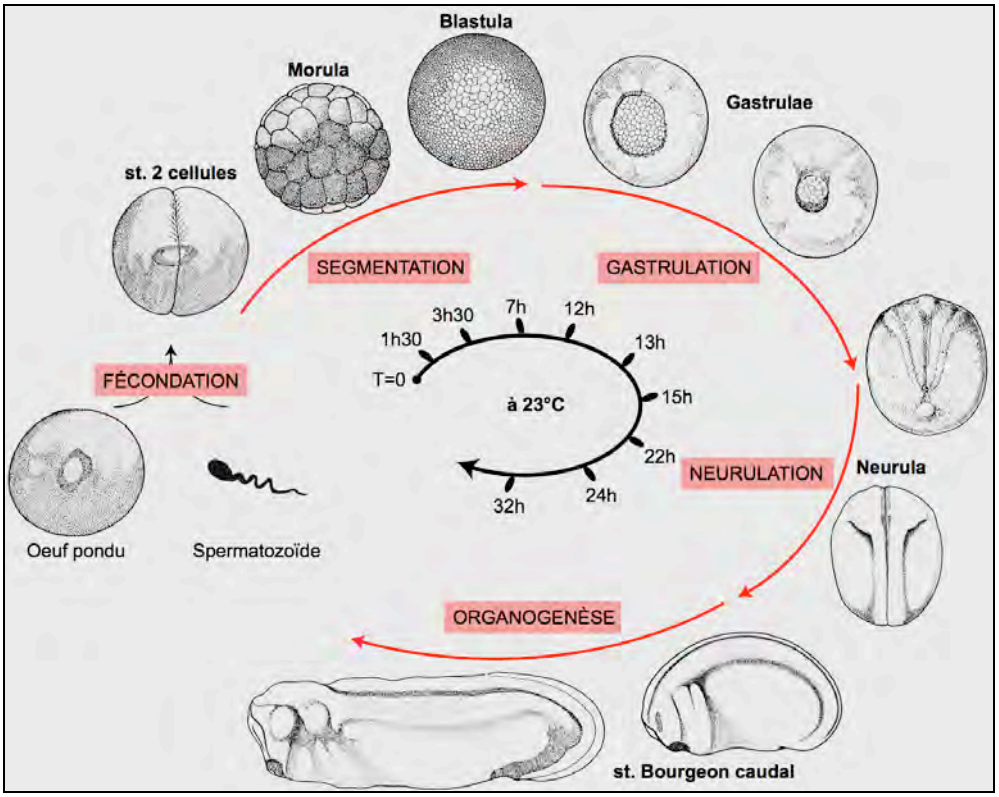


Figure 7 : Développement précoce du *Xenopus laevis*
Représentation schématique du développement précoce de *X. laevis* : ses différentes étapes de la fécondation à l'organogenèse. Le temps nécessaire pour atteindre les stades indiqués après fécondation (T=0) à température ambiante (23°C) est indiqué au centre. *Images des embryons d'après* (Nieuwkoop and Faber, 1994).

1. Le modèle *Xenopus laevis*

L'amphibien le plus utilisé dans les laboratoires est *Xenopus laevis* ou Xénope du Cap, d'origine africaine. Il s'agit d'un amphibien anoure, c'est à dire sans queue contrairement aux urodèles tel que le triton. Cette espèce s'est initialement répandue dans les laboratoires grâce à son usage pour les diagnostics de grossesse, avant d'être par la suite remplacée par les tests immunochromatographiques actuels. En effet, une hormone présente dans l'urine des femmes enceintes, la gonadotropine chorionique, a pour effet de déclencher la ponte chez les femelles Xénope. Ce test était commun dans les années 1940 sous le nom de test de Hogben (Hogben, 1946).

Ainsi introduit en Europe et Amérique du Nord, *X. laevis* fut alors utilisé par les biologistes dans les études des sciences du vivant (Gurdon and Hopwood, 2000). Cet amphibien présente en effet plusieurs avantages, en particulier en biochimie et en biologie du développement. Il peut se reproduire toute l'année, souffre rarement de maladies et est facile à entretenir en laboratoire. Mais son succès comme modèle expérimental est principalement dû au fait que ses œufs sont de grande taille et pondus en très grande quantité (Figure 6). Ils contiennent toutes les réserves nécessaires au développement précoce qui peut se réaliser dans un milieu aquatique sans apport alimentaire de la mère. Grâce à ce développement externe et à la taille de l'œuf (1 à 2mm), l'observation macroscopique et continue des différentes étapes de l'embryogenèse ainsi que la manipulation des embryons sont en effet grandement facilitées.

L'utilisation d'œufs ou d'extraits d'œufs de *X. laevis*, qui fournissent un système *ex vivo* facile à manipuler, permet l'étude du cycle cellulaire ainsi que différents mécanismes tels que la réplication, la réparation ou encore la traduction. Celle-ci a notamment permis d'identifier le moteur moléculaire permettant l'entrée en mitose, le *M-phase Promoting Factor* (MPF) (Masui and Markert, 1971), de découvrir la transmission maternelle de l'ADN mitochondrial (Dawid, 1966), ainsi que la première aquaporine, protéine spécialisée dans le transport de molécules d'eau à la surface des membranes plasmiques (Preston et al., 1992).

Les différentes étapes du développement embryonnaire du *X. laevis* sont très bien documentées (Nieuwkoop and Faber, 1956) (Figure 7). Grâce à cette base et en exploitant les possibilités de manipulation des embryons, de nombreuses approches techniques ont permis d'aborder ces étapes au niveau mécanistique. C'est ainsi que la technique de transfert nucléaire initiée chez la grenouille léopard *Rana pipiens* (Briggs and King, 1952), a pu être adaptée chez le Xénope et permettre le clonage du premier vertébré à partir de cellules différenciées (Gurdon, 1962; Gurdon and Uehlinger, 1966) (Figure 8). Cette révolution technique a permis d'affirmer sans équivoque que la différenciation cellulaire peut se produire sans inactivation irréversible ou perte de matériel génétique.

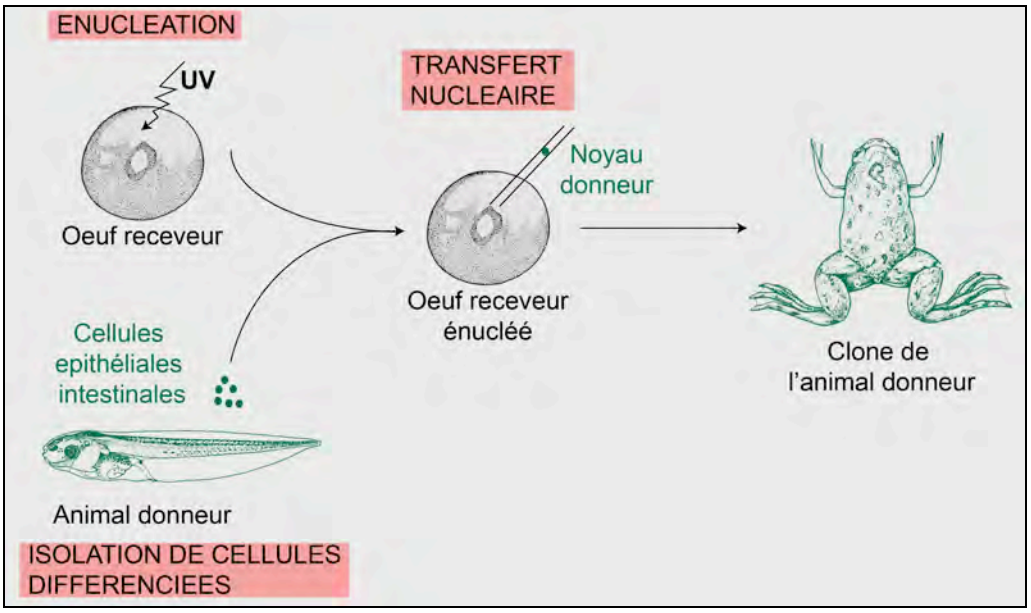


Figure 8 : Principe du clonage par transfert nucléaire chez *X. laevis*
Clonage par transfert nucléaire, à partir de cellules différenciées, établi pour la première fois chez un vertébré en 1962 grâce aux expériences de John Gurdon chez le *Xenopus laevis* (Gurdon, 1962; Gurdon and Uehlinger, 1966). *Images des animaux d'après* (Nieuwkoop and Faber, 1956).

C'est à partir de ces années que le Xénope est progressivement devenu un modèle de choix pour les biologistes du développement et que les outils se sont progressivement développés. L'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* (Hemmati-Brivanlou et al., 1990; Frank and Harland, 1991; Harland, 1991) ou d'immunohistochimie (Dent et al., 1989; Hemmati-Brivanlou et al., 1990) sur embryons entiers permettent de visualiser le patron d'expression de transcrits ou protéines au cours du développement. De plus, la fonction des gènes peut être aisément analysée par microinjection des embryons. Des expériences de surexpression par injection d'ARNm afin de comprendre leurs fonctions cellulaires peuvent être réalisées. Inversement, la perte de fonction par injection d'ARNm codant pour des formes à effet dominant négatif a notamment permis de démontrer l'importance de la voie de signalisation FGF dans la formation du mésoderme (Amaya et al., 1991). L'injection d'oligonucléotides antisens, bloquant spécifiquement la traduction d'ARNm cibles, a permis de grandes découvertes tel que le rôle de la β-caténine dans la voie Wnt (Heasman et al., 2000). Cette technique fut récemment améliorée par l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos qui sont plus stables et actuellement largement utilisés (Heasman et al., 2000; Heasman, 2002). Ainsi, la conservation des principaux processus de développement avec les mammifères fait de la recherche sur le Xénope un outil puissant pour comprendre le développement et les maladies humaines.

Il faut cependant noter que *Xenopus laevis* présente certaines caractéristiques limitantes pour des études génétiques. Il est en effet pseudo-tétraploïde (36 chromosomes) (Tinsley and Kobel, 1996) et possède un temps de génération long de deux ans. Ainsi, pour des études génétiques, il tend à être délaissé au profit de son cousin *Xenopus tropicalis*, qui est lui diploïde (20 chromosomes), se reproduit cinq fois plus vite et permet l'établissement de mutants par mutagenèse chimique (Nakayama and Grainger, 2003). De plus, son génome contenant environ 1,7 milliard de paires de bases (pb) et 24 000 gènes est maintenant entièrement séquencé (Hellsten et al., 2010).

2. L'ovogenèse

Le développement embryonnaire est fortement conditionné par la structure du gamète femelle, car c'est lui qui contient, hormis le génome paternel et les centrioles apportés par le spermatozoïde, tous les éléments nécessaires au développement du futur embryon. On appelle ovogenèse l'ensemble des processus qui conduit à la production de l'ovocyte haploïde et fécondable, il s'agit donc en particulier de la méiose, de l'accumulation des réserves (ou vitellogenèse) et de la formation des enveloppes le protégeant.

Le gamète femelle se différencie dans l'ovaire à partir de cellules en multiplication appelées ovogonies, qui sont elles-mêmes issues de cellules germinales primordiales mises en place dès le début du développement embryonnaire. Après un certain nombre de mitoses, chaque ovogonie entre en méiose, ce qui les transforme en ovocytes primaires, bloqués en prophase de première division méiotique. Au cours du processus de vitellogenèse, ces ovocytes primaires s'entourent d'une enveloppe vitelline et accumulent des réserves. Ce sont ces réserves qui permettront un développement externe et autonome, et leur nature comme leur répartition toutes deux conditionnent le développement ultérieur de l'embryon.

Pendant ce blocage en prophase I, on distingue une phase de prévitellogenèse (ou petit accroissement), qui s'étend sur environ deux ans, et une phase de croissance d'environ 1 an, la vitellogenèse proprement dite (Figure 9). Les réserves accumulées sont à la fois d'origine endogène, c'est à dire élaborées par l'ovocyte lui-même, et d'origine exogène, prélevées chez la femelle et accumulées par l'ovocyte.

En effet, au cours de la vitellogenèse, l'ovocyte primaire accumule une quantité importante de matériel nécessaire au développement futur de l'embryon. Il s'agit notamment d'ARN, de protéines, et de réserves énergétiques sous forme de vitellus qui ont pour effet une augmentation considérable de la taille de la cellule : l'ovocyte primaire en début de vitellogenèse mesure 50μm de diamètre, tandis qu'il atteint environ 1,2mm en fin de croissance. Ce sont ces critères de taille et également de pigmentation qui permettent de définir six stades au cours de l'ovogenèse, ou stades Dumont (Dumont, 1972) (Figure 9).

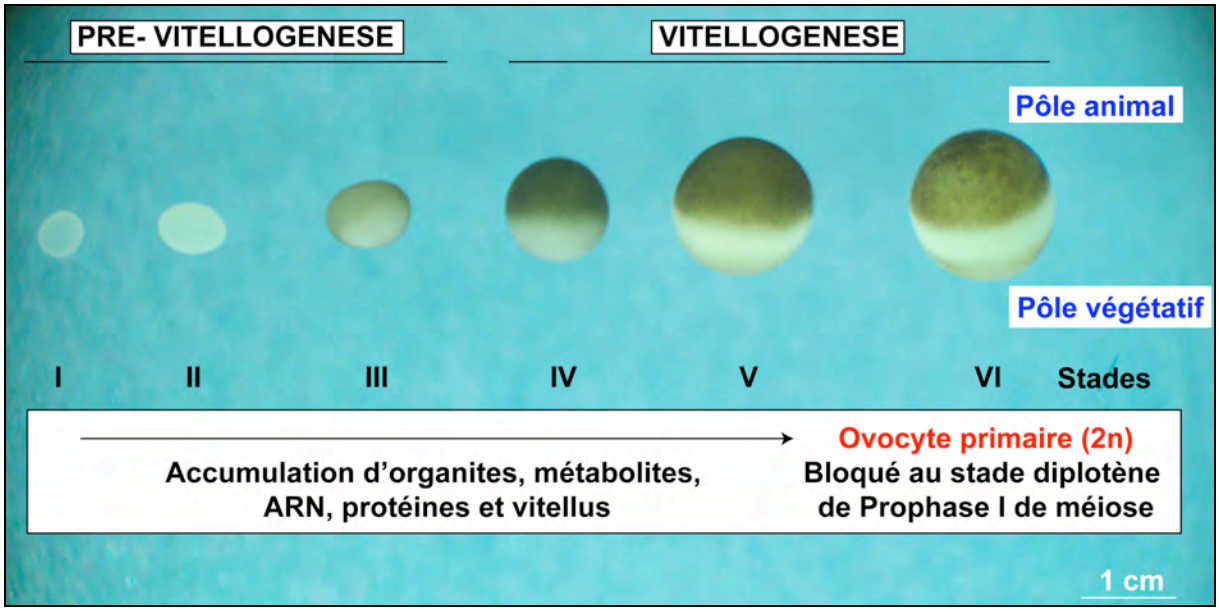


Figure 9 : Les différents stades de la vitellogenèse
Photo d'ovocytes à différents stades au cours de la vitellogenèse (Stades Dumont de I à VI). Ces stades sont définis en fonction de la taille et la pigmentation de l'ovocyte. En effet, au cours de cette phase, on peut distinguer à la fois un accroissement de la taille de l'ovocyte qui accumule des réserves, ainsi que la mise en place de la polarité animale – végétative visible par la pigmentation plus intense du pôle animal. A la fin de ce processus, l'ovocyte primaire (2n) a accumulé toutes les réserves nécessaires et est prêt à être maturé. *Photo prise par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

a. Les réserves endogènes

Pour permettre la synthèse de protéines au cours du développement précoce, les ovocytes doivent en particulier accumuler un grand stock de ribosomes, d'ARN messagers et d'ARN de transfert. Pour cette raison, la batterie de gènes codant pour les ARN ribosomiques est exceptionnellement amplifiée en de nombreuses copies supplémentaires sous forme d'ADN circulaire extrachromosomique (Brown, 1967; Brown and Dawid, 1968; Gall, 1968) qui se dispersent pour former des milliers de nucléoles dans le noyau de l'ovocyte, plus souvent dénommé vésicule germinative (VG). A ce stade, les quatre chromatides de chaque paire d'homologue s'associent pour former une structure appelée bivalent, caractéristique de la prophase méiotique. Les chromosomes restent cependant actifs pendant l'ovogenèse et présentent ainsi un grand nombre de boucles de chromatine protubérantes qui sont le siège de transcription massive aboutissant à ce stock massif d'ARNm. En raison de cette apparence, on les appelle chromosomes plumeux, ou en « écouvillon » (Flemming, 1882; Rückert, 1892; Müller, 1974).

Après fécondation de l'ovocyte, les premières étapes de développement consistent en une série de divisions rapides sans transcription zygotique significative jusqu'au stade 4096 cellules (12 cycles cellulaires). Ainsi, au cours de l'ovogenèse, l'ovocyte doit préparer un stock de toutes les protéines nécessaires à la formation de la chromatine lors de la réplication de l'ADN. Il s'agit en particulier des protéines histones, composants protéiques

majeures de la chromatine, dont la synthèse est généralement couplée à la synthèse d'ADN (Marzluff et al., 2008). Or, les premiers cycles de développement sont très courts et le grand nombre de cellules générées engendre une demande très forte en histones. Ainsi, une grande partie des histones sont synthétisés au cours de l'ovogenèse et stockées en très grand nombre sous forme de protéines, principalement dans le noyau des ovocytes (Adamson and Woodland, 1974; Bonner, 1975; Adamson and Woodland, 1977; Woodland and Adamson, 1977; Kleinschmidt and Franke, 1982). Il en résulte un pool nucléaire d'histone en excès d'environ 1000 fois par rapport à la quantité d'ADN présente dans l'ovocyte (Kleinschmidt and Franke, 1982). Cet approvisionnement en protéines histones est complété par la stabilisation d'ARNm codant les histones qui seront traduits lors de la maturation de l'ovocyte (Woodland, 1980; Wang et al., 1999). Ces importantes réserves d'histones ont fait de l'œuf de Xénope un modèle de choix pour étudier les histones ainsi que les protéines qui leur sont associées. Ainsi, ce système permit l'identification de la première protéine « chaperon » d'histones, la nucléoplasmine, représentant l'une des protéines les plus abondantes dans les ovocytes de Xénope (Laskey et al., 1978).

b. Les réserves exogènes

Pendant cette phase de croissance, l'ovocyte acquiert également des réserves exogènes qui permettront à l'embryon de se développer en l'absence de ressources nutritives externes jusqu'au stade larvaire. Ces réserves se confondent essentiellement avec le vitellus, qui s'accumule dans le cytoplasme de l'ovocyte sous forme d'agrégats constitués de protéines et de lipides appelés plaquettes vitellines. Celles-ci ont pour précurseur la vitellogénine, qui n'est pas fabriquée par les ovocytes eux-mêmes (Wallace et al., 1972) : sous l'influence d'œstrogènes sécrétés par les cellules folliculaires entourant l'ovocyte, ce sont les hépatocytes du foie maternel qui synthétisent et secrètent la vitellogénine, qui est alors transportée par la circulation sanguine jusqu'à l'ovaire (Wallace and Dumont, 1968; Wallace and Jared, 1969). Elle se lie à la membrane plasmique de l'ovocyte au niveau de son récepteur, une protéine de la famille des *very low density lipoproteins receptors* (VLDLR) (Opresko and Wiley, 1987; Okabayashi et al., 1996). Le complexe est intégré dans l'ovocyte par endocytose et est transféré dans les lysosomes au niveau desquels la vitellogénine est libérée de son récepteur et clivée en deux protéines : la phosvitine, une protéine phosphorylée, et la lipovitelline, une lipoprotéine (Redshaw and Follett, 1971; Bergink and Wallace, 1974). Ces protéines sont ensuite concentrées et déshydratées pour constituer les plaquettes vitellines qui s'accumulent dans l'ovocyte au cours de la phase de vitellogenèse à laquelle elles donnent son nom, le vitellus représentera alors plus de 50% du volume de l'ovocyte et 80% de ses réserves protéiques (Wallace et al., 1972).

c. L'hétérogénéité des réserves

Ces réserves exogènes et endogènes qui s'accumulent dans l'ovocyte se distribuent de façon hétérogène dans le cytoplasme, ce qui conduit à la formation de deux gradients : le gradient vitellin et le gradient de ribonucléoprotéines, qui constituent une polarité pôle animal – pôle végétatif (Figure 10).

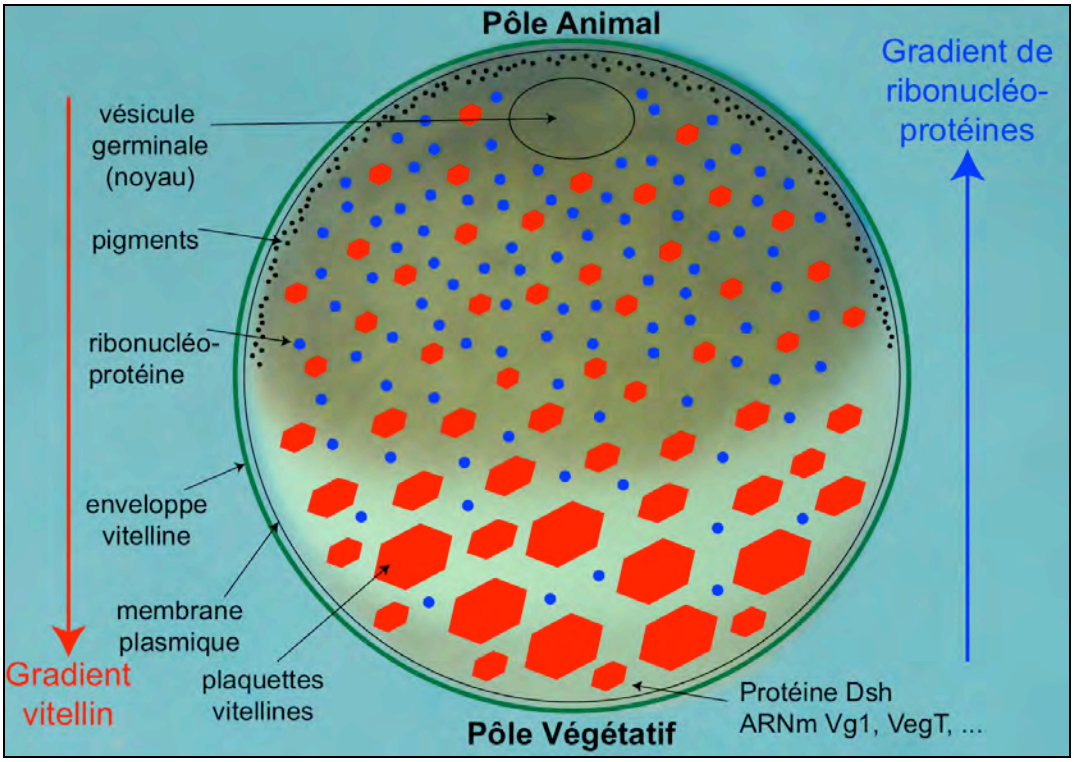


Figure 10 : Représentation schématique de la structure hétérogène de l'ovocyte
Représentation d'une coupe passant par les pôles animal et végétatif, sur fond d'une photo d'ovocyte primaire *(Photo prise par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218)*. Les gradients vitellin (rouge) et de ribonucléoprotéines (bleu) sont schématisés. Les granules pigmentaires sont concentrés au niveau du cortex du pôle animal tandis que certains déterminants cytoplasmiques tels que les ARNm Vg1 et VegT sont au niveau du pôle végétatif. *Schéma inspiré de* (Darribère, 2002).

Les plaquettes vitellines de taille variable qui s'accumulent dans l'ovocyte au cours de la vitellogenèse sont redistribuées lors de mouvements cytoplasmiques : les plaquettes incorporées dans la région opposée au noyau demeurent sur place et se concentrent tandis que celles dans la région du noyau se déplacent vers le centre de l'ovocyte (Danilchik and Gerhart, 1987). Il s'en suit ainsi la mise en place d'un gradient de vitellus qui est minimal au pôle animal de l'ovocyte, et maximal au pôle végétatif. Ainsi, à la fin de la vitellogenèse, 75% du vitellus est concentré dans l'hémisphère végétatif. Il faut également noter qu'il existe aussi un gradient d'ARN ribosomaux contenus dans les sous unités ribosomales (ribonucléoprotéines) opposé à celui du vitellus.

La polarité Animal-Végétatif se manifeste en réalité très tôt au cours de l'ovogenèse. Entre les stades II et IV de l'ovogenèse, une classe d'ARNm parvient au cortex végétatif : elle comprend en particulier *Vg1*, un facteur de croissance de la famille TGF-β (*Transforming Growth Factor β*) (Melton, 1987), et *VegT*, un facteur de transcription à boîte T (Zhang and King, 1996), ces facteurs jouant par la suite un rôle essentiel dans la formation des tissus endomésodermiques dont nous rediscuterons (Heasman, 2006a). De plus, alors que l'ARNm de *Dishevelled* (Dsh), protéine impliquée dans l'activation de la voie de signalisation Wnt, est distribué de façon homogène dans l'ovocyte (Sokol et al., 1995), la protéine Dsh s'accumule spécifiquement au niveau du cortex végétatif (Miller et al., 1999; Tadjuidje et al., 2011). La présence de la protéine Dsh maternelle au niveau du pôle végétatif sera impliquée au moment de la fécondation, dans la détermination de l'axe dorso-ventral (DV) (Sokol et al., 1995; Miller et al., 1999). Dès le stade IV, l'asymétrie est renforcée par le positionnement sous le pôle animal de granules pigmentaires, la vésicule germinative se déplace vers le cortex animal tandis que les plaquettes vitellines remplissent progressivement l'hémisphère végétatif (Dumont, 1972).

La distribution asymétrique du vitellus et de certains ARNm ou protéines maternels conduira à la formation d'un œuf dit hétérolécithe, dont la segmentation après fécondation produira des cellules inégales. En effet, elles ne contiendront pas toutes la même information maternelle, ou déterminants cytoplasmiques, ce qui contribuera à leur détermination. Ainsi, l'axe Animal – Végétatif est établi très tôt, et correspond approximativement à la future polarité antéropostérieure de l'embryon.

d. La maturation de l'ovocyte

Au terme de sa croissance, l'ovocyte primaire de stade VI ou ovocyte immature est toujours bloqué en prophase de première division de méiose. Ce blocage est levé par la progestérone synthétisée par les cellules folliculaires environnantes. Cette synthèse a lieu en réponse à la sécrétion de gonadotropines par l'hypophyse au moment de l'ovulation ou, expérimentalement, par l'injection de l'hormone Gonadotropine Chorionique humaine (hCG) dans les sacs lymphatiques dorsaux.

La progestérone agit localement sur les ovocytes en activant des voies de signalisation qui ont pour conséquence l'activation du *M-phase ou Maturation Promoting Factor* (MPF) (Masui and Markert, 1971; Smith and Ecker, 1971), complexe composé de la kinase cdc2 (Dunphy et al., 1988; Gautier et al., 1988) et de la cycline B (Gautier and Maller, 1991). L'activation du MPF est requise pour la maturation méiotique et repose sur la conversion d'un stock de pré-MPF inactif en stock de MPF actif (Masui and Markert, 1971). En effet, en

prophase, le complexe est déjà présent mais maintenu sous une forme inactive par deux phosphorylations inhibitrices sur la Thréonine 14 et la Tyrosine 15 de la kinase cdc2 (Ferrell et al., 1991; Jessus et al., 1991; Posada et al., 1991) (Figure 11).

En réponse à la stimulation hormonale, la phosphatase Cdc25 est activée et permet la déphosphorylation de cdc2, provoquant ainsi l'activation brutale du stock de pré-MPF en MPF actif (Gautier et al., 1989; Strausfeld et al., 1991) (Figure 11). L'activation de Cdc25 dépend de la Polo-like kinase Plk1 qui n'est exprimée dans les ovocytes qu'à partir du stade V (Karaiskou, 2004), empêchant les ovocytes trop précoces d'être sensibles à la progestérone. L'activation du MPF induit la rupture de la vésicule germinative ou *Germinative Vesicle BreakDown* (GVBD), suivie de la formation du fuseau de métaphase I et la condensation des chromosomes via en particulier la phosphorylation de l'histone H1 par cdc2 (Lohka et al., 1988). Après dégradation de la cycline B (Murray et al., 1989), l'ovocyte termine sa première division de méiose et se divise alors de manière asymétrique : une grosse cellule contenant la quasi totalité du cytoplasme, l'ovocyte secondaire ; et une petite cellule, le premier globule polaire qui est expulsé au niveau du pôle animal provoquant l'apparition d'une tache dépigmentée (Rzehak, 1972) (Figure 11).

En réponse à la progestérone, les ARNm du proto-oncogène c-mos, un activateur de la voie de signalisation MAPK, sont polyadenylés, ce qui favorise leur traduction (Gebauer et al., 1994; Sheets et al., 1995). La protéine c-mos joue un rôle majeur dans la maturation méiotique, en particulier pour empêcher une phase S intermédiaire (Tachibana et al., 2000) avant que l'ovocyte entre dans la deuxième division de méiose. Le fuseau de métaphase II se forme mais le niveau d'activité du MPF reste à un niveau haut grâce à l'activité d'un autre facteur, le Facteur Cytostatique (CSF) qui empêche la dégradation de la cycline B (Meyerhof and Masui, 1979), et qui correspond à un complexe de c-mos avec cdk2 (Masui and Markert, 1971) (Figure 11). Cette stabilisation du MPF bloque la cellule en métaphase II, un arrêt caractéristique de l'ovocyte mature qui sera levé par la fécondation. Ce stade est souvent appelé « œuf non fécondé », bien qu'il s'agisse au sens strict d'un ovocyte secondaire arrêté dans la seconde métaphase méiotique.

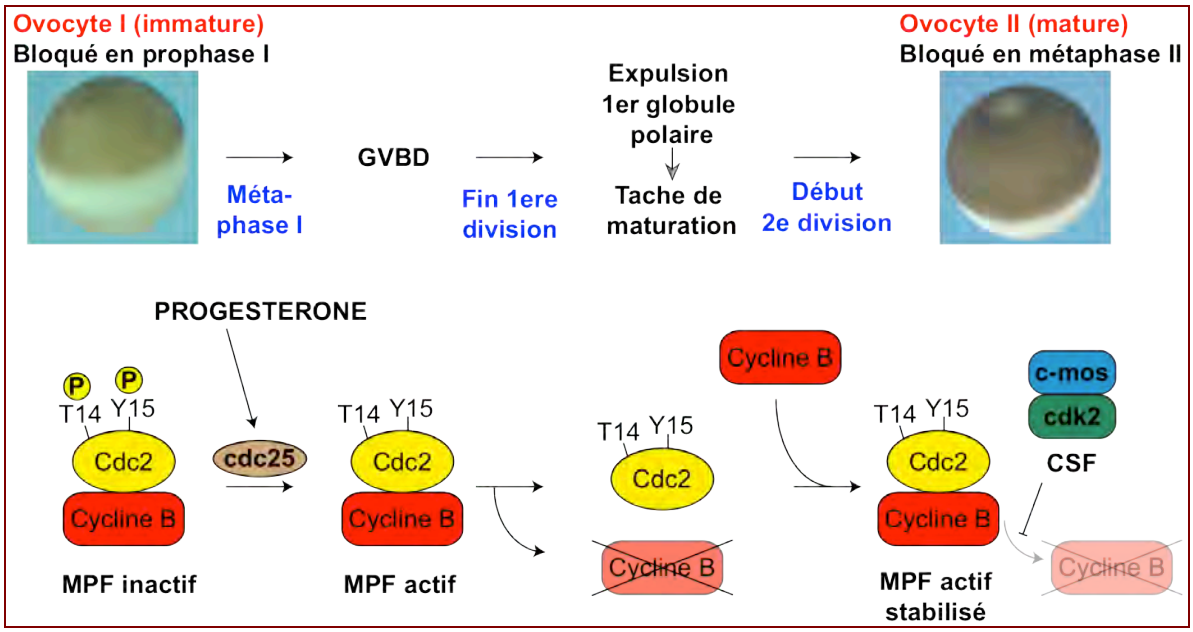


Figure 11 : La maturation de l'ovocyte de Xénope
Schématisation de la maturation d'un ovocyte primaire après stimulation par la progestérone. La déphosphorylation de cdc2 par cdc25 permet l'activation du MPF (Maturation Promoting Factor) qui lève le bloque en prophase I de méiose en induisant la rupture de la vésicule germinative (GVBD). La fin de la 1ère division a lieu après dégradation de la cycline B conduisant à l'expulsion du premier globule polaire et à la formation de la tâche de maturation au pôle animal. Après une nouvelle accumulation de la cycline B, la 2ème division de méiose a lieu. La présence du facteur cytostatique (CSF) empêche la dégradation de la cycline B. Cette stabilisation du MPF bloque l'ovocyte mature en métaphase II en attendant la fécondation. *Photos prises par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

Les ovocytes secondaires se répandent dans la cavité péritonéale par le processus d'ovulation, entrent dans l'oviducte où ils sont enrobés de plusieurs couches d'une gangue de mucus gélatineuse (Bakos et al., 1990; Bonnell and Chandler, 1996) avant d'être pondus par milliers.

3. La fécondation

Dans leur habitat naturel, l'accouplement des grenouilles *Xenopus laevis* est caractérisé par la fécondation externe de centaines d'œufs pondus par la femelle et arrosés au fur et à mesure par le sperme du mâle accroché sur le dos de la femelle. Ainsi, en laboratoire, les ovocytes secondaires pondus après stimulation hormonale des femelles sont fécondés *in vitro* par l'ajout dans le milieu de fragments de testicule contenant et libérant les spermatozoïdes. Ce processus *in vitro* permet une fécondation d'un grand nombre d'ovocytes secondaires simultanément conduisant ainsi à un développement synchrone des embryons. Les interactions du spermatozoïde avec la gangue de mucus puis la membrane vitelline de l'ovocyte sont primordiales car elles confèrent au spermatozoïde la capacité de fusionner avec la membrane de l'ovocyte (Reinhart et al., 1998; Olson and Chandler, 1999). La fécondation conduit alors à la formation d'un œuf fécondé, ou zygote lorsque les deux pronoyaux auront fusionné pour restaurer la diploïdie.

a. La rotation d'équilibration et la prévention de la polyspermie

La fusion des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovocyte résulte en une modification rapide du potentiel de membrane, qui réduit la possibilité de fusion entre un second spermatozoïde et l'ovocyte (Grey et al., 1982). Ceci constitue une première barrière à l'entrée d'autres spermatozoïdes dans l'œuf fécondé (polyspermie).

De plus, la fécondation provoque une libération massive de calcium dans le cytoplasme (Busa and Nuccitelli, 1985), ce qui entraine notamment la destruction du facteur cytostatique (CSF) (Meyerhof and Masui, 1979). Ceci permet la reprise de la méiose avec la progression de la seconde division, entraînant la libération du second globule polaire, et la disparition de la tâche de maturation via l'expansion du pigment dans le cortex au-dessus du noyau. Le calcium provoque également l'exocytose des granules corticaux qui conduit à la libération de leur contenu dans l'espace entre la membrane de l'ovocyte et la membrane vitelline (Grey et al., 1974). Un espace périvitellin est ainsi formé environ une demi heure après la fécondation. Celui-ci permet à l'œuf fécondé de tourner librement sous l'influence de la gravité pour amener l'hémisphère animal au sommet. Cette rotation, avec la disparition de la tâche de maturation, est le premier signe pour l'observateur que l'ovocyte est fécondé.

L'enveloppe vitelline, ainsi distancée de la membrane cellulaire de l'œuf, devient alors l'enveloppe de fécondation, ou chorion. Sa composition est en effet modifiée : des protéases libérées par les granules corticaux inactivent des glycoprotéines qui servent de récepteurs aux spermatozoïdes (Lindsay and Hedrick, 1989; Tian et al., 1997) et des changements de conformation la font durcir (Wolf et al., 1976; Lindsay et al., 2003). Ces deux propriétés de

l'enveloppe de fécondation en font une seconde barrière à la polyspermie (Grey et al., 1976; Stewart-Savage and Grey, 1987).

b. La rotation corticale et la redistribution des déterminants cytoplasmiques

Le point d'entrée du spermatozoïde (ou *sperm entry point* (SEP)) se situe toujours dans la partie animale (pigmentée) de l'œuf car la densité des récepteurs nécessaires à la reconnaissance du spermatozoïde semble y être plus importante (Grey et al., 1982) bien que cela n'ait été formellement démontré chez les amphibiens que chez la grenouille *Rana pipiens* (Elinson, 1975). Il est visible grâce à la formation d'une concentration de pigments à la surface de l'œuf quelques minutes après la fécondation (Palecek et al., 1978). Le SEP est très important car il détermine l'orientation du futur axe dorso-ventral de l'embryon : il marquera le côté « ventral » tandis que le point opposé correspondra au côté « dorsal » (Figure 12).

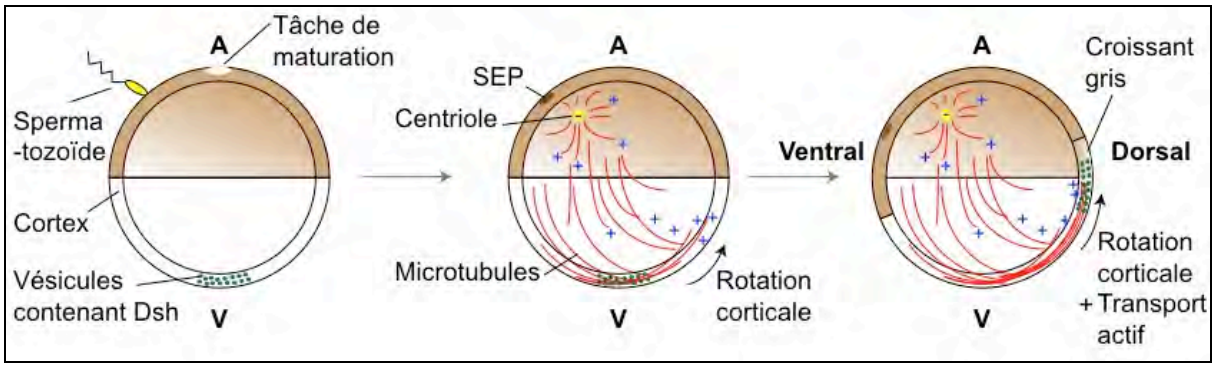


Figure 12 : La rotation corticale et l'établissement de l'axe dorso-ventral
Au cours de l'ovogenèse, des vésicules contenant Dishevelled (Dsh) sont déposées au pôle végétatif (V) de l'ovocyte. Au moment de la fécondation, les centrioles issus du spermatozoïde forment un centre organisateur de microtubules (spermaster) à partir duquel les extrémités « plus » divergent. La rotation corticale et le mouvement actif des vésicules contenant Dsh, les entrainent via le réseau de microtubules vers l'équateur à l'opposé du point d'entrée du spermatozoïde (SEP). Cette région définit alors le côté dorsal de l'embryon visible par la formation du croissant gris. *Modifié d'après* (Weaver, 2004) *et* (Miller et al., 1999).

Le SEP détermine en effet le sens de la rotation du cortex, c'est à dire de la couche du cytoplasme juste au-dessous de la membrane plasmique (Ancel and Vintemberger, 1948; Vincent et al., 1986). Cette rotation corticale d'environ 30° est l'événement fondateur de la polarité dorso-ventrale et commence environ 40 minutes après la fécondation. Elle se manifeste par l'apparition d'un «croissant gris» au niveau équatorial du côté opposé au SEP, où du cortex végétatif clair est amené à recouvrir du cytoplasme pigmenté de la partie animale (Brachet, 1977). La rotation corticale permet le déplacement de déterminants

dorsaux du pôle végétatif vers la région équatoriale au niveau du croissant gris. Le mécanisme de rotation corticale implique notamment une population importante de microtubules, qui polymérisent dans la région du cortex végétatif (Elinson and Rowning, 1988; Rowning et al., 1997) (Figure 12). Certains de ces microtubules polymérisent à partir du centriole issu du spermatozoïde et donc vers le côté opposé du SEP. Ainsi, les extrémités « plus » des microtubules, qui se concentrent au niveau du cortex végétatif, sont dirigées dans le sens du mouvement du cortex (Houliston and Elinson, 1991) (Figure 12).

Cette polymérisation des microtubules est cruciale pour la formation de l'axe dorso-ventral : si elle est bloquée par exemple par exposition d'un œuf aux UV après fécondation, les embryons ainsi formés n'ont pas de structure dorso-antérieure (Elinson and Rowning, 1988). En effet, l'absence de microtubules fonctionnels empêche la rotation corticale et l'activité dorsalisante reste bloquée au pôle végétatif (Marrari et al., 2003). Ainsi, la rotation corticale est primordiale pour l'activité dorsalisante des déterminants cytoplasmiques qui se situent initialement au niveau du pôle végétatif. Mais cette rotation de 30° seule ne peut expliquer leur déplacement de presque 90°. Il fut alors démontré que lors de la rotation, des petites vésicules sont rapidement propulsées le long des microtubules sous-corticaux vers le côté dorsal (Rowning et al., 1997). De plus, l'étude de billes fluorescentes injectées dans le pôle végétatif a pu montrer qu'elles sont transportées d'au moins 60° vers l'équateur. Ainsi, l'hypothèse la plus probable est que la rotation corticale permet également d'aligner les microtubules sous-corticaux, qui assurent ensuite le transport actif des déterminants dorsalisants (Figure 12). Mais quels sont ces déterminants cytoplasmiques dorsalisants ?

La stabilisation de la β-caténine, un facteur de transcription effecteur de la voie Wnt, au niveau de la future partie dorsale de l'embryon est un événement crucial pour la formation de l'organisateur dorsal (Heasman et al., 1994; Larabell et al., 1997). En effet, la déplétion de la β-caténine maternelle conduit à une perte totale de structures dorsales tandis que son expression ectopique au niveau ventral conduit à la formation d'un second axe dorsal. Or, ce n'est pas la β-caténine elle même qui est transportée au niveau dorsal (Marikawa and Elinson, 1999). Il fut alors proposé que c'est l'inhibition spécifique de la *glycogen synthase kinase 3* (GSK-3), un régulateur négatif de la stabilisation de la β-caténine, au niveau dorsal qui permet l'accumulation de la β-caténine (Larabell et al., 1997). En effet, l'enrichissement dorsal de la β-caténine est bloqué par l'expression ectopique de la GSK-3, tandis qu'il est augmenté en présence d'une forme dominante négative. L'inactivation de la GSK-3 requiert la présence de la *GSK-3-binding protein* (GBP) (Yost et al., 1998) et de Dishevelled (Dsh), un composant cytoplasmique de la voie Wnt (Noordermeer et al., 1994) qui interagit directement avec GBP (Salic et al., 2000). L'étude de ces protéines étiquetées GFP montra en effet leur présence dans le cortex végétatif au niveau de petites vésicules qui sont transportées via l'association aux microtubules au moment de la rotation corticale (Miller et

al., 1999; Weaver, 2003). GBP se lie en effet directement à la kinésine, permettant un transport des deux protéines vers l'extrémité « plus » des microtubules (Figure 12).

Ainsi, la β-caténine est stabilisée au côté opposé au SEP et contribue à la formation du centre de Nieuwkoop (Nieuwkoop, 1973; Gerhart et al., 1989), ou centre inducteur dorsal, qui dirigera le développement de la région dorso-antérieure de l'embryon. Il permettra en effet l'induction de l'organisateur de Spemann par l'activation de l'expression de gènes régulateurs du mésoderme dorsal au moment de la gastrulation, que nous verrons plus en détail par la suite.

c. L'amphimixie, ou la fusion des génomes

L'augmentation de calcium intracellulaire après fécondation permet donc à l'ovocyte secondaire de terminer sa méiose, ce qui conduit à l'expulsion du second globule polaire et à la formation du pronoyau maternel haploïde dont les chromosomes se décondensent.

Le génome paternel, quant à lui, doit également se décondenser pour former le pronoyau mâle (Lohka and Masui, 1983; Kline, 1988). En effet, pendant la spermatogenèse, le génome paternel acquiert une organisation extrêmement condensée (Caron et al., 2005). Chez les mammifères et la drosophile, ceci consiste principalement en un remplacement massif des 4 types d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) qui forment l'unité de base de la chromatine, le nucléosome, par des protéines appelées protamines qui permettent une condensation massive et globale du génome (Ward and Coffey, 1991; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005). D'autres mécanismes rentrent également en jeu tels que des modifications d'histones, ou l'incorporation de variants d'histones spécifiques dans certaines régions du génome, et ceci participerait à la transmission d'informations épigénétiques au zygote (Boussouar et al., 2008).

Chez le Xénope, la chromatine du spermatozoïde reste organisée autour d'une structure fondamentale similaire à celle des nucléosomes, contenant les histones H3 et H4, mais dont les histones H2A et H2B sont remplacées par des protéines nucléaires spécifiques des spermatozoïdes, des *Sperm-specific Proteins* (SPs) (Mann et al., 1982). Une étape cruciale au moment de la fécondation est donc de décondenser le génome paternel pour qu'il puisse participer à la formation du noyau diploïde du zygote. Ainsi, dans l'œuf fécondé de Xénope, il y a un remplacement massif des protéines SPs du génome paternel par des histones H2A et H2B maternelles pour reformer une structure nucléosomale de la chromatine. Il a notamment été montré grâce à l'étude d'extraits d'œufs de Xénope, que la nucléoplasmine, une protéine acide pouvant lier les histones extrêmement abondante dans les œufs (Mills et al., 1980; Dilworth et al., 1987), est nécessaire et suffisante pour cette étape clé de décondensation du génome paternel (Philpott et al., 1991; Philpott and Leno, 1992).

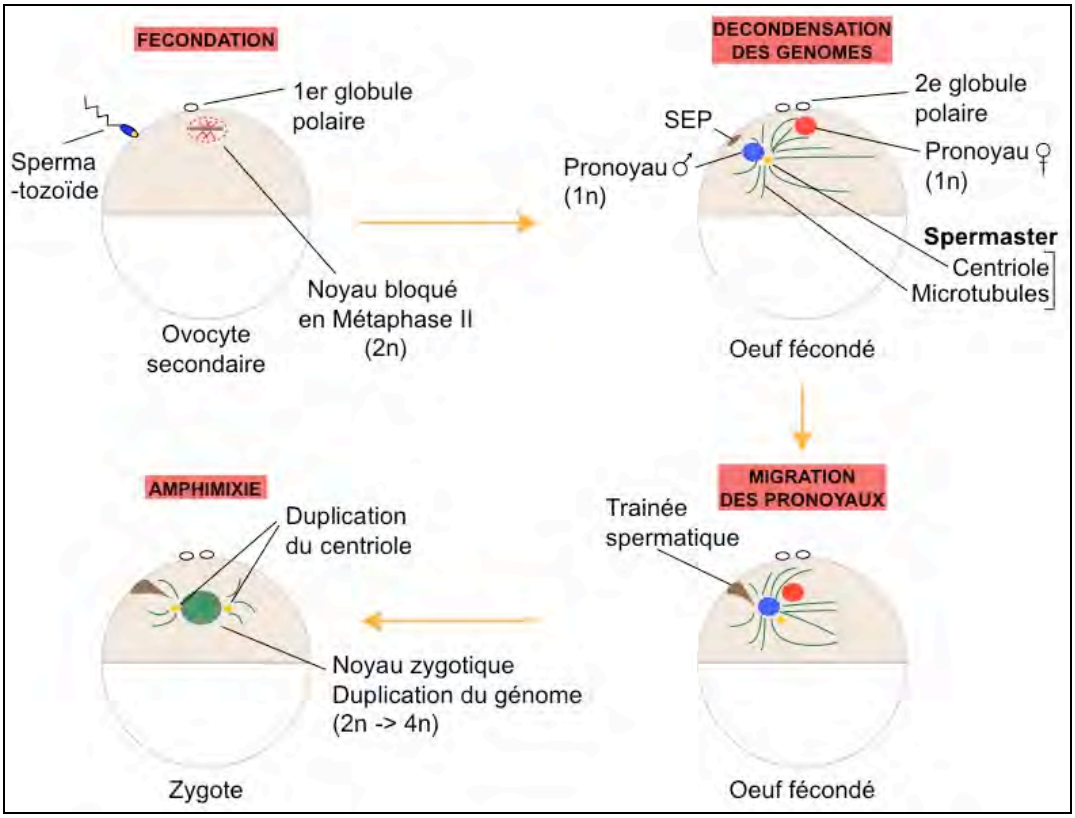


Figure 13 : De la fécondation à l'amphimixie
Après la fécondation, le noyau de l'ovocyte termine sa méiose avec expulsion du 2e globule polaire puis décondensation. Le noyau du spermatozoïde et son centriole proximal pénètrent dans l'œuf fécondé. Le génome paternel est très fortement décondensé tandis qu'un spermaster se forme à partir du centriole avec formation de microtubules. Ces microtubules permettent la migration des deux pronoyaux qui se rencontrent au milieu de l'œuf dans l'hémisphère animale. La fusion des pronoyaux (amphimixie) est suivie de la duplication du centriole et des génomes qui se préparent pour la première division mitotique. *Inspiré de* (Stewart-Savage and Grey, 1982).

Seul le génome et le centriole proximal du spermatozoïde pénètrent dans le cytoplasme ovocytaire. Le centriole paternel est très important car il permet la formation du spermaster (Félix et al., 1994), visualisé pour la première fois par Oscar Hertwig en 1877 chez l'oursin (Hertwig, 1891). Il s'agit de la formation d'un aster de microtubules autour du centriole (Figure 13). En plus de participer à la rotation corticale, ces microtubules permettent de façon très importante aux deux pronoyaux de migrer l'un vers l'autre avant de fusionner et de s'engager dans la première division mitotique (Maller et al., 1976; Klotz et al., 1990; Félix et al., 1994). Le déplacement du pronoyau mâle s'accompagne d'une trainée spermatique constituée de grains de pigments qui pénètrent dans le cytoplasme de l'œuf (Stewart-Savage and Grey, 1982). La fusion des deux pronoyaux, qui rétablit l'état diploïde, a lieu environ une heure après la fécondation et constitue l'amphimixie (Stewart-Savage and Grey, 1982) (Figure 13). Le premier fuseau mitotique est mis en place par le spermaster apporté par le pronucléus mâle (Maller et al., 1976). La réplication de l'ADN démarre grâce au stock protéique maternel et la première division peut avoir lieu, environ 90min après la fécondation.

4. La segmentation

Chez le Xénope, il s'agit d'une segmentation totale mais inégale (œuf hétérolécithe), pendant laquelle une succession de divisons fait passer l'œuf de l'état unicellulaire à un état pluricellulaire hautement organisé sans augmentation de taille, la blastula (cycle 12, stade 9).

a. Les premiers cycles : rapides et synchrones

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le premier cycle mitotique est particulièrement long : il dure environ 90min à température ambiante. Il contient en effet des phases G (*gap phase*) atypiques qui sont nécessaires pour les événements uniques à ce cycle cellulaire : la rotation du cortex et la fusion des pronoyaux.

Les onze divisions cellulaires suivantes (cycles 2 à 12) sont des cycles synchrones, courts de 30 minutes, qui segmentent très rapidement l'embryon (Figure 14). Ces cycles cellulaires sont dépourvus de phases G1 et G2, et ne nécessitent pas d'étape de croissance ni de transcription (Newport and Kirschner, 1982a; 1982b). Ainsi, ils reposent entièrement sur les réserves maternelles effectuées pendant l'ovogenèse et la synthèse protéique après maturation. En particulier, ces cycles atypiques semblent être en partie régulés par la synthèse de la cycline B (Murray and Kirschner, 1989), et par la phosphatase Cdc25A, des régulateurs de l'activité du MPF et donc de la mitose. En effet, l'isoforme Cdc25A est spécifiquement traduite 30min après la fécondation et est dégradée à la fin du 12ème cycle (Kim et al., 1999). L'injection de Cdc25A dans des œufs fécondés raccourcit le premier cycle cellulaire et accélère les clivages par rapport à des embryons contrôles. Inversement, les embryons injectés avec une forme dominante négative de Cdc25A présentent une augmentation de la longueur des cycles cellulaires avec un ralentissement du taux de clivage (Kim et al., 1999). De plus, la régulation fine de l'alternance des phases M et S est coordonnée par le recrutement dès la mitose, en vue de la phase S suivante, du complexe protéique *Mini-Chromosome Maintenance* (MCM) (Jares and Blow, 2000; Iwabuchi et al., 2002; Valles et al., 2002), l'hélicase de réplication normalement recrutée en phase G1 (Bell and Dutta, 2002). Ainsi, une régulation fine permet des cycles rapides tout au long de la phase de segmentation (Figure 14).

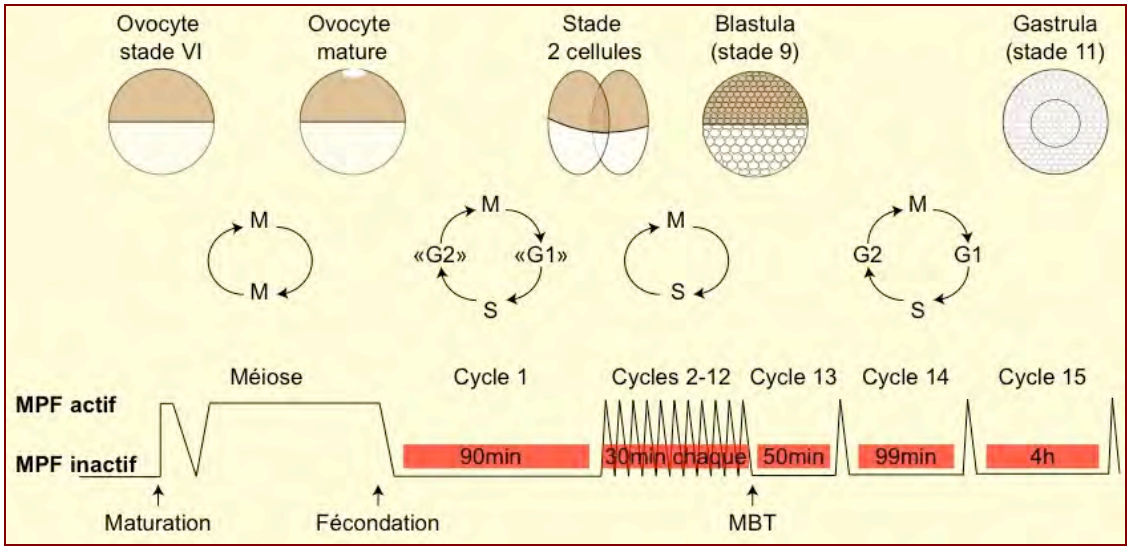


Figure 14 : Les cycles cellulaires au cours du développement précoce
Représentation schématique des cycles cellulaires de l'ovocyte à la gastrula, en fonction de l'activité du MPF. Le premier cycle cellulaire est long de 90 min tandis que les 11 divisions suivantes ne durent que 30min et sont dépourvues de phases G1 et G2. A la MBT, les phases G1 et G2 sont réintroduites et les cycles s'allongent. *D'après* (Murakami, 2004).

b. Divisions totales mais inégales

Le premier plan de segmentation est vertical, méridien dans l'axe animal-végétatif et divise l'œuf en deux cellules de taille identique, appelées blastomères. La deuxième segmentation est aussi verticale, et perpendiculaire à la première (Nieuwkoop and Faber, 1956). Bien qu'identiques en taille, ces quatre blastomères ainsi formés ont une composition moléculaire et des potentialités de développement très différentes. Hans Spemann a en effet montré chez le triton dès 1903 que si l'on isole chacun des blastomères au stade 4 cellules, les blastomères dorsaux contenant le croissant gris poursuivent leur développement et produisent deux embryons, tandis que les blastomères ventraux forment une masse indifférenciée (Spemann, 1903). Ce fut en effet la première preuve de l'existence de déterminants qui contrôlent la réalisation du programme de développement dans la région du croissant gris. Il réalisa alors une autre expérience fondamentale qui consista à ligaturer un œuf fécondé de triton en deux : ainsi l' « hémi-embryon » qui contient le noyau se divise. Si la ligature est relâchée au stade 16 cellules, permettant à un noyau de passer dans la moitié qui en était dépourvue, celui-ci permet le développement d'un embryon entier (Spemann, 1903) (Figure 15). Cette expérience clé, qui fut par la suite répétée chez le Xénope (Newport and Kirschner, 1982a), démontra que les déterminants se trouvent non pas dans les noyaux qui sont génétiquement identiques et capables de diriger un développement harmonieux, mais au niveau du cytoplasme. Ainsi, dès le stade 4 cellules, les blastomères ont des potentialités de développement distinctes.

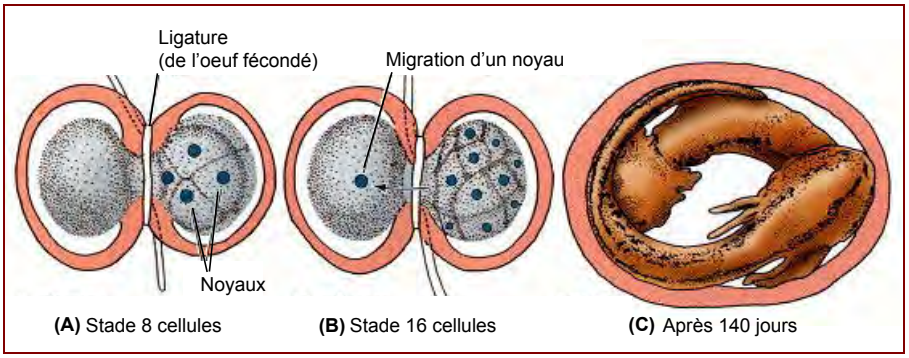


Figure 15 : Démonstration de l'équivalence des noyaux par H. Spemann
Un œuf fécondé de triton est ligaturé et le noyau se retrouve dans une seule moitié de l'embryon. (A) Stade 8 cellules : l'embryon se développe du côté où se trouvait le noyau. (B) Au stade 16 cellules, la ligature est relâchée et un noyau pénètre dans la moitié encore non divisée. (C) Après 140 jours, on peut observer que chaque côté s'est développé en un embryon normal. *D'après* (Gilbert, 2010).

A partir de la troisième division, la segmentation devient inégale. En effet, le troisième plan est horizontal mais passe légèrement au dessus de l'équateur, séparant un étage supérieur de quatre micromères pigmentés et un étage inférieur de quatre macromères riches en vitellus (Nieuwkoop and Faber, 1956). Les divisions suivantes se poursuivent à un rythme soutenu avec une succession de plans de division méridiens et équatoriaux. Au fur et à mesure de la segmentation, se créé une cavité, le blastocèle, au centre de l'hémisphère animal. Ainsi, à la fin du processus de segmentation, l'embryon contenant 4096 cellules est appelé blastula (cycle 12, stade 9) (Figure 16). Le blastocèle procurera l'espace nécessaire aux migrations cellulaires lors de la gastrulation, et empêche toute interaction entre les micromères au pôle animal et les macromères au pôle végétatif.

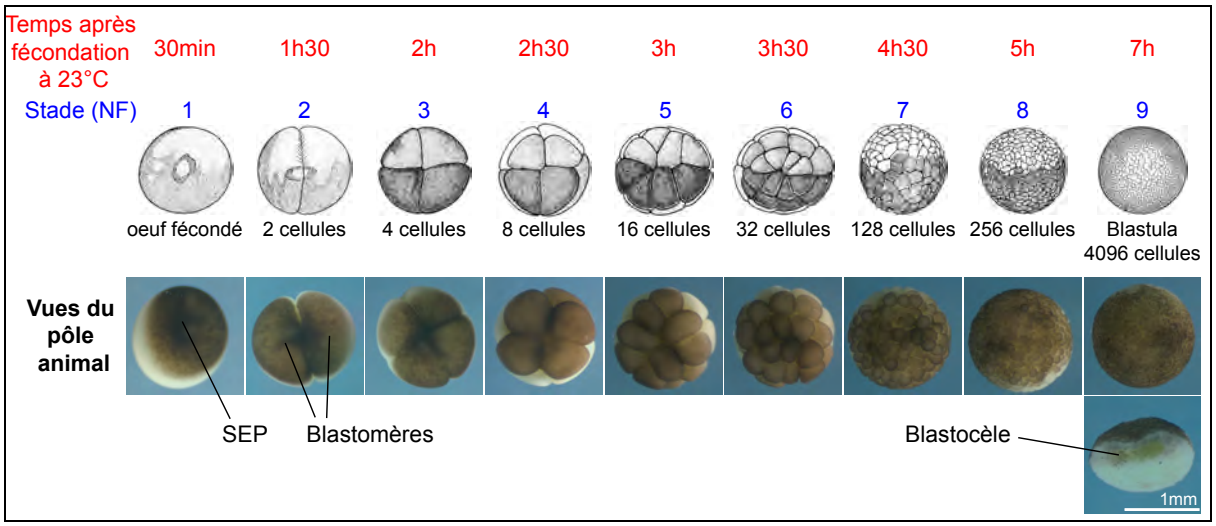


Figure 16 : Segmentation d'un embryon de Xénope
Photos d'embryons au cours de l'étape de segmentation, vus du pôle animal. Les divisions successives sans changement de taille de l'embryon sont observées. Les schémas représentatifs sont issus de la table de développement du Xénope de Nieuwkoop et Faber (stades NF) (Nieuwkoop and Faber, 1956). Au stade blastula, une coupe sagittale montre la cavité qui s'est formée, le blastocèle. SEP = Point d'entrée du spermatozoïde. Echelle = 1mm. *Photos des embryons prises par E. Szenker à l'institut Curie, UMR218.*

c. La Transition Mid-Blastuléenne (MBT) ou la reprise de la transcription zygotique

Alors que le génome zygotique était jusqu'alors silencieux, une transition s'opère au stade blastula où la reprise de la transcription zygotique est observée, il s'agit de la transition mid-blastuléenne (MBT) (Bachvarova et al., 1966; Newport and Kirschner, 1982a; 1982b; Kimelman et al., 1987). Il faut néanmoins noter qu'un processus de transcription zygotique isolé a été observé dès le stade 256 cellules. Il concerne les gènes Xnr5 et Xnr6 (*Xenopus Nodal Related*) au niveau des blastomères dorsaux dont l'expression en réponse au facteur de transcription β-caténine est importante pour le développement de l'embryon (Yang, 2002).

La reprise massive de la transcription zygotique semble être en partie régulée par une déméthylation progressive du génome. En effet, lorsque l'expression de la méthyltransférase xDNMT1 (*DNA MethylTransferase 1*) est affectée par des techniques d'interférence, la déméthylation du génome conduit à l'expression prématurée de gènes mésodermiques (Stancheva and Meehan, 2000; Stancheva, 2002). L'importance de xDNMT1 pré-MBT semble être également reliée à une activité de répression de la transcription de façon indépendante de la méthylation (Dunican et al., 2008).

De plus, pendant la période de segmentation, l'assemblage en chromatine qui est facilité par un stock conséquent d'histones maternelles, semble occuper une position dominante par rapport à la mise en place du complexe d'initiation de la transcription (Prioleau et al., 1994; Almouzni and Wolffe, 1995). En approchant de la MBT, cette balance est inversée en faveur du complexe de transcription au niveau de promoteurs clés, lorsque le stock d'histones maternelles est abaissé et que la synthèse des histones zygotiques devient couplée à la réplication de l'ADN en phase S. Ainsi, la transition mid-blastuléenne correspondrait au moment où le stock d'histones maternelles s'épuise. De plus, la MBT peut être expérimentalement avancée ou retardée en modifiant le rapport chromatine / cytoplasme. En effet, le début de la transcription zygotique peut être observé précocement dans des embryons polyspermiques donc polyploïdes (Newport and Kirschner, 1982a). Inversement, elle est retardée dans un embryon dont le développement a été différé par migration d'un noyau d'un embryon précédemment ligaturé (voir expérience de Spemann, Figure 15) (Newport and Kirschner, 1982a). Ainsi, l'importance de l'épuisement du stock d'histones est en cohérence avec l'hypothèse de Newport et Kirschner proposée en 1982 selon laquelle la MBT serait la conséquence de la titration d'une substance cytoplasmique présente dans l'ovocyte, par l'augmentation exponentielle du matériel nucléaire lors de la segmentation.

La reprise de la transcription zygotique à la MBT s'accompagne de l'acquisition de la motilité cellulaire et d'un changement au niveau des cycles qui deviennent alors plus long et asynchrones : les phases G1 et G2 sont réintroduites (Newport and Kirschner, 1982a). Ainsi,

après la MBT (cycles 13-15), le cycle cellulaire s'allonge de 55 minutes à 4 heures (Figure 14) grâce à la régulation d'une cycline A somatique et du MPF via la kinase inhibitrice Wee1 (Howe et al., 1995; Murakami, 2004), une régulation nécessaire alors que l'embryon subit une transformation morphologique spectaculaire au cours du processus de gastrulation.

La blastula ainsi formée contient deux feuillets embryonnaires : l'ectoderme, au pôle animal au dessus du blastocèle, et l'endoderme riche en vitellus, au pôle végétatif. A ce stade, la transcription zygotique permet d'induire les premières communications cellulaires pour spécifier les cellules fondatrices du troisième feuillet embryonnaire, le mésoderme, qui sera induit dans la zone équatoriale.

d. Induction du mésoderme par les blastomères végétatifs

Bien que composée uniquement d'ectoderme et d'endoderme présomptifs, la blastula contient les cellules fondatrices des trois feuillets embryonnaires fondamentaux qui seront mis en place lors de la gastrulation. Ce sont les expériences réalisées chez l'urodèle *Ambystoma mexicanum* par Pieter Nieuwkoop en 1969 qui ont fourni les premiers indices sur la détermination de ces trois feuillets. Il a en effet isolé et mis en culture les différentes parties de la blastula pour étudier leur destin cellulaire : la calotte animale (au dessus du blastocèle), la zone marginale (au niveau de l'équateur) ou encore les cellules végétatives (en dessous du blastocèle). Ainsi, il a pu observer qu'alors que la calotte animale se différencie en ectoderme et les cellules végétatives en endoderme, la zone équatoriale de la blastula à la limite entre les deux hémisphères se différencie spécifiquement en mésoderme (Nieuwkoop, 1969) (Figure 17). La blastula contient donc les cellules progénitrices des trois feuillets fondamentaux : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

De façon isolée, ni la calotte animale ni l'hémisphère végétatif ne peut former du mésoderme. En revanche, en réunissant les deux fragments en une masse unique, les cellules animales qui correspondent à de l'ectoderme présomptif sont alors induites à former des structures mésodermiques (Nieuwkoop, 1969; 1973) (Figure 17). Ce fut la première démonstration de l'induction du mésoderme par des facteurs provenant des cellules végétatives. De plus, ces expériences démontrèrent que deux types de mésoderme peuvent être induits : du mésoderme ventral ou du mésoderme dorsal (Nieuwkoop, 1969; 1973). Ceci permit d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un deuxième mécanisme d'induction par les cellules végétatives dorsales, une « dorsalisation ».

La preuve de l'existence du « centre de Nieuwkoop » comme inducteur de l'organisateur dorsal (Gerhart et al., 1989) (Figure 17), a été fournie par des expériences de transplantation et de recombinaison à partir d'embryons *Xenopus laevis* au stade 32 cellules. En effet, Gimlich et Gerhart ont montré en 1984 que la transplantation d'une cellule végétative dorsale au niveau ventral d'un autre embryon induit la formation de deux axes

embryonnaires (Gimlich and Gerhart, 1984). Trois ans plus tard, Dale et Slack ont réuni des blastomères végétatifs d'embryons au stade 32 cellules avec des cellules ectodermiques et ont pu confirmer que le blastomère végétatif le plus dorsal est susceptible d'induire la différenciation des cellules animales en tissu mésodermique dorsal (Dale and Slack, 1987), mettant en évidence la position du centre de Nieuwkoop.

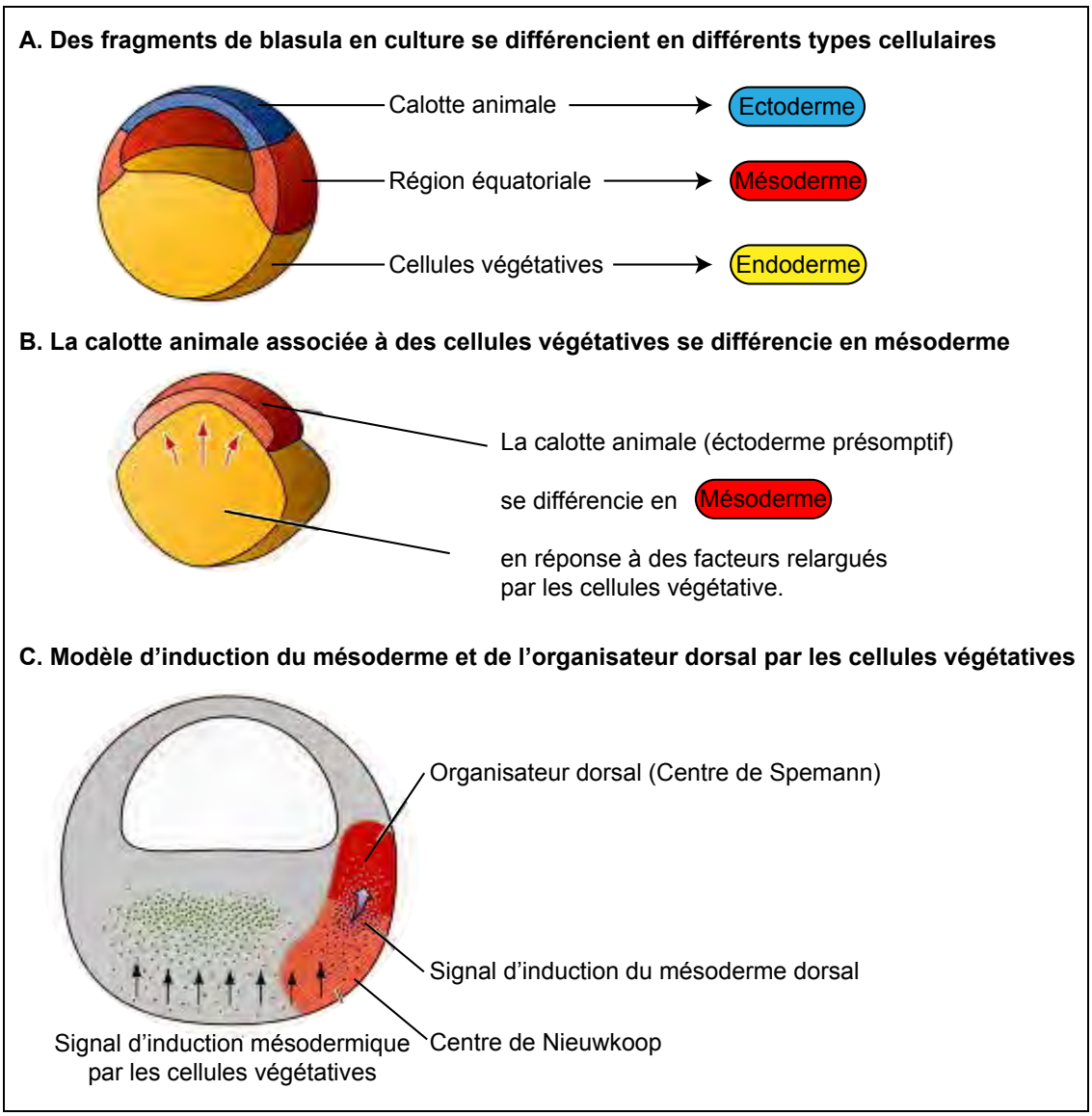


Figure 17 : L'endoderme est responsable de l'induction mésodermique
Résumé des expériences de Nieuwkoop (Nieuwkoop, 1969) démontrant l'induction mésodermique par l'endoderme végétatif.
(A) Les cellules de la calotte animale (ectoderme) d'une blastula mises en culture se développent en une masse d'épiderme cilié. Des cellules isolées du pôle végétatif (endoderme) génèrent du tissu endodermique tel que les cellules intestinales. Les cellules équatoriales (zone marginale), quant à elles, deviennent du mésoderme.
(B) Si la calotte animale est combinée avec la partie végétative d'un embryon, la plupart des cellules du pôle animal vont générer du tissu mésodermique.
(C) Modèle de l'induction du mésoderme chez le Xénope. Un signal ventral est libéré dans toute la région de l'embryon végétal. Celui-ci induit les cellules marginales à devenir du mésoderme. Sur la face dorsale (opposée au point d'entrée du spermatozoïde), le signal dorsalisant est libéré par les cellules végétatives du centre de Nieuwkoop. Ce signal dorsal induit la formation de l'organisateur de Spemann dans les cellules recouvrant la zone marginale.
D'après (Gilbert, 2010).

e. Les facteurs responsables de l'induction mésodermique

Un enjeu de taille fut alors de découvrir la nature des facteurs qui émanent de l'hémisphère végétatif de l'œuf et qui sont responsables de ces deux mécanismes d'induction du mésoderme. Au plan moléculaire, une induction nécessite au bon moment et au bon endroit, la présence d'un signal inducteur. Ce signal est généralement une molécule diffusible, émise par une cellule dite inductrice. Cette molécule doit interagir avec la cellule cible grâce à un récepteur spécifique localisé à la surface de celle-ci. La réalisation d'une induction nécessite donc également que la cellule cible soit en mesure de répondre au signal inducteur, qu'elle soit compétente. Grâce à une série d'expériences de pointe dans les années 1980, Jim Smith montra qu'il existait un puissant facteur d'induction dans le surnageant de cellules endodermiques mises en culture. Ainsi, un facteur secrété permet à des calottes animales de subir des mouvements de convergence et d'extension, les mouvements morphogénétiques de mésoderme dorsal, et de former des structures différenciées de muscle et de notocorde (Smith, 1987). Mais quel est ce facteur ?

Dans une série d'expériences qui ont révolutionné ce domaine, Jim Smith découvrit dans les années 1980 la présence *in vivo* d'un facteur inducteur de mésoderme dans le surnageant, et donc sécrété par, des cellules endodermiques en culture (Smith, 1987). La démarche consistait alors à tester l'effet de molécules inductrices *in vitro* dans le milieu de culture de calottes animales, afin de découvrir leur rôle potentiel sur l'induction mésodermique. Ainsi, après leurs expériences de 1987, Slack et ses collègues montrèrent qu'en présence d'un facteur de croissance fibroblastique FGF (*Fibroblast Growth Factor*), des explants ectodermiques sont le siège de différenciation de structures mésodermiques (Slack et al., 1987). Parallèlement, un autre facteur peptidique, le facteur de croissance transformant TGF-β fut associé aux mêmes fonctions d'induction du mésoderme (Rosa et al., 1988), et est de plus capable de potentialiser l'effet du FGF (Kimelman and Kirschner, 1987). Ces deux facteurs, cependant, induisent différents types de tissus : les facteurs de la famille FGF induisent du mésoderme ventral tandis que le TGF-β induit des structures mésodermiques plutôt dorsales, montrant la synergie de différents facteurs pour réaliser l'induction mésodermique. Puis, Jim Smith caractérisa le facteur d'induction mésodermique dans le surnageant des cellules endodermiques, il s'agit de l'Activine A (Smith et al., 1990), un membre de la famille TGF-β. Cependant, l'Activine ne s'exprime qu'après la MBT et ne semble donc pas être le premier inducteur émis par les blastomères végétatifs (Thomsen et al., 1990).

Une question clé était alors de connaître les bases moléculaires de cette induction *in vivo*, c'est à dire de découvrir les gènes exprimés spécifiquement dans l'endoderme et responsables de l'activation du signal d'induction mésodermique. Tout d'abord,

l'accumulation de transcrits dans l'hémisphère végétatif au cours de l'ovogenèse qui fut décrite pour le gène Vg1 (Melton, 1987), un facteur de la famille TGF-β, fait de lui un candidat plausible pour remplir le rôle de l'inducteur mésodermique naturel. De plus, l'injection d'une forme dominante négative de Vg1 dans des embryons compromet à la fois le développement de l'endoderme mais également des structures mésodermiques dorsales faisant de lui un important inducteur mésodermique *in vivo* (Joseph and Melton, 1998).

Un autre transcrit s'accumule fortement au niveau de l'hémisphère végétatif au cours de l'ovogenèse, il s'agit de VegT (Zhang and King, 1996). VegT est un facteur de transcription à boîte T, qui agit comme un déterminant de l'endoderme : il induit des marqueurs endodermiques s'il est injecté dans d'autres parties de l'embryon et son ablation dans des ovocytes produit des embryons sans endoderme (Zhang et al., 1998). Après la MBT, il induit notamment l'activation d'autres facteurs de transcription tels que les gènes homéotiques *mix1* et *mixer*, et le gène *sox17*α qui seront ultérieurement impliqués dans le développement des tissus endodermiques (Xanthos et al., 2001). Mais en plus de spécifier l'endoderme, il est également requis pour la formation de tissus mésodermiques dans les embryons, que ce soit ventral ou dorsal (Zhang et al., 1998). Il est donc un autre excellent candidat pour être à l'origine de l'induction mésodermique *in vivo*. En effet, par des techniques d'interférence, il a été montré que la présence maternelle de VegT semble responsable de la formation de 90% du tissu mésodermique, mesurée par l'expression de différents gènes mésodermiques (Kofron et al., 1999). De plus, il peut induire spécifiquement l'expression de protéines de la famille FGF tel que FGF3 et FGF8, et de la famille TGF-β, tels que les gènes *Xenopus Nodal Related (Xnrs)* ou le gène *Derrière.*

Les Xnrs, *Derrière,* et l'Activine qui est exprimée de façon ubiquitaire (Marchant et al., 1998) sont responsables de la formation du mésoderme et de l'initiation de la gastrulation (Osada and Wright, 1999; Takahashi et al., 2000). L'expression de Xnr1, Xnr2 et Xnr4 est en réalité activée grâce à l'action synergique de VegT et Vg1 des blastomères végétatifs, et de la β-caténine stabilisée au côté dorsal (Agius et al., 2000). L'expression de Xnr5 et de Xnr6, quant à elle, dépend de VegT et de la β-caténine mais pas de la voie TGF-β via Vg1 (Takahashi et al., 2000). Ainsi, s'ensuit un gradient d'expression zygotique des Xnrs dans les cellules végétatives de la blastula, de façon plus élevée au côté dorsal où la β-caténine est stabilisée (Figure 18). Il a donc été proposé que ce gradient puisse permettre l'induction différentielle du mésoderme dorsal et du mésoderme ventral (Agius et al., 2000).

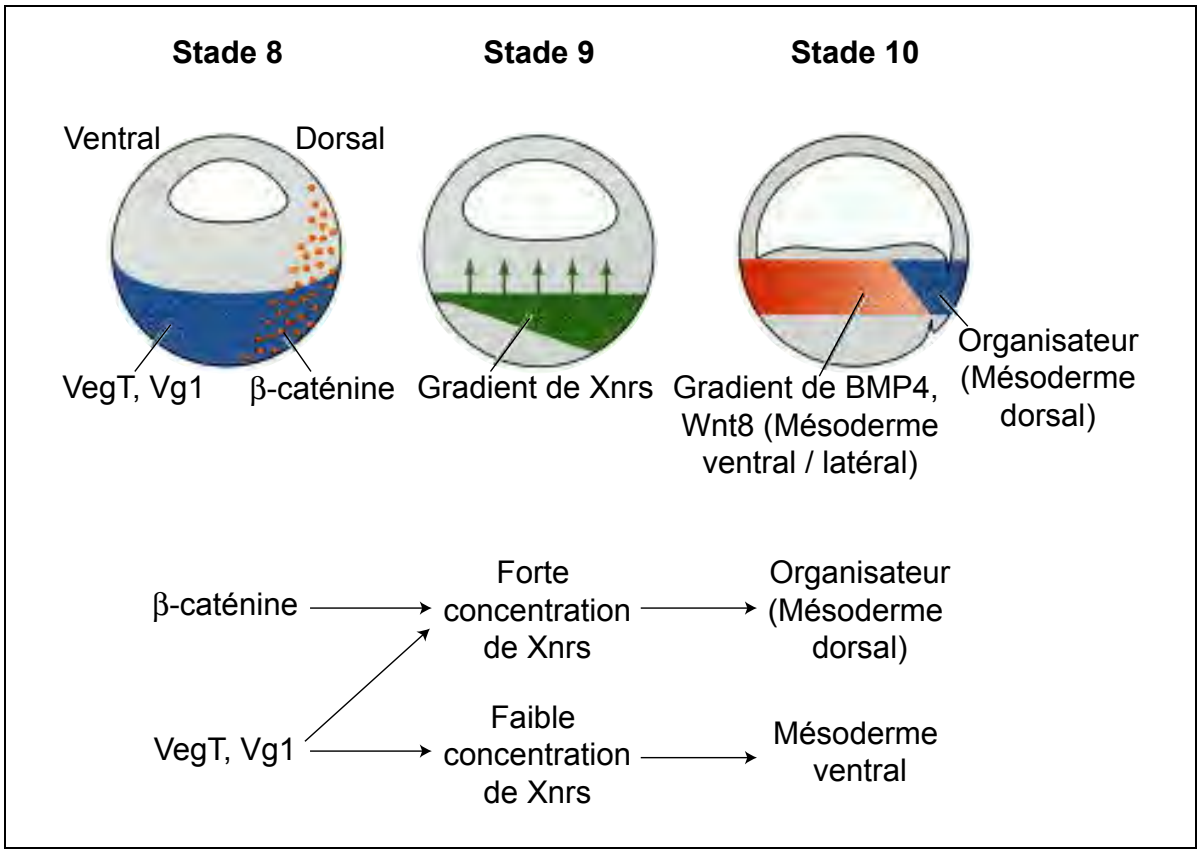


Figure 18 : Modèle de l'induction mésodermique et de l'organisateur dorsal
Au stade 8, Vg1 et VegT se trouvent dans l'hémisphère végétatif (accumulation lors de l'ovogenèse), tandis que la β-caténine est située dans la région dorsale (régionalisation mise en place au moment de la rotation corticale). Au stade 9, la β-caténine agit en synergie avec Vg1 et VegT pour activer les gènes Xenopus Nodal Related (Xnrs) de la famille des TGF-β. Un gradient de protéines Xnrs est ainsi créé au niveau de l'endoderme végétatif, le plus élevé étant dans la région dorsale. Au moment de la gastrulation (stade 10), le mésoderme est spécifié par le gradient de protéines Xnrs. Les régions mésodermiques avec peu ou pas de protéines Xnrs acquièrent des niveaux élevés de BMP-4 et Xwnt-8, ils deviennent alors du mésoderme ventral. Une concentration intermédiaire de Xnrs induit le mésoderme latéral. Dans la région dorsale où il y a une forte concentration de Xnrs et une stabilisation de la β-caténine, le gène *goosecoid* et d'autres gènes mésodermiques dorsaux sont activés, formant ainsi l'organisateur de Spemann. *D'après* (Agius et al., 2000) *et* (Gilbert, 2010).

Ainsi, la stabilisation de la β-caténine au côté dorsal semble agir en combinaison avec les facteurs d'induction mésodermique sécrétés par les blastomères végétatifs, en particulier de la voie TGF-β, pour permettre l'induction du centre organisateur dorsalisant, l'organisateur de Spemann (Spemann and Mangold, 1924) (Figure 19). La β-caténine permet notamment l'induction du gène à homéoboites *siamois* (Brannon and Kimelman, 1996), correspondant au premier événement moléculaire de l'induction de l'activité dorsalisante à partir du centre de Nieuwkoop (Fagotto et al., 1997). Le facteur de transcription Siamois, en synergie avec la voie TGF-β via Vg1 et les Xnrs, permettrait donc d'induire l'expression de gènes de l'organisateur dorsal, en particulier celle d'un autre gène à homéoboites, *goosecoid* (Moon and Kimelman, 1998) (Figure 19). Goosecoid joue un rôle important dans la fonction

dorsalisante, il peut notamment induire un deuxième axe lorsqu'il est exprimé ectopiquement (Cho et al., 1991). Il induit spécifiquement l'expression d'un certain nombre de gènes dont celui de *Chordin,* codant pour une protéine sécrétée (Sasai et al., 1994). La baisse d'expression de Chordin par injection d'oligonucléotides morpholino conduit au développement d'embryons qui sont principalement composés de structures ventro-postérieures, ayant en effet des structures dorso-antérieures réduites (Oelgeschläger et al., 2003). Ainsi, Chordin, sécrétée par le centre de Nieuwkoop, est un facteur caractéristique de l'organisateur de Spemann et de son activité dorsalisante. Un autre facteur secrété au niveau de l'organisateur au moment de la gastrulation et ayant une activité dorsalisante est la protéine Noggin (Smith and Harland, 1992). Bien qu'ayant des natures distinctes, Noggin et Chordin partagent une propriété importante au sein de l'organisateur de Spemann (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996) : elles agissent comme antagonistes d'un facteur ventralisant, la protéine de la famille TGF-β BMP4 (pour *Bone Morphogenetic protein 4*) (Dale et al., 1992). Il en résulte l'établissement d'un gradient de BMP4 au niveau du mésoderme équatorial (Jones and Smith, 1998) (Figure 18) qui contribue à la distinction des structures dorsales ou ventrales.

Ainsi, l'organisateur de Spemann, établi juste avant la gastrulation, induira le développement de structures dorsales en inhibant une activité ventralisante.

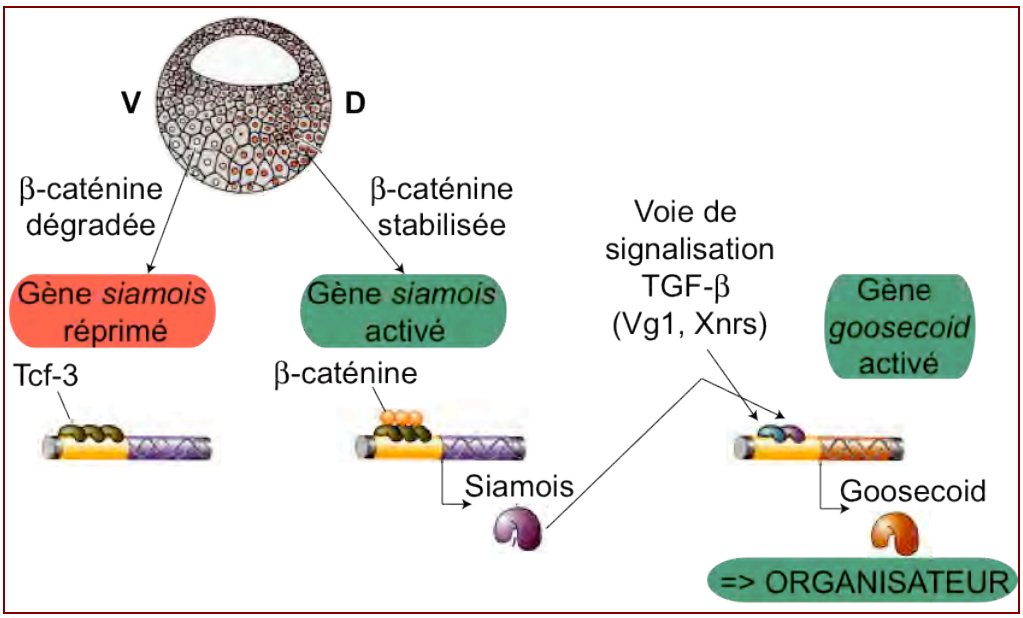


Figure 19 : Induction de l'organisateur dorsal par le centre de Nieuwkoop
Résumé des événements responsables de l'induction de l'organisateur dans le mésoderme dorsal de la blastula. La rotation corticale provoque la translocation des protéines Dishevelled et GSK-3 du côté dorsal de l'embryon, permettant ainsi à la β-caténine de s'accumuler. Lors de la segmentation, la β-caténine pénètre dans le noyau des cellules et interagit avec Tcf-3 pour former un facteur de transcription. Après la MBT, il active ses gènes cibles tels que *siamois*. En synergie avec la voie de signalisation TGF-β, Siamois active le gène *goosecoid* au niveau de l'organisateur. Goosecoid est un facteur de transcription qui active l'expression de facteurs responsables des activités inductrices de l'organisateur. *D'après* (Moon and Kimelman, 1998) *et* (Gilbert, 2010).

5. La gastrulation

Le côté fascinant de l'étude du développement embryonnaire est de comprendre comment un amas de cellules peut se différencier en un embryon extrêmement complexe et structuré. De ce point de vue, la gastrulation est un des processus les plus fondamentaux de l'embryogenèse car c'est lui qui assure l'agencement des trois feuillets embryonnaires au sein de l'embryon et représente ainsi un modèle expérimental pour l'épigenèse.

Au pôle animal de la blastula se trouvent les cellules fondatrices de l'ectoderme ; celles situées au niveau ventral formeront l'épiderme alors que celles situées au niveau dorsal seront à l'origine du système nerveux central (Figure 20). L'ectoderme recouvrira toute la surface de l'embryon à la fin du processus de gastrulation. Les cellules équatoriales, progénitrices du mésoderme, produiront notamment la chorde, les somites, et les cellules sanguines (Figure 20). L'endoderme, quant à lui, permettra la différentiation des tissus les plus internes de l'embryon telles que les épithéliums du tube digestif ou des voies respiratoires. Ainsi, les mouvements morphogénétiques de la gastrulation permettront de positionner le mésoderme et l'endoderme à l'intérieur de l'embryon, et de former une nouvelle cavité, l'archentéron, qui correspond à l'intestin primitif.

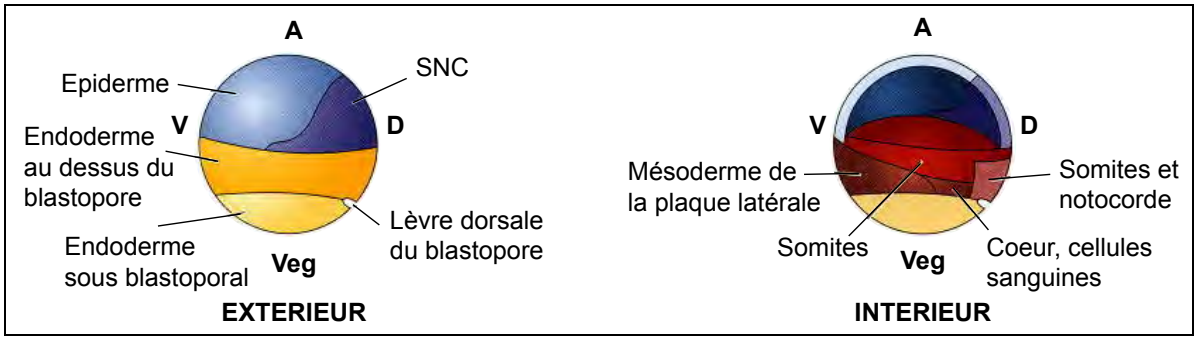


Figure 20 : Carte des territoires présomptifs au début de la gastrulation
Carte des territoires présomptifs des cellules superficielles (extérieur) ou profondes (intérieur) de la blastula tardive montrant les différents tissus qui en dériveront. Les axes Animal (A) – Végétatif (Veg) et Dorso (D) – Ventral (V) sont indiqués. SNC = Système nerveux central. *D'après* (Keller, 1975; 1976) *et* (Gilbert, 2010).

a. Vue générale de la gastrulation : morphologie externe

La gastrulation se manifeste par des mouvements morphogénétiques complexes qui impliquent toutes les cellules de l'embryon. Dès 1929 grâce à l'embryologiste allemand Walter Vogt et son idée de suivre les cellules grâce à des colorants, les mouvements principaux gouvernant le processus de gastrulation ont pu être établis (Vogt, 1929). Il déposa pour cela des morceaux d'agar imprégnés de colorants à la surface d'embryons d'urodèles et put suivre de façon macroscopique le mouvement de groupes de cellules marquées (Figure 21). Plus récemment, ces mouvements ont été analysés grâce à des études plus précises et sur des embryons amphibiens de différentes espèces dont *Xenopus laevis* (Keller, 1975; 1976). Notamment, des traceurs fluorescents ont pu être utilisés (Dale and Slack, 1987) et la microscopie électronique à balayage a permis de suivre finement ce processus. Les résultats obtenus diffèrent selon les espèces, mais ont pu mettre en évidence des processus fondamentaux.

Chez le Xénope, la gastrulation est déclenchée par la formation, au niveau de l'équateur dorsal, de la lèvre dorsale du blastopore observée par une concentration de pigments (Figure 21). Il s'agit de cellules qui acquirent des propriétés migratoires et s'invaginent à l'intérieur de l'embryon. Simultanément, les cellules de l'hémisphère animal, fondatrices de l'ectoderme, recouvrent toute la surface de l'embryon par un processus d'épibolie, tandis que les cellules fondatrices du mésoderme et de l'endoderme migrent à l'intérieur. En particulier, les cellules de la zone marginale s'involuent selon un mécanisme de convergence – extension. Ainsi, le sillon blastoporal s'allonge en décrivant une large courbe autour du pôle végétatif jusqu'à former un cercle qui délimite le bouchon vitellin. On distingue alors en plus de la lèvre dorsale, les lèvres latérales et la lèvre ventrale du blastopore. Ce dernier est ensuite internalisé dans l'embryon : le diamètre du cercle blastoporal ainsi formé diminue donc progressivement jusqu'à former une fente (Figure 21). Chez le Xénope, les mouvements de la gastrulation durent environ 6 heures à température ambiante.

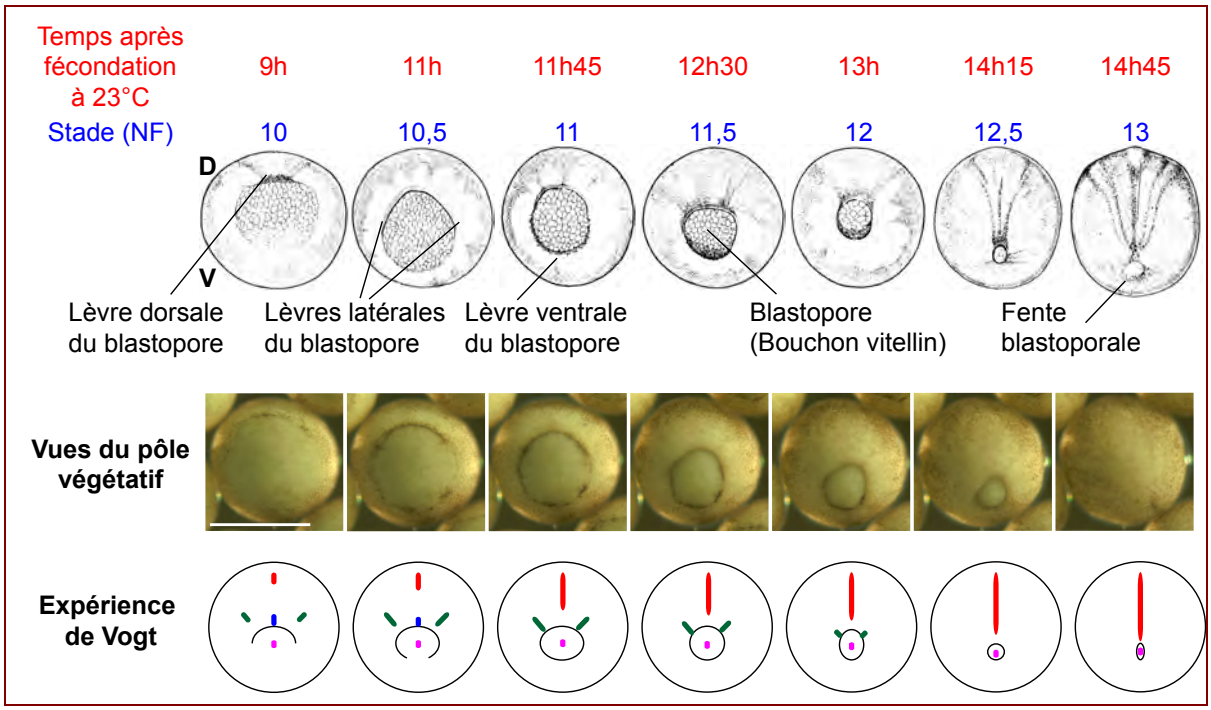


Figure 21 : Formation du blastopore et mouvements morphogénétiques
Photos d'embryons à différents stades de l'étape de gastrulation, vus du pôle végétatif. Les schémas représentatifs associés aux photos sont issus de la table de développement du Xénope de Nieuwkoop et Faber (stades NF) (Nieuwkoop and Faber, 1956). Barre d'erreur = 1mm. *Photos des embryons prises par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*
L'expérience de Vogt (Vogt, 1929) est schématisée. La marque colorée rouge déposée dans l'hémisphère animal s'étend à la surface de l'embryon vers le pôle végétatif, les cellules sont soumises au mouvement d'épibolie. La marque bleue déposée dans la zone marginale dorsale au dessus de la lèvre dorsale du blastopore disparaît au cours du processus de gastrulation : un mouvement d'invagination l'a emmenée à l'intérieur de l'embryon. Les marques vertes placées de part et d'autres du plan de symétrie animal-végétatif dans la zone marginale latérale convergent et s'étendent vers les lèvres latérales du blastopore. Enfin, la marque rose placée dans l'hémisphère végétatif au niveau du pôle ne se déplace pas.

b. Mouvements morphogénétiques réorganisant les trois feuillets

L'invagination est initiée par la formation des cellules en bouteille au niveau de la lèvre dorsale du blastopore

C'est l'apparition dans la région sous-équatoriale dorso-végétative d'une dépression, la lèvre dorsale du blastopore (Figure 21), qui marque conventionnellement le début de la gastrulation. Il s'agit d'un groupe de cellules qui changent de forme, s'allongent pour devenir des cellules dites « en bouteille », et s'enfoncent vers l'intérieur de l'embryon. Ces cellules endodermiques caractéristiques ont été décrites pour la première fois chez le triton par l'embryologiste Angelo Ruffini en 1907 (Ruffini, 1907). La forme caractéristique qui leur donne leur nom est produite par une contraction apicale et un allongement du corps cellulaire dans la région basale (Hardin and Keller, 1988) (Figure 22). Cette modification permet alors l'initiation des mouvements d'invagination. Alors que l'arrêt du cycle cellulaire est d'une importance capitale pour leur différenciation (Kurth, 2005), la modification de ces cellules semble liée à l'induction du mésoderme par la voie de signalisation TGF-β et le facteur de transcription VegT (Kurth and Hausen, 2000). De plus, la voie Wnt/β-caténine semble être importante car l'injection de Wnt5 peut également induire la formation de cellules en bouteille de façon ectopique (Choi and Sokol, 2009). Ainsi, il n'est pas surprenant que l'apparition de ces cellules, et donc la formation du blastopore, soient initiées au niveau de la région marginale dorsale.

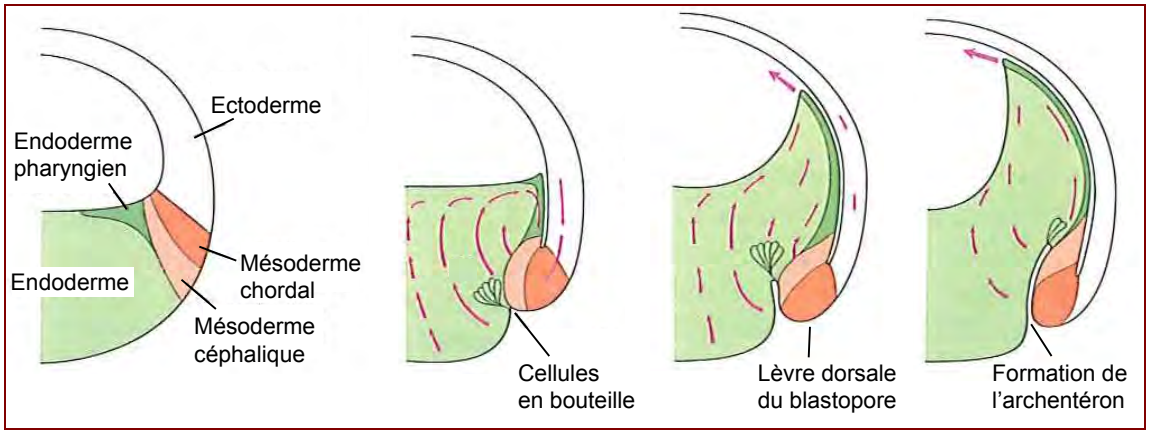


Figure 22 : Cellules en bouteilles et mouvement de rotation de l'endoderme
La formation des cellules en bouteille de la région dorsale entraîne les cellules de l'endoderme qui sont animées de mouvements de rotation (flèches roses). Ainsi, les cellules du plancher de l'endoderme sont progressivement repoussées contre le toit du blastocèle. Celles-ci constituent le futur endoderme pharyngien. Le mouvement se poursuit, permettant à l'endoderme de s'introduire à l'intérieur de l'embryon et de pousser le blastocèle. Ceci entraîne les cellules du mésoderme céphalique puis du mésoderme chordal à l'intérieur de l'embryon. *D'après* (Winklbauer and Schürfeld, 1999) *et* (Darribère, 2002).

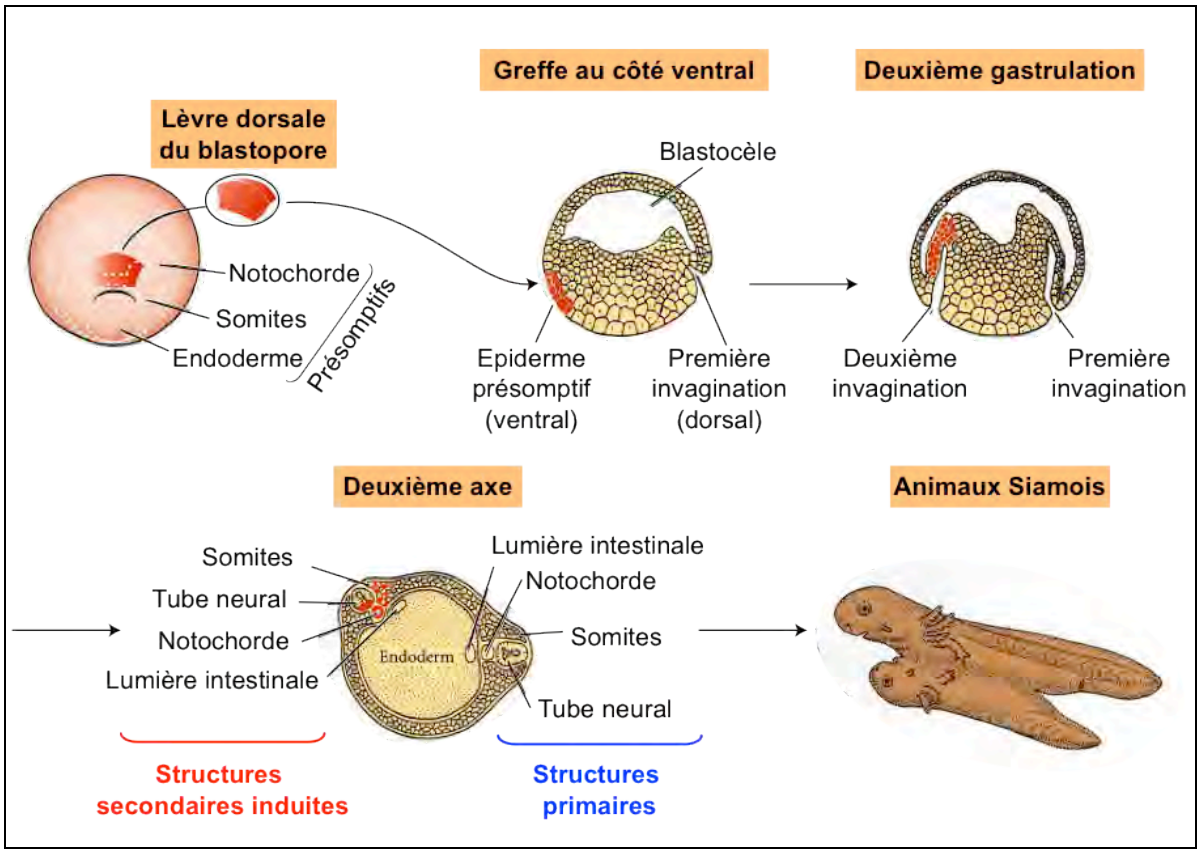


Figure 23 : Induction d'un axe secondaire par la lèvre dorsale du blastopore
Représentation schématique de l'expérience de Spemann et Mangold de 1924 (Spemann and Mangold, 1924). La lèvre dorsale du blastopore (=Organisateur de Spemann) d'une jeune gastrula est transplanté sur une autre jeune gastrula mais au côté ventral, région qui normalement se différencie en épiderme ventral. Le tissu donneur s'invagine et forme un deuxième blastopore puis un deuxième axe. Les nouvelles structures induites au niveau des somites, du tube neural et de la notochorde contiennent des cellules du donneur et de l'hôte. Ainsi, un deuxième embryon lié à l'hôte se forme tel des siamois. *Modifié d'après* (Gilbert, 2010).

L'organisateur de Spemann que nous avons précédemment décrit représente en effet la lèvre dorsale du blastopore observée dès le début de la gastrulation. C'est en 1924 que Hans Spemann et Hilde Mangold ont publié leurs extraordinaires expériences de transplantation chez le triton qui leur permirent de découvrir cet organisateur et furent récompensées par un prix Nobel en 1935 (Spemann and Mangold, 1924) (Figure 23). Ils ont en effet pu montrer que la greffe du tissu de la lèvre dorsale du blastopore dans la région ectodermique ventrale d'une autre gastrula déclenche la gastrulation et la genèse d'un deuxième embryon. Ainsi, il s'agit d'un organisateur susceptible de modifier la destinée des cellules ventrales de l'hôte et qui permet d'induire le développement autonome d'un deuxième embryon. Alors que cette expérience fut ultérieurement reproduite chez le Xénope (Smith and Slack, 1983), les propriétés moléculaires et l'origine de cet organisateur furent par la suite décrites comme nous l'avons vu au chapitre précédent.

L'invagination des cellules en bouteille engendre une traction sur les cellules adjacentes qui basculent vers l'intérieur de l'embryon, induisant la formation de la lèvre dorsale du blastopore (Figure 22). Contrairement à ce qu'il était précédemment admis, les cellules végétatives jouent en réalité un rôle important dans l'invagination des cellules par l'intermédiaire d'un mouvement de rotation actif qui a pour conséquence le positionnement de l'endoderme au devant du mésoderme, contre le toit du blastocèle (Winklbauer and Schürfeld, 1999) (Figure 22). Ceci permet en effet l'involution du mésoderme préchordal suivi du mésoderme céphalique (future notochorde). Après l'involution, les cellules du mésoderme préchordal acquièrent un mouvement migratoire vers le pôle animal (Shook et al., 2004). Ainsi, se forme une nouvelle cavité qui correspond à l'intestin primitif, l'archentéron, et dont le blastopore représente l'ouverture sur l'extérieur (Figures 22 et 24).

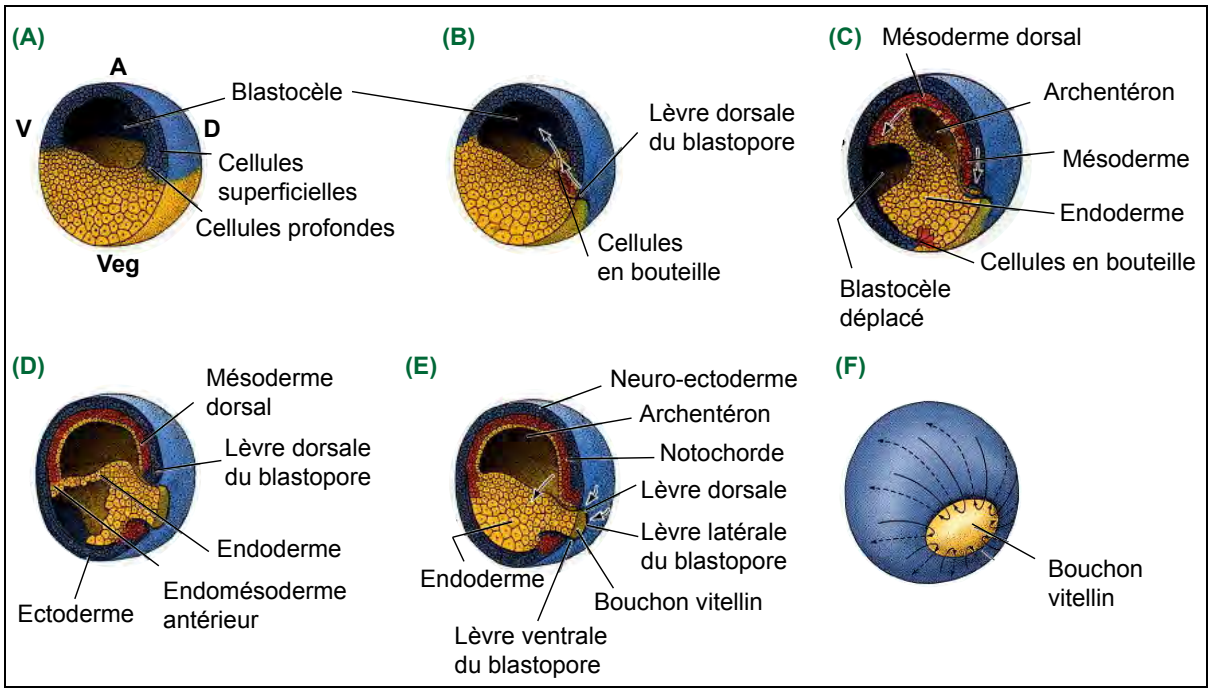


Figure 24 : Vues en coupe sagittales du processus de gastrulation
Mouvements cellulaires lors de la gastrulation. (A) Blastula. Les pôles sont indiqués. (B) Gastrula précoce. Les cellules en bouteille de la zone marginale dorsale s'invaginent et la lèvre dorsale du blastopore se forme. Les précurseurs du mésoderme migrent au niveau du toit du blastocèle (flèches). (C) et (D) Gastrula Moyenne. L'archentéron se forme tandis que le blastocèle est déplacé. Des cellules en bouteille se différencient au niveau ventral et le blastopore se forme via l'involution de cellules aux côtés latérales et ventrales en plus du côté dorsal. Les cellules ectodermiques du pôle animal migrent vert le pôle végétatif par épibolie. (E) Gastrula tardive. Le blastocèle disparaît tandis que l'embryon est entièrement recouvert de cellules ectodermiques. L'endoderme est complètement internalisé et les cellules mésodermiques se dont différenciées et positionnées entre l'ectoderme et l'endoderme. (F) Représentation de l'épibolie de l'ectoderme et de l'involution du mésoderme. *Modifié d'après* (Gilbert, 2010).

Les cellules ectodermiques recouvrent la surface de l'embryon par épibolie

L'ectoderme présomptif au dessus du blastocèle est composé d'un épithélium tristratifié formé d'une assise cellulaire superficielle et de deux assises cellulaires profondes. Dès le début de la gastrulation, les deux assises de cellules profondes s'intercalent entre elles. Ce mécanisme progresse du pôle animal vers la zone marginale, de façon radiaire (Keller et al., 1985). Ainsi, à la fin de gastrulation, la couche profonde n'est plus formée que d'une seule assise de cellules. La résolution en une seule couche cellulaire d'une assise originellement bistratifiée entraîne nécessairement une augmentation de surface. Parallèlement, les cellules de la couche superficielle, bien que ne participant pas aux mouvements d'intercalation radiale, se divisent tangentiellement à la surface de la gastrula, en suivant cette augmentation de surface. Ces mécanismes impliquent des modifications au niveau des interactions des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire. Au total, les mouvements d'intercalation radiale des cellules profondes ainsi que l'étalement des cellules superficielles rendent compte du mouvement d'épibolie qui œuvre au recouvrement de l'ensemble de l'embryon par le feuillet ectodermique (Figure 24).

Les cellules de l'ectoderme présomptif ventral sont destinées à devenir de l'épiderme grâce au signal morphogénétique BMP4 (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995; Dosch et al., 1997), qui induit notamment l'expression du gène à homéoboîte xVent1 à de fortes concentrations et du gène xVent2 à une concentration inférieure au niveau du mésoderme ventral (Gawantka et al., 1995; Onichtchouk et al., 1996). Les régions exprimant xVent1 et xVent2 donneront la lame latérale tandis que l'expression de xVent2 seule conduit à la formation des somites (Onichtchouk et al., 1998). Au cours de la gastrulation, l'ectoderme dorsal surplombe le mésoderme préchordal qui s'invagine à l'intérieur de l'embryon (Figure 24). Le mésoderme préchordal dérive de l'organisateur de Spemann et nous avons vu qu'il s'agit d'une source d'inhibiteurs des BMPs tels Chordin, Noggin, Follistatin ou encore Cerberus (De Robertis, 2009). Or, des études ont pu montrer que l'inhibition du signal BMP est nécessaire et suffisante pour l'induction neuronale (Onichtchouk et al., 1998; Reversade, 2005; Reversade and De Robertis, 2005). Ainsi, le mésoderme préchordal induit la différentiation neuronale de l'ectoderme sus-jacent, expliquant la formation de structures neurales secondaires dans l'expérience de Spemann et Mangold (Figure 23). L'induction du neuroectoderme correspondrait donc à une inhibition de la différentiation en épiderme. Parmi les gènes requis dans la spécification de la plaque neurale au moment de la gastrulation, le gène à homéoboite *Orthodenticle homeobox 2* (Otx2) joue un rôle capital (Pannese et al., 1995). De plus, la différenciation des cellules neuroectodermiques en tissu neuronal requiert l'expression du gène *SRY (sex determining region Y)-box 2* (Sox2) (Kishi et al., 2000).

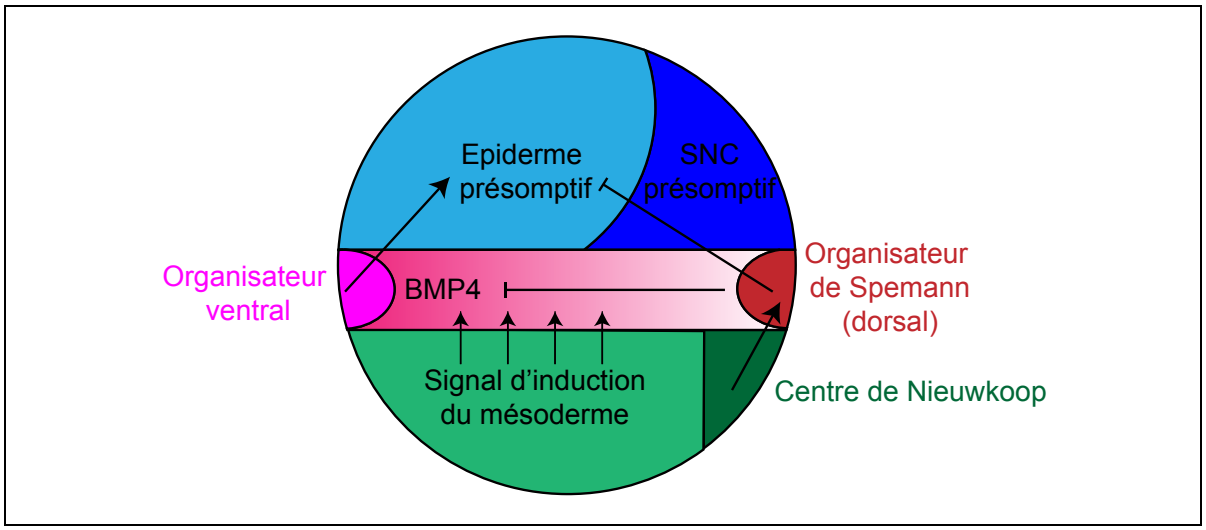


Figure 25 : Différenciation de l'ectoderme en épiderme ou neuroectoderme
Au cours de la gastrulation, le mésoderme dorsal se retrouve sous jacent de l'ectoderme dorsal qui se différencie en tissu neuronal grâce à l'action antagoniste des BMP du mésoderme dorsal (organisateur de Spemann). L'ectoderme ventral se différencie en épiderme par défaut. SNC = système nerveux central.

Les cellules de la zone marginale dorsale subissent un mouvement de convergence et d'extension

Les mouvements de convergence et d'extension concernent les tissus de la zone marginale dorsale, le mésoderme céphalique présomptif, puis des zones latérale et ventrale de la jeune gastrula. Ils consistent en une intercalation cellulaire latérale qui conduit à la formation d'une assise unique de cellules qui s'étend vers le pôle végétatif, c'est à dire vers le blastopore. Les cellules deviennent en effet bipolaires et s'allongent perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Figure 26). Elles sont donc obligées de s'intercaler avec leurs voisines et la résultante de ces mouvements est un allongement antéropostérieur des territoires concernés (Figure 26). Les cellules migrent alors jusqu'au niveau des lèvres blastoporales, où elles changent de forme et pénètrent à l'intérieur de l'embryon par invagination. Ceci permet l'invagination du mésoderme céphalique (Figures 22 et 24) et la fermeture du blastopore à la fin de la gastrulation.

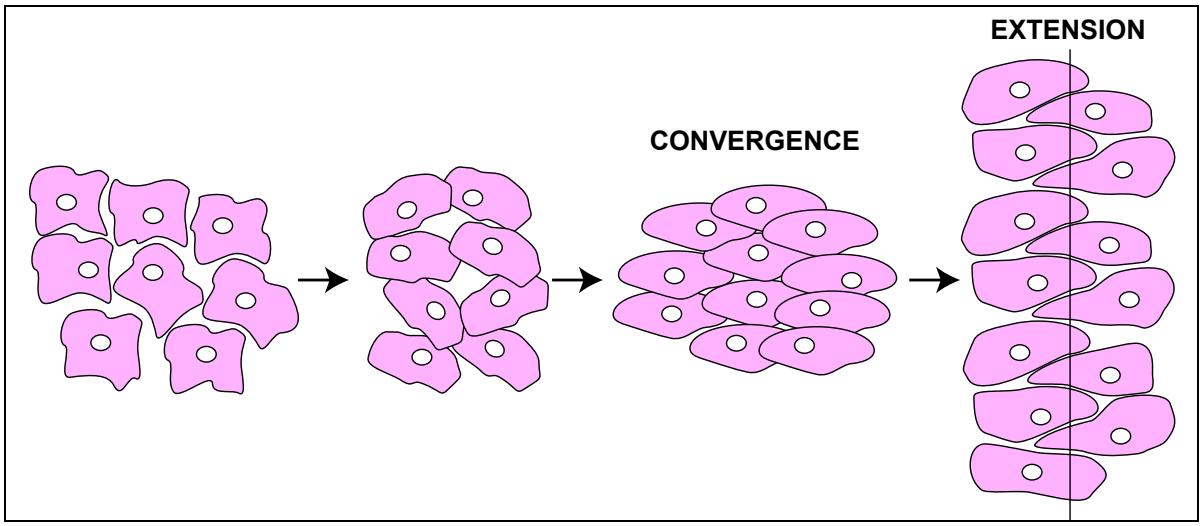


Figure 26 : Mouvements de convergence et d'extension
Schématisation de la convergence et extension des cellules mésodermiques de la zone marginale. Les cellules, qui présentent initialement des protrusions cytoplasmiques aléatoires deviennent bipolaires et s'allongent perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur de l'embryon (représenté par la ligne droite). Elles s'intercalent ensuite les unes par rapport aux autres, d'où une extension selon ce même axe. Ce mouvement est initié au niveau de la lèvre dorsale puis s'étant aux cellules des lèvres latérales puis de la lèvre ventrale du blastopore.

Ces mouvements de convergence et d'extension requièrent spécifiquement l'expression du marqueur mésodermique *brachyury (Xbra)* (Conlon et al., 1996) qui forme une boucle d'auto-amplification avec le facteur eFGF (Isaacs et al., 1994), également requis pour la différenciation mésodermique (Amaya et al., 1991). L'importance d'Xbra pour les mouvements de convergence et d'extension ainsi que la différenciation de la lignée myogénique sera détaillée dans la partie suivante. Cependant, il est important de noter qu'une voie de signalisation séparée semble également être impliquée dans les mouvements de convergence et d'extension. Celle-ci implique *xlim1,* un facteur de transcription qui est la cible de la voie de signalisation VegT et qui est exprimée spécifiquement au niveau de l'organisateur dorsal (Xanthos et al., 2001). En effet, la réduction de l'expression de *xlim1* conduit à des défauts de convergence et d'extension du mésoderme céphalique antérieur (Hukriede et al., 2003).

c. Le marqueur mésodermique *brachyury (Xbra)*

La régulation de son expression

Le phénotype lié à une mutation dans le gène *brachyury* (ou *T* pour *Tailless)* fut pour la première fois décrit il y a environ 85 ans chez la souris : à l'état hétérozygote les souris n'ont pas de queue (*tailless*) tandis qu'une mutation à l'état homozygote n'est pas viable (Dobrovolskaïa-Zavadskaïa, 1927).

Brachyury est un facteur de transcription à boîte T notamment impliqué dans l'activation de gènes mésodermiques, dont le gène fut cloné chez la souris en 1990 (Herrmann et al., 1990; Wilkinson et al., 1990) puis chez le Xénope en 1991 (Smith et al., 1991). *Xenopus brachyury (Xbra)* est exprimé au niveau de la zone marginale dès le début de la gastrulation (Smith et al., 1991) (Figure 27) et son expression ectopique est suffisante pour induire la formation de tissus mésodermiques (Cunliffe and Smith, 1992). Au cours de la gastrulation, son expression est inhibée dans le mésoderme préchordal qui s'invagine à l'intérieur de l'embryon tandis que son expression est maintenue dans la future notochorde (Smith et al., 1991) (Figure 27). A la fin de la gastrulation, *Xbra* est détecté uniquement au niveau de la notochorde et du bourgeon caudal (fermeture du blastopore) (Gont et al., 1993).

Son expression est activée par le signal d'induction mésodermique provenant du pôle végétatif via la voie TGF-β et notamment via l'Activine de façon dose dépendante (Smith et al., 1991; Latinkić et al., 1997). L'expression d'Xbra représente ainsi une réponse immédiate à l'activation du mésoderme au début de la gastrulation. Son expression est maintenue grâce à l'activité du eFGF (Isaacs et al., 1994), et Xbra est également capable d'activer l'expression de eFGF, formant ainsi une boucle d'autoamplification (Tada et al., 1997; Casey et al., 1998). En effet, des expériences d'injection d'une forme dominante négative d'eFGF démontrèrent que l'induction mésodermique via Xbra requiert l'activité du eFGF (Schulte-Merker and Smith, 1995). Cependant, l'injection d'une forme dominante négative de Xbra permit de montrer que cette autorégulation est requise principalement au niveau du mésoderme dorsal (Conlon et al., 1996). Les embryons ainsi formés ne développent pas de mésoderme postérieur et ont des défauts importants de différenciation de la notochorde.

Les défauts observés en l'absence de Xbra mettent en lumière l'importance de la régulation fine de son expression. En effet, une question clé est de comprendre comment son expression est restreinte à la zone marginale du mésoderme. L'analyse du profil d'expression de transgènes placés sous le contrôle transcriptionnel de versions mutées du promoteur d'Xbra a permis de mettre en évidence que Xbra est aussi régulé négativement pour restreindre son domaine d'expression et donc son activité au niveau du mésoderme (Lerchner et al., 2000). Notamment, il est la cible du répresseur *Smad-Interacting Protein 1* (Sip1) au niveau du neuroectoderme présomptif (Verschueren et al., 1999; Papin et al.,

2002). Son promoteur contient également des sites de liaison pour des facteurs à homéoboîtes tels Goosecoid, Mix1 ou encore Otx2 qui ont été suggérés comme médiateurs de la répression de Xbra à de trop fortes doses d'Activine (Green et al., 1992; Latinkić et al., 1997). De plus, la régulation de l'expression de Xbra pourrait également être liée à des changements au niveau de l'accessibilité de la chromatine qui ont lieu au moment de la gastrulation (Dimitrov et al., 1993; Patterton and Wolffe, 1996).

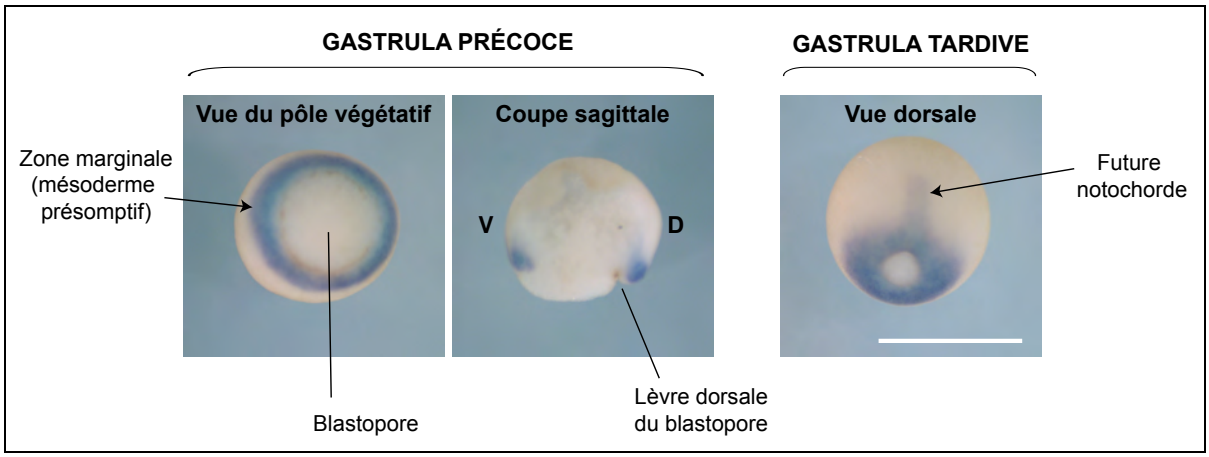


Figure 27 : Patron d'expression du marqueur mésodermique Xbra
Hybridation *in situ* de l'ARNm *Xbra* sur des embryons au stade gastrula précoce révélant son patron d'expression autour du blastopore au niveau de la zone marginale. Alors qu'il n'est pas exprimé dans le mésoderme qui s'invagine à l'intérieur de l'embryon, il marque également la future notochorde d'une gastrula tardive. Barre d'erreur = 1mm. *Photos prises par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

L'importance de *brachyury* pour les mouvements de convergence et d'extension, et la différenciation myogénique

Comme décrit précédemment, le mésoderme dorsal est soumis à deux comportements cellulaires différents au cours de la gastrulation. Le mésoderme préchordal subit un mouvement de migration actif tandis que le mésoderme céphalique (future notochorde) est le siège d'un mouvement de convergence et d'extension. Ces deux comportements sont mutuellement exclusifs et l'expression de Xbra semble jouer un rôle important. En effet, alors que VegT est important pour les deux types de mouvements, Xbra est spécifiquement requis pour les mouvements de convergence et d'extension (Conlon et al., 1996) tandis qu'il inhibe la migration cellulaire (Kwan, 2003). Ceci est en cohérence avec l'absence de son expression au niveau du mésoderme préchordal et permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle Xbra permet de réguler la distinction entre les deux mouvements cellulaires. Les mouvements de convergence et d'extension requièrent en effet l'activation de l'expression d'un gène cible de Xbra, Wnt11 (Tada and Smith, 2000), puisque la présence d'une forme dominante négative de Wnt11 empêche l'élongation par convergence et

extension des calottes animales en réponse à un signal d'induction mésodermique. De plus, il a été montré que Wnt11 agit de façon non canonique, c'est à dire de façon indépendante de la β-caténine, via notamment la localisation de Dishevelled au niveau du cortex cellulaire qui semble jouer un rôle important.

Le patron d'expression de Xbra au niveau de la zone marginale suggère que son importance n'est pas restreinte aux mouvements de convergence et d'extension du mésoderme dorsal. De façon remarquable, Xbra semble être impliqué dans la régulation de la mise en place de l'axe de symétrie gauche-droite, notamment via l'activation de l'expression mésodermique du gène *Zic family member 3 (Zic3)* (Kitaguchi et al., 2002). Zic3 est un régulateur connu de la mise en place de l'axe gauche-droite, notamment chez le Xénope (Kitaguchi et al., 2000), et l'importance de Xbra pour l'activation de l'expression de Zic3 est en cohérence avec l'observation de défauts de symétrie chez des mutants *brachyury* murins (King et al., 1998). De plus, au milieu de la gastrulation, le patron d'expression des marqueurs myogéniques *Myogenic factor 5 (Myf5)* et *Myogenic determination gene 1 (MyoD)* est similaire à celui de Xbra et de eFGF autour du blastopore. Ainsi, la réduction de l'expression de Xbra ou eFGF entraîne des défauts de leur expression, démontrant l'importance de Xbra pour la régulation de la différenciation myogénique (Conlon et al., 1996; Fisher et al., 2002).

Xbra est donc un important marqueur mésodermique qui a un rôle capital au cours de la gastrulation : (1) il permet de coordonner les mouvements de convergence et d'extension du mésoderme céphalique et les mouvements migratoires du mésoderme préchordal ; et (2) il est un important régulateur de la différenciation myogénique.

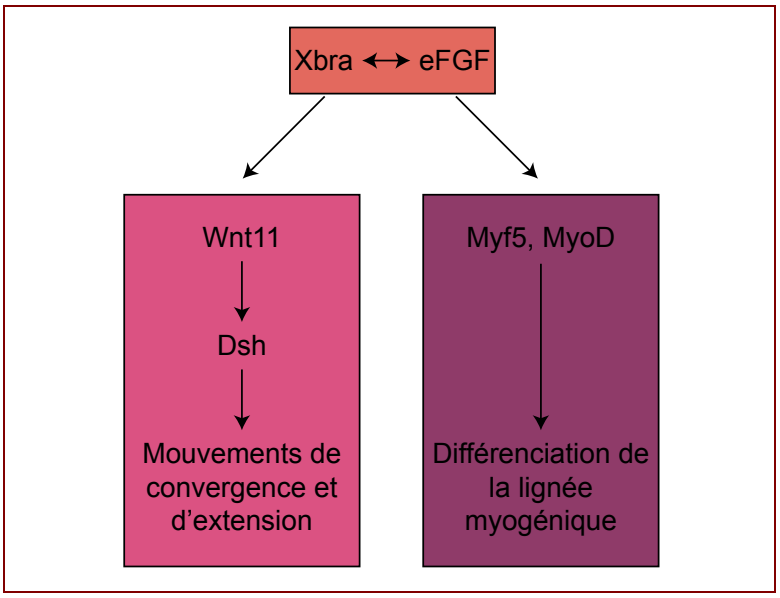


Figure 28 : Le rôle central de Xbra au cours de la gastrulation
Schématisation non exhaustive de l'importance de Xbra pour (1) les mouvements de convergence et d'extension via l'activation du gène cible Wnt11 et (2) la différenciation de la lignée myogénique via notamment l'activation de l'expression de Myf5 et MyoD. *Inspiré de* (Heasman, 2006b).

6. La neurulation et l'organogenèse

La neurulation permet de finaliser la mise en place du plan d'organisation primaire de l'embryon et de former le système nerveux au côté dorsal de l'embryon. Elle modifie en effet la structure de l'embryon dans la région dorsale, aboutissant à la formation de la plaque neurale puis du tube neural (Figure 29). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, c'est le mésoderme dorsal issu du centre de Spemann qui migre à l'intérieur de l'embryon au cours de la gastrulation, qui est à l'origine de l'induction de la formation du tube neural (pour revue (Kessler and Melton, 1994)).

Brièvement, à la fin de la gastrulation au moment où les trois feuillets se sont différenciés, qu'ils se sont organisés les uns par rapport aux autres, et que le blastopore se ferme au niveau postérieur, on constate d'un point de vue externe que l'embryon commence à s'allonger selon l'axe antéropostérieur. Parallèlement à ce changement morphologique, se produisent un aplatissement et un épaississement de la couche ectodermique dorsale. Ceci correspond à l'apparition de la plaque neurale, délimitée par des replis ou bourrelets neuraux (Figure 29). Les replis latéraux vont se rapprocher progressivement l'un vers l'autre en même temps que la plaque s'incurve formant ainsi une gouttière neurale. Les mouvements de rapprochement sont plus rapides dans la région postérieure, et plus lents dans la région antérieure (Figure 29, stade 17). Enfin, les bourrelets neuraux se soudent et délimitent ainsi le tube neural (Figure 29, stade 20, neurula). Les cellules de la crête neurale, originellement situées à la bordure entre le neuroectoderme et l'épiderme, migrent et participeront à la constitution de multiples formations tissulaires (Milet and Monsoro-Burq, 2012).

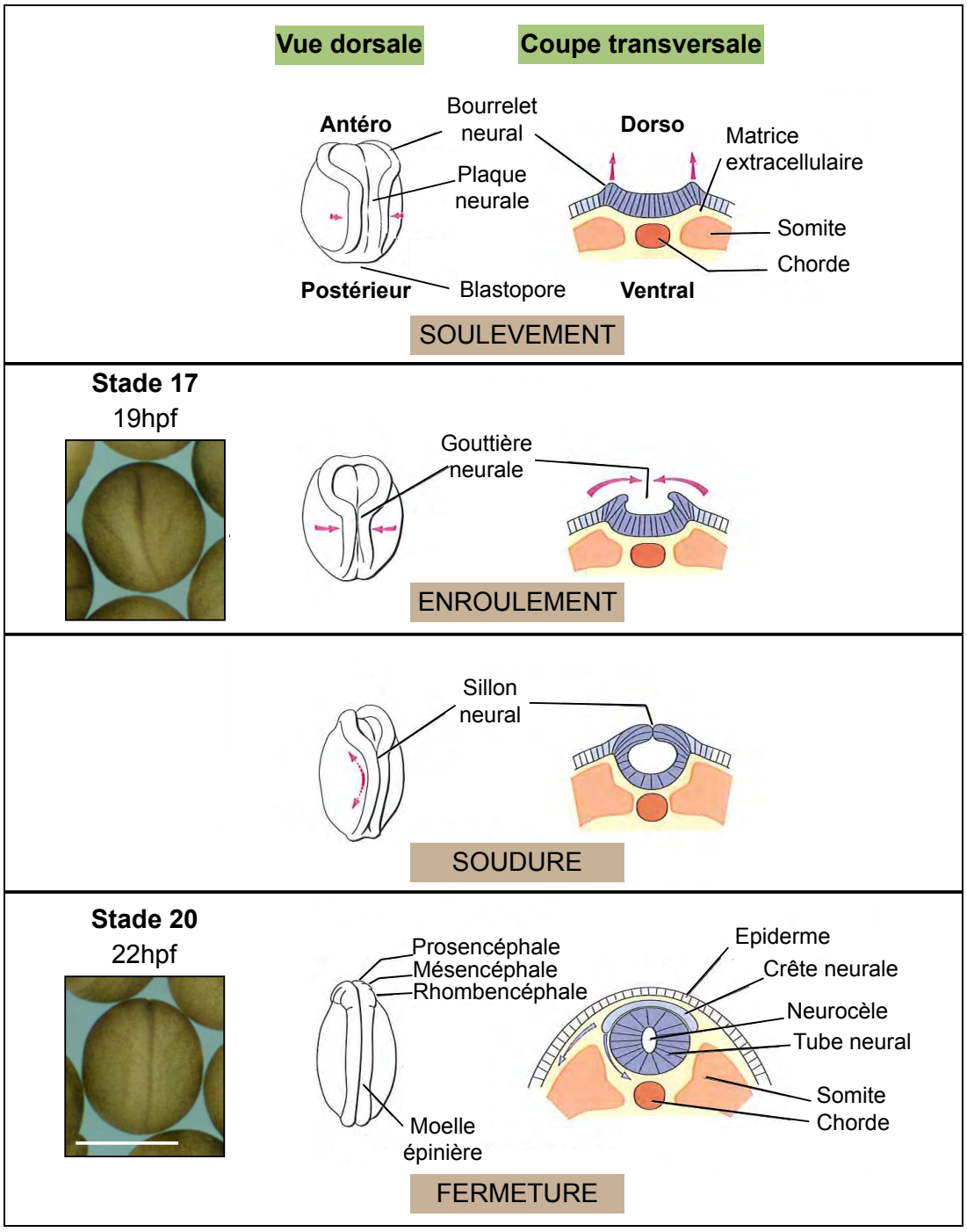


Figure 29 : Représentation schématique de la neurulation
Représentation des différentes étapes gouvernant le processus de neurulation : l'épaississement formant le bourrelet neural, l'enroulement conduisant à la formation d'une gouttière neurale puis la soudure et fermeture du tube neural. Ce processus dure environ 7 heures à température ambiante. Stades selon (Nieuwkoop and Faber, 1956), hpf : heures après fécondation. Echelle = 1mm. *Modifié d'après* (Darribère, 2002). *Photos des embryons prises par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

Avec la formation du tube neural, la neurulation marque le début de l'organogenèse. La neurulation précède en effet le stade bourgeon caudal où l'embryon s'est globalement allongé selon l'axe antéro-postérieur et a éclos de sa membrane vitelline. Les yeux en formation, la glande adhésive et les somites commencent à être visibles (Figure 30). La glande adhésive, qui se différencie dans la région céphalique ventrale, correspond à un organe transitoire permettant au bourgeon caudal de se fixer aux substrats grâce à la sécrétion d'un mucus (Van Evercooren and Picard, 1978). Alors que les organes se différencient, l'embryon continue d'épuiser ses réserves avant que ne s'ouvre la bouche au stade larvaire (têtard) tardif. Le têtard mènera une vie aquatique libre aidée par une respiration de type branchial et la présence d'une région caudale différenciée en nageoire. La métamorphose, impliquant la formation des pattes et la disparition de la queue, conduira au développement d'une grenouille adulte strictement aquatique.

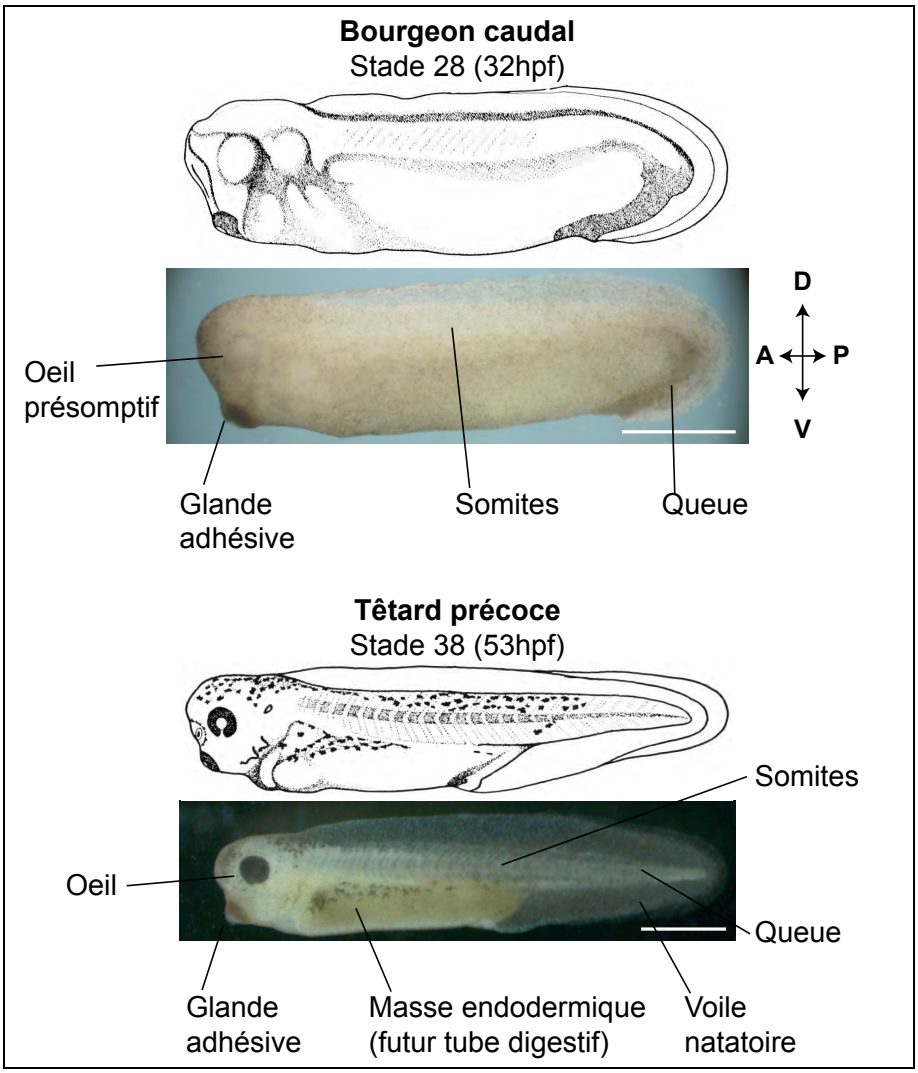


Figure 30 : Du stade bourgeon caudal au têtard
Images d'embryons aux stades bourgeon caudal et têtard précoce. Les principaux organes visibles sont annotés. hpf : heures après fécondation (à température ambiante). Les axes dorso-ventral (D-V) et antéro-postérieur (A-P) sont également indiqués. Echelle = 1mm. *Schémas et stades à partir de* (Nieuwkoop and Faber, 1956). *Photos des embryons prises par E. Szenker à l'Institut Curie, UMR218.*

II. L'IMPORTANCE DE L'ORGANISATION EN CHROMATINE

Comme nous l'avons vu, l'étude du développement embryonnaire implique la régulation spatio-temporelle fine de l'expression de gènes spécifiques. Dans ce contexte, la dynamique de la chromatine est une notion essentielle à prendre en compte. En effet, la chromatine est la forme sous laquelle se présente notre information génétique au sein des noyaux de nos cellules. Découverte en 1882 par Walther Flemming (Flemming, 1882), la chromatine a été ainsi dénommée en raison de son affinité particulière pour les colorants (issu du grec « khrôma » : couleur). Il s'agit d'un complexe associant l'ADN avec des petites protéines basiques appelées histones, découvertes en 1884 par Albrecht Kossel (Kossel, 1911). Ce n'est que dans les années 1970 que les premières observations de fibres chromatiniennes en microscopie électronique révèlent l'existence du nucléosome (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975). Cette unité de base de la chromatine sera finalement résolue par cristallographie aux rayons X en 1997 (Luger et al., 1997) pour fournir la structure détaillée que l'on connaît aujourd'hui (Figure 31).

Dans ce second chapitre, je détaillerai la structure de la chromatine ainsi que ses différents niveaux de compaction. Par la suite, l'incroyable diversité de la chromatine, en particulier par le choix de différents variants d'histones, sera spécifiée en fonction de leur caractère potentiellement épigénétique. Enfin, nous verrons comment cette organisation en chromatine se met en place et se réarrange de façon dynamique en explorant les différentes voies d'assemblage et de remodelage de la chromatine.

1. Structure de la chromatine

a. L'unité de base de la chromatine : le nucléosome

En 1869, Friedrich Miescher, un jeune docteur suisse, isole des noyaux de cellules leucocytaires et met en évidence la présence d'une substance non protéique et non lipidique qu'il nomme alors « nucléine » (Miescher, 1871) (Figure 31). Il en étudie les constituants et isole en particulier le phosphore, ce qui en fait une nouveauté en terme de biochimie. C'est au siècle suivant que cette substance sera identifiée comme acide désoxyribonucléique (ou ADN) et support de notre information génétique (Avery et al., 1944), dont la structure en double hélice sera établie par Watson et Crick en 1953 (Watson and Crick, 1953). Alors que les protéines histones sont déjà connues depuis 1884 (Kossel, 1911), la découverte de la structure de l'ADN au milieu du 20^{e} siècle stimule alors l'intérêt de la communauté scientifique quant à l'étude de la structure de la chromatine (Figure 31).

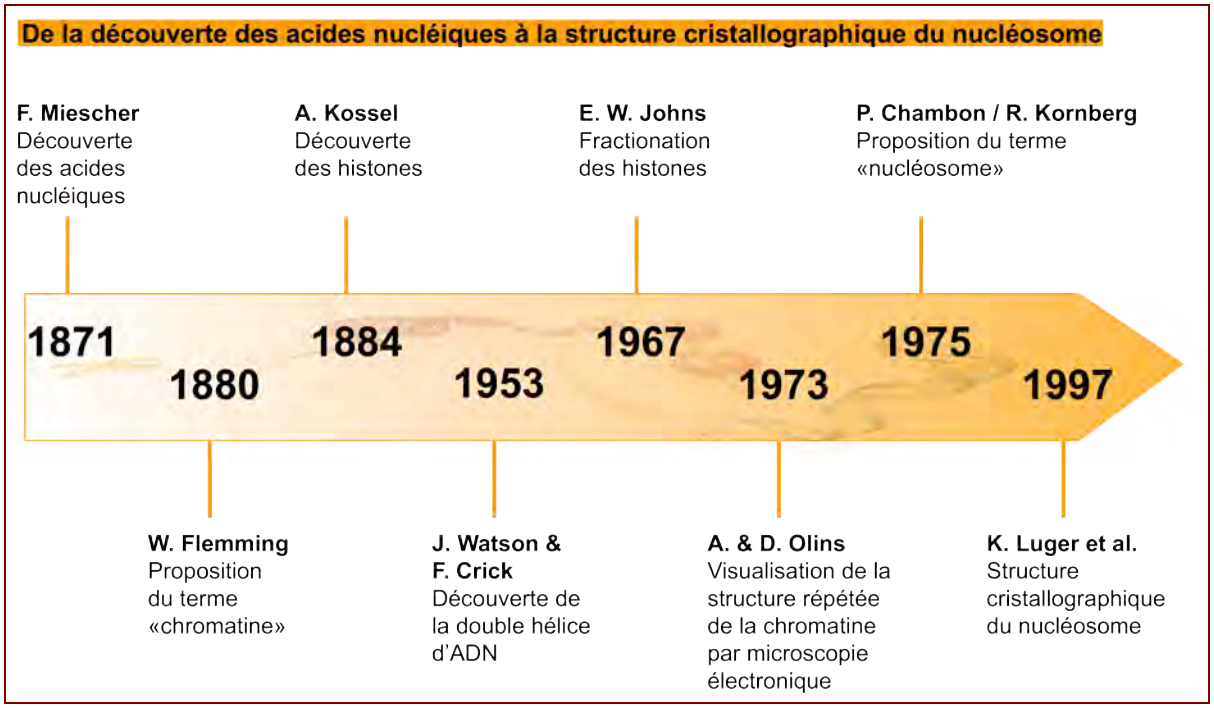


Figure 31 : Les origines de la découverte du nucléosome
Récapitulatif des principales avancées réalisées dans le domaine de la chromatine, de la découverte des acides nucléiques à l'obtention de la structure cristallographique du nucléosome. *Figure inspirée de* (Olins and Olins, 2003).

Mais ce n'est qu'avec les progrès réalisés en microscopie électronique que la chromatine fut visualisée, dévoilant une organisation en « collier de perle » (Figures 32 et 33) (Olins and Olins, 1974; Oudet et al., 1975). En parallèle, Hewish et Burgoyne observaient que la digestion de la chromatine de noyaux d'hépatocytes par une nucléase endogène provoquait le clivage de l'ADN en fragments de 180 à 200 paires de bases (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975). Ces observations conduisirent à l'hypothèse de l'existence d'une structure répétée protégeant l'ADN. Ainsi, la double hélice d'ADN n'est non pas enrobée de protéines histones comme les précédents modèles l'envisageaient, mais s'enroule lui même à l'extérieur d'une particule cœur (Figure 32). Ceci permet à la fois sa compaction mais également son accessibilité à d'autres protéines nucléaires. Le « collier de perle » ou fibre nucléosomale de 11nm, qui constitue le niveau de compaction de l'ADN en chromatine, est donc composé d'une unité de base répétée de façon régulière, il s'agit du nucléosome (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975) (Figure 32). En contrôlant l'accessibilité du double-brin d'ADN, il est directement impliqué dans la régulation de plusieurs processus nucléaires comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN.

La particule cœur du nucléosome est formée d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule environ 146 pb d'ADN (Kornberg, 1974) (Figure 32). L'octamère est composé de deux dimères H3-H4 qui forment un tétramère central $(H3\text{-}H4)_2$ et qui est flanqué de deux dimères d'histones H2A-H2B. Au sein de la chromatine, les particules cœurs sont séparées les unes des autres par des segments d'ADN internucléosomal, l'ensemble formant la fibre de 11nm de diamètre (Figure 32). Ainsi, le terme nucléosome désigne l'ensemble formé par une particule cœur nucléosomale et l'ADN de liaison adjacent.

Les histones sont de petites protéines basiques extrêmement conservées au cours de l'évolution, dont le rôle est essentiel pour le maintien de la stabilité du génome (Malik and Henikoff, 2003). Leur propriété basique, et donc leur charge positive *in vivo*, favorise vraisemblablement leur interaction avec l'ADN qui est chargé négativement. Toutes les histones de la particule cœur sont caractérisées par la présence d'un domaine central composé de trois hélices α, constituant un motif globulaire ou « histone-fold domain » (Arents and Moudrianakis, 1995). Celui-ci est impliqué dans la compaction de l'ADN et la dimérisation des histones, comme l'illustre la représentation de la structure cristallographique du nucléosome (Luger et al., 1997) (Figure 32), réalisée grâce à la reconstitution *in vitro* de nucléosomes à partir d'histones de Xénope recombinantes purifiées. Cette structure montre également que les extrémités amino- et carboxy- terminales sont quant à elles non structurées et émergent à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome (Luger et al., 1997; Davey et al., 2002). Nous verrons par la suite que ces extrémités sont le siège de modifications covalentes qui peuvent modifier la compaction de la chromatine et également permettre le recrutement de protéines spécifiques (Kouzarides, 2007).

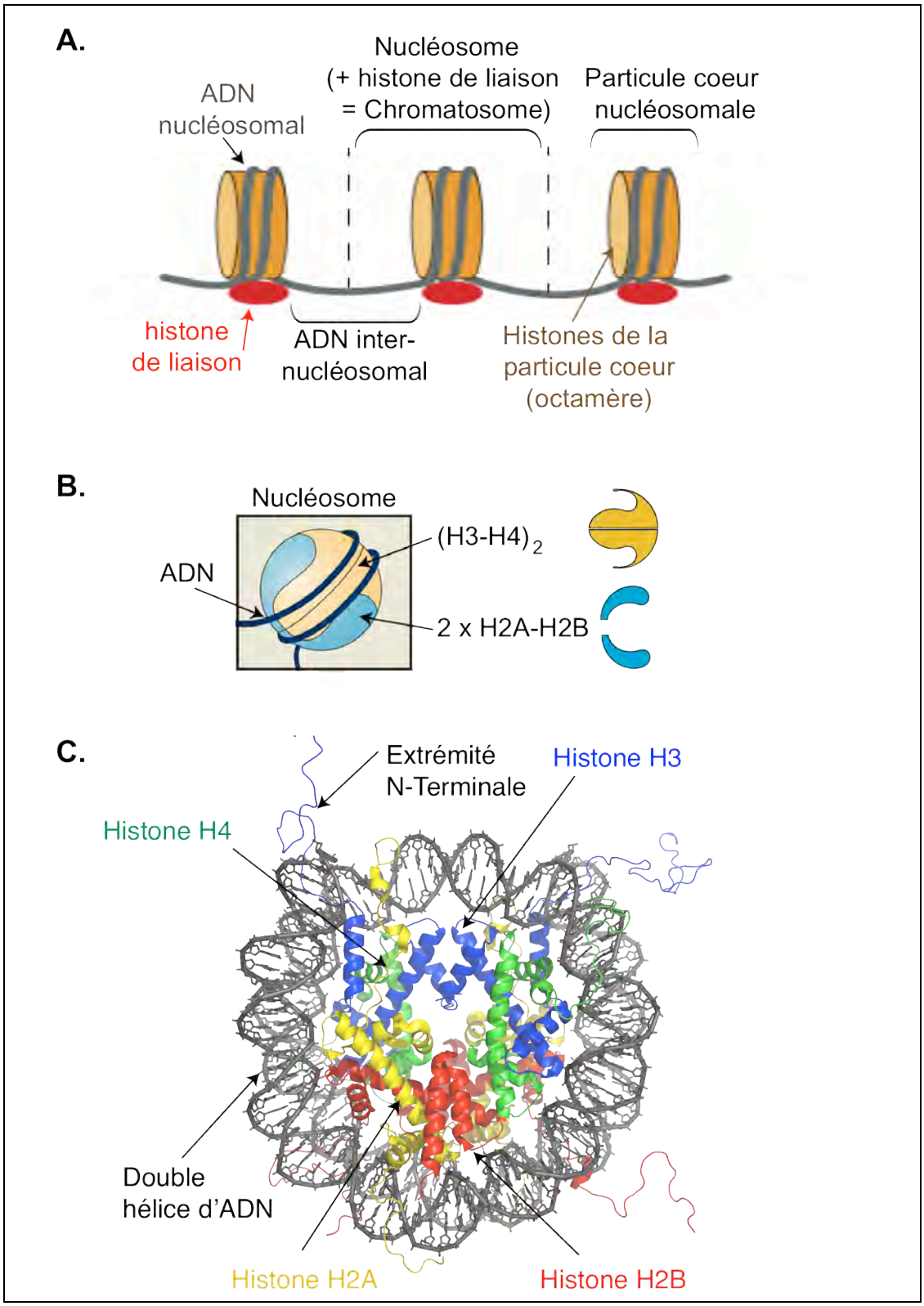


Figure 32 : La particule cœur nucléosomale
A. Image modifiée à partir de (Brown, 2001) permettant d'indiquer les différents composants du « collier de perle ». **B.** Représentation schématique de la particule cœur nucléosomale composée d'un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ et de deux dimères H2A-H2B autour desquels s'enroule environ 146pb d'ADN. *Modifié d'après* (Probst et al., 2009). **C.** Structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome à 2,8 Å (Protein Data Bank [PDB] ID: 1KX5, (Luger et al., 1997)).

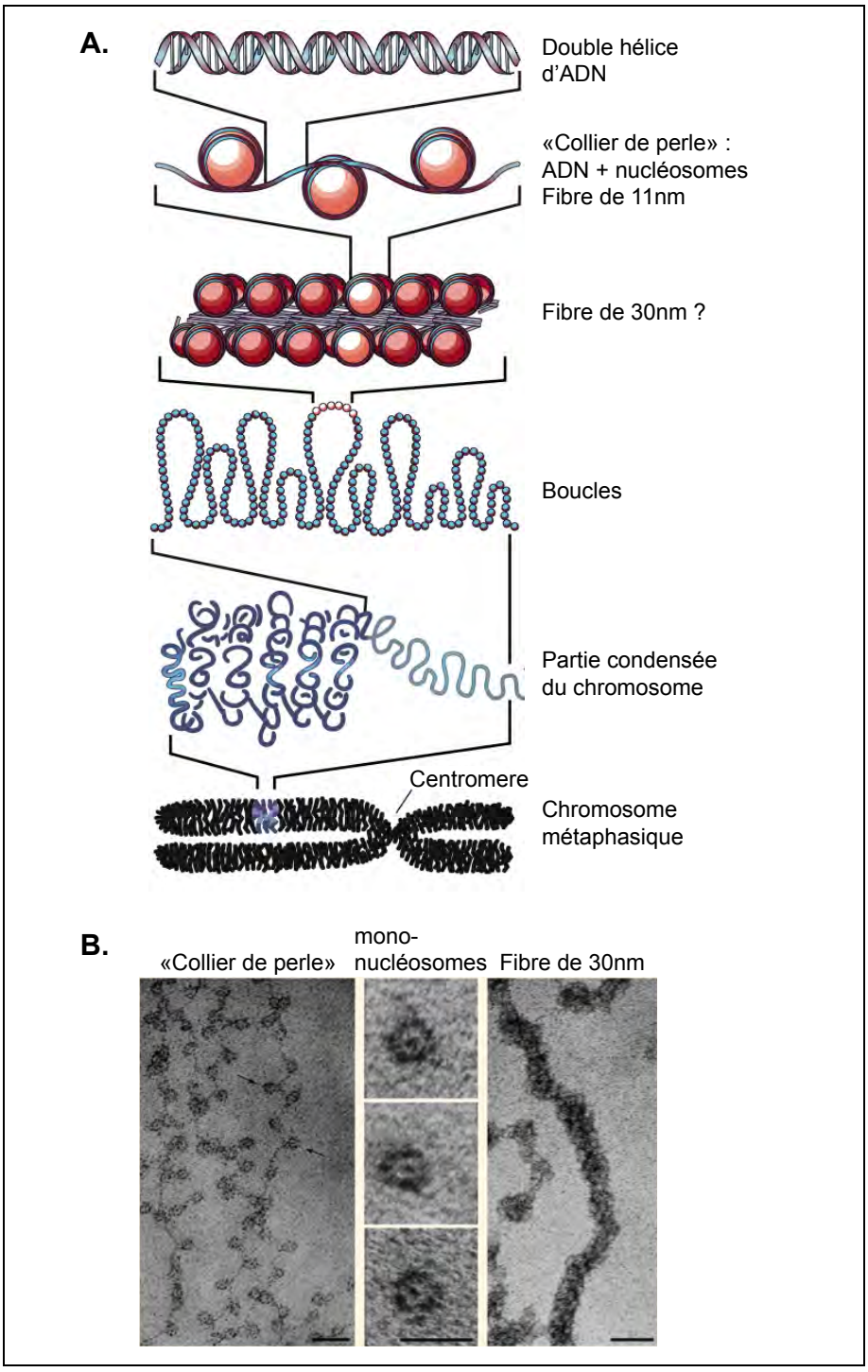


Figure 33 : Du chromosome au nucléosome
A. Image modifiée à partir de (Felsenfeld and Groudine, 2003) montrant les différents niveaux de compaction de la chromatine jusqu'à sa forme la plus condensée, le chromosome. **B.** Image modifiée à partir de (Olins and Olins, 2003) présentant : à gauche, un étalement moléculaire de chromatine à basse force ionique montrant le « collier de perle », échelle : 30nm ; au milieu, des mononucléosomes isolés après une digestion à la nucléase, échelle : 10nm ; et à droite, un étalement à force ionique modérée montrant la fibre de 30nm, échelle : 50nm.

b. Les niveaux d'organisation supérieurs

La fibre nucléosomale de 11 nm remplit deux fonctions : (1) la charge positive des histones de la particule cœur neutralise la charge négative de l'ADN et (2) l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones représente le premier niveau de compaction de l'ADN nécessaire pour permettre au génome de 2m de long par cellule d'être compacté dans un noyau de quelques micromètres de diamètre. Cependant, ce collier de perle représente *a priori* un niveau de compaction insuffisant pour l'élaboration des chromosomes observés en mitose (Figure 33).

Les histones de liaison

L'association de la particule cœur avec une histone de liaison, l'histone H1, permet de protéger 20 paires de base d'ADN supplémentaires à la digestion aux nucléases, formant ainsi le « chromatosome » qui contient environ 166pb d'ADN enroulés autour de la particule cœur et stabilisés par la molécule d'histone de liaison (Noll and Kornberg, 1977; Simpson, 1978) (Figure 32 A). L'histone H1 lie l'ADN au niveau où celui-ci rentre et sort de la particule de cœur, rapprochant ainsi l'ADN de liaison et scellant le complexe nucléoprotéique (Hayes and Wolffe, 1993; Hayes et al., 1994). Ainsi, les histones de liaison H1 sont impliquées dans la compaction du nucléofilament de 11 nm et participeraient à la stabilisation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur (Ramakrishnan, 1997). En limitant l'accès de la chromatine à des facteurs de transcription, elles peuvent également réprimer la transcription (Brown, 2001), comme cela a été démontré au cours du développement embryonnaire du Xénope avec l'exemple de l'expression de l'ARNr 5S (Bouvet et al., 1994). Ainsi, une perturbation ou modification de la liaison de l'histone H1 au nucléosome pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des gènes dont l'importance est majeure au cours du développement.

La fibre de 30nm

Il fut proposé il y a plus de 30 ans que l'histone de liaison contribue à la compaction du nucléofilament de 11nm et ainsi à la formation d'une fibre d'ordre supérieur, la fibre de 30nm, notamment décrite *in vitro* (Finch and Klug, 1976) (Figure 33). Cependant, l'existence et l'organisation de cette fibre fait toujours l'objet de débat à l'heure actuelle (Fussner et al., 2011).

Deux modèles principaux ont été par la suite proposé grâce à des études biochimiques et biophysiques *in vitro* (Figure 34) : (1) le modèle « one start » de la fibre solénoïde précédemment observée *in vitro* par Finch et Klug en 1976 qui décrit l'enroulement des nucléosomes sous forme d'une hélice tournant vers la gauche, l'ADN internucléosomal se trouvant à l'intérieur de la fibre (Robinson and Rhodes, 2006); et (2) le

modèle « two start » selon lequel les nucléosomes sont en fait arrangés en zigzag reliés par l'ADN internucléosomal (Schalch et al., 2005). Des études récentes sur des fibres de chromatines reconstituées suggèrent que les deux modèles pourraient exister en fonction de la présence d'histones de liaison et de la taille de l'ADN internucléosomal qui favoriserait ainsi l'un ou l'autre modèle (Routh et al., 2008; Kruithof et al., 2009).

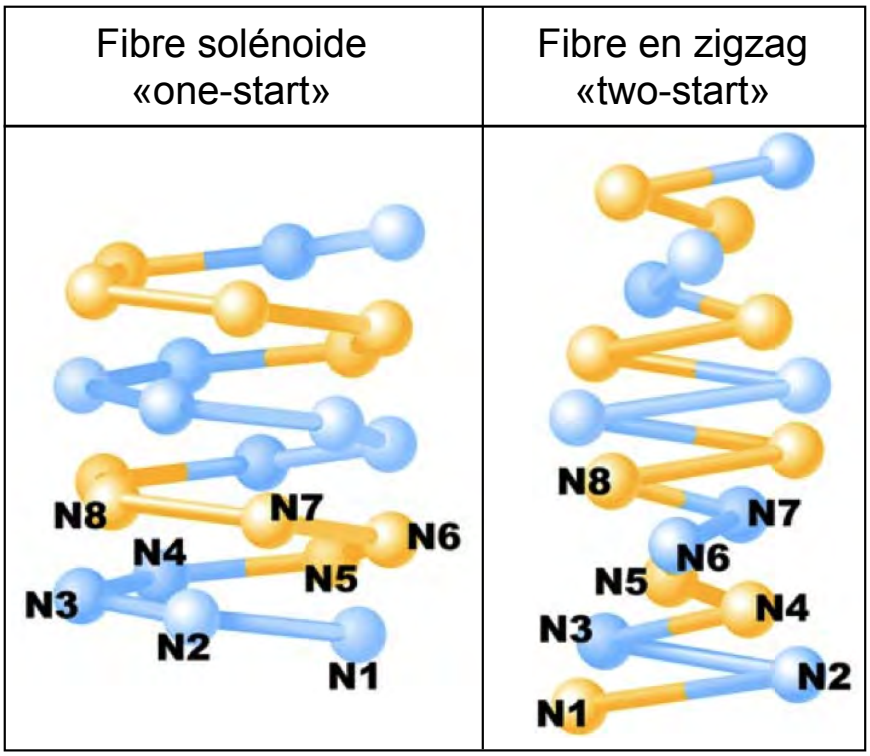


Figure 34 : Les deux modèles de la fibre de 30nm
Représentation schématique des deux modèles potentiels pour l'agencement des nucléosomes au sein de la fibre de 30nm. N = nucléosome. *Modifié d'après* (Maeshima et al., 2010).

La question reste de connaître la réalité et l'importance fonctionnelle de la fibre de 30nm *in vivo*. La première preuve de l'existence d'une telle structure *in vivo* fut son observation dans des noyaux de sperme d'étoile de mer, selon une organisation en zigzag (Bazett-Jones, 1992; Horowitz et al., 1994). Cependant, l'observation de noyaux humains mitotiques ou en interphase grâce à des techniques d'imagerie à haute résolution n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une telle structure (Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2010). De plus, la fibre de 11nm semble être majoritaire même dans les régions chromatiniennes condensées, l'hétérochromatine (voir ci-après) (Ahmed et al., 2010). Ainsi, la formation de structures d'ordre supérieur aboutissant à la formation des chromosomes métaphasiques pourraient ne pas dépendre de la formation d'une fibre de 30nm comme généralement admis (Figure 32), mais plus simplement de l'interaction entre fibres de 11nm aboutissant à une condensation de la chromatine (Fussner et al., 2011).

c. L'hétérochromatine

L'observation de noyaux par microscopie, notamment d'hépatocytes de mammifères (Figure 35), montre une organisation spatiale en différents domaines chromatiniens. Ainsi, la distinction historique entre l'euchromatine (vraie chromatine) et l'hétérochromatine (l'autre chromatine) a été réalisée (Heitz, 1928). L'hétérochromatine correspond aux régions chromatiniennes qui restent condensées durant tout le cycle cellulaire, et sont généralement situées à la périphérie du noyau et autour du nucléole (Figure 35). L'euchromatine, quant à elle, est globalement décondensée et n'est compactée qu'au moment de la mitose. D'un point de vue moléculaire, l'hétérochromatine correspond généralement aux régions pauvres en gènes et transcriptionnellement inactives tandis que l'euchromatine est riche en gènes et transcriptionnellement active. Deux types d'hétérochromatine peuvent être distinguées : l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive (Brown, 1966). L'hétérochromatine facultative comprend les régions dont le statut transcriptionnel varie d'une cellule à l'autre, notamment au cours du développement embryonnaire en fonction de l'état de différenciation d'une cellule donnée. L'exemple le mieux décrit d'hétérochromatine facultative correspond à l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X dans les cellules des mammifères, permettant une compensation de dose des cellules femelles par rapport aux cellules mâles (Augui et al., 2011). L'hétérochromatine constitutive est quant à elle condensée dans tous les types cellulaires et correspond notamment aux régions péricentriques, entourant les centromères, aux télomères ou encore aux séquences répétées. Le maintien et la régulation de ces structures sont essentiels pour la réalisation de divers processus cellulaires, notamment la ségrégation correcte des chromosomes lors de la mitose (Grewal and Jia, 2007). Ainsi, l'hétérochromatine constitutive joue un rôle majeur pour l'intégrité globale du génome (Almouzni and Probst, 2011).

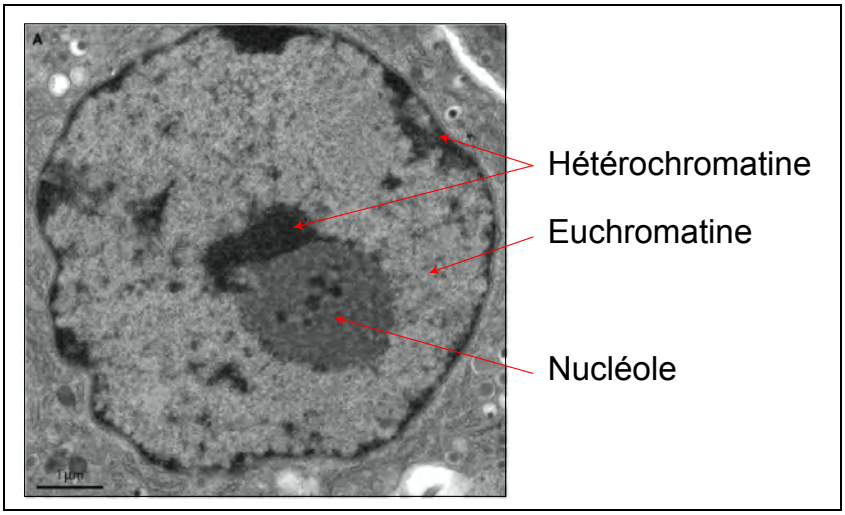


Figure 35 : Visualisation de l'hétérochromatine dans un noyau de mammifère
Noyau d'hépatocyte de mammifère observé en microscopie électronique. L'euchromatine est moins dense aux électrons que l'hétérochromatine, qui se situe principalement au centre du noyau bordant le nucléole ainsi qu'en périphérie du noyau. *Source :* (Akhtar and Gasser, 2007).

d. Organisation en 3D au sein du noyau

L'organisation en territoires chromosomiques des noyaux de cellules animales en interphase fut suggérée par Carl Rabl dès 1885 (Rabl, 1885), mais le nom « territoire chromosomique » fut introduit en 1909 par Theodor Boveri qui pensait que chaque chromosome reste individualisé en interphase et occupe un espace nucléaire distinct (Boveri, 1909). A la fin des années 1970, les frères Cremer partirent du principe selon lequel l'irradiation d'une petite partie d'un noyau devrait affecter (1) un grand nombre de chromosomes différents dans l'hypothèse d'une distribution aléatoire des chromosomes ou (2) un petit nombre de chromosomes dans l'hypothèse d'une organisation en territoires chromosomiques (Figure 36 A). Ainsi, ils confirmèrent l'hypothèse des territoires chromosomiques car l'irradiation ne toucha qu'un nombre restreint de chromosomes (Zorn et al., 1976; 1979). Ces territoires furent par la suite visualisés grâce à des expériences d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), en utilisant des sondes marquant des chromosomes entiers (Lamond and Earnshaw, 1998).

Une carte 3D de la localisation de tous les chromosomes simultanément au sein du noyau d'une cellule humaine diploïde mâle (46 autosomes, XY) a été obtenue en 2005 (Figure 36 B) (Bolzer et al., 2005). L'importance de cette organisation pour la régulation de l'expression des gènes est illustrée par le fait que les chromosomes pauvres en gènes et transcriptionnellement inactifs, comme le chromosome 18, ont tendance à être localisés au niveau de la périphérie du noyau (Croft et al., 1999), tandis que les chromosomes riches en gènes tel le chromosome 19 sont localisés à l'intérieur (Tanabe et al., 2002). De plus, les interactions inter et intra chromosomiques peuvent maintenant être précisément cartographiées grâce à l'essor des techniques de capture de conformation des chromosomes (3C) (Lieberman-Aiden et al., 2009).

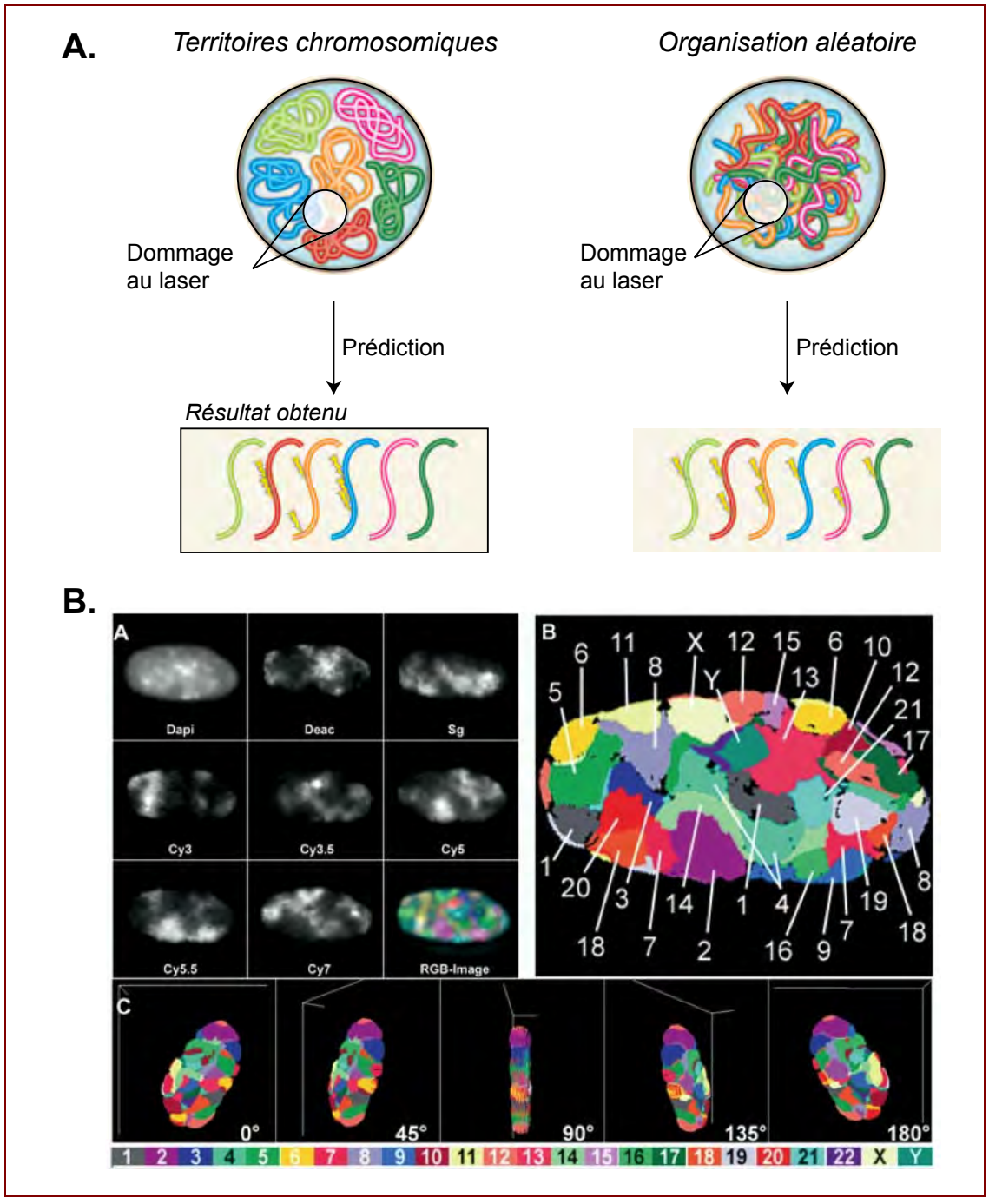


Figure 36 : Identification des territoires chromosomiques

A. Représentation schématique de l'expérience réalisée dans le laboratoire des frères Cremer en 1976 et qui démontra l'existence de territoires chromosomiques (Zorn et al., 1976; 1979). L'hypothèse d'une organisation aléatoire implique qu'une irradiation locale aux UV affecte un grand nombre de chromosomes différents. Or, en réalisant cette expérience, ils affectèrent qu'une petite fraction de chromosomes, confirmant le modèle des territoires chromosomiques.
Schéma adapté d'après (Meaburn and Misteli, 2007).
B. Première expérience de FISH en 3D permettant de visualiser les territoires chromosomiques à partir de fibroblastes diploïdes humains mâles (46, XY). (A) Les 23 paires de chromosomes et les chromosomes sexuels sont visualisés à l'aide de différents fluorochromes observés à travers 7 canaux différents. (B) Reconstitution avec de fausses couleurs des territoires chromosomiques. (C) Représentation 3D, vue de différents angles.
Image de (Bolzer et al., 2005).

2. Diversité et dynamique de la chromatine

L'organisation en chromatine est très dynamique et porteuse d'informations potentiellement épigénétiques, c'est à dire de « changements héritables dans l'expression des gènes qui n'impliquent pas de changement de la séquence d'ADN » (Riggs and Russo, 1996). Le concept d'héritabilité permet de bien distinguer l'épigénétique des changements temporaires d'expression des gènes resultant de la signalisation cellulaire. Les modifications de la chromatine, connues pour leur influence potentielle sur l'expression des gènes, font en particulier intervenir (a) la méthylation de l'ADN, (b) des modifications post-traductionnelles des histones, (c) la présence de variants d'histones dans la chromatine, ou l'association avec certaines protéines ou ARNs, ou encore la position dans le noyau (voir Figure 5, préambule). Récemment, une étude à grande échelle dans des cellules de Drosophile a permis de mettre en évidence cinq signatures différentes de la chromatine définient par la combinaison de protéines qui la compose (Filion et al., 2010). Ainsi, l'étude de la chromatine constitue un enjeu central pour notre compréhension de l'expression différentielle des gènes et le maintien de leur expression, en particulier au cours du développement embryonnaire.

a. La méthylation de l'ADN

En 1987, R. Holliday associa l'épigénétique aux situations où des changements dans l'activité des gènes résultaient de différences dans la méthylation de l'ADN (Holliday, 1987). Il s'agit en effet d'une modification covalente de l'ADN : l'ajout d'un groupe méthyle par une enzyme spécifique, une *DNA methyltransferase* (DNMT). La méthylation de l'ADN est retrouvée dans la plupart des organismes, bien que certaines espèces semblent en être dépourvu, telle *Drosophila melanogaster* (Bird et al., 1995). Chez les procaryotes, et notamment les bactéries, l'ADN peut être méthylé sur les bases adénines et cytosines. Ceci constitue une protection contre l'intrusion d'ADN étranger grâce à des enzymes de restriction qui ciblent uniquement l'ADN non méthylé, et donc étranger, permettant ainsi sa dégradation (Noyer-Weidner and Trautner, 1993). De plus, cette méthylation est impliquée dans la réparation de l'ADN après réplication (Cooper et al., 1993). Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN n'affecte que la base cytosine, et spécifiquement suivie d'une guanine (dinucléotide CG ou CpG). Alors que ce dinucléotide est sous représenté dans le génome (5 à 10% de la fréquence prédite à cause de la mutation du C méthylé en base T par déamination au cours de l'évolution), jusqu'à 90% de ces CpG sont méthylés chez les mammifères (Bird, 1993). Contrairement à la globalité du génome, il existe de petites régions d'ADN ayant une taille de 0.5 à 4 ou 5kb contenant des dinuclétotides CpG à la fréquence attendue (ilots CpG) (Bird, 1995). Ces ilots CpG sont enrichis au niveau des promoteurs des gènes, probablement car ces régions n'étaient pas méthylées et n'ont donc pas subi la

mutation de C vers T au cours de l 'évolution (Antequera and Bird, 1993). Ainsi, ces ilots sont le plus souvent déméthylés pour permettre l'activité des gènes. En effet, la méthylation de l'ADN corrèle avec la répression transcriptionnelle, selon une interférence directe, bloquant l'accès aux facteurs de transcription, ou indirecte via un mécanisme impliquant le recrutement des facteurs de répression (Boyes and Bird, 1991).

Chez les vertébrés, la méthylation *de novo* permet le réarrangement du profil de méthylation de l'ADN au moment de l'embryogenèse ainsi qu'au cours des processus de différenciation (Razin and Cedar, 1993). Celle-ci nécessite la fonction des enzymes DNMT3a et DNMT3b qui sont nécessaires pour le développement embryonnaire des mammifères (Okano et al., 1999). Cette modification est ensuite stablement transmise au cours de la réplication grâce à un processus de maintien, impliquant notamment l'enzyme DNMT1 (Bestor et al., 1988) qui est capable de copier la méthylation du brin parental sur le brin nouvellement synthétisé. Ainsi, la méthylation de l'ADN apparaît comme une modification héritable au cours de la réplication, comme il l'a été démontré grâce à l'injection d'ADN méthylé dans des œufs de *Xenopus laevis* (Harland, 1982).

Le fait que la méthylation soit une modification réversible, qu'elle n'affecte pas directement la séquence nucléotidique de l'ADN, et de façon importante qu'elle soit transmissible au cours des divisions, fait clairement d'elle une modification épigénétique (pour revue, (Suzuki and Bird, 2008)). Notamment, celle-ci permettrait potentiellement d'expliquer la différence de couleur du pelage de souris ayant le même patrimoine génétique, en fonction du régime alimentaire de la mère via la méthylation du gène Agouti (Waterland and Jirtle, 2003). La méthylation de l'ADN contribuerait également aux discordances qui s'accumulent au cours de la vie de jumeaux monozygotes (Fraga et al., 2005) (Figure 37).

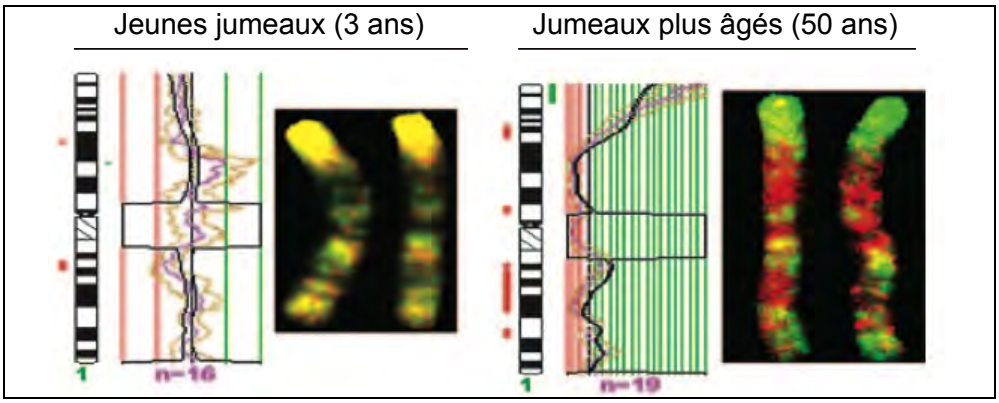


Figure 37 : Méthylation de l'ADN chez des jumeaux monozygotes
Cartographie des régions ayant des différences de méthylation de l'ADN chez des jumeaux monozygotes grâce à une étude d'hybridation génomique comparative. Des sondes correspondant aux fragments méthylés ont été générées à partir de paires de jumeaux (rouge pour l'un et vert pour l'autre) de 3 et 50 ans puis hybridées de façon compétitive sur des chromosomes métaphasiques. L'exemple du chromosome 1 est ici illustré. La paire de jumeaux de 50 ans montre d'importantes différences dans le profil de méthylation à l'ADN (rouge ou vert, région hypo ou hyperméthylée) comparé aux jumeaux de 3 ans qui montre une distribution similaire (jaune, quantité égale de colorant rouge et vert). *Figure d'après* (Fraga et al., 2005).

b. Les modifications des histones (PTMs)

Les histones, longtemps pensées comme étant des inhibiteurs de la transcription basale en limitant l'accès à l'ADN, sont en réalité versatiles, notamment par l'ajout de groupes chimiques sur certains résidus (pour revue, voir (Kouzarides, 2007)). Ces modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones peuvent avoir pour conséquence (1) de changer la nature de l'interaction ADN-nucléosome, ou bien (2) de permettre le recrutement de protéines interagissant avec la chromatine et impliquées dans divers processus. Il existe un grand nombre de modifications différentes des histones (Figure 38A) impliquées dans différents processus cellulaires, dont les plus étudiées sont l'acétylation et la méthylation. La plus récemment identifiée est la crotonylation (Tan et al., 2011), une modification qui semble spécifique des gamètes mâles post-méiotiques (pour revue, voir (Montellier et al., 2012)). Ces PTMs ont principalement lieu au niveau des extrémités N-terminales non structurées des histones (Figure 38B) qui émergent à l'extérieur du nucléosome et sont donc facilement accessibles aux enzymes de modification (Luger et al., 1997) (pour rappel, voir Figure 32C). Il est important de noter qu'un acide aminé peut éventuellement être la cible de différentes modifications, mais une seule n'est possible à un moment donné. De plus, il existe de nombreuses interférences entre les modifications soit en *cis* sur une même histone soit en *trans* sur des histones différentes, ajoutant un degré de complexité supplémentaire au répertoire d'information porté par les histones (Latham and Dent, 2007) (Exemple, Figure 38C).

Dans cette partie, j'illustrerai l'influence des PTMs avec l'exemple de l'acétylation et la méthylation de certains résidus spécifiques.

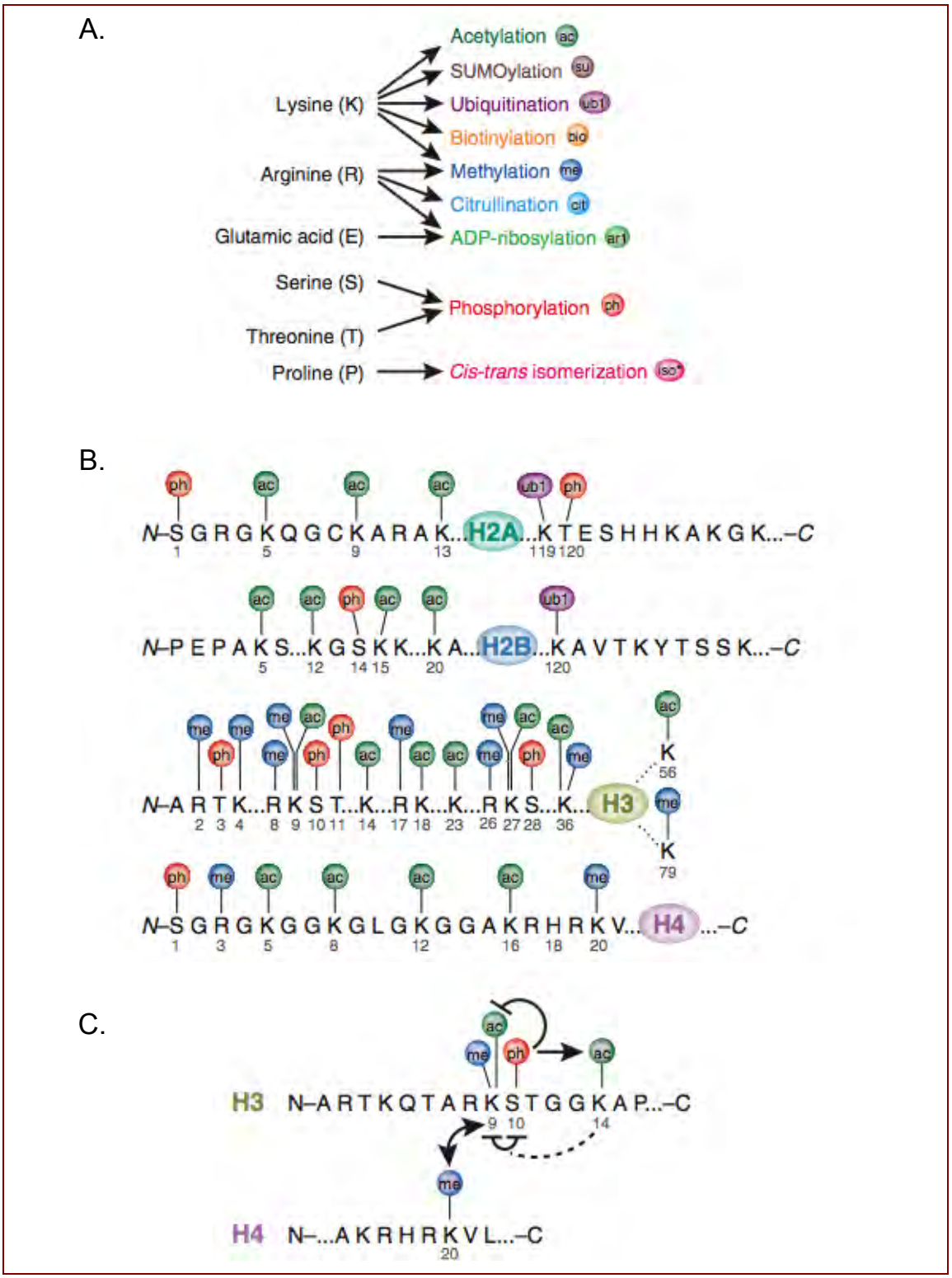


Figure 38 : Modifications post-traductionnelles des histones
A. Principales modifications post-traductionnelles des histones connues et les types de résidus modifiés. *D'après* (Latham and Dent, 2007). **B.** Modifications principales des histones humaines de la particule cœur nucléosomale et qui ont majoritairement lieu sur les extrémités N-terminales. Le domaine globulaire des histones est indiqué par un ovale coloré. *D'après* (Bhaumik et al., 2007). **C.** Exemple d'interférence entre des modifications des histones H3 et H4. Notamment, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 stimule l'acétylation de la lysine 14 (flèche) tandis qu'elle inhibe la modification de la lysine 9, notamment par méthylation (H3K9me). De plus, les modifications H3K9me et H4K30me semblent être fonctionnellement liées. *D'après* (Latham and Dent, 2007).

L'acétylation

L'acétylation des résidus lysines des histones et son lien avec la transcription a été établi il y a presque 50 ans (Allfrey et al., 1964). Cette modification permet notamment de neutraliser la charge positive de la lysine et, ainsi, déstabiliserait l'interaction entre la particule cœur du nucléosome et l'ADN, pour faciliter son accessibilité aux différents facteurs de transcription. En accord avec cette hypothèse, des analyses à l'échelle du génome chez la levure montrent que les régions transcrites sont globalement hyperacétylées alors que les régions silencieuses semblent plutôt hypoacétylées (Pokholok et al., 2005). De plus, l'acétylation des histones est reconnue par des protéines contenant un *bromodomain* qui sont généralement des facteurs de transcription ou de remodelage de la chromatine (pour revue, voir (Taverna et al., 2007)).

L'acetylation des histones est régulée au cours du développement embryonnaire, comme étudié chez *Xenopus laevis* où une hyperacétylation des histones requise pour la formation du mésoderme est observée au moment de la gastrulation (Dimitrov et al., 1993; Almouzni et al., 1994). L'acétylation est également impliquée au cours de la spermatogenèse chez les mammifères et chez la drosophile, où une vague d'hyperacétylation des histones a lieu dans un noyau pourtant transcriptionnellement inactif (Govin et al., 2004; Rathke et al., 2007). Cette hyperacétylation a lieu juste avant le remplacement des histones par des protéines spécifiques permettant la condensation du sperme, un phénomène faisant intervenir la protéine à bromodomaines *BRomoDomain Testis-specific* (BRDT) qui est capable de reconnaître la combinaison des marques H4K5ac, H4K8ac et H3K18ac (Pour revue, voir (Rousseaux et al., 2011)).

La méthylation

La méthylation des histones fut également découverte en 1964 (Murray, 1964). Cette modification cible des lysines ou des arginines (Figure 38A), principalement sur les extrémités des histones H3 et H4 (Figure 38B). Selon les résidus touchés, la méthylation des histones aura des conséquences distinctes sur les processus cellulaires. De plus, les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées ajoutant encore un autre niveau de variabilité. Chez les eucaryotes supérieurs, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est fortement représentée au niveau de l'hétérochromatine, celle-ci permet l'ancrage de la protéine Heterochromatin Protein 1 (HP1) requise pour le maintien de l'hétérochromatine péricentrique (Bannister et al., 2001) (pour revue, voir (Maison and Almouzni, 2004)).

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) est une marque très conservée qui est, quant à elle, liée à l'état transcriptionnel actif de l'euchromatine (Strahl et al., 1999). En effet, la monométhylation de H3K4 marque spécifiquement les « enhancers » (Heintzman et al., 2007), la diméthylation est globalement associée aux corps des gènes actifs ou potentiellement actifs tandis que la triméthylation est spécifiquement enrichie au niveau des promoteurs (Bernstein et al., 2002; Ng et al., 2003). Plusieurs études montrent que la méthylation de H3K4 favorise le recrutement de protéines impliquées dans l'acétylation des histones, et donc la transcription (Wang et al., 2001; Bernstein et al., 2002; Pray-Grant et al., 2005). En effet, la triméthylation de H3K4 ne semble pas en tant que telle être directement nécessaire pour l'élongation de la transcription (Pavri et al., 2006) mais permettrait le recrutement de différents facteurs facilitant la transcription (Sims et al., 2007). Il s'agit notamment du facteur de remodelage de la chromatine *Chromodain Helicase DNA binding protein 1* (CHD1) qui possède un double chromodomaine capable d'interagir avec H3K4me3 (Pray-Grant et al., 2005). CHD1 participe ainsi au maintien de l'état pluripotent des cellules souches embryonnaires (ES) qui sont caractérisées par une structure chromatinienne enrichie en marques permissives (Gaspar-Maia et al., 2009) (pour revue, voir (Persson and Ekwall, 2010)). Ainsi, la différenciation des cellules ES murines s'accompagne d'une augmentation globale de la méthylation des résidus H3K9 et H3K27, deux marques répressives, et une baisse de la méthylation de H3K4 et de l'acétylation des histones (pour revue, voir (Gaspar-Maia et al., 2011)). Cependant, certains gènes du développement sont caractérisés par la présence conjointes de marques activatrice (H3K4me3) et répressive (H3K27me3), permettant à la fois leur répression dans les cellules ES mais aussi leur activation rapide au cours de la différenciation via la perte de la marque H3K27me3 (pour revue, voir (Gaspar-Maia et al., 2011)). Chez le xénope également, certains stades de différenciation ont été associés avec différentes signatures de PTMs des histones (Shechter

et al., 2008). Notamment, des études à grande échelle montrent que l'acquisition de la marque H3K4me3 corrèle avec l'activation de l'expression des gènes zygotiques tandis que H3K27me3 n'apparaît que plus tard probablement pour restreindre l'activité des gènes de façon spatio-temporelle (Akkers et al., 2009). De plus, la protéine *WD-Repeat protein 5* (WDR5), nécessaire pour la triméthylation de H3K4, est essentielle pour le développement embryonnaire, en particulier pour assurer une expression spatiale correcte des gènes homéotiques (Wysocka et al., 2005).

L'acétylation et la méthylation sont toutes les deux des modifications réversibles et dynamiques, faisant respectivement intervenir l'action d'*histone acetylases* (HAT) (Sterner and Berger, 2000) et *histone deacetylases* (HDAC) (Witt et al., 2009), et l'action d'*histone methyltransferases* (HMT) (Sims et al., 2003) et *histone demethyltransferases* (HDMT) (Agger et al., 2008). Ces modifications qui sont donc dynamiques peuvent résulter d'une signalisation cellulaire et permettre la régulation de processus impliquant la chromatine à court terme. Alternativement, elles peuvent être maintenues et transmises au cours des divisions comme porteuses d'une information de nature épigénétique. En effet, le maintien de l'hétérochromatine péricentrique fournit un exemple, avec la méthylation H3K9, d'une possibilité de transmission épigénétique via un mécanisme sophistiqué lors de la réplication de l'ADN (pour revue (Corpet and Almouzni, 2009)).

c. Les variants d'histones

L'incroyable diversité de la chromatine s'illustre également par l'incorporation de variants d'histones dans la chromatine (Talbert et al., 2012). En effet, bien que les histones représentent les protéines les plus conservées au cours de l'évolution, il existe des variants d'histones non alléliques. On distingue les variants « canoniques » des variants dits « de remplacement ».

Les variants canoniques sont les variants majoritaires. Ils présentent un pic d'expression en phase S permettant de fournir un stock massif d'histones lors de la réplication de l'ADN. Ceci est rendu possible notamment grâce à une régulation d'expression coordonnée de multiples copies de gènes codant pour les quatre histones de la particule nucléosomale, organisés en tandem chez les vertébrés (pour revues, voir (Marzluff et al., 2008) et (Szenker et al., 2011) ci après). Les ARNm des histones canoniques ont la particularité d'être dépourvus de queue poly-A, mais possèdent une boucle à leur extrémité 3' qui contribue aussi à leur régulation en phase S (Marzluff and Duronio, 2002). Les variants de remplacement ont été découverts pour les histones H2A, H2B et H3 par A. Zweidler en 1977 (Franklin and Zweidler, 1977). Par définition, ils se distinguent des variants canoniques par la présence d'une queue poly-A à l'extrémité 3' de leurs ARN messagers dont l'expression n'est pas régulée en phase S (Wu and Bonner, 1981) et qui sont codés par des gènes uniques. Chez les vertébrés, des variants de toutes les histones à l'exception de H4 ont été identifiés à ce jour (Figure 39) (pour revue, (Sarma and Reinberg, 2005) ; pour la nomenclature (Talbert et al., 2012)). Dans cette partie, je souhaiterai les décrire brièvement avant de me consacrer dans un troisième chapitre à deux variants de l'histone H3, H3.2 (canonique) et H3.3 (de remplacement) sur lesquels mon intérêt s'est particulièrement porté au cours de ma thèse.

Variants de l'histone de liaison H1

La famille des histones de liaison H1 présente un grand nombre de variants, il en existe 11 chez l'Homme (pour revue voir (Happel and Doenecke, 2009)). Quatre classes de variants peuvent être distinguées. (1) Six variants canoniques ont été identifiés : **H1.1 à H1.5** dont les gènes sont organisés en tandem au niveau du cluster des histones et **H1.10** (H1x) codé par un gène situé sur autre chromosome. (2) Trois variants exprimés dans les testicules ont également été identifiés : **H1.6** (H1t), **H1.7** (H1t2) et **H1.9**. (3) Il existe un variant de remplacement spécifiquement exprimé au cours de l'ovogenèse, **H1.8** (H1oo chez les mammifères ou B4 (H1.4) chez le Xénope). (4) De plus, un variant exprimé dans les cellules avancées dans leur programme de différenciation a été identifié, il s'agit de **H1.0** (H1°).

Les variants de l'histone H1 ont particulièrement été étudiés chez le Xénope (pour revues (Khochbin and Wolffe, 1994; Khochbin, 2001)). Brièvement, ces données révèlent l'importance du variant B4 au cours du développement embryonnaire précoce. Il est stocké au cours de l'ovogenèse et correspond au variant H1 majoritaire jusqu'à quelques heures après l'activation de la transcription zygotique (MBT) (Dimitrov et al., 1993). Ce variant, qui est moins basique que les variants H1 canoniques (somatiques), permettrait une déstabilisation plus facile des nucléosomes pour faciliter les divisions rapides sans phases G1/G2 (voir Chapitre I). Les variants somatiques sont alors exprimés après la MBT, au moment où les cycles s'allongent. Le remplacement progressif de B4 par H1 somatique conduit notamment à la perte de compétence mésodermique à la gastrulation (Steinbach et al., 1997). H1.0 (H1°) est quant à lui exprimé qu'au stade têtard dans les cellules différenciées telles que les neurones (Grunwald et al., 1995). Très basique, il permettrait de stabiliser la structure chromatinienne d'un type cellulaire donné.

Variants de l'histone H2A

Cinq variants de l'histone H2A ont été décritscv à ce jour chez l'Homme : le variant canonique H2A et les variants de remplacement H2A.X, H2A.Z, mH2A (macroH2A) et H2A.B (ou H2A.Bbd pour *bar body deficient*) (Figure 39).

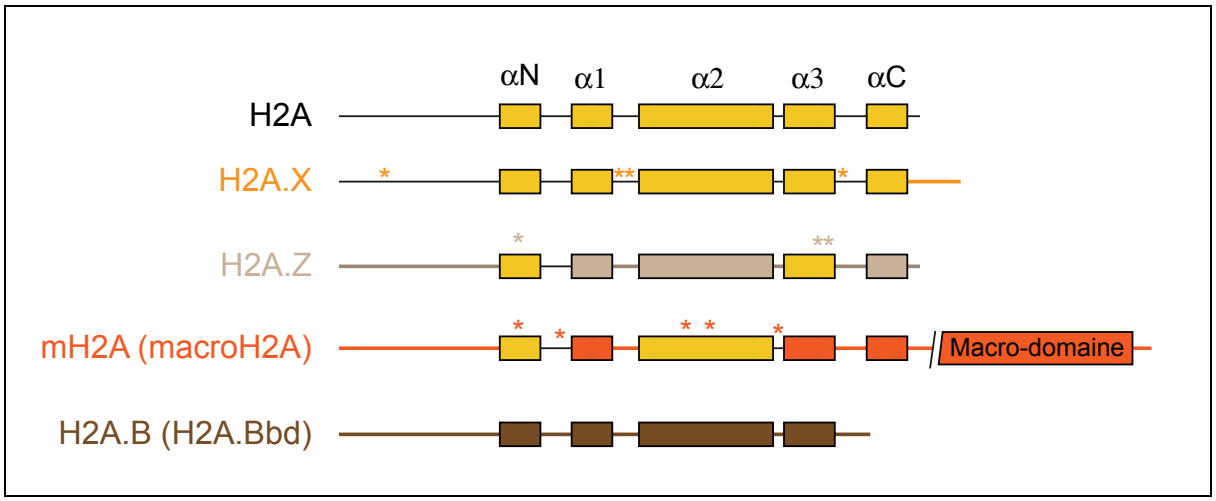


Figure 39 : Variants de l'histone H2A chez l'Homme
Représentation schématique de la structure secondaire des variants de l'histone H2A connus chez l'Homme, avec les différentes hélices α et les liaisons ou extrémités non structurées. Les étoiles représentent des acides aminés différents par rapport au variant canonique. Lors d'un grand nombre de différences par rapport au variant canonique, le domaine entier est indiqué de la couleur du variant.

L'histone **H2A.X** représente 10 à 15% de la quantité totale d'H2A et diffère du variant canonique principalement sur sa queue C-terminale (Figure 39), dont la présence d'une sérine (en position 139 chez les mammifères) qui peut être phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN (Rogakou et al., 1998). En effet, la signalisation des lésions de l'ADN fait notamment intervenir des protéines de la famille des PI-3-kinases qui phosphorylent H2A.X sur plusieurs mégabases au voisinage du site du dommage (Rogakou et al., 1999). Ceci permet le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (pour revue (van Attikum and Gasser, 2009)). H2A.X est donc un variant essentiel pour le maintien de l'intégrité du génome.

L'histone **H2A.Z**, représentant 5 à 10% des histones H2A, est très conservé au cours de l'évolution. Il ne possède qu'environ 60% d'homologie avec H2A (Figure 39) et aurait plusieurs fonctions biologiques (pour revues, voir (Guillemette and Gaudreau, 2006; Billon and Côté, 2012)). En effet, son importance a été démontrée au niveau de régions régulatrices telles que les promoteurs pour la transcription des gènes (revue (Billon and Côté, 2012)), mais aussi au niveau des centromères pour la ségrégation des chromosomes en particulier via la régulation de la condensation de l'hétérochromatine péricentrique (Rangasamy et al., 2003; 2004). Il n'est ainsi pas étonnant que ce variant soit essentiel au développement de nombreux organismes, et notamment le Xénope (Ridgway, 2004).

Le troisième variant de remplacement H2A, **macroH2A**, est spécifique des vertébrés et est extrêmement divergent de H2A notamment au niveau de ses extrémités (Figure 39). Un large domaine globulaire formant les deux tiers de la protéine est en effet retrouvé dans la partie C-terminale, il porte le nom de macrodomaine et donne son nom à ce variant (Pehrson and Fried, 1992). Le macrodomaine de macroH2A dépasse à l'extérieur de la

structure du nucléosome (Chakravarthy et al., 2005), ainsi il pourrait servir de plateforme pour l'interaction de régulateurs de la chromatine (Gamble and Kraus, 2010). Chez les mammifères, macroH2A est enrichi au niveau du chromosome X inactif des femelles (Costanzi and Pehrson, 1998; Chadwick et al., 2001), suggérant son implication dans la répression génique et l'hétérochromatinisation. Il interfère en effet avec la liaison de facteurs de transcription et l'initiation de la transcription *in vitro* (Angelov et al., 2003; Doyen et al., 2006). Une récente étude à grande échelle montra que macroH2A chez l'Homme est également enrichi au niveau du promoteur d'un grand nombre de gènes et particulièrement de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Buschbeck et al., 2009). Cette fonction semble être conservée chez les vertébrés puisque ce variant est essentiel pour le développement du poisson zèbre, notamment en raison de son activité dans la régulation de l'expression des gènes homéotiques (Buschbeck et al., 2009). Par ailleurs, des expériences de transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope ont permis d'illustrer son importance dans le maintien de l'état transcriptionnel inactif (Pasque et al., 2011a; 2011b).

Le dernier variant de H2A, **H2A.B (H2A.Bbd),** a été identifié plus récemment chez l'Homme (Chadwick and Willard, 2001) et est le variant de H2A le moins étudié. Il présente environ 50% d'homologie avec H2A mais ne possède pas d'hélice α C-terminale (Figure 39). Ce variant a la particularité d'être exclu du chromosome X inactif (ou corps de Barr) lorsqu'il est surexprimé (Chadwick and Willard, 2001), ce qui lui a valu son nom et fait de lui un variant associé avec l'euchromatine. H2A.Bbd est fortement exprimé au niveau des testicules et semble avoir un rôle important au cours de la spermatogenèse, étant associé à la chromatine hyperacétylée précédant le remplacement des histones par les protamines (Ishibashi et al., 2010).

Notons également qu'un variant exprimé dans les testicules chez le rat a été identifié, il s'agit de **tH2A**. Il ne présente que 8 acides aminés de différence avec H2A et est fortement incorporé dans la chromatine des spermatocytes (Trostle-Weige et al., 1982; Rao et al., 1983). Plus récemment, deux variants spécifiques des spermatides chez la souris ont été identifiés, il s'agit de **H2A.L.1 et H2A.L.2** (Govin et al., 2007). Ils participeraient à l'organisation des régions péricentromériques à la fin de la spermatogenèse. Enfin, un variant similaire à H2A.B humain et retrouvé spécifiquement au niveau des sites d'initiation de la transcription a été découvert chez la souris, **H2A.Lap1**, ces sites également marqués par la présence du variant H2A.Z. H2A.Lap1 participerait à la régulation de l'expression de gènes spécifiques pendant la spermatogenèse (Soboleva et al., 2011).

Variants de l'histone H2B

En plus du variant canonique H2B, deux variants de remplacement de cette histone ont récemment été identifiés. Il s'agit de **H2B.1** (TS H2B pour *testis specific*) (Zalensky, 2002) et **H2B.W** (H2BFWT) (Churikov et al., 2004) qui sont tous les deux spécifiquement exprimés dans les testicules mais dont les rôles respectifs ne sont pas très bien connus. H2B.1 partage 85% d'homologie avec H2B (les principales différences résident dans la partie N-terminale où H2B.1 possède trois sites additionnels de phosphorylation potentielle) tandis que H2B.W est particulièrement divergent de H2B (Figure 40). De façon intéressante, H2B.1 est enrichi au niveau de gènes importants pour la spermatogenèse (Hammoud et al., 2009), et pourrait donc participer à promouvoir leur transcription de façon directe ou indirecte en empêchant l'incorporation de protamines. De plus, il dimérise préférentiellement avec le variant H2A.L1/L2 lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules somatiques, formant des octamères moins stables (Govin et al., 2007). H2B.W, quant à lui, ferait partie du complexe protéique télomérique spécifique des spermatozoïdes (Churikov et al., 2004).

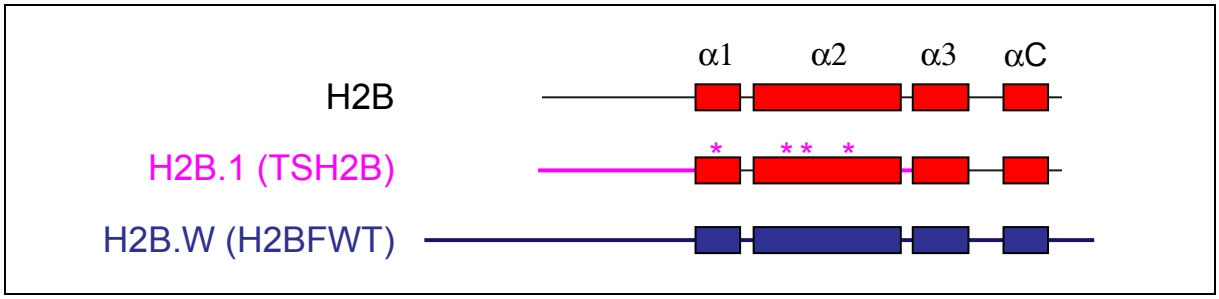


Figure 40 : Variants de l'histone H2B chez l'Homme
Représentation schématique de la structure secondaire des variants de l'histone H2B connus chez l'Homme, avec les différentes hélices α et les liaisons ou extrémités non structurées. Les étoiles représentent des acides aminés différents par rapport au variant canonique. Lors d'un grand nombre de différences par rapport au variant canonique, le domaine entier est indiqué de la couleur du variant.

Variants de l'histone H3

A ce jour, 8 variants de l'histone H3 ont été identifiés chez l'Homme.

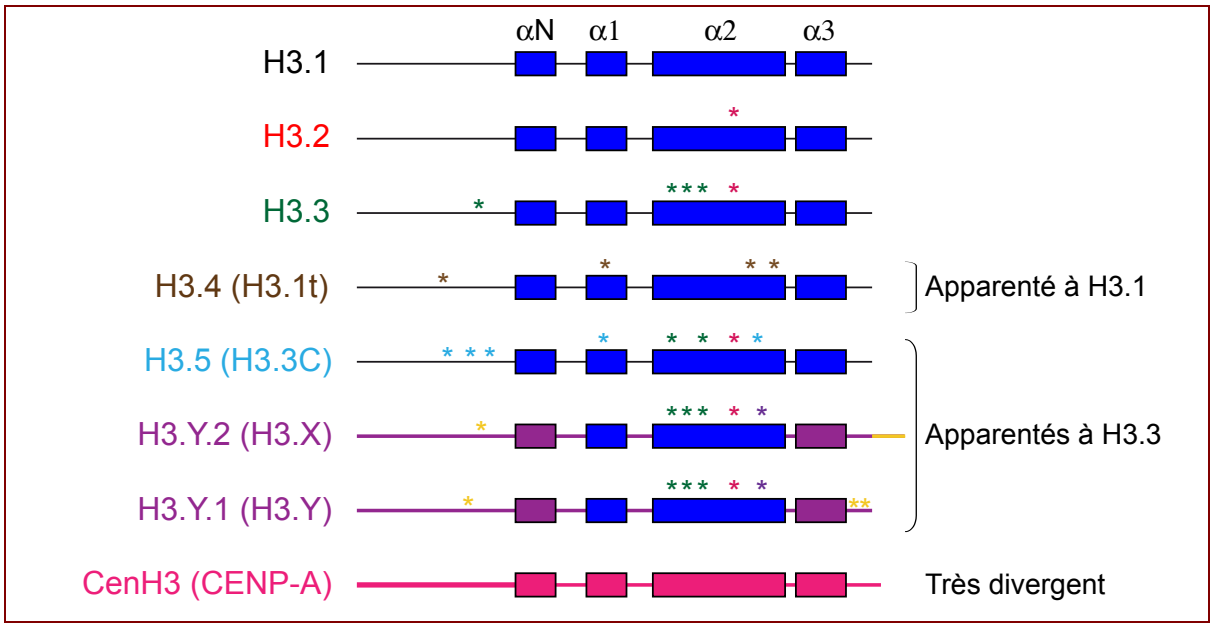


Figure 41 : Variants de l'histone H3 chez l'Homme
Représentation schématique de la structure secondaire des variants de l'histone H3 connus chez l'Homme, avec les différentes hélices α et les liaisons ou extrémités non structurées. Les étoiles représentent des acides aminés différents par rapport au variant canonique. Les couleurs correspondent à l'acide aminé présent dans le variant de cette couleur et éventuellement conservé dans d'autres variants. Pour les histones H3.Y.1 et H3.Y.2, les quelques différences entre elles sont illustrées en jaune. Lors d'un grand nombre de différences par rapport au variant canonique, le domaine entier est indiqué de la couleur du variant.

H3.1 et H3.2 sont tous les deux des variants canoniques. Ils ne présentent qu'un seul acide aminé de différence (Figure 41) et H3.1 n'est retrouvé que chez les mammifères (voir revue (Szenker et al., 2011) ci-après). Cependant, H3.1 est le variant canonique le plus étudié chez les mammifères, et la fonction potentiellement spécifique de H3.2 reste à explorer. Notons tout de même que ces deux variants présentent des modifications post-traductionnelles différentes : H3.1 est enrichi en PTMs associées avec l'euchromatine (H3K14ac) et l'hétérochromatine constitutive (H3K9me2) tandis que H3.2 est enrichi en PTMs associées avec l'hétérochromatine facultative telles H3K27me2 et H3K27me3 (Hake, 2005). Dans les cellules HeLa, H3.1 est majoritaire par rapport à H3.2 (Loyola et al., 2006). Il représente environ 52% de la quantité d'histone H3 totale tandis que H3.2 représente environ 32%.

Le troisième variant le plus représenté correspond au variant de remplacement **H3.3** (environ 15% dans les cellules HeLa) (Loyola et al., 2006) qui ne diffère d'H3.2 et H3.1 que par 4 et 5 acides aminés, respectivement (Figure 41). H3.3 semble être le variant ancestral

car certaines espèces telles la levure *S. cerevisiae* ne possèdent qu'un variant H3 proche de H3.3. Contrairement à H3.1 et H3.2, H3.3 est fortement associé aux PTMs caractéristiques de l'euchromatine telle H3K4me3 (McKittrick et al., 2004) et est enrichi dans les régions transcriptionnellement actives (Ahmad and Henikoff, 2002a). Nous détaillerons les caractéristiques et fonctions potentielles de ce variant dans le chapitre III et la revue (Szenker et al., 2011).

Le quatrième variant **CenH3** (ou CENP-A chez les mammifères) est très important pour l'intégrité du génome. CenH3 est un variant centromérique : il est crucial pour définir l'identité du centromère des chromosomes et sert de plateforme pour l'assemblage des protéines du kinétochore (pour revue (Allshire and Karpen, 2008)). CenH3 présente un pic d'expression en phase G2 du cycle cellulaire (Shelby et al., 2000) et ce variant est incorporé dans la chromatine indépendamment de la réplication à la fin de la mitose (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009).

Un variant exprimé spécifiquement dans les testicules chez l'Homme, **H3.4** (ou H3.1t ou H3t) a été identifié en 1996 (Witt et al., 1996) mais sa fonction spécifique reste à ce jour à explorer. Sa séquence est très proche de H3.1 (Figure 41).

Trois autres variants dont la séquence est proche de H3.3 ont été identifié très récemment (Figure 41). Il s'agit de **H3.Y.1** (H3.Y) et **H3.Y.2** (H3.X) qui sont spécifiques des primates et dont la fonction précise reste à explorer (Wiedemann et al., 2010). Notons qu'aucune protéine codée par le gène H3.Y.2 n'a été détectée *in vivo.* Le nouveau variant **H3.5** (H3.3C) est spécifique des hominidés et exprimé dans les tubes séminifères des testicules humains (Schenk et al., 2011).

III. LES VARIANTS D'HISTONE H3.1/H3.2 ET H3.3

Comme nous l'avons vu précédemment, les histones présentent un grand nombre de variants non-alléliques. Beaucoup d'entre eux sont spécifiquement exprimés au cours de la spermatogenèse, un processus qui implique un remaniement majeur de la chromatine (pour revue (Govin et al., 2004)). L'histone H3 présente un variant incorporé spécifiquement au niveau des centromères, contribuant à son identité de façon épigénétique (pour revue (Allshire and Karpen, 2008)). Mais qu'en est-il de l'importance du variant dit de remplacement H3.3 ? Est-il interchangeable avec les variants canoniques ou possède-t-il une ou plusieurs fonctions spécifiques ? Pour répondre à cette question, je me suis particulièrement intéressée à son importance fonctionnelle au cours du développement embryonnaire vertébré grâce au modèle de choix *Xenopus laevis*.

J'ai eu l'opportunité de rédiger une revue pour un numéro spécial du journal *Cell Research* sur l'épigénétique et la chromatine. Ce fut l'occasion de mettre en lumière les dernières découvertes sur ce variant d'histone spécifique et son importance dans différents organismes. Ainsi, dans ce chapitre, j'ai choisi d'inclure cette revue pour introduire précisément ce variant H3.3 en comparaison aux variants canoniques H3.1/H3.2. Ceci recouvre leurs différences d'expression, leurs distinctes voies d'assemblage grâce à leurs chaperonnes respectives, leur différents enrichissements au sein de la chromatine ainsi que leurs importances fonctionnelles dans différents organismes. Cette revue me permet d'introduire la problématique que j'ai abordée au cours de ma thèse, et que je détaillerai dans la partie résultats.

1. Les voies d'assemblages distinctes des histones H3.1/H3.2 et H3.3

Dans un premier temps, j'introduirai brièvement les différentes voies d'assemblage des histones. Les histones nouvellement synthétisées sont transportées dans le noyau et incorporées dans la chromatine de façon très régulée. Les protéines histones étant très basiques, elles ont une forte affinité avec l'ADN. Cette caractéristique pourrait avoir des conséquences désastreuses si elle n'était pas régulée, les histones pouvant alors interagir de manière incontrôlée avec l'ADN, ou tout autre composant de charge opposée. Ainsi, il existe des protéines particulières qui prennent en charge les histones lorsqu'elles ne sont pas liées à l'ADN, ce sont les protéines « chaperons » d'histones (pour revue (De Koning et al., 2007)). Les protéines chaperons d'histones sont définies comme des « facteurs qui s'associent aux histones et stimulent une réaction de transfert d'histones sans faire partie du produit final de la réaction ». Ces chaperons peuvent permettre le stockage des histones (comme la nucléoplasmine découverte dans les ovocytes de Xénope (Laskey et al., 1978) – chapitre I) ou encore être nécessaires à l'assemblage progressif du nucléosome (Figure 42).

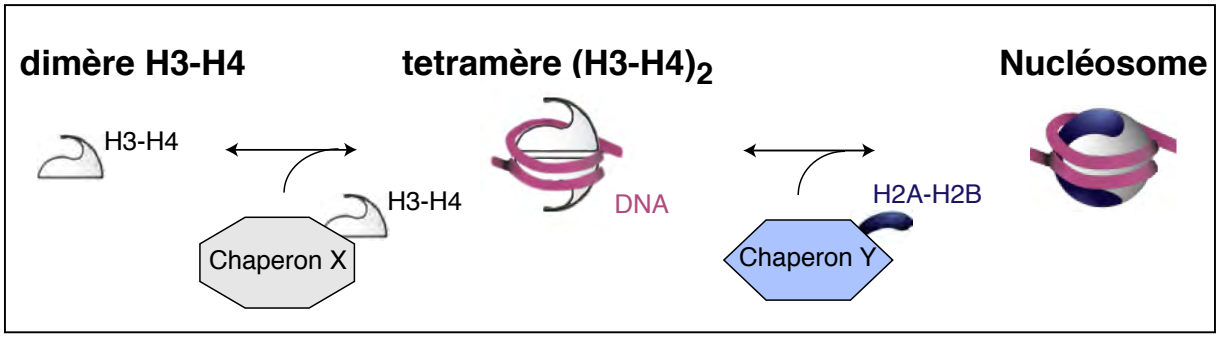


Figure 42 : Étapes de l'assemblage du nucléosome
Représentation schématique de l'assemblage du nucléosome à partir d'un dimère d'histone H3-H4 pris en charge par un chaperon X permettant l'assemblage d'un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ au sein de l'ADN (particule subnucléosomale) et autour duquel s'ajoute deux dimères H2A-H2B grâce à un autre chaperon Y.

La première étape de l'assemblage de la chromatine est la formation de la particule subnucléosomale qui contient un tétramère d'histones $(H3\text{-}H4)_2$ entouré des 146pb de l'ADN. Ensuite, viennent s'ajouter deux dimères d'H2A-H2B pour former le nucléosome (Figure 42). Ces étapes requièrent des protéines chaperons spécifiques. Concernant les chaperons spécifiques d'H3-H4, des études *in vitro* permirent l'identification du complexe *Chromatin Assembly Factor 1* (CAF-1) pour l'assemblage de la chromatine de façon couplée à la synthèse d'ADN au moment de la réplication (Smith and Stillman, 1989) et lors de la réparation de l'ADN (Gaillard et al., 1996) (Figure 43). Le complexe CAF-1 comprend trois sous-unités appelées p150, p60 et RbAp48 chez les mammifères (Kaufman et al., 1995; Verreault et al., 1996). CAF-1 est spécifiquement ciblé aux fourches de réplication via son

interaction avec *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), un complexe qui forme un anneau servant de facteur de processivité pour les ADN polymérases (Shibahara and Stillman, 1999; Moggs et al., 2000). Il a été montré dans plusieurs organismes que CAF-1 est essentiel, notamment pour le développement embryonnaire du Xénope via des expériences d'injection d'une forme dominante négative de la sous unité p150 (Quivy et al., 2001).

L'utilisation d'œufs de Xénope comme système acellulaire a permis de vérifier l'importance *in vivo* d'une protéine donnée quant à l'assemblage de la chromatine. Ainsi, lors d'une déplétion de la sous-unité p150 de CAF-1, les extraits d'œufs perdent leur capacité à promouvoir l'assemblage de la chromatine de façon couplée à la synthèse d'ADN (Ray-Gallet and Almouzni, 2004). Cette méthode fut utilisée avec succès pour identifier une autre protéine chaperon d'histone, l'*histone regulator A* (HIRA), comme un facteur nécessaire pour l'incorporation des histones H3-H4 de manière indépendante de la synthèse d'ADN (Ray-Gallet et al., 2002). L'étude des complexes de pré-déposition des variants d'histone H3.1 et H3.3 permit de mettre en évidence la spécificité de CAF-1 pour la déposition des dimères H3.1-H4 de façon dépendante de la synthèse d'ADN, tandis que HIRA est spécifique de H3.3-H4 pour son incorporation de façon indépendante de la synthèse d'ADN (Tagami et al., 2004) (Figure 43).

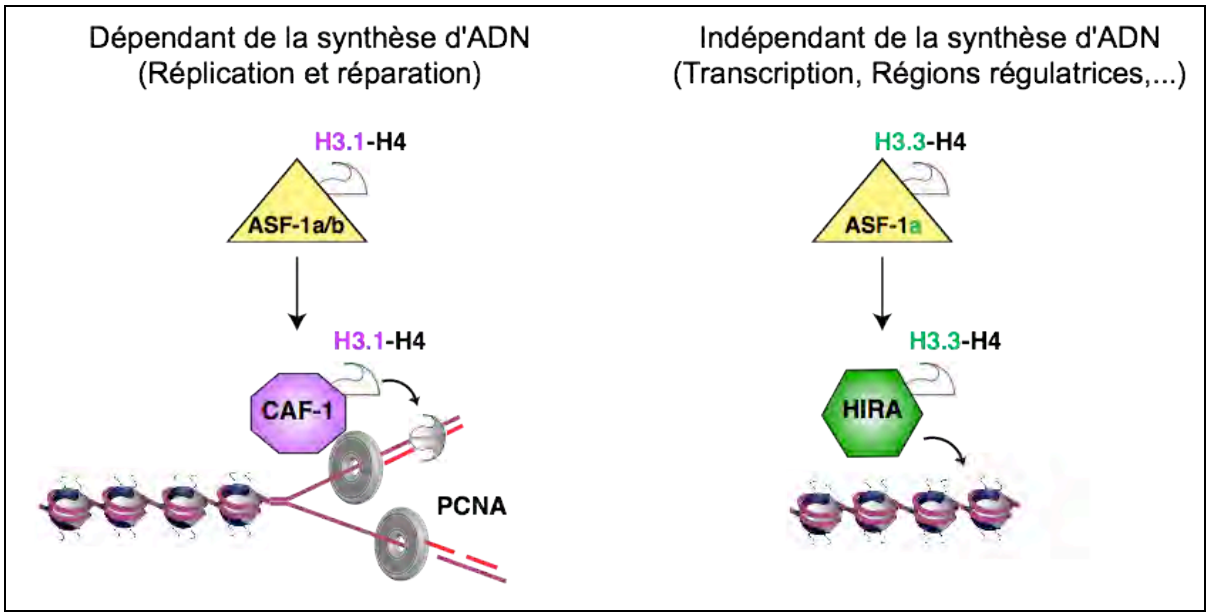


Figure 43 : Assemblages de la chromatine dépendant et indépendant de la synthèse d'ADN

L'assemblage de la chromatine couplé à la synthèse d'ADN (réplication et réparation) fait intervenir le complexe CAF-1 qui interagit directement avec PCNA et permet l'incorporation de dimère H3.1-H4. L'assemblage indépendant de la synthèse d'ADN fait intervenir HIRA et l'incorporation de dimère H3.3-H4 aux endroits nécessitant l'incorporation de nouvelles histones de façon indépendante de la synthèse d'ADN (transcription, régions régulatrices, etc…). ASF-1 est une protéine chaperon d'histone à l'interface des deux voies et permet de donner les dimères d'histone à l'une ou l'autre chaperone spécifique. *Schéma adapté à partir de* (De Koning et al., 2007).

HIRA participe à l'incorporation d'H3.3 spécifiquement au niveau des régions régulatrices et des gènes transcrits (Goldberg et al., 2010). Dans ce sens, une étude récente dans notre laboratoire a pu mettre en évidence le fait que HIRA interagit directement avec l'ADN et avec l'ARN polymérase II (Ray-Gallet et al., 2011) (Figure 44). Ainsi, HIRA participerait à la stabilité du génome en permettant l'incorporation d'histone à tout endroit de la chromatine où se trouverait de l'ADN nu.

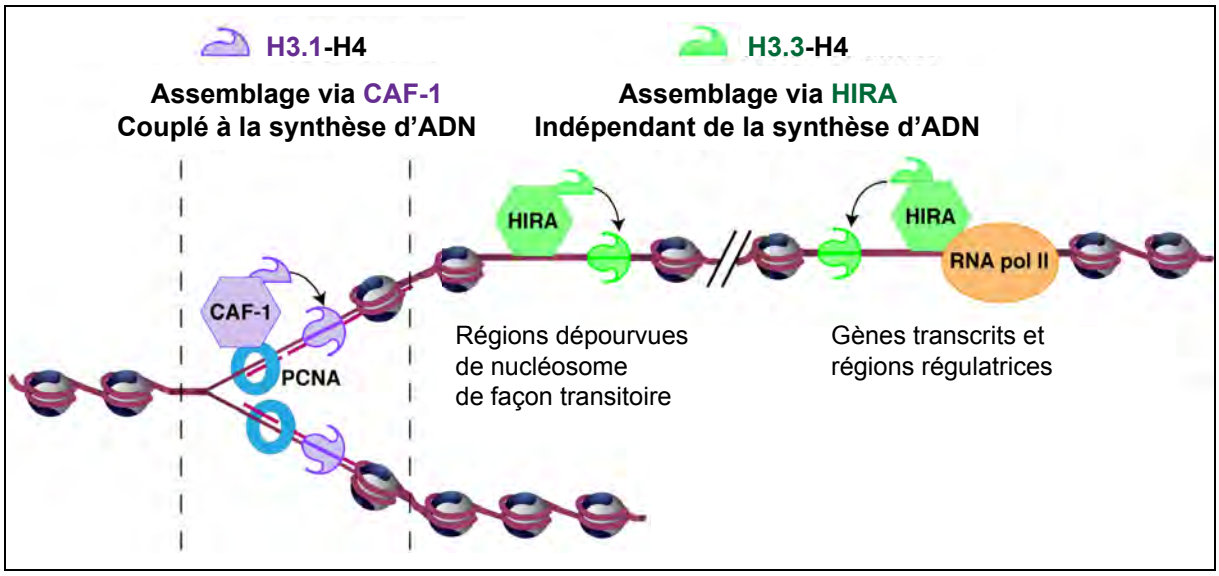


Figure 44 : Modèle revisité des deux voies d'assemblage des histones H3
L'assemblage de la chromatine couplé à la synthèse d'ADN (réplication et réparation) fait intervenir le complexe CAF-1 qui interagit directement avec PCNA et permet l'incorporation de dimère H3.1-H4. L'assemblage indépendant de la synthèse d'ADN fait intervenir HIRA et l'incorporation de dimère H3.3-H4 aux endroits nécessitant l'incorporation de nouvelles histones de façon indépendante de la synthèse d'ADN (transcription, régions régulatrices, toutes régions dépourvues de nucléosome de façon transitoire). HIRA interagit directement avec l'ADN et avec l'ARN polymérase II.
D'après (Ray-Gallet et al., 2011).

Il est intéressant de noter que la phosphorylation de l'histone H4 sur la sérine 47 semble favoriser l'intéraction de HIRA avec le dimère H3.3-H4 (Kang et al., 2011). De plus, HIRA semble jouer un rôle essentiel dans l'incorporation massive d'H3.3 dans la chromatine paternelle lors de sa décondensation au moment de la fécondation chez la drosophile (Loppin et al., 2005), chez la souris (van der Heijden et al., 2005) et chez la carpe C. auratus (Zhao et al., 2011). Récemment, de nouvelles protéines chaperon d'histones ont été identifiées pour H3.3 et participeraient à l'enrichissement d'H3.3 au niveau de régions répétées telles l'hétérochromatine péricentrique et les télomères (voir revue (Szenker et al., 2011) ci-après pour les détails).

Une autre protéine chaperon d'histone importante pour la régulation des dimères H3-H4 en interagissant directement avec H3 est la protéine *Anti Silencing Function 1* (ASF-1) (Munakata et al., 2000). Cependant, elle ne participe pas directement à la mise en place des histones dans la chromatine *de novo* (Ray-Gallet et al., 2007). Elle est retrouvée dans les complexes de pré-déposition des histones H3.1 et H3.3 confirmant son importance pour les deux voies d'assemblage (Tagami et al., 2004). Notons que chez certaines espèces dont les vertébrés, deux formes paralogues d'ASF-1 sont retrouvées : ASF-1a et ASF-1b interagissent toutes deux avec CAF-1 p60 et sont essentielles pour l'incorporation des histones en phase S (Tyler et al., 1999; Groth et al., 2007) et lors de la réparation de l'ADN (Mello et al., 2002) ; tandis que ASF-1a est la seule forme capable d'interagir avec HIRA (Daganzo et al., 2003; Tang et al., 2006). Ainsi, ASF-1 agirait comme un donneur d'histones à l'interface entre les voies d'assemblage des nucléosomes de façon dépendante ou indépendante de la synthèse d'ADN (Figure 43) (Corpet et al., 2011).

Il faut cependant noter que l'assemblage de la chromatine par les protéines chaperons d'histones seules est insuffisant pour expliquer la présence au sein de la chromatine, de nucléosomes régulièrement espacés. Ainsi, les protéines chaperons d'histones fonctionnent en étroite collaboration avec de nombreux facteurs de remodelage de la chromatine (pour revue (Polo and Almouzni, 2006)). Ceux-ci incluent la protéine *Chromodomaine-Helicase-DNA binding protein 1* (CHD1) qui interagit avec la modification H3K4me3 (Pray-Grant et al., 2005). Notamment, CHD1 participerait chez la drosophile à l'incorporation massive d'H3.3 dans le génome paternel après fécondation en collaboration avec HIRA (Konev et al., 2007).

En conclusion, nous avons vu que l'assemblage des variants d'histones au sein de la chromatine semble représenter une étape essentielle pour un nombre important de processus clés pour l'intégrité du génome : la réplication, la transcription, la ségrégation des chromosomes, la condensation et décondensation du génome paternel, et également la réparation de l'ADN (Figure 45) (pour revues (Boyarchuk et al., 2011; Soria et al., 2012)).

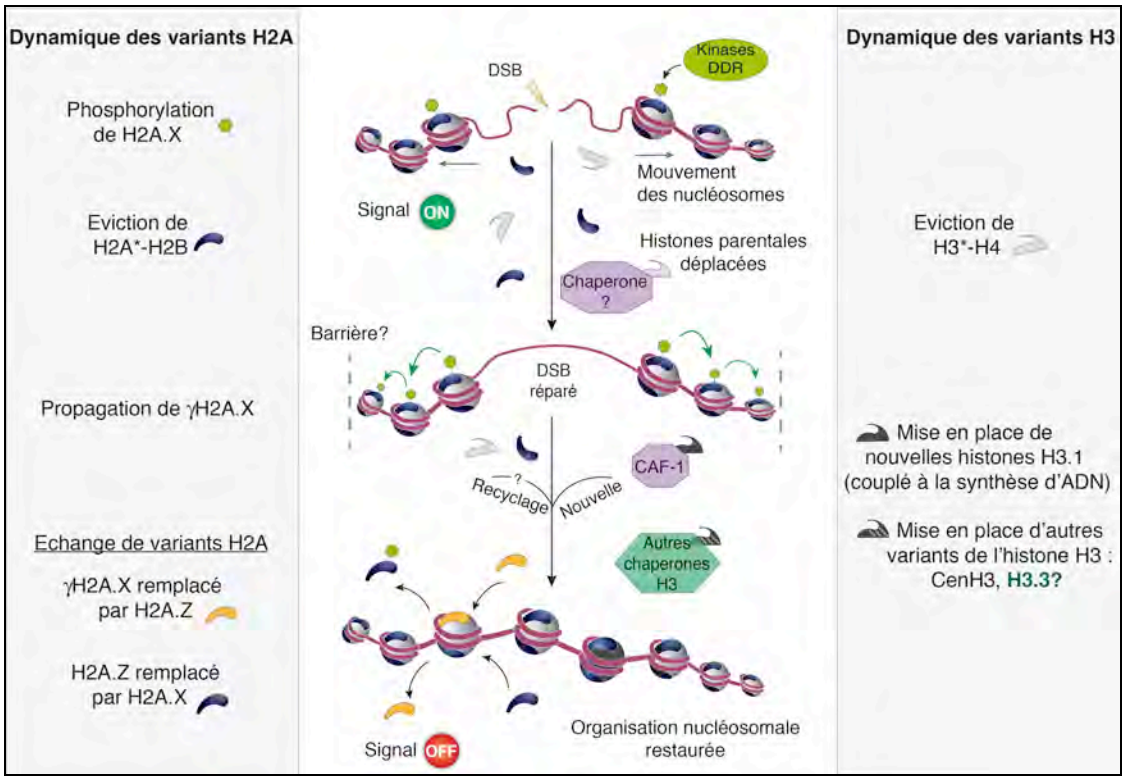


Figure 45 : Dynamique des variants d'histones H2A et H3 en réponse aux dommages à l'ADN

La phosphorylation de H2A.X par des kinases spécifiques de la réponse aux dommage (DNA Damage Response (DDR)) suite à une lésion de l'ADN double brin (DSB) initie la cascade de signalisation de la réparation. Les histones parentales sont déplacées du DSB par mouvement latéral des nucléosomes et/ou éviction. La propagation bidirectionnelle de γH2A.X à partir du DSB permet de délimiter la région chromatinienne affectée à l'intérieur de barrières potentielles, comme indiqué par le point d'interrogation. La restauration de l'organisation nucléosomale après réparation implique l'intervention de chaperons d'histones (et de remodeleurs de la chromatine) pour promouvoir la mise en place de nouvelles histones, l'échange de variants d'histones (ex : H2A.X/H2A.Z) et le recyclage potentiel d'histones parentales. H3.1 est alors incorporé par CAF-1 de façon couplé à la synthèse d'ADN. D'autres variants de l'histone H3 tels CenH3 et potentiellement H3.3 pourraient être incorporés de façon indépendante de la synthèse d'ADN au niveau des régions adjacentes au DSB, alors dépourvues de nucléosomes. Enfin, la restauration de cette organisation nucléosomale ainsi que l'échange des histones γH2A.X permet de désactiver le point de contrôle (DNA damage checkpoint). * N'importe quel variant H2A ou H3. *Modifié d'après* (Soria et al., 2012).

Ces données soulignent l'importance de l'incorporation des variants d'histones dans la chromatine pour le maintien de l'intégrité du génome. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au variant d'histone H3.3 afin de déterminer l'importance de son incorporation dans la chromatine *in vivo* à l'échelle d'un organisme. La revue que j'ai eu l'opportunité d'écrire permet notamment d'illustrer son importance fonctionnelle dans différentes espèces étudiées.

2. Caractéristiques et importance fonctionnelle du variant H3.3 - Revue

The double face of the histone variant H3.3

Szenker Emmanuelle, Ray-Gallet Dominique et Almouzni Geneviève

Cell Research, Mars 2011, Volume 21, numéro 3, pages 421-434,
DOI : 10.1038/cr.2011.14

Dans cette revue, nous avons choisi de décrire précisément les propriétés spécifiques du variant H3.3 par rapport aux variants canoniques H3.1/H3.2, ainsi que les différentes voies d'incorporation aboutissant à un enrichissement dans différents domaines chromatiniens et impliquant des chaperones spécifiques. De façon importante, nous avons discuté l'éventuelle importance fonctionnelle d'H3.3 au cours du développement embryonnaire à travers différentes espèces modèles.

Cell Research (2011) 21:421-434.
© 2011 IBCB, SIBS, CAS All rights reserved 1001-0602/11 $ 32.00
www.nature.com/cr

REVIEW

The double face of the histone variant H3.3

Emmanuelle Szenker[1, 2], Dominique Ray-Gallet[1, 2], Geneviève Almouzni[1, 2]

[1]*Institut Curie, Centre de Recherche, Paris F-75248, France;* [2]*CNRS, UMR218, Paris F-75248, France*

Histone proteins wrap DNA to form nucleosome particles that compact eukaryotic genomes while still allowing access for cellular processes such as transcription, replication and DNA repair. Histones exist as different variants that have evolved crucial roles in specialized functions in addition to their fundamental role in packaging DNA. H3.3 – a conserved histone variant that is structurally very close to the canonical histone H3 – has been associated with active transcription. Furthermore, its role in histone replacement at active genes and promoters is highly conserved and has been proposed to participate in the epigenetic transmission of active chromatin states. Unexpectedly, recent data have revealed accumulation of this specific variant at silent loci in pericentric heterochromatin and telomeres, raising questions concerning the actual function of H3.3. In this review, we describe the known properties of H3.3 and the current view concerning its incorporation modes involving particular histone chaperones. Finally, we discuss the functional significance of the use of this H3 variant, in particular during germline formation and early development in different species.

***Keywords*:** histone variants; H3.3

Cell Research (2011) **21**:421-434. doi:10.1038/cr.2011.14; published online 25 January 2011

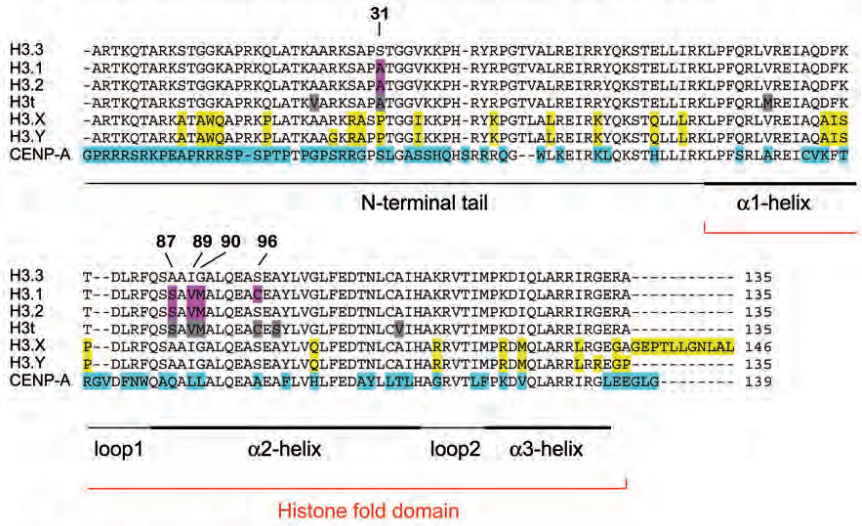
Introduction

Histones, the main protein components of chromatin, are small basic proteins highly conserved in eukaryotes. They package and organize DNA at the level of the fundamental unit of chromatin, the nucleosome [1]. The nucleosome core particle is composed of a hetero-octamer of histones comprising a tetramer of $(H3\text{-}H4)_2$ flanked by two dimers of H2A-H2B, around which about 147 bp of DNA is wrapped [2]. The dynamics of this organization permits the compaction of the genome, while enabling all cellular processes operating on DNA to occur, such as transcription, replication, recombination and repair. Nucleosomes can be modulated not only by a large variety of covalent post-translational modifications (PTMs) mostly occurring in the N-terminal tails of histones, including acetylation, phosphorylation and methylation [3] but also by the incorporation of histone variants corresponding to the histones H3, H2A, H2B but not H4 for which only one form has been identified so far [4]. Histone variants were discovered on the basis of differences at the level of their primary sequence that can range from a few amino acid changes to large domains. These variants show distinct regulatory mechanisms for their expression and deposition that can potentially confer specific properties to nucleosomes [5]. "Canonical histones" are defined as those with an expression peak during S phase to provide the main supply of histones during replication. In contrast, "replacement histones" designate those that do not show an expression peak during S phase. How the different histone variants are incorporated into chromatin and how they mark specific chromatin states has been a subject of intensive investigation. In this context, the study of histone chaperones, escort proteins that help to control histone supply and their incorporation into chromatin, is of interest to shed light on the specific regulation of histone variant incorporation [6].

Here, we will focus on the H3.3 histone H3 variant [7-9] to discuss the latest discoveries in this area. In mammals, five H3 variants have been identified: (i) two canonical variants (hereafter often referred to as H3), H3.2 and the mammalian-specific H3.1, and (ii) three replacement variants, H3.3, the centromere-specific variant CenH3 (or CENP-A in mammals) [10] and the testis-specific histone H3t [11] (Figure 1). To this list, one can add two newly characterized primate-specific H3 variants, H3.X and H3.Y [12]. In this review, we focus on the

Correspondence: Geneviève Almouzni
Tel: +33 0 1 56 24 67 01
E-mail: almouzni@curie.fr

A. Alignment of amino acid sequences corresponding to human H3 variants



B. Distinct features of human H3 variants

Histone H3 variants		Expression	DNA-Synthesis Coupled (DSC) or DNA-synthesis independent (DSI) depositions	and contexts
canonical	H3.1	peak in S phase	DSC	Replication and repair
	H3.2	peak in S phase	DSC	Replication and repair ?
replacement	H3.3	throughout the cell cycle	DSI	Transcription Male pronucleus formation Mejotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI) Telomere and centromere heterochromatin
	H3t	?	-	Tissue specific (testis)
	H3.X	?	-	?
	H3.Y	?	-	Response to stress
	CENP-A	peak in G2 phase	DSI	Proper chromosome segregation

Figure 1 Sequence alignment and specific features of human H3 variants. **(A)** Alignment of amino acid sequences corresponding to human H3 variants. Sequences are compared with the "ancestral" variant H3.3 and the amino acid differences are highlighted. H3.1 and H3.2 differences are highlighted in purple, H3t in gray, H3.X and H3.Y in yellow, and CENP-A in light blue. The position numbers of amino acids that are different between H3.3 and H3.1/2 are indicated. The positions of the N-terminal tail and of the α-helixes of the histone-fold motif are shown. **(B)** Distinct features of human H3 variants. The features of canonical and replacement H3 variants are indicated according to their expression, mode of deposition and contexts. Canonical histones are shown in purple while H3.3 in green.

recent advances concerning the histone variant H3.3 to highlight its potential role in transcription and transmission of epigenetic states. Until recently, H3.3 was largely considered as a mark of transcriptional activity, for which its functional importance was under debate. While recent studies in several organisms have challenged the

view of its specific importance during development, the unexpected enrichment of H3.3 at silent chromatin loci such as telomeres or centromeres prompts to broaden our views concerning the role of this variant. Here, we will first describe the nature, properties and regulated expression of H3.3 as compared with its canonical counterparts. Then, we will summarize the current views concerning mechanisms of H3.3 incorporation into chromatin based on recent studies. This will allow us to highlight histone chaperone complexes and major chromatin rearrangements that necessitate H3.3 deposition. Finally, we will discuss the functional relevance of the choice of a specific variant in key developmental contexts, in particular during the germline formation and early development.

H3.3 properties compared with its canonical counterparts

Genes encoding canonical histones such as H3.1 and H3.2 have no introns and are organized in tandem, multicopy clusters (Figure 2). Their corresponding mRNAs are not polyadenylated and their translation is tightly regulated by the binding of a particular protein, the stem loop binding protein, and of the U7 small nuclear RNA to the 3′ end of the histone RNAs [13]. The peculiar genomic organization and transcriptional regulation of canonical histone genes allows a massive production at the beginning of S phase, ensuring a major supply for incorporation events during replication [14], in a DNA synthesis-coupled (DSC) manner. Of note, outside S phase, but still in a DSC manner, canonical H3.1 can also be incorporated onto chromatin at sites of DNA repair after UV lesion and possibly other damage events [15]. In contrast, genes coding for non-canonical histones are represented by single or few gene copies scattered throughout the genome (Figure 2). In addition, they often possess introns, and their mRNAs are polyadenylated. In mouse, human and *Drosophila*, two H3.3 genes (H3.3A and H3.3B) encode the same conserved H3.3 protein, but have distinct untranslated regions [16-18]. They are expressed throughout the cell cycle, in quiescence, and are enriched in various stages of differentiation compared with their canonical counterparts [17-20]. This constitutive expression enables histone deposition/exchange through a DNA synthesis-independent (DSI) pathway during and outside S phase. Remarkably, this replacement variant H3.3 is one of the most conserved proteins present in all eukaryotes (see later, Figure 4) [21]. H3.3 has only four amino acid differences with H3.2 (at positions 31, 87, 89 and 90) and five with H3.1 (with an additional difference at amino acid 96), with position 31 located in the N-terminal tail of the protein and positions 87, 89 and 90 located in the α2 helix of the histone-fold domain (Figures 1 and 2). In spite of the high sequence similarity between H3.3 and H3, these specific residues have been proposed to account for particular properties of histone H3.3. Interestingly, serine 31 specifically found in H3.3 can be phosphorylated [22]. In vertebrates and *Drosophila*, residues 87, 89 and 90 are S, V and M in H3, and A, I and G in H3.3. In *Drosophila*, any amino acid substitution in H3 toward the H3.3 residues at these positions allows some DSI deposition of canonical H3 [23]. This result suggests that the amino acids SVM in H3 are critical for its restricted DSC assembly pathway. Moreover, in mouse embryonic stem (ES) cells, mutation of the endogenous H3.3B gene to the canonical H3.2 sequence alters its genome-wide enrichment patterns, supporting the importance of the amino acid sequence of H3.3 in determining its final distribution [24]. Thus, those three amino acid positions directly or indirectly provide specificity potentially via the interaction with distinct assembly machineries. Importantly, the identities of the residues found at these positions in H3 and H3.3 vary between species but always distinguish H3 from H3.3, arguing for a critical function of this site [21]. Furthermore, these three residues are thought to participate in the regulation of histone-histone interaction stability [25]. Indeed, H3.3 nucleosomes isolated from avian cells stably expressing tagged H3.3 are unusually sensitive to salt-dependent disruption, resulting in loss of their H2A/H2B dimers [26]. Moreover, a recent study in HeLa cells expressing tagged H3.3 showed that splitting events of H3.3-H4 tetramers could be detected during DNA replication *in vivo*, a process that could not be observed for H3.1 [27]. The fact that H3.3 is highly enriched in actively transcribed regions raises the question whether splitting is indeed variant-specific or region-specific [28]. Taken together, these findings underscore the importance of the H3.3 sequence in addition to its cell-cycle-independent expression pattern. Additional properties of H3.3 relate to the increased proportion of PTMs associated with active chromatin such as acetylation and H3K4 methylation (Figure 2) [29-33]. How these PTMs are established on H3.3 and what roles they play in conferring an epigenetic role to this variant are crucial questions [34]. Interestingly, non-nucleosomal H3.1 and H3.3 carry a distinct set of modifications before their deposition, which in turn determine their final PTMs in nucleosomes (Figure 2) [32]. The connection between H3.3 and active transcription is further underlined by the relative depletion of the heterochromatin protein 1 (HP1) in association with H3.3-purified oligonucleosomes [32], and by the observation that H3.3 counteracts the association of the linker histone H1 [35]. Altogether, these data

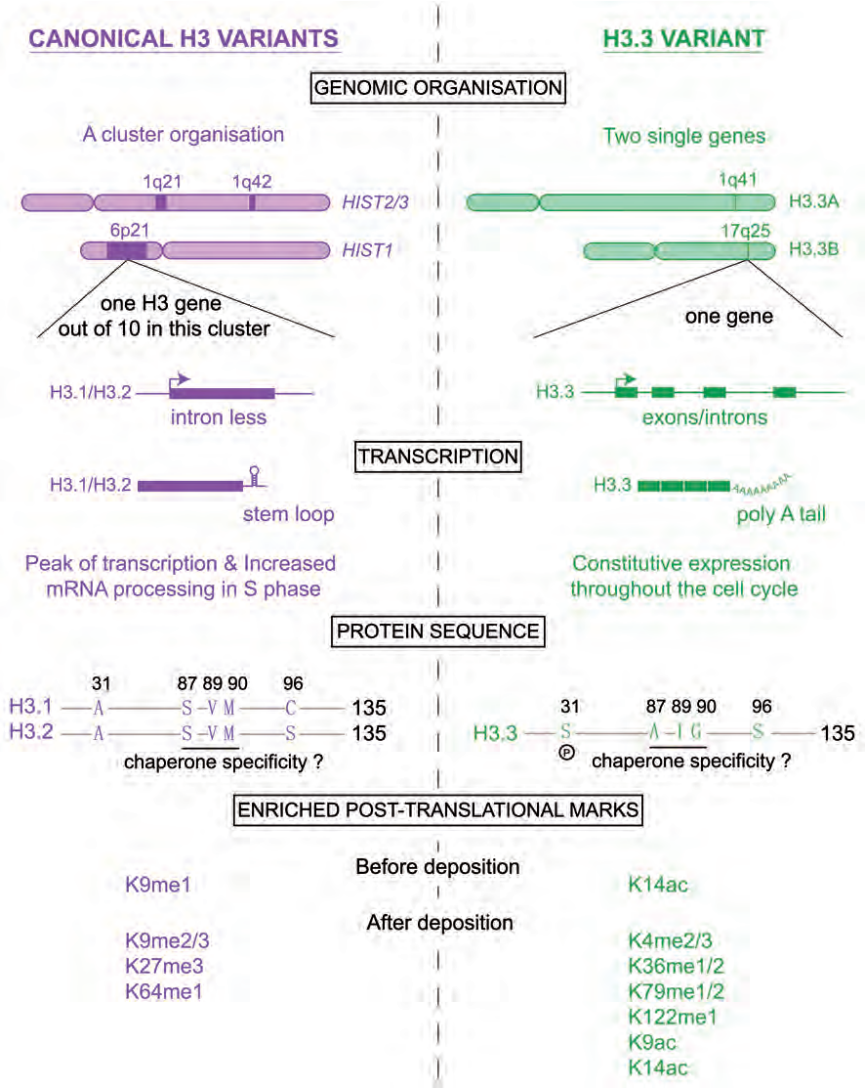


Figure 2 Human histone H3.3 compared with H3.1 and H3.2. Differences between the canonical H3 variants (H3.1 and H3.2) – in purple – and the replacement variant H3.3 – in green – are illustrated. Canonical histone genes are organized in tandem and the cluster *HIST1* located on chromosome 6p21 contains 6 histone H1 and 49 core histone genes including 10 histone H3 genes. Canonical histone genes lack introns and are not polyadenylated in contrast to the regular genes coding for H3.3 (H3.3A and H3.3B). The amino acid differences between the canonical H3 and H3.3 are illustrated. H3.3 S31 can be phosphorylated. The motifs SVM and AIG in H3.1/2 and H3.3, respectively, could account for chaperone specificity. We also illustrate the distinct enriched marks in H3 and H3.3 before and after deposition into chromatin.

highlight the fact that H3.3-containing nucleosomes may possess unique functional properties.

H3.3 enrichment at particular genome sites

The bulk of newly synthesized canonical histones are incorporated during DNA replication in a DSC manner, while H3.3, originally found enriched within actively transcribed genes, gets incorporated in a DSI replacement process [23, 36]. Here, we will describe how H3.3 enrichment could be found at particular genome sites in somatic or embryonic cells and how global chromatin rearrangements in gametes and early zygotes take advantage of the use of this variant.

In somatic and embryonic cells

The use of chromatin immunoprecipitation combined with high-resolution genome mapping technologies has provided a detailed genome-wide localization profile of H3.3 in *Drosophila* and mammalian cells. These studies revealed specific enrichment of H3.3 throughout the gene body of transcribed genes as well as at the promoter regions (Figure 3) [24, 31, 36-40]. H3.3 enrichment at promoters has been observed not only at active but also at inactive genes, possibly accounting for a poised state of these genes [40, 41]. Furthermore, H3 replacement by the H3.3 variant also occurs at genic and intergenic regulatory regions in various metazoans [40, 42, 43]. These observations point to the possible existence of distinct roles of H3.3 linked with gene activity. A first "passive" role for H3.3 in transcription-coupled deposition could be to compensate for the eviction of nucleosomes due to the progression of the RNA polymerase complex in the body of highly transcribed genes [44]. Another "active" role could be envisaged in which H3.3 would contribute to a continuous process of histone turnover that maintains accessibility of regulatory elements to their cognate factors, which could account for the epigenetic memory of an activated state [45, 46]. Gurdon group's findings in *Xenopus laevis* indeed support the latter hypothesis where the presence of some "H3.3 epigenetic mark" transmitted throughout cell division rather than through a mechanism involving the reactivation of transcription at each cycle would suffice to keep the memory of an active state [46]. However, in other species such as *Drosophila* (embryos) or mouse (ES cells), H3.3 seems dispensable for active transcription memory. Indeed, the downregulation of H3.3 does not visibly impact upon global transcription [24, 47]. *Drosophila* survivors lacking H3.3 show an overexpression of H3 that may function in part as a compensatory mechanism. In mouse ES cells that are deficient for H3.3 enrichment at genic regions, the transcriptome does not exhibit dramatic changes when compared with wild-type cells [24], arguing that the presence of H3.3 is not critical for basal transcription in these cells. Whether this is stem cell-specific should be considered given that ES cells are plastic and may not necessarily stabilize a memory of activated genes in a manner comparable to differentiated cells. It would thus be of great interest to study the effect of H3.3 on the memory of an active state in differentiated mammalian cells.

In addition to its preferential accumulation at sites of active chromatin, H3.3 enrichment is also observed in particular chromosomal landmarks (Figure 3). Ahmad and Henikoff [23] found an enriched staining for H3.3-GFP fusion protein that coincided with large rDNA gene repeat arrays in *Drosophila Kc* cells. This correlation is likely due to the presence of densely repeated genes with high transcriptional activity in the rDNA locus. Unexpectedly, enrichment of H3.3 was recently also observed in regions of the genome that should be transcriptionally silent. Indeed, H3.3 accumulation is found at telomeres and pericentric heterochromatin in mouse ES cells and mouse embryonic fibroblasts (MEF), respectively (Figure 3) [24, 48-50]. Of note, these accumulations could either reflect more loading or less removal of H3.3 at these loci as compared with other places in the genome. In addition, studying the proportion of H3.3 versus H3 that may influence their deposition efficiencies would need to be considered for a better understanding of the enrichment of H3.3 in different cell types, and in particular in ES cells. Accumulation of H3.3 at telomeres has so far only been described in mouse embryonic cells whereas its presence at centromeres has been previously reported in somatic cells. Indeed, in human HeLa cells, an accumulation of H3.3 at pericentric heterochromatin was also revealed with the use of a specific antibody recognizing H3.3 phosphorylated on serine 31 [22]. Surprisingly, in contrast to the proposed role of H3.3 in marking active chromatin, its presence at telomeres is required for the transcriptional repression of telomeric repeats [24]. While the specific functions of H3.3 in the organization of centromere and telomere chromatin still need to be explored, it would be of interest to illuminate whether these accumulations are also linked to transcription and whether they are essential for cell division and genome stability.

In gametes and early zygotic cells

Chromosome-wide nucleosome replacement with H3.3 incorporation occurs during mammalian meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in the first male meiotic prophase. This process provides a means for

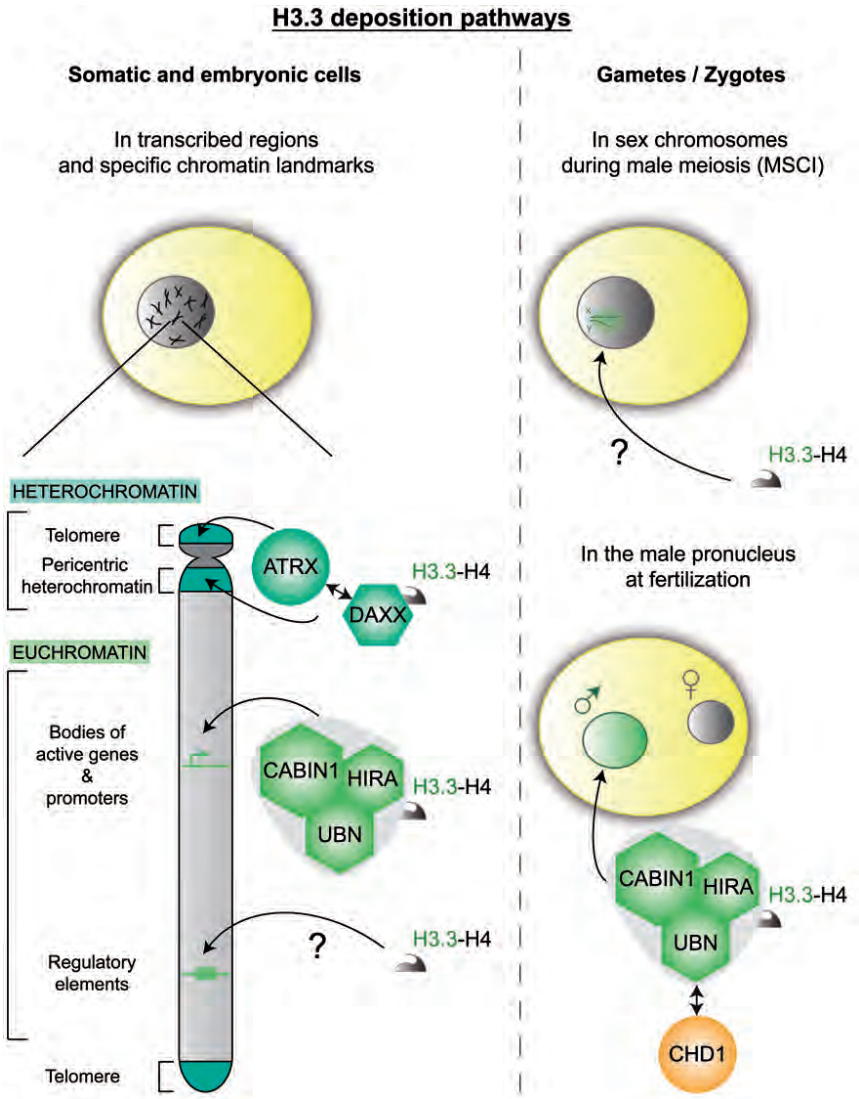


Figure 3 Local enrichment of H3.3 and complexes promoting deposition. Left: in mouse somatic and embryonic cells, H3.3 is enriched in coding regions and at specific chromatin landmarks. In heterochromatin, DAXX cooperates with the chromatin remodeler ATRX in accumulating H3.3 at pericentric heterochromatin and telomeres. It has to be noticed that accumulation of H3.3 at telomeres is so far only described in ES cells. In euchromatin, the HIRA complex mediates H3.3 enrichment in the body of transcribed genes and at promoters of transcribed or non-transcribed genes. The chaperone complex that mediates H3.3 enrichment at regulatory elements remains to be clearly identified but DAXX and/or DEK proteins have been suggested to play a role in this process. Right: in gametes, H3.3 is enriched in sex chromosomes during mouse male meiosis during MSCI. HIRA and DAXX colocalize with XY bodies but their potential role in this process still needs to be uncovered. In zygotes, H3.3 is loaded in the male pronucleus at fertilization in *Drosophila* and in mouse through the HIRA complex that cooperates with the chromatin remodeling factor CHD1.

Cell Research | Vol 21 No 3 | March 2011

epigenetic reprogramming of sex chromatin presumably required for gene silencing in the male mammalian germ line [51]. In most sexually reproducing animals, another major rearrangement during spermatogenesis consists of the replacement of histones with small proteins named protamines, a process that is essential for the spermatid genome condensation into a genetically inactive state [52]. After entering the oocyte and before the formation of the diploid zygote, the sperm nucleus becomes a male pronucleus in a process that involves a series of conserved steps. Notably, a major modification of the male gamete lies in the decondensation of the highly compacted protamine-containing sperm chromatin. Concomitant with protamine removal upon fertilization, nucleosomes containing H3.3, but not H3, are specifically assembled in paternal chromatin before the first round of DNA replication in *Drosophila* and in mouse [53-55]. The exclusive marking of paternal chromosomes with H3.3 in the zygote represents a primary epigenetic distinction between parental genomes and underlines an important consequence of critical and highly specialized function of H3.3 loading at fertilization. In addition, H3.3 is specifically enriched in the paternal mouse pericentromeric chromatin during *de novo* pericentric heterochromatin formation in the male pronucleus. In this context, mutation of H3.3K27 but not H3K27 results in aberrant accumulation of pericentromeric transcripts and dysfunctional chromosome segregation [49]. This observation potentially reinforces the importance of H3.3 at centromeres. Interestingly, at the time of chromocenter formation in mouse early embryos, pericentric satellites undergo a transient peak in expression that is strongly biased by the parental asymmetry, an event that is necessary for proper chromocenter formation and development progression [56]. Whether the accumulation of H3.3 at centromeric regions is actually required for pericentric repeats transcription, or the converse, is worth further explorations.

H3.3 accumulation is thus observed both in active chromatin where it is proposed to participate in the epigenetic transmission of active chromatin states and in regions of the genome that should be transcriptionally silent. Whether centromeric and telomeric regions undergo transcription that is linked to H3.3 accumulation is still unclear. Knowing how H3.3 is incorporated at these specific loci and identifying the histone chaperone complexes involved in its deposition is critical to better understand the meaning of H3.3 enrichment patterns.

H3.3 deposition and the importance of dedicated specific histone chaperones

An important aspect of histone variant dynamics relates to their mode of incorporation. This mechanism involves histone chaperones and can represent a crucial step with major implications for cell fate and stability of gene expression programs. Analysis of the preassembly complexes associated with the different H3 variants has therefore been of interest to gain more insights in the dynamic of their incorporation and the potential histone chaperones implicated.

HIRA complex

While the study of the human canonical histone H3.1 predeposition complexes revealed the presence of the chromatin assembly factor-1 (CAF-1), the isolation of H3.3 predeposition complexes identified a distinct factor, the histone regulator A (HIRA) [57]. CAF-1, which is composed of three subunits p150, p60 and RbAp48, represents the prototype of a chaperone that promotes nucleosome assembly in a DSC pathway during replication and UV-damage repair [58, 59]. In contrast, HIRA was described as a chaperone involved in the DSI nucleosome assembly pathway *in vitro* using the *X. laevis* egg extract system and shows a critical role in H3.3 deposition [57, 60]. The genome-wide enrichment of H3.3 at promoters and in the body of active genes is affected in HIRA knockout ES cells, suggesting a critical requirement for HIRA in H3.3 deposition at these specific regions (Figure 3) [24]. Moreover, HIRA is required for H3.3 deposition in the paternal chromatin during sperm nucleus decondensation upon fertilization in *Drosophila* and in mouse [53, 54, 61]. HIRA might also be involved in global H3.3 incorporation in the process of MSCI as HIRA level increases in the XY body concomitantly with H3.3 deposition [51]. Accumulation of HIRA was also observed during early mouse development in primordial germ cell nuclei that undergo reprogramming to establish a distinct chromatin signature that is reminiscent of pluripotency, including the exchange of histone variants [62]. Investigating whether this HIRA behavior relates to particular rearrangement of H3.3 patterns would shed light on a general importance of H3.3 dynamics during reprogramming events. HIRA has two orthologs in *Saccharomyces cerevisiae*, Hir1p and Hir2p, and biochemical purification of the Hir complex in this species revealed the presence of two co-purifying proteins Hir3 and Hpc2. Interestingly, their corresponding orthologs in human, Cabin1 and Ubinuclein (UBN1 and 2), respectively [63, 64], co-purify with human H3.3 in a sub-complex with HIRA, showing that the yeast Hir complex is conserved in human [57, 65]. It is thus tempting to speculate that HIRA is likely to function as a complex in the process of H3.3 deposition although the respective role of each protein is still unclear. Future work should shed light on the

mechanism at play.

DAXX-ATRX complex

Two other unexpected proteins have been specifically identified in H3.3 preassembly complexes [48]: the death domain-associated protein (DAXX), a protein originally described as being associated with FAS-mediated apoptosis [66], and the alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome protein (ATRX), a SNF2-like ATP-dependent chromatin remodeling factor [67]. ATRX localizes to pericentric heterochromatin in HeLa cells [68] and was previously shown to physically associate and form a complex with DAXX *in vivo* [69]. DAXX was recently shown to exhibit chaperone activity and directly interact with H3.3 in a tighter manner than with H3.1 *in vitro* [48]. Moreover, DAXX preferentially facilitates the deposition of purified recombinant H3.3 onto naked DNA in "nucleosome reconstitution" assays [48, 70]. Unexpectedly, the purification of H3.3-containing complexes in DAXX$^{-/-}$ MEF cells identified the DSC deposition factor CAF-1 [48]. This result suggests that DAXX-deficient cells exploit H3.3 by using alternative mechanisms to bypass the loss of DAXX but further investigation is needed to understand the physiological relevance of this finding. Interestingly, ATRX co-exists in a complex with the DAXX protein, yet this complex is not required for H3.3 accumulation at active or repressed genes, nor at regulatory elements. Instead, this complex is specifically required for H3.3 enrichment at telomeres of murine ES cells [24, 70] and pericentric heterochromatin in MEFs [48] (Figure 3). Although only DAXX was demonstrated to display H3.3 chaperone activity [70], ATRX is also required for H3.3 accumulation at telomeres [24], suggesting that ATRX plays a role to favor H3.3 accumulation at specific chromosome landmarks. The targets of ATRX were recently shown to include G-rich tandem repeats (TRs) that are found in telomeres, subtelomeric regions, rDNA, and near genes that can display altered expression patterns in the absence of ATRX [71]. However, the distribution of H3.3 at genic and intergenic TRs is only subtly perturbed when ATRX is disrupted, challenging the role of ATRX in H3.3 enrichment at these regions and its requirement for gene expression via H3.3 accumulation. An attractive possibility is that ATRX is required for H3.3 enrichment at a subset of TRs such as telomeres, while other proteins can intervene at genic and intergenic regions. Interestingly, DAXX can be found in complex with H3.3 in the absence of ATRX, and this complex has been proposed to mediate H3.3 deposition at regulatory elements. Additionally, DAXX was reported to accumulate in the XY body of mid to late stage pachytene spermatocytes, suggesting that it could be involved in the accumulation of H3.3 during the MSCI process, as also proposed for HIRA [72]. Lewis *et al*. [70] found that the interaction between DAXX and H3.3 occurs via the unique "AIG" motif at the base of the α-helix2 of H3.3 (Figures 1 and 2). For the first time, a peptide containing this "AIG" motif is demonstrated as necessary and sufficient for an interaction with a specific chaperone. This remarkable feature is an attractive entry point for structural studies focusing on this domain and its interaction with the other known histone H3-H4/H3.3-H4 chaperones, which offer promises to characterize the molecular nature of the specificity.

Additional players

Other proteins have been shown to be involved in the deposition of H3.3 at specific locations even though they are not directly found in H3.3 complexes. The remodeling factor named chromodomain helicase DNA-binding protein 1 (CHD1) physically associates with HIRA to mediate massive H3.3 incorporation into male chromatin during the decondensation of the *Drosophila* sperm DNA upon fertilization (Figure 3) [73]. Whether this chromatin-remodeling factor is required for other HIRA complex-mediated H3.3 depositions is an open issue. Another protein, the chromatin-bound oncogene product DEK is suggested to be an H3.3 histone chaperone in *Drosophila* and human cells, with potential functions to direct its deposition at regulatory elements and enhance transcription [74]. Given that DEK also associates with DAXX [75], it is possible that DEK and DAXX act together in H3.3 deposition at regulatory elements. Intriguingly, despite the importance of the HIRA complex in the deposition of H3.3 in the male pronucleus upon fertilization, HIRA is apparently dispensable for H3.3 deposition in *Drosophila* HIRA$^{-/-}$ embryos and adult cells [76]. This observation could be explained by the use of alternative mechanisms to bypass the loss of HIRA in *Drosophila*, potentially using distinct histone chaperones. In contrast, in mouse HIRA$^{-/-}$ ES cells, the accumulation of H3.3 at promoters and in the body of active genes is affected, arguing for a critical role of HIRA in H3.3 enrichment at these particular domains in mammals [24]. Altogether, these data suggest that distinct H3.3 deposition processes involving specific histone chaperone complexes have to be considered. They may act depending on the species, the developmental status and the different cell types. Moreover, the existence of alternative H3.3 deposition pathways using non-dedicated chaperones in the absence of the specific H3.3 chaperones would be an interesting compensatory mechanism that needs to be further investigated.

Biological significances of H3.3 deposition in various organisms

Ascomycetes, such as yeast, have only one form of non-centromeric histone H3, closely related to H3.3. This histone H3 (H3.3-like) present in all eukaryotes can be considered as a common ancestor. It is thus reasonable to envisage a "universal role" for this variant that can be used for both DSI and DSC nucleosome assemblies. According to the view of H3.3 as an ancestor, all non-centromeric H3 would derive from this original form (Figure 4). H3.2 variant present in *Drosophila* would be a first derivative that is already present in early branching animals such as *Trichoplax*. H3.1 and H3t, which are restricted to mammals, would appear later [21, 77]. H3.X and H3.Y so far only detected in primate may be restricted to this latter situation [12]. A specialization of H3 deposition and functions could have thus evolved while new H3 variants emerged. In this way, canonical H3 could specifically be restricted to DSC deposition, while H3.3 incorporation would occur mainly through a DSI pathway. Thus, an attractive hypothesis is that canonical forms of H3 derive from H3.3-like forms by duplication and divergence in a recurrent manner during eukaryotic evolution (Figure 4). Interestingly, so far organisms containing only a single H3-like variant have not been found. It is therefore tempting to speculate that the assembly of H3.3-containing nucleosomes may be es-

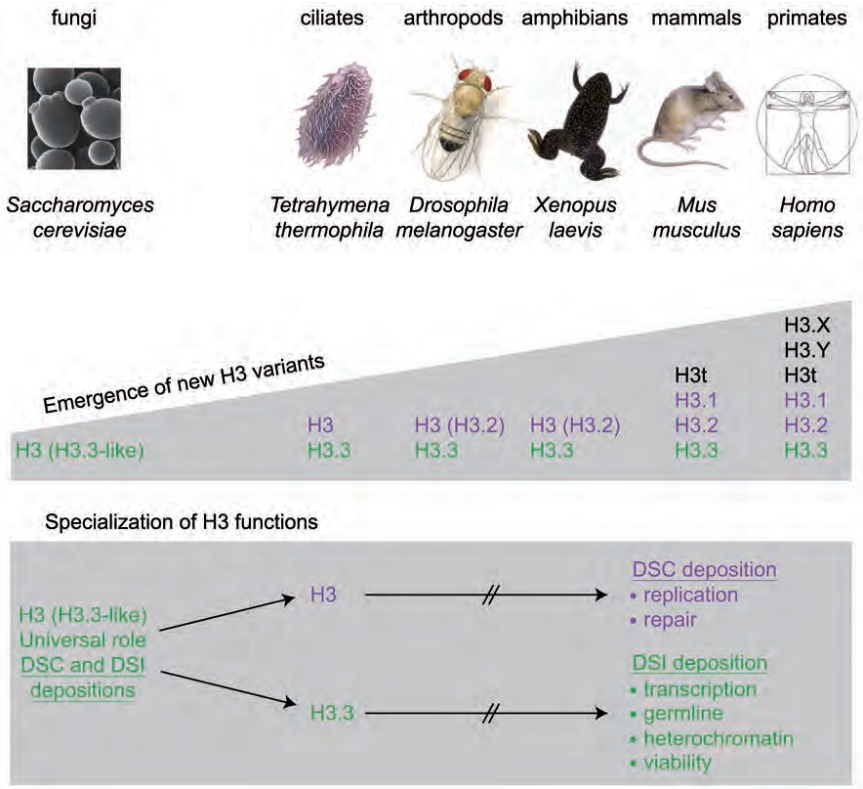


Figure 4 Emergence of non-centromeric H3 variants and specialization of their functions during evolution. Schematic representation of the emergence of new H3 histone variants concomitant with the specialization of H3.3 functions through evolution. Most probably, all non-centromeric H3 derive from the ancestral H3.3-like histone (green), whose functions get specialized when new H3 variants emerged, in particular the canonical H3.1 and H3.2 histones (purple). The specialization of canonical H3 and H3.3 variants functions from the universal H3.3-like histone is illustrated.

sential, although additional studies may be needed to further explore this issue. In light of this hypothesis, we will present and discuss here the putative biological functions of H3.3 in different organisms from yeast to mammals.

Yeast

As mentioned above, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* contain only one non-centromeric H3 variant that is related to H3.3. This H3.3-like variant is used for nucleosome assembly both outside and during S phase and can therefore be deposited through both DSI and DSC pathways. In *S. pombe*, the deposition of H3 in a DSI manner preferentially occurs in euchromatin regions [78]. In *S. cerevisiae*, DSI deposition is essentially correlated with transcription [79] and this H3 incorporation is mainly observed at active promoters and to a lesser extent in the body of transcribed genes as well as at promoters of repressed genes [80, 81]. The pattern of yeast H3 DSI deposition thus resembles the one mediated by the HIRA complex for H3.3 incorporation in "higher" eukaryotes. Of note, in both *S. cerevisiae* and *S. pombe*, a homolog of the HIRA complex was identified with orthologs characterized for each component of this complex [82-84]. In *S. cerevisiae,* the Hir complex is one of the factors required for nucleosome reassembly after the passage of the RNA polymerase II, a mechanism that is proposed to play a critical role in transcription-coupled H3 deposition [85]. Moreover, given that a *S. cerevisiae* hirΔ mutant is still viable, it is possible that other chaperone complexes might replace the activity of the Hir complex or that H3 DSI deposition is not absolutely required. It would be important to try and assess whether replacing this H3.3-like histone by canonical H3 proteins can preserve viability in *S. cerevisiae*.

Tetrahymena and Drosophila

Canonical H3 is not essential in the ciliate protazoa *Tetrahymena thermophila*. Indeed, cells can grow without canonical H3 if H3.3 is expressed at high levels [86]. However, *T. thermophila* cells lacking H3.3 are viable and maintain normal nucleosome density at highly transcribed regions. Moreover, when no H3.3 is available, H3 is still not detectably deposited by the DSI pathway, indicating that DSI deposition may not be essential for survival in this organism. Strikingly though, H3.3 is required to produce viable sexual progeny and plays a critical role in the germline micronuclei late in conjugation. Along the same lines, mutations of the two H3.3 genes in *Drosophila* lead to partial lethality but most H3.3-deficient animals that survive to adulthood appear morphologically normal [47, 87]. Thus, here, H3.3 is not absolutely required for viability and global development as mutant flies compensate for the lack of H3.3 in two ways: they upregulate the expression of the canonical histone H3 genes, and they maintain chromatin structure by using H3 proteins for DSI nucleosome replacement at genes. The increased expression of H3 is therefore sufficient to relieve transcriptional defects. However, *Drosophila* H3.3 is essential for fertility, as germline cells specifically require this histone variant [47, 87]. The recent development of an *in vivo* genetic system that allows the replacement of deleted canonical histone genes by histone transgenes in *Drosophila* [88] should be most useful in order to further analyze the importance of H3.3 versus H3 in this species. Furthermore, it is interesting to realize that *Drosophila* paternal chromatin reorganization that necessitates the use of H3.3 at fertilization is the only developmental process that requires HIRA, a key H3.3 histone chaperone [76]. Indeed, while maternally provided HIRA is essential for global H3.3 rearrangement upon fertilization, H3.3 can be deposited in the chromatin of mutant embryos and adult cells later, suggesting that other factors are implicated in the assembly of H3.3 nucleosomes. Thus, in *Tetrahymena* and *Drosophila*, H3.3 is not required for viability and development but plays a critical role in the germline.

Xenopus laevis

Further insights into the function of H3.3 during development are provided by studies performed in the vertebrate *X. laevis*, a model organism of wide interest in developmental biology. Indeed, in contrast to *Drosophila, Xenopus* sperm chromatin retains H3 variants and H4 histones, possibly allowing sperm decondensation in the absence of global H3.3 DSI assembly. This distinct situation makes *X. laevis* an ideal model to study later roles of H3.3 during early development. The histone H3 lysine 4 methylation mark, enriched on H3.3 and correlated with transcriptional activation, has been linked to the WD40-repeat protein WDR5 as part of the methyltransferase complex associated with H3K4 trimethylation. Interestingly, WDR5-depleted *X. laevis* tadpoles exhibit a variety of developmental defects and abnormal spatial expression of *Hox* genes [89]. This result shows that H3K4me3, a mark enriched on H3.3, is essential for vertebrate development. *X. laevis* is the pioneer organism in terms of animal cloning from transplanted nuclei [90]. However, the percentage of successful nuclear transfer is low and decreases when highly differentiated donor cells are used. This underlines the complexity of reprogramming a differentiated nucleus into that of an embryonic cell. After nuclear transfer, the memory of an active gene state indeed persists through numerous cell divisions in the absence of transcription and this mechanism is shown

to depend on histone H3.3 incorporation into chromatin [46]. Moreover, the association with promoters of a mutated H3.3 on the methylable H3.3 lysine 4 eliminates this memory. This indicates a requirement for H3.3 K4 in the stability of gene expression patterns. Thus, incorporation of H3.3 would establish a marking system for cellular memory: after cell division, daughter cells would still maintain their patterns of gene expression by the inheritance of H3.3 at active gene loci. An emerging question now is to consider the developmental importance of this kind of memory. A key issue is thus to determine whether H3.3 is actually important for *X. laevis* early development.

Mouse

In mice, one of the two H3.3 genes, H3.3A, is ubiquitously expressed during embryonic development until 13.5 days post coitum and its expression is then enriched in the adult heart, kidney, brain, testes and ovaries [91]. Mutation in H3.3A results in postnatal death of 50% of homozygous mutants. Surviving animals display reduced growth rates when competing with wild-type siblings for food, exhibit neuromuscular deficits, and mutated males display reduced copulatory activity. When copulations did occur, they resulted in very few pregnancies, confirming the requirement of H3.3 for male fertility [91]. Thus, here, mammalian H3.3 seems not only required for reproduction but also for early development. Interestingly, HIRA is also essential for murine embryogenesis. Indeed, all homozygous $HIRA^{-/-}$ mutants die by day 10 or 11 of gestation. Analysis of embryos revealed an initial requirement during gastrulation, with many mutant embryos having a distorted primitive streak and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality [92]. A deficiency in DAXX, another H3.3 chaperone, results in extensive apoptosis in early mouse development leading to embryonic lethality by day 9.5 of gestation [93]. In mice embryos null for ATRX, a partner of DAXX in dealing with H3.3, implantation and gastrulation seem normal but the embryos do not survive beyond 9.5 days post coitum due to a defect in the formation of the extraembryonic trophoblast [94]. It is important to note that these H3.3 chaperone complexes have been implicated in various cellular functions. For instance, HIRA is involved in the formation of senescence associated heterochromatin foci [95] and DAXX associates with numerous proteins involved in disparate cellular processes such as apoptosis, survival or transcriptional repression [66]. Whether the H3.3 chaperone activity is playing any role in those distinct processes and whether the observed phenotypes in null mutant mice for HIRA, DAXX and ATRX are related to their functions in H3.3 deposition are questions that remain to be explored.

Conclusions

The replacement variant H3.3 differs from its canonical counterparts at only a few amino acid positions. Although it is still unclear whether these amino acid differences are by themselves important to modulate the chromatin organization, they are sufficient to drive H3.3 and the canonical H3 variants to distinct nucleosome assembly processes through the interaction with specific histone chaperones. Of note, in contrast to canonical H3, which so far uses mainly one identified chaperone, the CAF-1 complex, for incorporation into chromatin, H3.3 deposition may involve at least two different chaperone complexes, HIRA and DAXX-ATRX. The interaction with specific histone chaperones is responsible for the enrichment of the different H3 variants at distinct genomic sites. While the recruitment of CAF-1 at sites of DNA synthesis is likely mediated by the DNA polymerase processivity factor PCNA, ATRX is proposed to be the required component for the targeting of the DAXX-ATRX complex to telomeres or pericentric heterochromatin. How the HIRA complex is targeted to promoters and transcriptionally active genes remains to be uncovered.

Importantly, the actual role of H3.3 incorporation at specific regions of the genome is still under debate. In somatic cells, the presence of H3.3 was first proposed to facilitate transcription by creating a less compact chromatin. However, the importance of H3.3 enrichment for active transcription has been challenged in several organisms where normal expression of genes can occur in the absence of H3.3. Moreover, H3.3 enrichment is also observed in silent chromatin such as centromeres and telomeres, where H3.3 presence in the latter case is correlated with the repression of telomeric RNA transcription. Whether H3.3 deposition is crucial for transcriptional memory in specific contexts, in particular during development or differentiation when new expression programs have to be established, will need further exploration. In zygotes, whether global incorporation of H3.3 is an active mechanism with a specific role at fertilization or whether H3.3 is the only H3 histone available to replace the protamines and allow the decondensation of the sperm DNA is still unclear. Further investigations will be necessary to illuminate the functional relevance of H3.3 incorporation.

Nevertheless, specialization of H3.3 functions seems concomitant with the appearance of new H3 variants and the complexity of the organisms across evolution, with a specific requirement for H3.3 during development in mammals but this requirement remains to be addressed

in *Xenopus*. Further work on how the H3.3-specific pathways affect chromatin structure and functions that are essential during development should help to shed light on the importance of H3.3 during evolution.

Acknowledgments

We are grateful to Armelle Corpet, Nicolas Lacoste, Zachary Gurard-Levin, Kelly Romeo and Adam Woolfe for critical reading of the manuscript and helpful discussions. The work in the authors' laboratory is supported by la Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2010), PIC Programs, the European Commission Network of Excellence Epigenome (LSHG-CT-2004-503433), the European Commission ITN FP7-PEOPLE-2007 "Image DDR" and FP7-PEOPLE-2008 "Nucleosome 4D", ACI-2007-Cancéropôle IdF "Breast cancer and Epigenetics", ANR "ECenS" ANR-09-BLAN-0257-01, INCa "GepiG" and ERC Advanced Grant 2009-AdG_20090506.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1 Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974; **184**:868-871.
2 Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* 1997; **389**:251-260.
3 Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; **128**:693-705.
4 Zweidler A. Core histone variants of the mouse: primary structure and differential expression. In: JL Stein GS Stein, WF Marzluff, eds. Vol. Chapter 14, *Histones Genes, Structure, Organization and Regulation*. John Wiley & sons, 1984:339-371.
5 Talbert PB, Henikoff S. Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**:264-275.
6 De Koning L, Corpet A, Haber JE, Almouzni G. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**:997-1007.
7 Orsi GA, Couble P, Loppin B. Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int J Dev Biol* 2009; **53**:231-243.
8 Elsaesser SJ, Goldberg AD, Allis CD. New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Curr Opin Genet Dev* 2010; **20**:110-117.
9 Banaszynski LA, Allis CD, Lewis PW. Histone variants in metazoan development. *Dev Cell* 2010; **19**:662-674.
10 Allshire RC, Karpen GH. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 2008; **9**:923-937.
11 Witt O, Albig W, Doenecke D. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* 1996; **229**:301-306.
12 Wiedemann SM, Mildner SN, Bonisch C, *et al.* Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J Cell Biol* 2010; **190**:777-791.
13 Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin J, Maltais LJ. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 2002; **80**:487-498.
14 Osley MA. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**:827-861.
15 Polo SE, Roche D, Almouzni G. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 2006; **127**:481-493.
16 Akhmanova AS, Bindels PC, Xu J, *et al.* Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome* 1995; **38**:586-600.
17 Frank D, Doenecke D, Albig W. Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene* 2003; **312**:135-143.
18 Krimer DB, Cheng G, Skoultchi AI. Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**:2873-2879.
19 Castiglia D, Cestelli A, Scaturro M, Nastasi T, Di Liegro I. H1(0) and H3.3B mRNA levels in developing rat brain. *Neurochem Res* 1994; **19**:1531-1537.
20 Wu RS, Tsai S, Bonner WM. Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell* 1982; **31**:367-374.
21 Malik HS, Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 2003; **10**:882-891.
22 Hake SB, Garcia BA, Kauer M, *et al.* Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:6344-6349.
23 Ahmad K, Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 2002; **9**:1191-1200.
24 Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 2010; **140**:678-691.
25 Hake SB, Allis CD. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:6428-6435.
26 Jin C, Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* 2007; **21**:1519-1529.
27 Xu M, Long C, Chen X, *et al.* Partitioning of histone H3-H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly. *Science* 2010; **328**:94-98.
28 Ray-Gallet D, Almouzni G. Molecular biology. Mixing or not mixing. *Science* 2010; **328**:56-57.
29 Waterborg JH. Sequence analysis of acetylation and methylation in two histone H3 variants of alfalfa. *J Biol Chem* 1990; **265**:17157-17161.
30 McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:1525-1530.
31 Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, *et al.* Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep* 2005; **6**:354-360.
32 Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell* 2006; **24**:309-316.

33 Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, *et al.* Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* 2006; **281**:559-568.
34 Loyola A, Almouzni G. Marking histone H3 variants: how, when and why? *Trends Biochem Sci* 2007; **32**:425-433.
35 Braunschweig U, Hogan GJ, Pagie L, van Steensel B. Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. *EMBO J* 2009; **28**:3635-3645.
36 Schwartz BE, Ahmad K. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* 2005; **19**:804-814.
37 Delbarre E, Jacobsen BM, Reiner AH, *et al.* Chromatin environment of histone variant H3.3 revealed by quantitative imaging and genome-scale chromatin and DNA immunoprecipitation. *Mol Biol Cell* 2010; **21**:1872-1884.
38 Wirbelauer C, Bell O, Schubeler D. Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev* 2005; **19**:1761-1766.
39 Daury L, Chailleux C, Bonvallet J, Trouche D. Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep* 2006; **7**:66-71.
40 Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet* 2005; **37**:1090-1097.
41 Tamura T, Smith M, Kanno T, *et al.* Inducible deposition of the histone variant H3.3 in interferon-stimulated genes. *J Biol Chem* 2009; **284**:12217-12225.
42 Jin C, Zang C, Wei G, *et al.* H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* 2009; **41**:941-945.
43 Nakayama T, Nishioka K, Dong YX, Shimojima T, Hirose S. *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading. *Genes Dev* 2007; **21**:552-561.
44 Schwartz BE, Ahmad K. 2. Chromatin assembly with H3 histones: full throttle down multiple pathways. *Curr Top Dev Biol* 2006; **74**:31-55.
45 Henikoff S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 2008; **9**:15-26.
46 Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* 2008; **10**:102-109.
47 Sakai A, Schwartz BE, Goldstein S, Ahmad K. Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr Biol* 2009; **19**:1816-1820.
48 Drané P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* 2010; **24**:1253-1265.
49 Santenard A, Ziegler-Birling C, Koch M, *et al.* Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* 2010; **12**:853-862.
50 Wong LH, Ren H, Williams E, *et al.* Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res* 2009; **19**:404-414.
51 van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, *et al.* Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 2007; **39**:251-258.
52 Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007; **8**:227.
53 Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, *et al.* The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* 2005; **437**:1386-1390.
54 van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, *et al.* Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* 2005; **122**:1008-1022.
55 Torres-Padilla ME, Bannister AJ, Hurd PJ, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol* 2006; **50**:455-461.
56 Probst AV, Okamoto I, Casanova M, *et al.* A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* 2010; **19**:625-638.
57 Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004; **116**:51-61.
58 Stillman B. Chromatin assembly during SV40 DNA replication *in vitro*. *Cell* 1986; **45**:555-565.
59 Gaillard PH, Martini EM, Kaufman PD, *et al.* Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* 1996; **86**:887-896.
60 Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, *et al.* HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* 2002; **9**:1091-1100.
61 Loppin B, Docquier M, Bonneton F, Couble P. The maternal effect mutation sesame affects the formation of the male pronucleus in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 2000; **222**:392-404.
62 Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, *et al.* Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 2008; **452**:877-881.
63 Banumathy G, Somaiah N, Zhang R, *et al.* Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol* 2009; **29**:758-770.
64 Balaji S, Iyer LM, Aravind L. HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst* 2009; **5**:269-275.
65 Elsaesser SJ, Allis CD. HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predisposition complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010 Dec 7. doi:10.1101/sqb.2010.75.008
66 Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 2006; **16**:97-104.
67 Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 1995; **80**:837-845.
68 McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, *et al.* Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chro-

mosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**:13983-13988.
69 Xue Y, Gibbons R, Yan Z, *et al.* The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**:10635-10640.
70 Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:14075-14080.
71 Law MJ, Lower KM, Voon HP, *et al.* ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* 2010; **143**:367-378.
72 Rogers RS, Inselman A, Handel MA, Matunis MJ. SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 2004; **113**:233-243.
73 Konev AY, Tribus M, Park SY, *et al.* CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin *in vivo*. *Science* 2007; **317**:1087-1090.
74 Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, *et al.* A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev* 2010; **24**:159-170.
75 Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 2002; **115**:3319-3330.
76 Bonnefoy E, Orsi GA, Couble P, Loppin B. The essential role of *Drosophila* HIRA for *de novo* assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet* 2007; **3**:1991-2006.
77 Postberg J, Forcob S, Chang WJ, Lipps HJ. The evolutionary history of histone H3 suggests a deep eukaryotic root of chromatin modifying mechanisms. *BMC Evol Biol* 2010; **10**:259.
78 Choi ES, Shin JA, Kim HS, Jang YK. Dynamic regulation of replication independent deposition of histone H3 in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:7102-7110.
79 Jamai A, Imoberdorf RM, Strubin M. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Mol Cell* 2007; **25**:345-355.
80 Rufiange A, Jacques PE, Bhat W, Robert F, Nourani A. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol Cell* 2007; **27**:393-405.
81 Dion MF, Kaplan T, Kim M, *et al.* Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science* 2007; **315**:1405-1408.
82 Prochasson P, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Workman JL. The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev* 2005; **19**:2534-2539.
83 Green EM, Antczak AJ, Bailey AO, *et al.* Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr Biol* 2005; **15**:2044-2049.
84 Anderson HE, Kagansky A, Wardle J, *et al.* Silencing mediated by the *Schizosaccharomyces pombe* HIRA complex is dependent upon the Hpc2-like protein, Hip4. *PLoS One* 2010; **5**:e13488.
85 Formosa T, Ruone S, Adams MD, *et al.* Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* 2002; **162**:1557-1571.
86 Cui B, Liu Y, Gorovsky MA. Deposition and function of histone H3 variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 2006; **26**:7719-7730.
87 Hodl M, Basler K. Transcription in the absence of histone H3.3. *Curr Biol* 2009; **19**:1221-1226.
88 Gunesdogan U, Jackle H, Herzig A. A genetic system to assess *in vivo* the functions of histones and histone modifications in higher eukaryotes. *EMBO Rep* 2010; **11**:772-776.
89 Wysocka J, Swigut T, Milne TA, *et al.* WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 2005; **121**:859-872.
90 Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; **10**:622-640.
91 Couldrey C, Carlton MB, Nolan PM, Colledge WH, Evans MJ. A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunded growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 1999; **8**:2489-2495.
92 Roberts C, Sutherland HF, Farmer H, *et al*. Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002; **22**:2318-2328.
93 Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 1999; **13**:1918-1923.
94 Garrick D, Sharpe JA, Arkell R, *et al.* Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS Genet* 2006; **2**:e58.
95 Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 2007; **27**:2343-2358.

RÉSULTATS

1. Questions clés

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'importance fonctionnelle du variant d'histone H3.3 au cours du développement embryonnaire d'un vertébré, *Xenopus laevis.* En effet, l'importance fonctionnelle de ce variant et de sa voie d'assemblage au niveau d'un organisme et en particulier au cours du développement étaient encore peu clairs, et il était difficile de dégager des principes généraux.

Chez la souris, une mutation hypomorphe d'un des deux gènes codant pour H3.3 (H3.3A) conduit à une mortalité néonatale dans 50% des cas. Or, la cause développementale de cette mortalité n'a pas pu être précisemment établie, et les souris qui survivent présentent en particulier une stérilité et des défauts neuromusculaires (Couldrey et al., 1999). Toujours chez la souris, l'absence du chaperon HIRA provoque des défauts de développement au moment de la gastrulation conduisant à une létalité embryonnaire (Roberts et al., 2002). Cependant, le lien entre ces défauts et de potentiels problèmes d'incorporation d'H3.3 n'a pas été exploré.

Chez la drosophile, de façon surprenante, l'absence d'HIRA ou du variant H3.3 paraissent compensés au cours du développement embryonnaire par une augmentation de l'expression du variant canonique H3.2 (Bonnefoy et al., 2007; Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009). Ces dernières données chez la drosophile seraient donc plus en faveur d'une hypothèse selon laquelle un variant peut se substituer à l'autre. Cependant, les données chez la souris suggèrent un rôle plus important/spécifique d'H3.3 et potentiellement sa voie d'assemblage au cours du développement vertébré.

Le Xénope est un modèle particulièrement intéressant à replacer en tant que vertébré dans ce contexte. (1) Il ne possède qu'un variant H3 réplicatif, H3.2, ce qui facilite l'étude. (2) Lors de la spermatogenèse, les histones H3 et H4 ne sont pas remplacées par des protamines (Katagiri and Ohsumi, 1994). Ceci permet d'étudier le rôle des variants d'H3 au cours du développement embryonnaire, indépendemmant du processus de décondensation du sperme qui a lieu au moment de la fécondation et qui implique une incorporation massive d'H3.3 chez la souris (van der Heijden et al., 2005) et chez la drosophile (Loppin et al., 2005). (3) Une étude d'expression à grande échelle réalisée en 2005 a mis en evidence un pic d'expression d'H3.3 au moment de la gastrulation et, globalement, H3.3 est plus exprimé dans l'embryon que chez l'adulte ce qui suggère une importance dévelopementale

particulière (Baldessari et al., 2005). (4) Le Xénope est un modèle de choix pour l'étude des histones et l'assemblage de la chromatine, en particulier via des outils *in vitro* développés grâce aux extraits d'œufs (Ray-Gallet and Almouzni, 2004). (5) Enfin, une étude réalisée en 2008 dans un système artificiel sur la reprogrammation après transfert nucléaire chez le Xénope impliquerait le variant H3.3 dans le maintien et/ou la mémoire d'un état transcriptionnellement actif (Ng and Gurdon, 2008), ce qui amène à considérer si ce type de fonction a une importance dans un contexte normal**.**

Cet ensemble de données nous a donc incités à creuser la question concernant l'importance spécifique du variant H3.3 au cours du développement normal en nous appuyant sur le modèle vertébré, Xénope.

Lors de mon arrivée au laboratoire, Nicolas Lacoste, ingénieur de recherche, travaillait sur ce projet et avait déjà obtenu des premiers résultats encourageants quant à l'importance développementale d'H3.3 et de son chaperon HIRA. Etant passionnée par le développement embryonnaire, c'était une évidence pour moi de continuer ce projet afin d'explorer les mécanismes impliqués. J'ai donc travaillé avec Nicolas les premiers mois de ma thèse puis suis devenue plus indépendante. Nous avons pu montrer qu'H3.3 est requis de façon spécifique au moment de la gastrulation, une étape qui implique un changement massif dans l'expression des gènes au cours du processus de différenciation. Ces travaux m'ont permis de rédiger un manuscrit à partir de ma 3ème année de thèse qui a donné lieu à une publication en premier auteur et qui sera détaillée dans une deuxième sous partie :

Szenker E., Lacoste N. and Almouzni G. (2012) A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. Cell Reports *1,* 730-740

Il faut par ailleurs noter qu'en association avec le chaperon d'histone HIRA, le facteur de remodelage CHD1 (Chromodomain Helicase DNA binding protein 1) a été impliqué dans le mécanisme d'incorporation d'H3.3 au cours décondensation du sperme après fécondation chez la drosophile (Konev et al., 2007). De plus, très récemment, une nouvelle voie d'incorporation d'H3.3 a été proposée. En effet, DAXX (Death domain-Associated protein) et ATRX (Alpha-Thalassemia/mental Retardation X-linked syndrome protein), sont impliquées dans l'incorporation d'H3.3 au niveau des télomères et régions d'hétérochromatine péricentrique, respectivement dans des fibroblastes embryonnaires et cellules souches embryonnaires de souris (Drane et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Lewis et al., 2010). L'ensemble de ces données montre la complexité de la régulation de la distribution du

variant H3.3 et soulèvent la question de la spécificité de son incorporation et de ses fonctions.

Ainsi, j'aimerais dans une troisième sous partie présenter quelques résultats préliminaires quant à l'importance développementale de ces différents facteurs afin de discuter la spécificité des différentes voies d'assemblages d'H3.3 au cours du développement embryonnaire. Je décrirai également dans cette partie d'autres résultats préliminaires non publiés.

Enfin, dans une quatrième sous partie je présenterai ma contribution à un travail effectué en collaboration avec le laboratoire de John Gurdon (Gurdon Institute, Cambridge, Royaume-Uni) quant à l'importance de l'incorporation du variant d'histone H3.3 via son chaperon HIRA dans un autre contexte développemental : la reprogrammation transcriptionnelle après transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope. Ce travail a donné lieu à un manuscrit actuellement en révision à Epigenetics & Chromatin, sur lequel j'ai travaillé au cours de ma dernière année de thèse et que je signe en deuxième auteur :

Jullien J.*, Astrand C.*, Szenker E., Garrett N., Almouzni G. and Gurdon JB.
HIRA-dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes.
* contribution équivalente
En révision à Epigenetics & Chromatin

2. Rôle d'H3.3 au cours du développement embryonnaire du Xénope

L'importance développementale de l'incorporation du variant H3.3 dans la chromatine via son chaperon HIRA observée au moment de la gastrulation chez le Xénope

A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*

Szenker Emmanuelle, Lacoste Nicolas and Almouzni Geneviève

Cell Reports, Juin 2012, Volume 1, numéro 6, pages 730–740,
DOI : 10.1016/j.celrep.2012.05.006

Résumé des résultats principaux :

Afin d'étudier les rôles respectifs d'H3.2 et H3.3 au cours du développement embryonnaire, nous avons exploité la technique d'injection d'oligonucléotides morpholinos, découverte en 2000 (Heasman et al., 2000; Heasman, 2002). Cette technique est particulièrement puissante pour interférer avec la fonction de nombreux facteurs et est très bien documentée chez le Xénope. Le principe de cette méthode s'appuie sur la reconnaissance spécifique de séquences d'ARN messagers (en général au niveau du codon intiateur), pour interférer avec la progression du complexe d'initiation et empêcher la traduction du transcrit ciblé. Pour cela, des molécules synthétiques appelées morpholinos et permettant une interaction stable avec les ARNm cibles ont été élaborées. Ces molécules possèdent environ 25 bases azotées classiques, fixées sur des cycles morpholines au lieu de désoxyribose qui sont liées entre eux par des groupements phosphorodiamidates non chargés au lieu de groupements phosphates. Ces différentes caractéristiques donnent aux morpholinos une très grande stabilité et les rendent insensibles aux nucléases. Ils fournissent donc un moyen commode pour inactiver l'expression d'une protéine cible et étudier comment cette inactivation influence le développement dans une étape particulière, qu'il est ensuite possible d'analyser au niveau mécanistique en la replaçant dans le contexte des cascades d'inductions développementales.

Dans cette étude, nous avons donc utilisé deux morpholinos distincts dont nous avons vérifié la spécificité après injections dans des embryons (Figure 1A). Ainsi, un morpholino (MO H3) cible à la fois H3.2 et H3.3 tandis que l'autre morpholino (MO H3.3) cible spécifiquement H3.3 (voir Figure S2A pour la spécificité des anticorps). L'étude de l'effet de ces morpholinos sur le développement des embryons montre que la baisse

d'expression d'H3.2 et H3.3 conduit à un arrêt de développement peu après la MBT, dès le début de la gastrulation (Figure 1B), tandis qu'affecter spécifiquement H3.3 conduit à des défauts au cours de la gastrulation, en particulier au moment de la fermeture du blastopore, conduisant à des embryons non viables (Figure 1B). De façon remarquable, ces défauts peuvent être sauvés par une surexpression d'ARNm H3.3 alors que l'ARNm H3.2 ne permet pas de contrecarrer l'action du morpholino H3.3 (Figure 2). Ainsi, nous pouvons conclure qu'H3.3 est nécessaire, au moment de la gastrulation, pour assurer une fonction dont ne peut s'acquitter le variant canonique H3.2.

Pour replacer l'origine des défauts observés en dérégulant le niveau d'expression d'H3.3 dans le contexte des mécanismes d'induction mésodermique au moment du processus de gastrulation, nous avons exploité le marqueur précoce du mésoderme, Xbra (Smith et al., 1991). Ainsi, par hybridation *in situ*, nous observons que la baisse d'expression d'H3.3 conduit à un défaut très marqué dans l'expression d'Xbra tout au long du processus de gastrulation (Figure 3A). Ce résultat a également pu être confirmé par qRT-PCR (Figure 3B). Ainsi, la baisse du niveau d'H3.3 affecte clairement l'expression du marqueur mésodermique Xbra, ce qui explique en partie les défauts de gastrulation observés. De plus, une analyse par qRT-PCR d'une trentaine de gènes impliqués dans l'identité cellulaire de l'endoderme, mésoderme, neuroectoderme ou de l'épiderme a permis de mettre en évidence que les gènes affectés en absence d'H3.3 régulent principalement la différenciation du mésoderme en aval de Xbra (Figure 3B) ou encore le neuroectoderme (Figure S4A).

Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des défauts observés au cours de la gastrulation, nous avons souhaité tester la capacité de réponse aux signaux mésodermiques (qui sont responsables de l'induction de l'expression de Xbra comme nous l'avons vu dans l'introduction) des embryons déplétés pour H3.3, en particulier en ce qui concerne les mouvements morphogénétiques de convergence et d'extension. Cette étude a pu être réalisée grâce au test de la calotte animale (Green, 1999). Cette expérience consiste à prélever les cellules ectodermiques du pôle animal de l'embryon au stade blastula et de les mettre en culture avec l'activine, un inducteur de mésoderme de la famille des TGFβ (Smith et al., 1990). Dans une telle situation, la calotte animale d'un embryon sauvage est induite en mésoderme et suit des mouvements de convergence et d'extension visualisés par une élongation de la calotte. La baisse d'expression d'H3.3 ne semble pas affecter la réponse des calottes animales à l'activine (Figure 4A). Dans ces conditions, Xbra semble alors suffisamment exprimé pour induire l'élongation des calottes. Ce résultat peut être mis en relation avec le fait que les embryons traités avec le morpholino H3.3 sont affectés à la fin du processus de gastrulation. Ces résultats peuvent suggérer un rôle d'H3.3 non pas dans l'induction mais dans le maintien de l'expression de Xbra dans le mésoderme au cours du développement. De plus, H3.3 joue un rôle important dans la

viabilité cellulaire *ex vivo* (calottes animales, Figure 4A) et *in vivo* au cours du développement embryonnaire (Figure 4B et C).

Afin de déterminer si l'effet d'interférence avec H3.3 peut être assigné à son incorporation par une voie d'assemblage spécifique, nous avons ciblé des facteurs clefs tel que son chaperon HIRA. De façon très intéressante, nous observons un phénotype comparable à celui obtenu en ciblant H3.3 (Figure 5A et B). De plus, ces défauts de gastrulation se traduisent également par un défaut d'expression de Xbra (Figure 5C). De façon remarquable, nous avons pu montrer un lien direct entre les phénotypes HIRA et H3.3 car l'absence de HIRA conduit clairement à un défaut d'incorporation d'H3.3 dans la chromatine des embryons injectés (Figure 6B). De plus, des défauts d'expression de HIRA ou de H3.3 conduisent tous deux à une sensibilité plus importante de la chromatine à la MNase, une nucléase qui digère préférentiellement l'ADN non protégé par les nucléosomes (Figure 6C). L'ensemble de ces données montre l'importance de la voie d'incorporation de H3.3 via HIRA pour l'intégrité de la chromatine au cours du développement embryonnaire.

Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence que le variant d'histone H3.3 est essentiel au cours du développement embryonnaire vertébré et que sa voie d'assemblage via son chaperon HIRA est particulièrement critique au moment de la gastrulation à la fois pour l'expression de gènes clés et l'intégrité de la chromatine.

Graphical abstract :

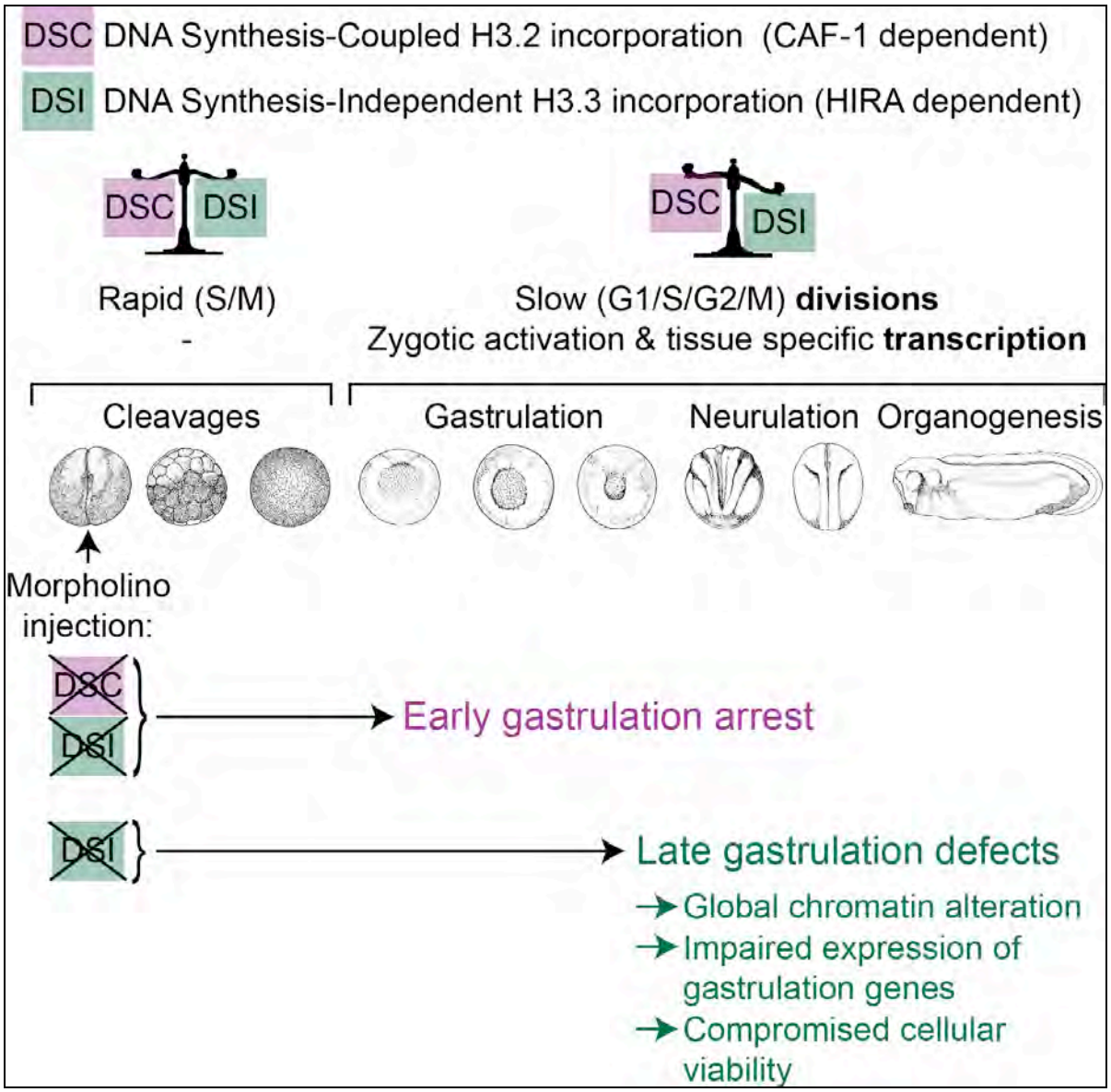


Figure 46 : Schéma représentant les résultats principaux

Manuscript :

Cell PRESS Open ACCESS

Cell Reports
Article

A Developmental Requirement for HIRA-Dependent H3.3 Deposition Revealed at Gastrulation in *Xenopus*

Emmanuelle Szenker,[1,2] Nicolas Lacoste,[1,2] and Geneviève Almouzni[1,2,*]
[1]Institut Curie, Centre de Recherche, Paris F-75248 France
[2]CNRS, UMR218, Paris F-75248, France
*Correspondence: almouzni@curie.fr
DOI 10.1016/j.celrep.2012.05.006

SUMMARY

Discovering how histone variants that mark distinct chromatin regions affect a developmental program is a major challenge in the epigenetics field. To assess the importance of the H3.3 histone variant and its dedicated histone chaperone HIRA, we used an established developmental model, *Xenopus laevis*. After the early rapid divisions exploiting a large maternal pool of both replicative H3.2 and replacement H3.3, H3.3 transcripts show a distinct peak of expression at gastrulation. Depletion of both H3.2 and H3.3 leads to an early gastrulation arrest. However, with only H3.3 depletion, defects occur at late gastrulation, impairing further development. Providing exogenous H3.3 mRNAs, but not replicative H3.2 mRNAs, rescues these defects. Notably, downregulation of the H3.3 histone chaperone HIRA similarly impairs late gastrulation, and we find a global defect in H3.3 incorporation into chromatin comparable to H3.3 depletion. We discuss how specific HIRA-dependent H3.3 deposition is required for chromatin dynamics during gastrulation.

INTRODUCTION

Proper packaging of eukaryotic DNA into chromatin is required for functional genome organization (Probst et al., 2009). This involves the use of a fundamental motif, the nucleosome, which comprises DNA wrapped around histones. A large number of variations, including covalent posttranslational modifications (PTMs) of histones (Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002), and histone variant incorporation (Ahmad and Henikoff, 2002b; Boyarchuk et al., 2011; Loyola and Almouzni, 2007; Sarma and Reinberg, 2005) defines distinct chromatin landscapes typical of individual cell types.

In mammals, several H3 variants contribute to these landscapes including the replicative forms H3.1 and H3.2, the replacement variant H3.3, and the centromere-specific H3 variant CenH3 (CENP-A) (Szenker et al., 2011). While the unique importance of CENP-A for defining the identity of the centromere is well documented, the respective roles of the closely related H3 replicative forms compared to the replacement variant H3.3 are less clear. The expression of replicative H3 peaks in S phase to supply histones during DNA replication. In contrast, the replacement variant H3.3, which is expressed throughout the cell cycle, in quiescent cells, and during distinct stages of differentiation, provides a continuous source of histones (Szenker et al., 2011). Thus, given the overall similarity of the core particle containing either type of histone H3 (Tachiwana et al., 2011), one might assume that these subtypes could functionally substitute for one another and that incorporation of distinct replicative or replacement H3 is mainly due to their availability during the cell cycle.

However, H3.3 is specifically enriched within regions of high transcriptional activity (Ahmad and Henikoff, 2002a; Chow et al., 2005; Jin and Felsenfeld, 2006; Jin et al., 2009; Mito et al., 2005; Schwartz and Ahmad, 2005) and typically marked by PTMs associated with active transcription such as H3K4 methylation (Hake et al., 2006; Loyola et al., 2006; McKittrick et al., 2004; Waterborg, 1990). This prompted the hypothesis that H3.3 could mark transcriptionally active genes, potentially by promoting transcription and/or as a consequence of transcription. The dynamic properties of tagged H3.3 nucleosomes, revealed by their unusual sensitivity to salt-dependent disruption could account for an enhancement in transcriptional activity (Jin and Felsenfeld, 2007). Interestingly, based on nuclear transfer and reprogramming experiments in *Xenopus laevis,* the memory of an active state is thought to involve H3.3 maintenance through a number of cell divisions without ongoing transcription (Ng and Gurdon, 2008). Indeed, the observed maintenance of H3.3 is unlikely to involve reactivation of transcription at each cycle, given that zygotic transcription only starts after the 12th division in *Xenopus* (Newport and Kirschner, 1982). Furthermore, the global incorporation of maternal H3.3 onto male DNA upon fertilization in *Drosophila* (Loppin et al., 2005) and mice (Torres-Padilla et al., 2006; van der Heijden et al., 2005) underlines the capacity of this histone to be incorporated independently of transcription. Obviously, these findings emphasize a major requirement of H3.3 for reproduction in both organisms, but do not address the question of its importance at later stages during development.

A further comparison of H3.3 function during development in several organisms (Banaszynski et al., 2010; Orsi et al., 2009; Szenker et al., 2011) highlights the fact that developmental roles of H3.3 are still poorly defined. In *Drosophila*, most animals

with mutations of both *H3.3* genes survive to adulthood and appear morphologically normal but are sterile (Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009), most likely due to a deficiency in protamine replacement by maternal H3.3 onto male DNA at fertilization (Loppin et al., 2005). In mice, a hypomorphic mutation in only one of the two *H3.3* genes leads to unexplained neonatal lethality in 50% of cases. Yet surviving animals show not only subfertility phenotypes but also growth and neuromuscular defects (Couldrey et al., 1999). Subfertility phenotypes could reflect defects in paternal genome reprogramming since alteration in protamine replacement by H3.3 is critical for promoting heterochromatin formation (Santenard et al., 2010). However, other growth defects suggest additional developmental roles in vertebrates. Most recently, in human, the observations of somatic mutations affecting H3 variants or their chaperones in specific pediatric tumors further emphasize the importance of considering their role in a developmental context (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012).

Our choice of *Xenopus laevis* as an ideal model system to reveal aspects of H3.3 function was guided by four important criteria. First, the fact that *Xenopus* sperm chromatin, unlike *Drosophila* and mice, retains H3 variants and H4 histones (Katagiri and Ohsumi, 1994), enables us to examine H3.3 developmental roles separately from protamine replacement. Second, the presence of a single representative of the replicative H3 in *Xenopus*, related to human H3.2, makes the situation simpler to analyze. Third, the relatively high level of H3.3 transcripts in early development compared to adult tissues, as noted in global gene expression analyses (Baldessari et al., 2005), suggested additional developmental roles for H3.3. Finally, powerful in vitro assays using *Xenopus* egg extracts permit the study of specific histone deposition pathways, involving dedicated histone chaperones (Ray-Gallet and Almouzni, 2004).

Indeed, much has been elucidated concerning histone H3 variants' dynamics and their specific chaperones (De Koning et al., 2007). For replicative H3, Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1), which comprises three subunits, namely, p150, p60, and p48, represents the major candidate for deposition in a DNA synthesis-dependent manner (Smith and Stillman, 1989; Tagami et al., 2004). Concerning H3.3, the early identification of HIRA as a histone chaperone promoting H3.3 deposition onto DNA in vitro using extracts derived from *Xenopus* eggs (Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004) made it the first candidate for this role in vivo. In *Drosophila,* HIRA functions together with the remodeling factor Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1 (CHD1) to promote H3.3 loading onto male DNA during sperm decondensation (Konev et al., 2007; Loppin et al., 2005). However, other H3.3 histone chaperones have been recently identified in mammals, including a complex composed of the death-associated protein (DAXX) and the alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome protein (ATRX) (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Lewis et al., 2010). The recent analysis of de novo histone H3 incorporation in cultured cells using the SNAP tagging system advanced the notion that the HIRA deposition pathway could work at any time during the cell cycle to ensure chromatin integrity whenever a failure in histone deposition occurs (Ray-Gallet et al., 2011). How such a requirement may become critical during the development of a whole organism has yet to be established.

In this paper, we studied H3.3 during *Xenopus* development and found that it is required for late gastrulation to proceed. Importantly, this requirement cannot be substituted by replicative H3.2. Similarly, the HIRA chaperone proved critical at late gastrulation, and HIRA morphants showed chromatin defects associated with reduced H3.3 levels and higher sensitivity to MNase digestion. We discuss how HIRA-mediated H3.3 deposition is required to meet the needs of chromatin dynamics to properly complete gastrulation in *Xenopus*.

RESULTS

H3.3 Is Specifically Required during Gastrulation

We first explored the expression profile of H3 variants both at the RNA and protein levels during *Xenopus* development. We found both by northern blot and in situ hybridization that transcripts corresponding to both variants are maternally stored in the egg with a distinct peak for H3.3 at gastrulation (Figures S1A and S1B). This was complemented by our analysis at the protein level using a Triton acetic acid urea gel (Zweidler, 1978), which shows that both H3.2 and H3.3 are present at similar levels in eggs through the mid blastula transition (MBT) stage (Figure S1C), suggesting an equal use of both maternal proteins prior to MBT. After this transition, H3.3 protein levels decreased relative to H3.2 to reach a level comparable to that in somatic cells, where the replicative H3 largely dominates as observed in HeLa cells (Loyola et al., 2006). These observations prompted us to explore whether H3.3 could have a particular contribution at the time of gastrulation during *Xenopus* early development. To address the functional importance of H3 proteins, we designed specific antisense morpholino oligonucleotides that prevent translation of target transcripts when injected into embryos. We first tested our morpholinos (MO) for specificity in oocytes (not shown) and then assessed their efficiency in embryos. Using soluble fractions derived from embryos injected with the respective morpholinos, we show that MO H3.3 specifically diminishes H3.3 while MO H3 targets both H3.2 and H3.3 (Figure 1A). This is shown by western blot analysis using monoclonal antibodies whose specificity for either H3.2 or H3.3 was confirmed (Figure S2A). In MO H3 treated embryos, we observed an early gastrulation developmental arrest (Figure 1B and Movie S1). This is consistent with the prevention of all new H3 expression while exhausting the maternal histone proteins (Laskey et al., 1978). Of note, this arrest is comparable to a CAF-1 p150 MO (Figure S2B) and occurs later than the one observed when a dominant negative form of CAF-1 interferes with chromatin assembly prior to the MBT in *Xenopus* (Quivy et al., 2001). In contrast, the specific knockdown of H3.3 enabled further developmental progression in early gastrulation but revealed later defects (Figure 1B and Movie S1). Embryos surviving to the tailbud stage show severe developmental defects including an open blastopore, *spina bifida*, and a shortened anteroposterior axis (Figure 1B, white arrow). The penetrance and severity of the phenotype was dose dependent (Figure S3A), but never matched the effect seen with the morpholino targeting both H3.2 and H3.3 (MO H3).

Cell PRESS
Open ACCESS

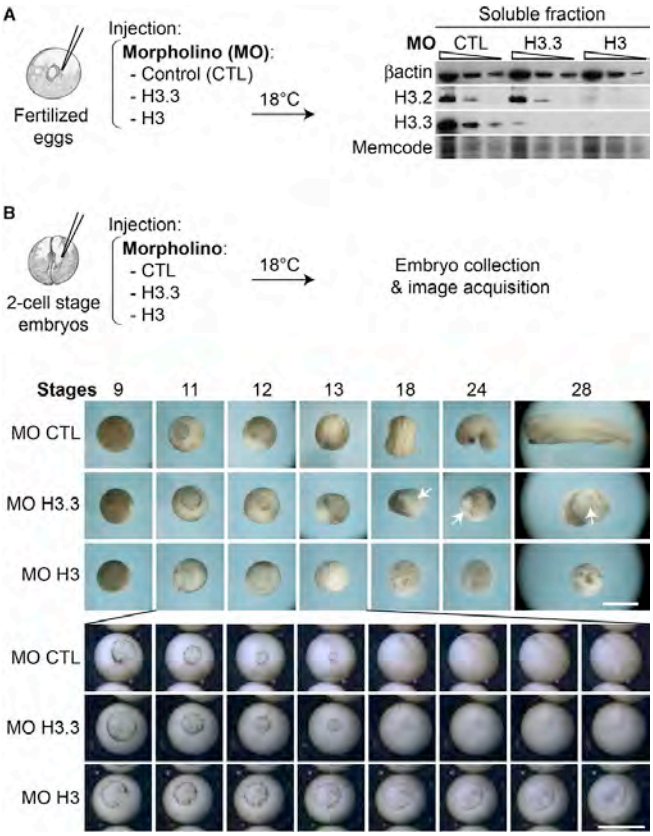


Figure 1. Importance of H3.2 and H3.3 during Early Development

(A) Specificity of H3.3 and H3 morpholinos. (Left) The scheme shows injections of indicated morpholinos (MO) in fertilized eggs (13.8 ng). After incubation to reach stage 12 in controls, 80 embryos were used to prepare soluble fractions for western blot analysis. (Right) Results used a 2-fold dilution series (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to three embryos, and detection with indicated antibodies (see also Figure S2A). Anti-β actin and memcode staining served as loading controls.

(B) H3.3 and H3 downregulation leads to distinct phenotypes. The scheme shows injections of indicated MO (4.6 ng) in one cell of 2-cell stage embryos. We kept embryos at 18°C and acquired images at the indicated stages (using control embryos as a reference). White arrows point to the gastrulation defects in H3.3 morphants. In the bottom panel, we show a broader coverage of the gastrulation time period (stages 11–13) with eight distinct time points (see also Movie S1). Scale bar: 1 mm.

See also Figures S1, S2, and S3.

Closer inspection revealed a slowdown of morphogenetic movements leading to embryos that failed to close their blastopore correctly at the end of gastrulation and that shed cells through the open blastopore (Figure 1B, white arrows, and Movies S1 and S2).

To ask whether this gastrulation phenotype simply reflects a general limitation in availability of H3 or is specifically due to H3.3 loss, we designed a rescue experiment by injecting MO H3.3 together with control GFP, H3.2-HA, or H3.3-HA mRNAs (Figure 2C). First, we verified that both H3.2 and H3.3 tagged constructs could be effectively incorporated into chromatin (Figure 2A). Moreover, to eliminate the possibility that depletion of the variants may affect the chaperones, we documented the expression of the H3.2 and H3.3 histone chaperones, CAF-1 and HIRA, in the embryos throughout development (Figure S3B), and verified that they remain unaffected in gastrulae upon downregulation of H3.3 (Figure 2B). These data establish that both tagged H3.2 and H3.3 are functional, and that depletion of H3.3 does not affect H3-specific chaperones. The observation of embryos at the early tail-bud stage (stage 25) revealed a rescue in 62% of MO H3.3 treated embryos with the coinjection of H3.3 transcripts, supporting the specificity of the observed phenotype (Figure 2C). Notably, coinjection of H3.2 mRNAs failed to rescue gastrulation defects in H3.3-deficient embryos (Figure 2C). Comparable protein levels for GFP, H3.2, and H3.3 in injected embryos confirmed that the lack of rescue could not reflect a defect in H3.2 mRNAs translation (Figure 2C). Taken together, our data support a model where there is a specific requirement for H3.3 for proper gastrulation that cannot be bypassed by H3.2 overexpression.

H3.3-Mediated Defects at Gastrulation and Abnormal Expression of Late Mesoderm Markers

Among the important events occurring during gastrulation, mesoderm induction represents a major developmental step that involves activating the expression of a series of genes. The induction starts at stage 9.5, and accumulation of specific transcripts is diagnostic of a successful process. As a reference, we first examined the gene *Xenopus* brachyury (*Xbra*), a transcription factor whose transcripts mark the marginal zone, a region containing cells destined to become mesoderm, at the gastrula stage (stage 11) (Herrmann and Kispert, 1994; Showell et al., 2004). Following injection with MO H3.3 in one cell of 4 cell-stage embryos, we found by in situ hybridization that *Xbra* expression is clearly reduced at gastrulation and

Cell PRESS
Open ACCESS

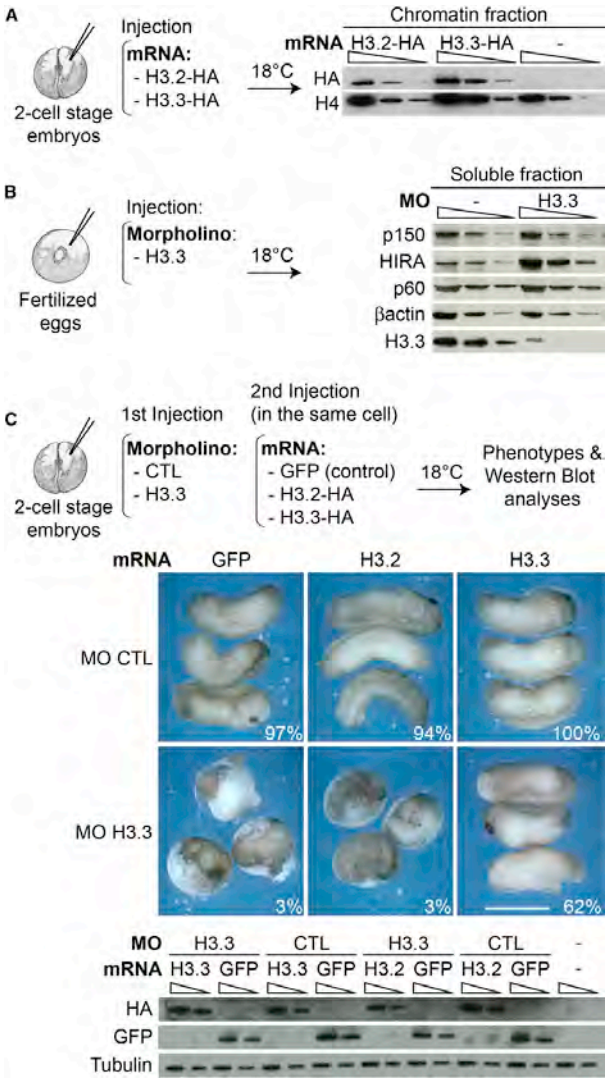


Figure 2. Additional H3.2 Cannot Bypass the Need for H3.3

(A) HA tagged-H3.2 and -H3.3 proteins can be incorporated into chromatin. (Left) The scheme shows injections of indicated mRNA (500 pg) in one cell of 2-cell stage embryos. After incubation to reach stage 11 in controls, 50 embryos were used to prepare chromatin for western blot analysis. (Right) Results used a 2-fold dilution series (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to two embryos, and detection with indicated antibodies. Anti-H4 served as a loading control.

(B) Expression of histone chaperones in H3.3-deficient embryos. (Left) The scheme shows injections of H3.3 MO (23 ng) in fertilized eggs. After incubation to reach stage 14 in controls, 40 noninjected (–) and 40 injected (MO H3.3) embryos were used to prepare soluble fractions for western blot analysis. (Right) Results used a 2-fold dilution series (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to three embryos, and detection with indicated antibodies. Anti-β-actin served as a loading control. We note that H3.3 downregulation leads to overexpression of HIRA in soluble fractions.

(C) H3.3 but not H3.2 mRNAs can rescue the H3.3-deficient phenotype. The scheme shows injections of indicated MO (46 ng for CTL and 4.6 ng for H3.3) in one cell of 2-cell stage embryos followed by a second injection with indicated mRNAs (2 ng). After incubation to reach stage 25 in control embryos, three embryos served for image acquisition (top) and followed by total protein extraction for western blot analysis (bottom). (Top) We scored the viability for 30 embryos (percentage is shown). Scale bar: 1 mm. (Bottom) We loaded the equivalent of 0.5 and 0.25 embryo (gradient bar) and revealed with indicated antibodies. Anti-tubulin served as a loading control.

See also Figures S2 and S3.

throughout development when H3.3 is depleted (Figure 3A, white arrows, Figure S3C). We thus conclude that H3.3 is critical for the proper expression of a mesodermal gene, *Xbra*.

We then analyzed the expression levels of a larger series of lineage marker genes after depletion of H3.3 in embryos harvested at stage 11, by reverse transcription followed by quantitative PCR (qRT-PCR) (Figures 3B and S4A). First, we considered genes involved in early mesoderm induction, which are in part responsible for *Xbra* expression (Heasman, 2006), including genes encoding members of the tranforming growth factor-beta (TGF-β) family such as *Derrière*, or proteins of the nodal family (*Xenopus* nodal related genes, Xnrs). For a comparison, we also examined transcription factors involved in endoderm formation such as *Sox17*, *Mixer*, and *Mix1* (Heasman, 2006). We found that the expression level of endodermal genes and mesodermal-inducing factors such as *Xnr2* and *Derrière* did not significantly change in H3.3 morphant embryos when compared to control embryos (Figure 3B and S4A). We then examined the expression of genes directly implicated in the formation of the mesodermal layer, including *Xbra*, *eFGF*, *xWnt11*, *Myf5*, and *MyoD* (Heasman, 2006). Importantly, we confirmed the defect in *Xbra* expression levels, in parallel with the downregulation of *eFGF*, *Wnt11*, *Myf5*, and *MyoD* (Figures 3B, S4A, and S4B). This is in accordance with the facts that eFGF and Xbra cross-activate each other's expression during the establishment of the mesoderm (Isaacs et al., 1994) and that *MyoD* expression is regulated by

Cell PRESS
Open ACCESS

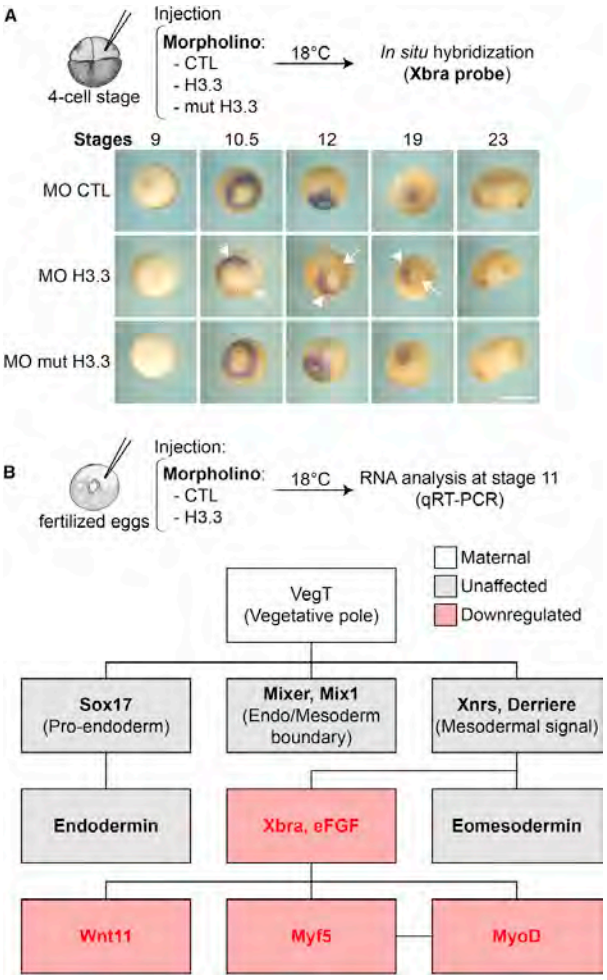


Figure 3. The Early Mesodermal Marker Xbra Is Misregulated in the Absence of H3.3

(A) Xbra expression pattern defects in H3.3 morpholino injected embryos. The scheme shows injections of indicated MO (69 ng of CTL, 4.6 ng of either H3.3 or mutH3.3 MO) in one cell of 4-cell stage embryos. After incubation to reach the indicated stages in controls, we fixed embryos and performed whole mount in situ hybridization with an *Xbra* probe. White arrows indicate the injected part and arrowheads the noninjected part of H3.3 morphants. Scale bar: 1 mm.

(B) Expression level of developmental genes. The scheme shows injections of indicated MO (9.2 ng) in fertilized eggs. After incubation to reach stage 11 (gastrula) in controls, embryos were used to prepare total RNA extracts and were analyzed by qRT-PCR of indicated genes (see also Figure S4A). We represent the expression of a series of genes in H3.3 morphants compared to controls. Red boxes show genes that are significantly downregulated and gray boxes genes whose expression is not significantly affected. Statistical test from 8 independent experiments performed in duplicates: paired Student's t test, p value < 0.05. See also Figure S4.

eFGF and Xbra (Fisher et al., 2002). Taken together, our data show that while early mesoderm inducing signals are largely unaffected, abnormal expression of later mesodermal differentiation markers occurs in H3.3 morphants.

Interestingly, we found both by qRT-PCR and in situ hybridization that H3.3 downregulation also affects the expression of some genes implicated in the dorsal neural regulatory network including *Chordin*, *ADMP*, and the downstream proneural genes *Otx2* and *Sox2* (Heasman, 2006), but not *Sip1*, a known inhibitor of *Xbra* (Lerchner et al., 2000; Verschueren et al., 1999) (Figures S4A and S4B). However, ventral proepidermal genes such as *xVent1* and *xVent2* were not significantly affected (Figure S4A). These data support a model whereby loss of H3.3 impacts a set of genes that should normally be activated during mesoderm and neuroectoderm induction in the embryos at a similar time. This phenotype could potentially be due to either a defect in the mesoderm and/or neuroectoderm induction signals to specifically activate target genes, or, alternatively, it may be a consequence of the fact that activated genes at this particular stage become more dependent on H3.3 for the maintenance of their expression.

H3.3 Is Dispensable for Initiation of Mesoderm Induction Yet Critical for Cell Viability

To test the hypothesis whereby the mesoderm induction would be impaired in H3.3 morphants, we employed animal cap assays to investigate whether H3.3 morphants could respond to exogenous mesoderm-inducing factors. Using activin as a mesoderm-inducing growth factor to stimulate animal cap elongation (Suzuki et al., 1994), we did not observe a statistically meaningful difference between H3.3 morphants and controls when treating animal caps either for 90 min (Figure 4A, 5 ng) or 24 hr (data not shown). This is in contrast to the dramatic effect observed with the dominant negative form of Xbra, Xbra-EnR (Conlon et al., 1996) (Figures 4A and S5A). Interestingly, when we increased the amount of MO H3.3 to try to exacerbate a potential elongation defect, the animal caps instead disintegrated (Figure 4A, 9.2 ng). When examining H3.3 morphants more closely at the end of gastrulation, we observed white cells shed outside the embryos, a first indication of cell death

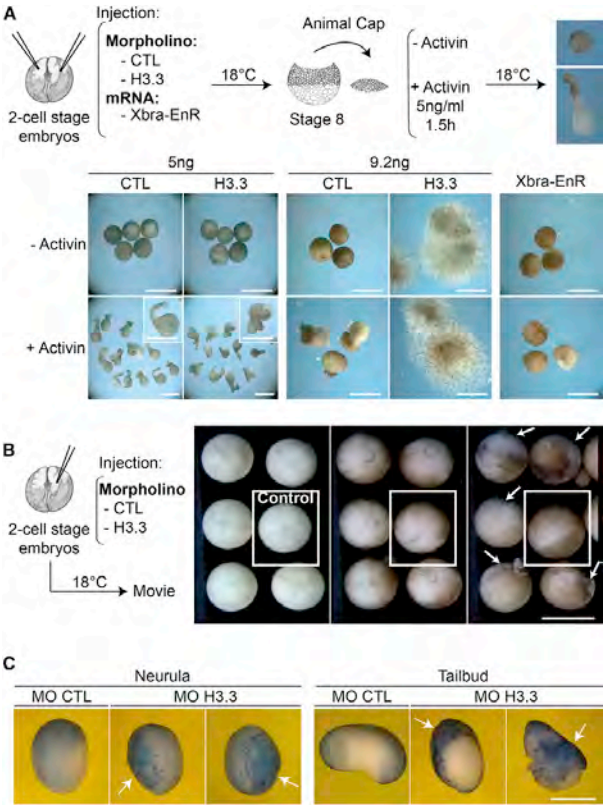


Figure 4. H3.3 Downregulation Does Not Affect Animal Caps Elongation upon Mesoderm Induction but Leads to Cell Death

(A) Animal Cap assay using MO H3.3 treated embryos. The scheme shows injections in both cells of 2-cell stage embryos with indicated MO [2.5 ng/cell (= 5 ng) or 4.6 ng/cell (= 9.2 ng)] or with Xbra-EnR mRNA [250 pg/cell (= 500 pg)], a dominant-negative form of Xbra as a negative control. After incubation to reach stage 8 in controls, we dissected animal caps in each case for incubation with or without activin (5 ng/ml) for 1.5 hr, and cultured them until sibling embryos reached the neurula stage. For the low MO dose (5 ng), we show an inset of one representative animal cap elongation at the same magnification scale as the other panels. Scale bar: 1 mm.

(B) Analysis of H3.3 morpholino injected embryos throughout development. The scheme shows injections of indicated MO (4.6 ng) in one cell of 2-cell stage embryos. We followed development at 18°C of one control (white box) and five H3.3 morphants with acquisition from the vegetative pole (see also Movie S2). Here are three time points: 64 cells, gastrula, and neurula stage. White arrows indicate the apoptotic cells observed at the end of the gastrulation. Scale bar: 1 mm.

(C) TUNEL assay of MO H3.3 treated embryos. We injected the indicated MO (4.6 ng) in one cell of 2-cell stage embryos and performed a TUNEL assay when controls embryos reached the neurula and tailbud stages. White arrows indicate the TUNEL positive cells in the injected side of H3.3 morphants. The majority of white apoptotic cells comes off the embryos at the beginning of the experimental procedure that involves dechorionization. Scale bar: 1 mm.

See also Figure S5.

(Figure 4B and Movie S2). We confirmed cell death in H3.3 morphants both at the neurula and tailbud stages (in contrast to control embryos, Figure 4C) by a Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay detecting DNA fragmentation (Hensey and Gautier, 1997). Taken together, our data show that in an animal cap assay using exogenous activin, the early response to mesoderm induction does occur in H3.3 morphants, but ultimately a strong depletion leads to cell death. These data indicate that early events can take place, but maintenance of the activation is impaired and downregulation of H3.3 leads to cell death when gastrulation fails to progress.

HIRA Is Required for Loading H3.3 and Late Gastrulation

We then asked whether the requirement for H3.3 could relate to a specific need for H3K4 methylation, given that this mark is specifically enriched on H3.3 nucleosomes that accumulate at actively transcribed loci. Global levels of H3K4 methylation are severely reduced when the highly conserved WD40-repeat protein 5 (WDR5), a major methyl K4-associated factor, is downregulated in *Xenopus* embryos (Wysocka et al., 2005), leading to developmental defects in tadpoles (Figure S5B). However, WDR5 knockdown embryos did not show any gastrulation defects resembling H3.3 downregulation (Figure 5B) and *Xbra* expression was unaffected (Figure 5C). Thus, the requirement for H3.3 at gastrulation cannot relate directly to H3K4 methylation promoted by WDR5.

We then assessed whether loss of HIRA could disrupt *Xenopus* development in a manner comparable to H3.3. Injection of morpholinos specifically downregulating HIRA proteins in embryos (Figure 5A) led to late gastrulation defects similar to the ones observed in H3.3-deficient embryos (Figure 5B – white arrows, Figure S3A for different doses of MO). In addition, in situ hybridization of HIRA morphants showed a comparable downregulation of *Xbra* (Figures 5C and S3C). We conclude that HIRA plays a critical role during late gastrulation in a manner that resembles the H3.3 requirement. This parallel suggested a possible connection between HIRA and H3.3 deposition that warranted further exploration.

Interestingly, in vitro nucleosome assembly assays using *Xenopus* egg extracts supported a critical role for HIRA in a deposition pathway independent of DNA synthesis using

Cell PRESS
Open ACCESS

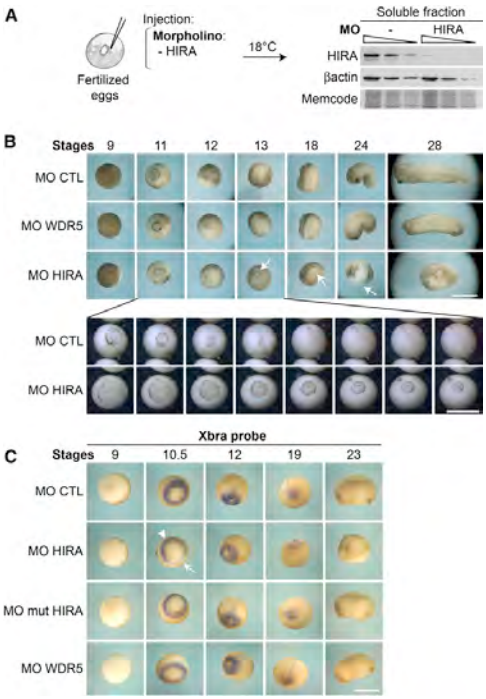


Figure 5. HIRA Downregulation Resembles the H3.3 Phenotype

(A) Specificity of HIRA morpholinos. (Left) The scheme shows injections of HIRA MO (92 ng) in fertilized eggs. After incubation to reach stage 11 in controls, 40 noninjected (−) and 40 injected (MO HIRA) embryos were used to prepare soluble extracts for western blot analysis. (Right) Results used a 2-fold dilution series (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to three embryos, and detection with a HIRA antibody. Anti-β-actin and memcode staining served as loading controls.

(B) Downregulation of HIRA but not WDR5 leads to gastrulation defects. We injected the indicated MO (46 ng) in one cell of 2-cell stage embryos. We acquired images when controls were at the indicated stages. White arrows indicate the gastrulation defects observed in HIRA morphants. In the bottom panel, we show a broader coverage of the gastrulation time period (stages 11 to 13) with eight distinct time points (see also Movie S1). Scale bar: 1 mm.

(C) Xbra mRNA in situ hybridization in HIRA- and WDR5-deficient embryos. We injected the indicated MO (69 ng for CTL or WDR5, 46 ng for either HIRA or mutHIRA) in one cell of 4-cell stage embryos. After incubation to reach the indicated stages in controls, we fixed injected embryos and performed whole-mount in situ hybridization with an Xbra probe. White arrows indicate the injected part and arrowheads the noninjected part of HIRA morphant embryos. Scale bar: 1 mm.

See also Figures S3 and S5.

depletion experiments (Ray-Gallet et al., 2002) and as shown here by neutralization with antibodies (Figure 6A). We thus tested if HIRA morphants showed defects in their chromatin particularly with respect to H3.3 incorporation. Given the comparable phenotypes between H3.3 and HIRA morphant embryos, an interdependency between them had to be considered. We thus compared their chromatin status in parallel, and found that in both H3.3 and HIRA morphants, the amount of H3.3 in the chromatin is similarly affected (Figure 6B). We thus showed a direct and major impact of HIRA on H3.3 in vivo. Furthermore, the analysis of chromatin sensitivity to MNase digestion in H3.3 or HIRA morphants showed remarkable similarity in its increased digestion relative to control embryos (Figure 6C). Taken together, these data support a view where HIRA is necessary to ensure H3.3 deposition and this would be critical at the time of gastrulation. We thus propose that a mechanism involving HIRA for H3.3 deposition, independent of DNA synthesis, is critical at the time of gastrulation.

DISCUSSION

Our data in *Xenopus* demonstrate the unique importance of the H3.3 variant at gastrulation, a critical transition during vertebrate development marked by major changes in cell cycle and developmental programs. Importantly, while the morpholino approach in *Xenopus* could unveil a time when H3.3 first becomes critical, other stages of development and cell differentiation could equally require H3.3 deposition. Thus, these findings should be considered with a broad implication.

A Distinct Role for H3.3 at Late Gastrulation

Remarkably, the distinct late gastrulation defects arising after depletion of H3.3 with morpholinos could not be overcome by providing exogenous H3.2 mRNAs. Thus, the two types of H3 variants are not easily interchangeable at this critical developmental stage. This argues for a specific requirement for H3.3 and/or its deposition mode rather than a mere histone H3 gene dosage deficiency. Similarly, in *Tetrahymena,* extra provision of replicative H3 cannot overcome the absence of H3.3 (Cui et al., 2006) and *H3.3A* knockout mice are neonatal lethal (Couldrey et al., 1999). Intriguingly, though sterile, most *Drosophila* embryos lacking H3.3 survive until adulthood. However this involves an upregulation of the replicative histone H3 transcripts to compensate for the lack of H3.3 (Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009). It is thus possible that the overexpression of one variant in the absence of the other enables *Drosophila* embryos to survive. This would support the view that the variant itself may not be the most critical parameter but it would rather be the ability to exploit different deposition pathways and corresponding chaperones.

The Impact of H3.3 on Transcriptional Program at Late Gastrulation

Here, following depletion of H3.3, clear defects occur at late gastrulation with a failure of blastopore closure and increased cell death. Importantly, the expression of nodal-related genes, which are fundamental for both mesoderm and endoderm formation in early gastrula embryos (Watabe and Miyazono, 2009), were unaffected by the lack of H3.3. Thus, the importance of H3.3 does not equally impact simply any transcribed gene, but rather relates to their activation timing. This is consistent with the downregulation after H3.3 depletion of the mesodermal marker, *Brachyury* (*Xbra*), one of the many genes controlled by

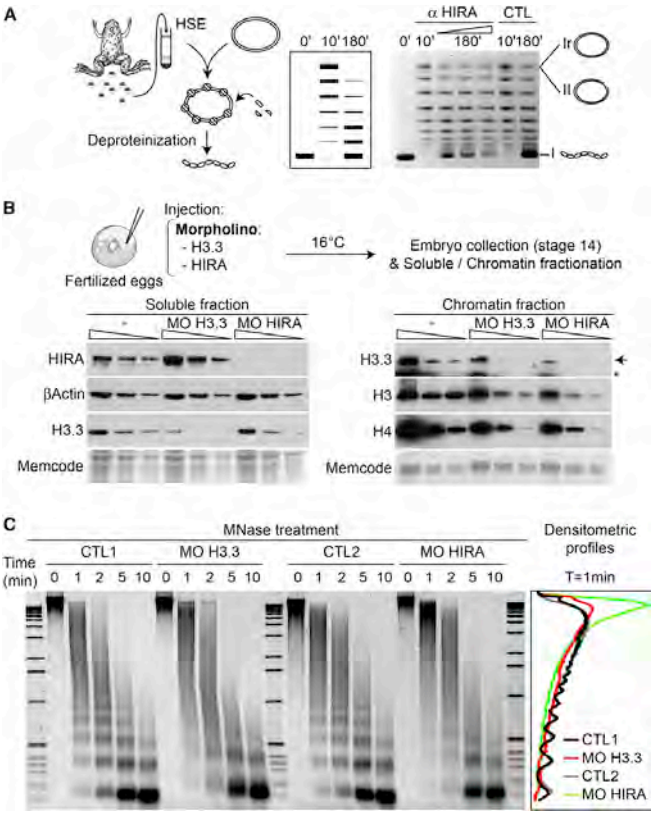


Figure 6. HIRA Is Critical for H3.3 Assembly during Early Development

(A) Nucleosome assembly independent of DNA synthesis requires HIRA in vitro. The scheme shows a nucleosome assembly assay independently of DNA synthesis using *Xenopus* high speed egg extracts (HSEs). We incubated circular DNA plasmids with HSE (5 μl) during the indicated times together with antibodies targeting xHIRA (αHIRA), PBS (CTL), or preimmune serum (not shown). After deproteinization, we analyzed plasmid DNA supercoiling by electrophoresis on agarose gel stained with ethidium bromide. Input DNA run in parallel (first lane on the left, 0 min) and migration positions of DNA plasmid form I (supercoiled), form II (nicked circular), form Ir (closed circular) are indicated.

(B) HIRA downregulation affects the level of H3.3 in the chromatin. The scheme shows injections of indicated MO (18.4 ng for H3.3 and 138 ng for HIRA) in fertilized eggs. After incubation to reach stage 14 in controls (–), 40 embryos in each case were used to prepare soluble and chromatin fractions for western blot analysis. Results used a 2-fold dilution series (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to three embryos, and detection with antibodies. Anti-β−actin and memcode staining served as loading controls. We note that H3.3 downregulation leads to overexpression of HIRA in soluble fractions.

(C) MNase digestion profile of H3.3 and HIRA MO injected embryos. We injected 18.4 ng of H3.3 and 138 ng of HIRA MO in fertilized eggs. After incubation to reach stage 14 in noninjected controls (CTL1 and 2), 40 embryos in each case were used to prepare nuclei that we subjected to MNase digestion for increasing indicated incubation times. For each time point, we purified the resulting DNA fragments from the equivalent of 1.5 embryos to be analyzed by electrophoresis on agarose gel stained with ethidium bromide. Densitometric profiles of the 1 min digestion products are shown on the right.

the nodal/activin signaling pathway (Latinkic et al., 1997). In addition to *Xbra* and *eFGF*, we also found that *Myf5*, as well as a downstream master gene in muscle differentiation, *MyoD*, are also downregulated. In agreement with these observations, a recent report showed that H3.3 histone deposition occurs at the *MyoD* promoter in a cellular model reproducing myogenic transcriptional activation (Yang et al., 2011). This could reflect a direct impact of H3.3 on transcription as proposed (Elsaesser et al., 2010), as well as the necessity to incorporate more H3 outside S phase when these genes are transcribed. These two possibilities are not mutually exclusive, and each should be considered. The presence of H3.3 at regions with high histone turnover, including promoters and regulatory elements (Goldberg et al., 2010; Ray-Gallet et al., 2011), could contribute to maintaining particular settings. In particular, in the context of chromatin changes during early development in *Xenopus*, other histone variants (Almouzni et al., 1994; Dimitrov et al., 1993) should be considered, especially given the crosstalk between H3.3 and H2A.Z promoting transcription in cellular models (Jin and Felsenfeld, 2007). First, somatic H1, whose overexpression reduces mesoderm-specific *MyoD* induction during gastrulation (Steinbach et al., 1997; Vermaak et al., 1998), could antagonize H3.3, as suggested by the anticorrelation between H1 and H3.3 distribution genome-wide (Braunschweig et al., 2009). Second, H2A.Z, whose depletion in *Xenopus laevis* led to gastrulation defects (Ridgway et al., 2004), could function together with H3.3 to antagonize H1 and establish permissive chromatin settings. These specific chromatin settings, beyond having an impact on transcriptional maintenance, could also contribute to maintaining chromatin integrity and thereby impact cell viability.

The Importance of a HIRA-Dependent H3.3 Deposition Pathway to Establish/Maintain Specific Chromatin States

The critical requirement of H3.3 may reflect the need for histone incorporation to replace histones at any sites presenting chromatin defects/nucleosome disruption (De Koning et al., 2007).

Recent findings showed that HIRA could enable nucleosomal free DNA to be reassembled genome wide when the CAF-1-dependent deposition of replicative H3 failed (Ray-Gallet et al., 2011). During gastrulation, when the length of gap phases are becoming significant, replicative chromatin assembly will not suffice to re-establish proper chromatin organization, and this may become even more critical at highly induced gene loci (Newport and Kirschner, 1982). A decrease in nucleosome density beyond a threshold could lead to cell death, possibly through mitotic catastrophe. While we could show that H3.3 was critically required during development, it was important to consider histone chaperones as an important aspect of histone variant dynamics (De Koning et al., 2007). Downregulation of HIRA proved critical during late gastrulation in our experiments in a manner paralleling the defects upon H3.3 downregulation. This is illustrated not only at the developmental level, but most importantly at the chromatin level, where we could detect decreased H3.3 levels and increased sensitivity to MNase digestion, similar to direct H3.3 depletion. Thus, we provide here a clear interdependency in the embryo between HIRA and H3.3, which both affect chromatin at a global level. Further studies will be needed to determine how the complex histone chaperone network acts with H3.3 during development.

Conceptually, the fact that a mechanism acting at the chromatin level and linked to cell cycle can both integrate changes in transcription and help maintain a transcriptional program provides an ideal regulatory means during normal development to control the balance between cell differentiation and viability. In pathological situations where H3 variants are mutated (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012), it will be important to evaluate these requirements to elucidate their contribution to tumor progression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Embryo Manipulation

We used *Xenopus laevis* adults from Centre Ressource Biologie "Xenope" for experiments approved by the Comité d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale Ile de France Paris 1. We prepared embryos as in (Almouzni et al., 1994; Roche et al., 2006) and staged them according to (Nieuwkoop and Faber, 1967). Procedures for the animal cap assay (Green, 1999) involved dissecting animal caps from stage 8 embryos, and incubating with Activin (R&D systems, catalog #338-AC-010, 5 ng/ml) for 90 min, followed by transfer in Activin-free medium for further incubation until sibling embryos had reached the neurula stage. Assays for TUNEL on embryos were performed as described (Hensey and Gautier, 1997).

Whole-Mount In Situ Hybridization

We performed whole-mount RNA in situ hybridizations as described (Sive et al., 2000). We revealed using BM purple substrate (Roche Diagnostics) and acquired images with a LEICA MZ FLIII stereomicroscope. When indicated, we performed cross sections on fixed embryos before the in situ hybridization experiment. See Extended Experimental Procedures for details on plasmids and probes.

Morpholino and mRNA Microinjection

We microinjected embryos using a Drummond Nanoject injector (Drummond Scientific, Broomall, PA) with an injection volume set from 4.6 to 27.6 nl to deliver the appropriate quantity of MO or mRNA (as indicated). See Table S1 for MO sequences (Gene Tools, LLC) that anneal to the initiation region (start codon) of targeted mRNAs; see Extended Experimental Procedures for details on in vitro-transcribed specific 5′ capped mRNAs.

Protein Extracts Preparation and Western Blotting

We prepared total protein extracts from embryos using the CelLytic Express reagent (Sigma-Aldrich). For soluble and chromatin (oligonucleosomes) fractionations, we adapted the following protocol (Kornberg et al., 1989), with modifications (see Extended Experimental Procedures). We analyzed protein samples by electrophoresis either on Triton Acetic acid Urea (TAU) gels to separate histone subtypes (Zweidler, 1978), or on 4%–12% NuPAGE SDS-PAGE gels (Life Technologies). We tested H3.2 (van der Heijden et al., 2005) and H3.3 ((Dran é et al., 2010); Abnova H00003021-M01) antibodies for specificity using wheat germ extracts (Promega, # L4380).

Supercoiling Assay and MNase Treatment

We carried out supercoiling assays using High Speed Egg extracts (HSEs) as described (Ray-Gallet and Almouzni, 2004), and added xHIRA antibodies (αHIRA), PBS (control) or preimmune serum (not shown) in variable volumes to monitor their blocking efficiency.

We carried out limited digestions with MNase (Nuclease S7; Micrococcal nuclease, #10107921001, Roche Diagnostics) on nuclei isolated from stage 14 embryos according to a modified protocol from (Kornberg et al., 1989).

See Extended Experimental Procedures for details.

RNA Extraction, Northern Blotting, and qRT-PCR

We isolated total RNA from embryos using the TRIZOL reagent (Life Technologies) or the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) to either perform a northern blot analysis ((Brown et al., 2004), see supplemental information for probe details) or generate first-strand cDNA with random primers (Superscript III Reverse Transcriptase Kit - Life Technologies). We used cDNA to carry out quantitative PCRs with either the 7500HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) or the Light Cycler System (Roche Diagnostics). We used the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primer sequences are listed in Table S2. For each experiment, biological and technical triplicates enabled statistical analysis using a Student's t test.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, five figures, two tables, and two movies and can be found with this article online at doi:10.1016/j.celrep.2012.05.006.

LICENSING INFORMATION

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License (CC-BY-NC-ND; http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. D. Ray-Gallet, A.-H. Monsoro-Burq, Z. Gurard-Levin, A. Van den Berg, and L. Attardi for critical reading and to members of UMR218 for helpful discussions. We thank Drs. A.-H. Monsoro-Burq and J. Smith for plasmids, and Dr. M. Umbhauer for assistance with the animal cap assay. We thank P. de Boer for the H3.1/H3.2 antibody. G. Almouzni's team is supported by la Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2010), the European Commission Network of Excellence EpiGeneSys (HEALTH-F4-2010-257082), an ERC Advanced Grant 2009-AdG_20090506 "Eccentric" and Canceropole INCa "GepiG," and E. Szenker recipient of support from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche/University Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, France and FRM.

Received: September 27, 2011
Revised: March 21, 2012
Accepted: May 7, 2012
Published online: May 31, 2012

Cell PRESS
Open ACCESS

REFERENCES

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002a). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *99* (*Suppl 4*), 16477–16484.

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

Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S., and Wolffe, A.P. (1994). Histone acetylation influences both gene expression and development of Xenopus laevis. Dev. Biol. *165*, 654–669.

Baldessari, D., Shin, Y., Krebs, O., König, R., Koide, T., Vinayagam, A., Fenger, U., Mochii, M., Terasaka, C., Kitayama, A., et al. (2005). Global gene expression profiling and cluster analysis in Xenopus laevis. Mech. Dev. *122*, 441–475.

Banaszynski, L.A., Allis, C.D., and Lewis, P.W. (2010). Histone variants in metazoan development. Dev. Cell *19*, 662–674.

Boyarchuk, E., Montes de Oca, R., and Almouzni, G. (2011). Cell cycle dynamics of histone variants at the centromere, a model for chromosomal landmarks. Curr. Opin. Cell Biol. *23*, 266–276.

Braunschweig, U., Hogan, G.J., Pagie, L., and van Steensel, B. (2009). Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. EMBO J. *28*, 3635–3645.

Brown, T., Mackey, K., and Du, T. (2004). Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. Curr. Protoc. Mol. Biol. *Chapter 4*, Unit 4 9.

Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., and Dillon, N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. EMBO Rep. *6*, 354–360.

Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M., and Smith, J.C. (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. Development *122*, 2427–2435.

Couldrey, C., Carlton, M., Nolan, P., Colledge, X., and Evans, M. (1999). A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunded growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. Hum. Mol. Genet. *8*, 2489–2495.

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

De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 997–1007.

Dimitrov, S., Almouzni, G., Dasso, M., and Wolffe, A.P. (1993). Chromatin transitions during early Xenopus embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. Dev. Biol. *160*, 214–227.

Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. Genes Dev. *24*, 1253–1265.

Elsaesser, S.J., Goldberg, A.D., and Allis, C.D. (2010). New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. Curr. Opin. Genet. Dev. *20*, 110–117.

Fisher, M.E., Isaacs, H.V., and Pownall, M.E. (2002). eFGF is required for activation of XmyoD expression in the myogenic cell lineage of Xenopus laevis. Development *129*, 1307–1315.

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. Cell *140*, 678–691.

Green, J. (1999). The animal cap assay. Methods Mol. Biol. *127*, 1–13.

Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. J. Biol. Chem. *281*, 559–568.

Heasman, J. (2006). Patterning the early Xenopus embryo. Development *133*, 1205–1217.

Hensey, C., and Gautier, J. (1997). A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. Mech. Dev. *69*, 183–195.

Herrmann, B.G., and Kispert, A. (1994). The T genes in embryogenesis. Trends Genet. *10*, 280–286.

Hödl, M., and Basler, K. (2009). Transcription in the absence of histone H3.3. Curr. Biol. *19*, 1221–1226.

Isaacs, H.V., Pownall, M.E., and Slack, J.M. (1994). eFGF regulates Xbra expression during Xenopus gastrulation. EMBO J. *13*, 4469–4481.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. Science *293*, 1074–1080.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2006). Distribution of histone H3.3 in hematopoietic cell lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 574–579.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. Genes Dev. *21*, 1519–1529.

Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark "nucleosome-free regions" of active promoters and other regulatory regions. Nat. Genet. *41*, 941–945.

Katagiri, C., and Ohsumi, K. (1994). Remodeling of sperm chromatin induced in egg extracts of amphibians. Int. J. Dev. Biol. *38*, 209–216.

Konev, A.Y., Tribus, M., Park, S.Y., Podhraski, V., Lim, C.Y., Emelyanov, A.V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J.T., Lusser, A., and Fyodorov, D.V. (2007). CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. Science *317*, 1087–1090.

Kornberg, R.D., LaPointe, J.W., and Lorch, Y. (1989). Preparation of nucleosomes and chromatin. Methods Enzymol. *170*, 3–14.

Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature *275*, 416–420.

Latinkic, B.V., Umbhauer, M., Neal, K.A., Lerchner, W., Smith, J.C., and Cunliffe, V. (1997). The Xenopus Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. Genes Dev. *11*, 3265–3276.

Lerchner, W., Latinkic, B.V., Remacle, J.E., Huylebroeck, D., and Smith, J.C. (2000). Region-specific activation of the Xenopus brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. Development *127*, 2729–2739.

Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Noh, K.M., Stadler, S.C., and Allis, C.D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *107*, 14075–14080.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., and Couble, P. (2005). The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. Nature *437*, 1386–1390.

Loyola, A., and Almouzni, G. (2007). Marking histone H3 variants: how, when and why? Trends Biochem. Sci. *32*, 425–433.

Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. Mol. Cell *24*, 309–316.

McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 1525–1530.

Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. Nat. Genet. *37*, 1090–1097.

Newport, J., and Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell *30*, 675–686.

Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2008). Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. Nat. Cell Biol. *10*, 102–109.

Nieuwkoop, P.D., and Faber, J. (1967). Normal Table of Xenopus laevis (Amsterdam: Daudin).

Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. Int. J. Dev. Biol. *53*, 231–243.

Probst, A.V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 192–206.

Quivy, J.P., Grandi, P., and Almouzni, G. (2001). Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during Xenopus early development. EMBO J. *20*, 2015–2027.

Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2004). DNA synthesis-dependent and -independent chromatin assembly pathways in Xenopus egg extracts. Methods Enzymol. *375*, 117–131.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. Mol. Cell *9*, 1091–1100.

Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E., and Almouzni, G. (2011). Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. Mol. Cell *44*, 928–941.

Ridgway, P., Brown, K.D., Rangasamy, D., Svensson, U., and Tremethick, D.J. (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for Xenopus laevis development. J. Biol. Chem. *279*, 43815–43820.

Roche, D., Almouzni, G., and Quivy, J.P. (2006). Chromatin assembly of DNA templates microinjected into Xenopus oocytes. Methods Mol. Biol. *322*, 139–147.

Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S., and Ahmad, K. (2009). Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in Drosophila. Curr. Biol. *19*, 1816–1820.

Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. Nat. Cell Biol. *12*, 853–862.

Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 139–149.

Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. Genes Dev. *19*, 804–814.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.Y., Jones, D.T., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.A., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature *482*, 226–231.

Showell, C., Binder, O., and Conlon, F.L. (2004). T-box genes in early embryogenesis. Dev. Dyn. *229*, 201–218.

Sive, H.L., Grainger, R.M., and Hardland, R.M. (2000). Early Development of *Xenopus laevis*. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in-vitro. Cell *58*, 15–25.

Steinbach, O.C., Wolffe, A.P., and Rupp, R.A. (1997). Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in Xenopus. Nature *389*, 395–399.

Suzuki, A., Nagai, T., Nishimatsu, S., Sugino, H., Eto, Y., Shibai, H., Murakami, K., and Ueno, N. (1994). Autoinduction of activin genes in early Xenopus embryos. Biochem. J. *298*, 275–280.

Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. Cell Res. *21*, 421–434.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *67*, 578–583.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. Cell *116*, 51–61.

Torres-Padilla, M.E., Bannister, A.J., Hurd, P.J., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2006). Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. Int. J. Dev. Biol. *50*, 455–461.

Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. Cell *111*, 285–291.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A., Muller, S., Berden, J.H., Braat, D.D., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. Mech. Dev. *122*, 1008–1022.

Vermaak, D., Steinbach, O.C., Dimitrov, S., Rupp, R.A., and Wolffe, A.P. (1998). The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early Xenopus embryos. Curr. Biol. *8*, 533–536.

Verschueren, K., Remacle, J.E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B.S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.T., Bodmer, R., et al. (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5′-CACCT sequences in candidate target genes. J. Biol. Chem. *274*, 20489–20498.

Watabe, T., and Miyazono, K. (2009). Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. Cell Res. *19*, 103–115.

Waterborg, J.H. (1990). Sequence analysis of acetylation and methylation in two histone H3 variants of alfalfa. J. Biol. Chem. *265*, 17157–17161.

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nat. Genet. *44*, 251–253.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. Cell *121*, 859–872.

Yang, J.H., Song, Y., Seol, J.H., Park, J.Y., Yang, Y.J., Han, J.W., Youn, H.D., and Cho, E.J. (2011). Myogenic transcriptional activation of MyoD mediated by replication-independent histone deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 85–90.

Zweidler, A. (1978). Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. Methods Cell Biol. *17*, 223–233.

Complément du Matériel et Méthodes

Supplemental Information

Cell PRESS Open ACCESS

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Northern Blot and In Situ Hybridization Probes

We used 500bp of the 3′UTR of the *H3.2a* (NCBI # X03104) or the *H3.3b* (BC042290) gene cloned into pCR4TOPO (Life Technologies) to produce specific in situ probes. We obtained a total H3 probe by mixing *H3.2b* (BC084311) and *H3.3b* cDNAs probes. We used the same sequences to produce Northern blot probes. We obtained a HIRA in situ probe from a pCR4TOPO-xHIRA construct (BC078007). We also used the following plasmids: psp73-Xbra (provided by Pr. J. Smith, MRC, London), and pBluescriptKS-MyoD (BC041190), pBluescriptSK-Sip1 (AB038353), pBluescriptSK-Sox17a (BC106403) (plasmids provided by Pr. A-H. Monsoro-Burq, Institut Curie, France).

Soluble and Chromatin Fractionation

To prepare soluble and chromatin (oligonucleosomes) fractions from embryos, we adapted the method from (Kornberg et al., 1989). Briefly, we homogenized 40 embryos in 200 μl of the following Lysis Buffer [Tris-HCl pH = 7.5 10mM, NaCl 200mM, $MgCl_2$ 5mM, NP40 0.5%, complete EDTA-free 1X (Roche Diagnostics, # 11873580001)]. After a centrifugation at 1000 g for 2 min at 4°C, we further ultracentrifuged the supernatant at 160,000 g for 1 hr at 4°C to obtain a clear soluble fraction. For chromatin fractions, we homogenized 40 embryos with a Lysis Buffer containing only 10mM NaCl. After a centrifugation at 1000 g for 2min and several washes with the same buffer, we washed the pellet in the Buffer A [Tris-HCl pH = 7.5, NaCl 15mM, KCl 60mM, sucrose 0.34M, DTT 1mM, complete EDTA-free 1X] and then resuspended it in 400 μl of this buffer. After addition of $CaCl_2$ (2mM final) and RNase A (Roche Diagnostics, #10109142001) treatment (75 μg/ml final, 5min at 37°C), we exposed nuclei to micrococcal nuclease digestion (MNase, Roche Diagnostics, #1010792100) with 11.25U/mL final during 10min (or as indicated) at 37°C. We stopped the digestion by adding EDTA (50mM final) and recovered the solubilized chromatin fraction after a centrifugation at 1000 g for 2min.

Detailed Supercoiling Assay and MNase Treatment

We carried out supercoiling assays using HSEs as described (Ray-Gallet and Almouzni, 2004), and added xHIRA antibodies (αHIRA), PBS (control) or preimmune serum (not shown) in variable volumes to monitor their blocking efficiency. After incubation during the indicated time at 23°C, we stopped the reaction by adding 25 μl of the following mix [30mM EDTA, 0.7% SDS]. We recovered DNA after RNase (Roche Diagnostics, #10109142001, 0.1mg/mL final, 30min at 37°C) and Proteinase K treatment (Roche Diagnostics, #03115879001, 0.2mg/mL final, 30min at 37°C) followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Purified plasmid DNA was subjected to agarose gel electrophoresis (1.2% agarose in 1XTAE buffer, migration at 2V/cm for 16 hr at 4°C) to resolve the topological forms. We used ethidium bromide staining for visualization with a Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare-Life Sciences).

For MNase experiments shown in Figure 6C, we recovered DNA after Proteinase K treatment followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Purified DNA was subjected to agarose gel electrophoresis (1.5% agarose in 1XTAE buffer, migration at 4V/cm for 4 hr) to analyze the extent of digestion. We used ethidium bromide staining for visualization with a Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare-Life Sciences).

We also prepared soluble fractions using the High Speed Egg (HSE) extract protocol (Ray-Gallet and Almouzni, 2004) to be analyzed by electrophoresis in a Triton Acetic acid Urea (TAU) gel and separate histone subtypes (Zweidler, 1978).

mRNAs Preparation

We in vitro transcribed capped mRNA from GFP, xH3.2-HA and hH3.3-HA cloned into the pβRN3P vector (Zernicka-Goetz et al., 1996) using T3 RNA polymerase (Promega). The plasmid pSP64T-Xbra-EnR was kindly provided by J. Smith.

Antibodies

After gel transfer on nitrocellulose membranes (Protran) for Western blotting, we used specific antibodies and revelation was performed with the Super Signal detection kit (Thermo Scientific). We used the following primary antibodies: anti- H3 (Abcam ab1791; 1:1,000 dilution), anti- H3.1/H3.2 ((van der Heijden et al., 2005); 1:1,000), anti- H3.3 (Abnova H00003021-M01; 1:40), anti-H4 (Millipore #05-858; 1:1,000), anti- HA (Roche Diagnostics Clone 3F10; 1:1,000), anti- xHIRA ((Ray-Gallet et al., 2002); 1:2,000), anti- xp150 ((Quivy et al., 2001); 1:1,000), anti- xp60 ((Ray-Gallet et al., 2007); 1:1,000), anti- GFP (SantaCruz #SC8334; 1:500), anti- β−actin (Sigma-Aldrich #a5441; 1:2,000), anti- α-tubulin (Sigma-Aldrich #T9026; 1:10,000). Secondary antibodies used were HRP-conjugated affinity-purified sheep anti–mouse or donkey anti–rabbit (1:20,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Casey, E.S., O'Reilly, M.A., Conlon, F.L., and Smith, J.C. (1998). The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. Development *125*, 3887–3894.

Conlon, F.L., and Smith, J.C. (1999). Interference with brachyury function inhibits convergent extension, causes apoptosis, and reveals separate requirements in the FGF and activin signalling pathways. Dev. Biol. 213, 85–100.

Kornberg, R.D., LaPointe, J.W., and Lorch, Y. (1989). Preparation of nucleosomes and chromatin. Methods Enzymol. *170*, 3–14.

Nieuwkoop, P.D., and Faber, J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Amsterdam: Daudin).

Quivy, J.P., Grandi, P., and Almouzni, G. (2001). Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during *Xenopus* early development. EMBO J. *20*, 2015–2027.

Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2004). DNA synthesis-dependent and -independent chromatin assembly pathways in *Xenopus* egg extracts. Methods Enzymol. *375*, 117–131.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. Mol. Cell *9*, 1091–1100.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Silljé, H.W., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2007). The histone chaperone Asf1 is dispensable for direct de novo histone deposition in *Xenopus* egg extracts. Chromosoma *116*, 487–496.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A., Muller, S., Berden, J.H., Braat, D.D., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. Mech. Dev. *122*, 1008–1022.

Zernicka-Goetz, M., Pines, J., Ryan, K., Siemering, K.R., Haseloff, J., Evans, M.J., and Gurdon, J.B. (1996). An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. Development *122*, 3719–3724.

Zweidler, A. (1978). Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. Methods Cell Biol. *17*, 223–233.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. Cell *121*, 859–872.

Figures supplémentaires :

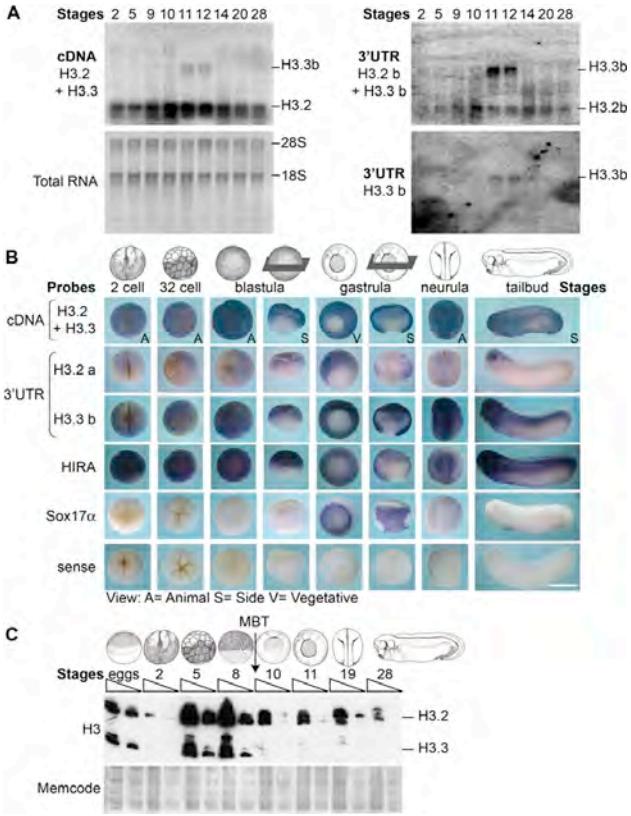


Figure S1. H3 and H3.3 Regulation during Early Development, Related to Figure 1

(A) H3 and H3.3 expression levels by Northern Blot. We extracted total RNAs from embryos at indicated developmental stages for analysis of H3.2 and H3.3 transcripts by Northern Blot. We show the signals for total H3 transcripts (*H3.2+H3.3* cDNA), total RNA visualized by methylene blue (revealing the 28S and 18 s rRNAs), H3.2 and H3.3 single transcripts (*H3.2b+H3.3b* 3′UTR) and single H3.3 transcript (*H3.3b* 3′UTR).

(B) Expression pattern of H3.2 and H3.3 mRNA during *Xenopus* development. We fixed embryos at indicated stages and performed whole mount in situ hybridization using DIG-UTP RNA probes. We show the expression pattern of total H3 (*H3.2+H3.3* cDNA), *H3.2a*, *H3.3b* and *HIRA* single transcripts (3′ UTR). The *Sox17α* probe served as a reference for endoderm staining, and a sense probe was used as a negative control. We sectioned stage 9 and 11 embryos prior to the in situ hybridization procedure. Scale bars: 1 mm, sketches adapted from (Nieuwkoop and Faber, 1967).

(C) Soluble pool of H3.2 versus H3.3 levels throughout development. We prepared HSE extracts from eggs and embryos at indicated stages for analysis by Triton Acid Urea (TAU) gel electrophoresis. This allowed the separation of H3.2 and H3.3 variants that we revealed by Western blot with an H3 antibody. Memcode staining served as a loading control, MBT = Mid Blastula Transition, sketches adapted from (Nieuwkoop and Faber, 1967).

Cell PRESS
Open ACCESS

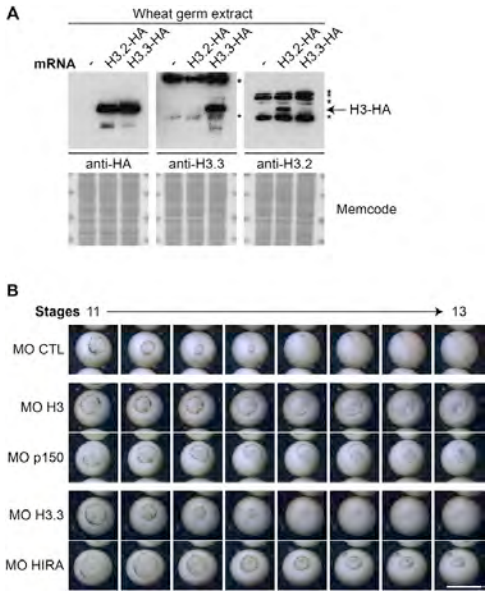


Figure S2. Specificity of H3.2 and H3.3 Antibodies and Histone Chaperones Phenotypes during Early Development, Related to Figures 1 and 2

(A) Specificity of H3.2 and H3.3 antibodies. We used wheat germ extracts to in vitro translate H3.2-HA and H3.3-HA mRNAs and analyzed them by Western blot using specific antibodies as indicated. Asterisks (*) show unspecific bands also present in extracts without exogenous mRNA (–) while the arrow indicates the H3-HA band (H3.2-HA or H3.3-HA). Memcode staining served as a loading control.

(B) HIRA phenotype phenocopies H3.3 phenotype while MO p150 phenocopies the one of MO H3 injected embryos. We injected indicated MO (13.8ng for H3 and H3.3, 138ng for CTL, p150 and HIRA MO) in one cell of two-cell stage embryos. We show the gastrulation time periode between stages 11 and 13 with 8 distinct time points (see also Figures 1 and 5, and Movie S1).

Scale bar: 1 mm.

Cell PRESS
Open ACCESS

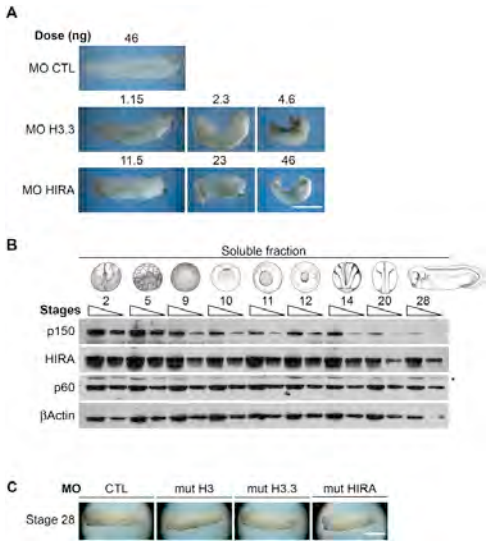


Figure S3. Dose-Dependent Phenotypes and Chaperone Expression throughout Development, Related to Figures 1 and 2

(A) Dose-dependent phenotype of H3.3 and HIRA morpholinos. We injected CTL, H3.3 or HIRA MO (at the indicated doses) in one cell of two-cell stage embryos and acquired images when control embryos reached stage 28. Scale bar: 1 mm.

(B) Expression of histone chaperones during early development. Embryos at indicated stages were used to prepare soluble fractions and were analyzed by Western blot. We used a 2-fold dilution series as indicated (gradient bar) with the highest quantity being equivalent to 3 embryos, and revealed with specific antibodies as indicated. βactin served as a loading control. Asterisk (*) shows an unspecific band, sketches are adapted from (Nieuwkoop and Faber, 1967).

(C) Control injection phenotypes. We injected the indicated MO (4.6 ng of mutH3 and mutH3.3 MO, 46 ng of CTL and mutHIRA MO) in one cell of two-cell stage embryos and acquired images when control embryos reached stage 28. Scale bar: 1 mm.

Cell PRESS
Open ACCESS

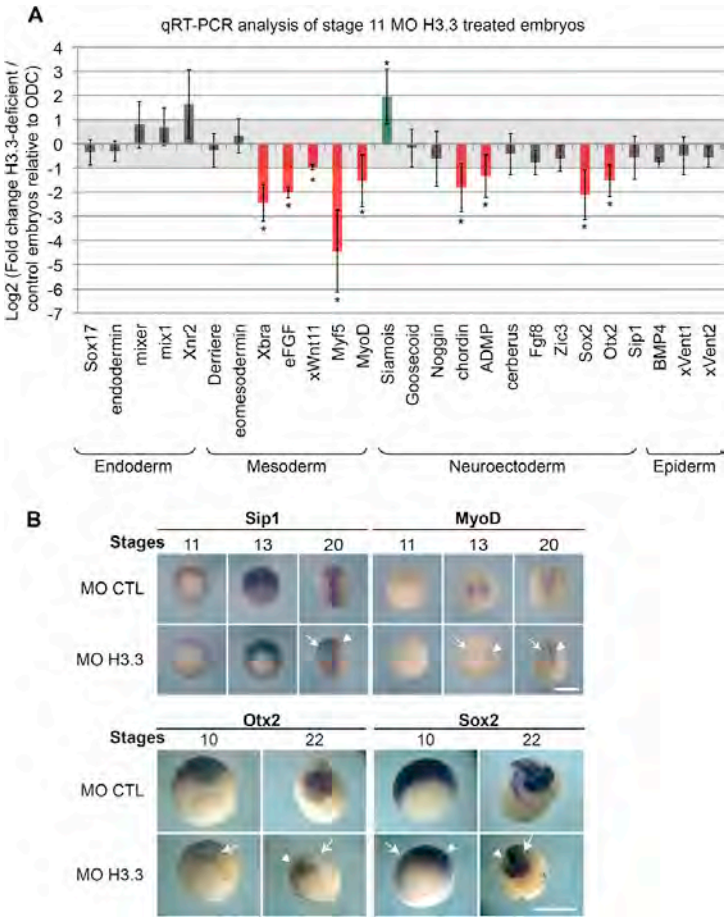


Figure S4. Specific Effects of H3.3 MO on the Transcription of Mesoderm Genes, Related to Figure 3

(A) qRT-PCR expression profiling of MO H3.3 treated embryos. We injected CTL or H3.3 MO (9.2ng) in fertilized eggs. After incubation at 18°C to reach stage 11 (gastrula) in controls, embryos were used in each case to prepare total RNA extracts and were analyzed by qRT-PCR of indicated genes. We represent graphically in a $\log_2$ scale the fold changes between MO H3.3 and MO CTL embryos, first normalized to the housekeeping gene ODC. We classified genes according to their importance for the endoderm, mesoderm, neuroctoderm or epiderm regulatory networks. Red shows genes that are significantly downregulated in MO H3.3, while green indicates significantly overexpressed genes. In gray are genes whose expression is not affected (* Paired Student's t test p-value < 0.05). Plotted are means and standard deviations of 8 independent experiments performed in duplicates.

(B) Spatio-temporal expression of specific markers in MO H3.3 treated embryos. We injected the indicated MO (4.6 ng) in one cell of 2-cell stage embryos and performed whole mount in situ hybridization with specific probes and stages as indicated. White arrows indicate the injected side and arrowheads the uninjected part of H3.3 morphant embryos. Scale bar: 1 mm.

Cell PRESS
Open ACCESS

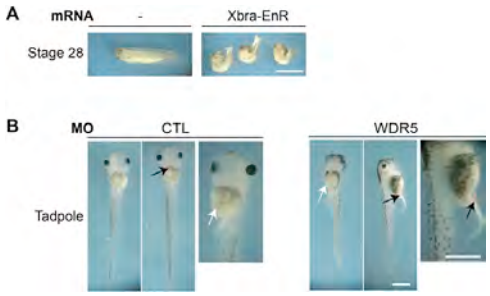


Figure S5. Control Injection Experiments, Related to Figures 4 and 5

(A) Xbra-EnR phenotype. We injected Xbra-EnR mRNA (500 pg) in one cell of two-cell stage embryos and acquired images when controls reached stage 28. Xbra-EnR injected embryos exhibit defects of the posterior mesoderm development. Scale bar: 1 mm.

(B) WDR5 phenotype. We injected indicated MO (46 ng) in one cell of two-cell stage embryos and acquired images when control embryos reached the tadpole stage. MO WDR5-injected tadpoles exhibit abnormal distribution of blood cells (blood is absent from heart while forming a hemorrhage in the tail – black arrows), and failure of gut patterning (white arrows). Some tadpoles also exhibited body curvature (not shown). Scale bar: 1 mm.

Tableaux supplémentaires :

Table S1. List of Morpholinos, Related to Experimental Procedures

Name	Morpholino sequences
Control (CTL)	CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A
H3	CGG TCT GTT TAG TAC GAG CCA TAG C
mut H3	CGc TCT cTT TAg TAC GAc CCA TAc C
H3.3	GGT CTG CTT TGT ACG GGC CAT TTC C
mut H3.3	GcT CTc CTT TcT ACG GGC gAT TaC C
HIRA	AGC TTC ATT GTC CCT CTG TGC CCA
mut HIRA	AGg TTg ATT GTC gCT CTc TGC aCA
p150	TAC TGC TGC TTC CTT CCC AGG CAT C
WDR5	CAT GGT GTC AGC ACT AGA ATG GTG C

We list the morpholinos sequences used in this study. The mutated nucleotides in mismatched morpholinos (mut MO) are shown in small letters.

Table S2. List of Primers, Related to Experimental Procedures

Gene	Reference	Primers	
		Forward	*Reverse*
Sox2	Primer Express	CCATGCACCGCTATGATGTC	CTGCGAGCTGCTCATGGA
Otx2	Primer Express	AAGATTCAGGATTTAGCGCAAAA	TGCGCTCGCTCGGAATA
Sip1	Primer Express	CAGGCAGAGATCAGCACGAA	CTGTGCATTTGAACTTGCGATT
xBra	Primer Express	TGGCACCCAGAGAATGATCAC	CGGTCACTGCTATGAACTGTGTCT
BMP4	Primer Express	TCCTGCTCGGAGGCACTAAC	ACTTTCTTCTTGCCCGTGTCA
Myf5	Primer Express	TTCAGCGTCAGGTGGTTCAG	CCGCGGAAGGGAGTCAGT
MyoD	Primer Express	CAACCAAAGGCTCCCCAAA	GAGGCTCTCTATGTAGCGAATCG
ADMP	Primer Express	TCCAAACATCATCCGTTTTGC	CCAGCATGGGCTGTTTGC
Fgf8	Primer Express	CCTGGTGACCGACCAACTAAG	CCGGCTGTACAACTGGTAGGTT
Chordin	Primer Express	TGCAGTCAGATGGAGCAGGAT	TGCAGTCAGATGGAGCAGGAT
Zic3	Primer Express	TGCCAGCTCAGGGTACGAAT	CCTCACTGTTGGCAGAAACCA
xVent1	Primer Express	CCCAACAAATAAGCAAACTGGAA	CAGGTGCCCCCAGATATCTC
xVent2	Primer Express	CCAGAACCGCAGGATGAAAT	GGTATGAGTCTGGTCTGCCATCT
Noggin	Primer Express	CAGACCGGCTCCTAGTGAAAA	GGGATCCGGGTGCTCAAT
Goosecoid	Primer Express	TGTACCCTCAGCTACAGCATACG	GTGAGGCACTGGTGGAATCA
Derriere	Primer Express	GGATGGCAGAACTGGGTCAT	GGATGGCAGAACTGGGTCAT
Eomesodermin	Primer Express	TGACCCCCGTGCAACAA	TTTCGTAGGCCCCCATGTC
Siamois	Primer Express	GAGCCCAGGATACAGGTTTGG	TGGTTGCTCTTGGCAGATGTC
Sox17	Primer Express	CGCCAGCGACGATCAGA	GCCCGAGTCCAGTCATCATT
Cerberus	Primer Express	TGCAGTCAGATGGAGCAGGAT	TTCAGCGTCAGGTGGTTCAG
Endodermin	Primer Express	GACGGTGCGCAAATATTTCC	AGCGTTCCCATCAGCATCTG
Mixer	Primer Express	CCGCGGAAGGGAGTCAGT	CCGCGGAAGGGAGTCAGT
Xnr2	Primer Express	CCGCGGAAGGGAGTCAGT	CCGCGGAAGGGAGTCAGT
Mix1	Primer Express	TCAGCCATTTGCCATGAATC	TGGGATGCTGCTGGAAGTC
ODC	Primer Express	ACCCAGCCCTGGATAAATACTTC	TCCCAGGCTCTGCAATGATT
eFGF	(Casey et al., 1998)	CTTTCTTTCCAGAGAAACGACACCG	AACTCACGACTCCAACTTCCACTG
Wnt11	Primer 3	TGGAATGAGAGCGAACACTG	TCCAGCGCATGTCAGATAAG

We list the set of primers and their reference used for the qRT-PCRs.

Films supplémentaires :

Téléchargeables sur le site de *Cell Reports* à l'adresse suivante :

http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(12)00130-1#suppinfo

Movie S1. Development of MO H3, H3.3, p150, and HIRA Treated Embryos Compared to Controls from Blastula to Tail-Bud Stage, Related to Figures 1, 5, and S2 (MOV 1.76 MB)

We injected cytotoxic T lymphocyte (CTL) (138 ng), H3 (13.8 ng), p150 (138 ng), H3.3 (13.8 ng), or HIRA (138 ng) MO in one cell of two-cell stage embryos and followed development of two injected embryos in each case from the vegetal side.

Movie S2. Development of H3.3-Deficient Embryo Compared to a Control Embryo from Blastula to Neurula Stage, Related to Figure 4 (MOV 9.29 MB)

We injected CTL or H3.3 (4.6 ng) in one cell of two-cell stage embryos and followed development of one Control (white boxed) and five H3.3 morphants. Note the apoptotic cells observed in the end of the gastrulation of H3.3 morphants. View from the vegetative side.

3. Résultats complémentaires non publiés

a. Quelle est l'expression des gènes H3.2 et H3.3 chez le Xénope?

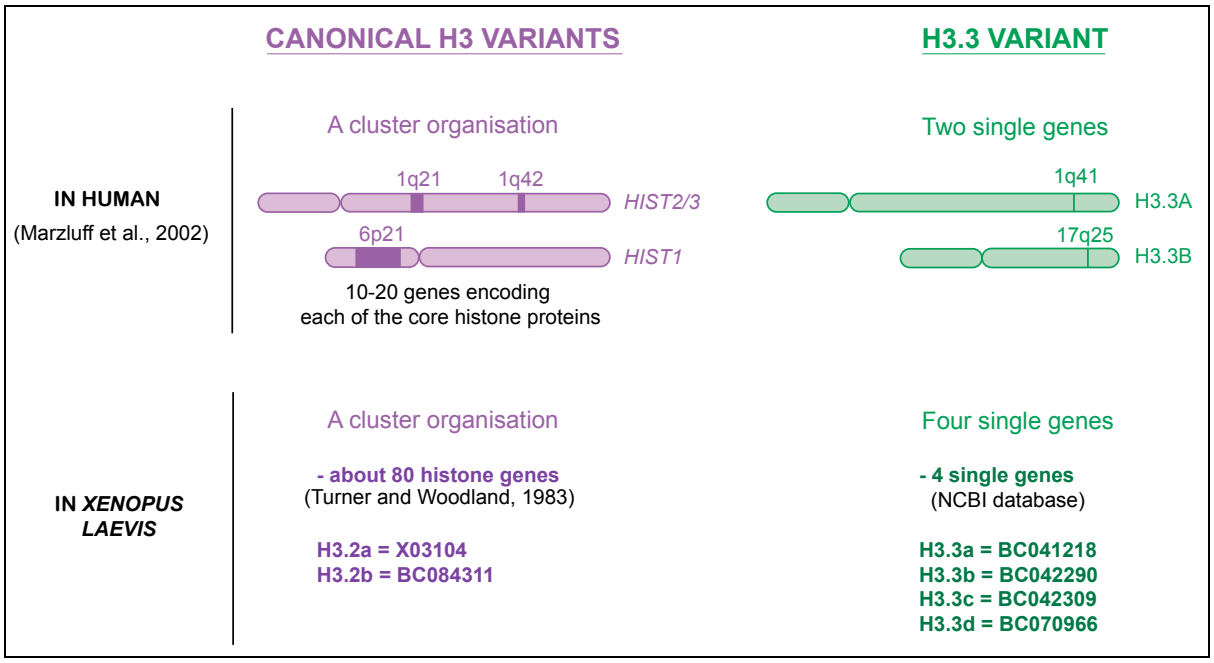


Figure 47 : Comparaison des gènes histones H3 chez l'Homme et le Xénope

Résultats et discussion

En recherchant dans les bases de données, 4 gènes codant pour H3.3 chez le *Xenopus laevis* ont été identifiés (Figure 47). Ceci n'est pas surprenant sachant que le génome des mammifères contient deux gènes H3.3 (H3.3A et H3.3B) (Figure 47) et que le *Xenopus laevis* est une espèce pseudo-tétraploïde. Concernant H3.2, les gènes histones canoniques regroupés en cluster seraient répétés en tandem environ 80 fois (Turner and Woodland, 1983). Cependant, dans les bases de données, uniquement deux gènes séquencés ont été identifiés (Figure 47), ce qui ne facilite pas l'étude spécifique de H3.2 par rapport à H3.3. Ainsi, dans le manuscrit présenté précédemment, nous avons comparé l'expression de H3 total (sonde complémentaire à une séquence commune aux ADNc de H3.2 et H3.3) par rapport à H3.3 (sonde complémentaire du 3'UTR d'un gène H3.3) à la fois par Northern Blot et par hybridation *in situ*. J'ai tout de même réalisé une analyse quantitative de chacun de ces 6 gènes par qRT-PCR en utilisant des amorces spécifiques au niveau des 3'UTR, que je présente en Figure 48A. Cette analyse est en accord avec l'analyse par Northern Blot qui montre particulièrement que le gène H3.3b présente un pic d'expression au moment de la gastrulation. De plus, l'expression d'H3.3c est plus forte à partir du processus de gastrulation. Ces données sont donc en accord avec la régulation et l'importance développementale d'H3.3. Cependant, la limite de cette étude par qRT-PCR est

que nous ne pouvons pas comparer chaque gène entre eux. Ainsi, l'étude de gènes individuels codant pour H3.2 donne l'impression d'une faible expression d'H3.2 par rapport à H3.3, ce qui n'est pas le cas comme le montre l'étude global d'H3 par Northern Blot (Figure S1A du manuscrit dans Cell Reports).

Afin de déterminer sur le plan temporel et spatial comment la régulation transcriptionnelle d'H3.2 et H3.3 s'effectue, nous avons réalisé une expérience d'hybridation *in situ* sur embryons fixés à différents stades de développement, en utilisant des sondes spécifiques des différents transcrits (Figure 48B). Alors que nous présentons l'expression d'H3 total, et d'un gène individuel pour H3.2 et pour H3.3 dans le manuscrit, je souhaite ici mettre en avant le patron d'expression des 6 gènes étudiés. Ainsi, nous avons obtenu de faibles signaux pour H3.2a et H3.2b, indiquant un faible niveau d'expression d'un gène individuel par rapport à 80 gènes au total, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par qRT-PCR. Les quatre transcrits codant pour H3.3 sont tous présents maternellement et exprimés de façon ubiquitaire au cours du développement. Un enrichissement au niveau de l'ectoderme semble être observé (comparaison avec le marqueur endodermique Sox17), cependant cet enrichissement n'est pas spécifique d'un type de variant (H3.2 ou H3.3) et pourrait simplement refléter une différence de densité des noyaux entre les deux feuillets.

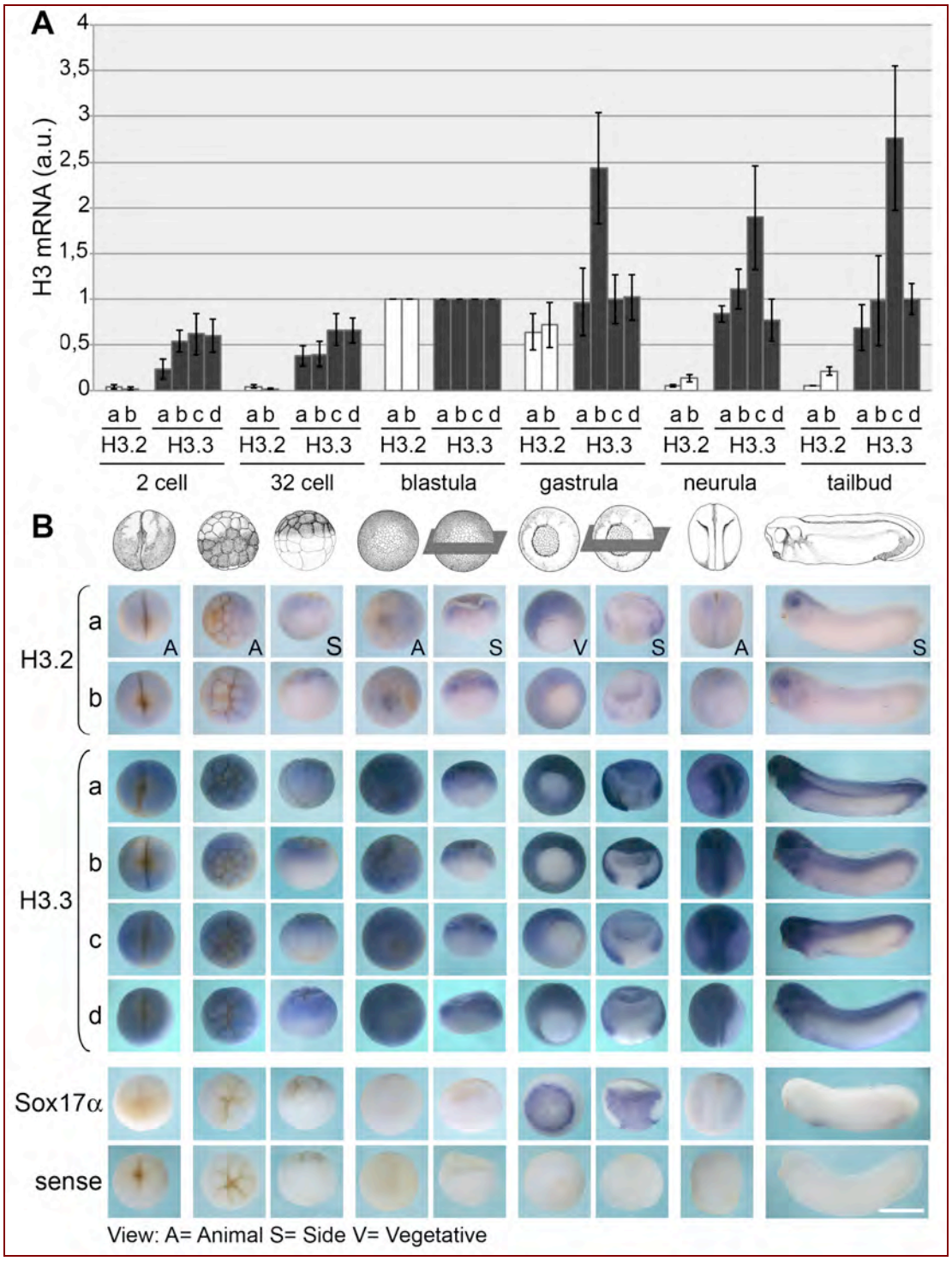


Figure 48 : Expression des ARNm H3.2 et H3.3 au cours du développement
(A) Niveaux d'expression des ARNm H3.2 et H3.3 au cours du développement. Analyse de l'expression des transcrits codés par 2 gènes H3.2 (a et b) et les 4 gènes H3.3 (a, b, c et d) par qRT-PCR à partir d'ARNm totaux extraits d'embryons à différents stades. Chaque barre représente l'expression de chaque transcrit normalisé grâce au gène de ménage ODC, en unité arbitraire (a.u.). Pour une meilleure comparaison, les valeurs du stade 9 ont été fixées à 1. (B) Patron d'expression des ARNm H3.2 et H3.3 au cours du développement. Hybridation *in situ* sur embryons entiers avec des sondes ARN anti-sens marquées au DIG-UTP montrant le patron d'expression des ARNm H3.2 a et b, et H3.3 a, b, c et d. La sonde Sox17α sert de référence pour le marquage de l'endoderme, et une sonde sens sert de contrôle négatif. Pour les stades 9 et 11, les embryons ont été bissectés avant la procédure d'hybridation. Echelle : 1mm, dessins des embryons adaptés de (Nieuwkoop and Faber, 1956).

Matériel et Méthodes

RT-qPCR

Les ARN totaux d'embryons à différents stades ont été isolés grâce au kit RNeasy Mini (Qiagen). A partir de ces ARNs, une transcription inverse (reverse transcriptase) a été réalisée avec des amorces oligonucléotidiques « au hasard » (random primers) afin de générer des molécules d'ADNc simple brin (Superscript II Reverse Transcriptase Kit - Invitrogen). Ainsi, une expérience de qRT-PCR fut réalisée à partir de cet ADN en utilisant le kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) et les amorces dessinées dans le 3'UTR de chaque gène grâce au logiciel primer express qui sont détaillées dans le tableau ci-dessous. La qRT-PCR fut réalisée sur la machine suivante : 7500HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Chaque expérience a été réalisée en triplicas techniques et biologiques, et les barres d'erreurs sont indiquées.

Gène	Amorce Forward	Amorce Reverse
H3.2a	CGGGCATCACTTAATGTGCTATT	GCCCTCCCGCCATGTAAT
H3.2b	AGCCCGTGAGATCCTTGTGT	TGCCGGTACCACAGCTGTT
H3.3a	CAGAAATTTGTATCTGCAGCTGTCTA	GGGCATGCACCAGGTTTTA
H3.3b	AGAGTGCTGATCTTGTGCAAATTT	CTGTAAGCCCCACATTTTTAGG
H3.3c	GGGCAATTTTCTTCCATTTTCA	TGACACGCCCTTGCACTTATAC
H3.3d	TCTTAATCGTGGACTGTTAGCATGA	TGGCCATACAGCTGGTGAAG
ODC	ACCCAGCCCTGGATAAATACTTC	TCCCAGGCTCTGCAATGATT

Hybridation in situ

Pour l'expérience d'hybridation *in situ*, se référer au matériel et méthodes de l'article. Chaque sonde a été dessinée pour s'hybrider à la partie 3'UTR des ARNm. En effet, les 3'UTR, contrairement aux corps des gènes, sont clairement divergents entre chaque gène, permettant l'obtention de sondes spécifiques.

b. Le signal d'induction mésodermique est-il affecté ?

Résultats et discussion

Nous avons vu que l'injection du morpholino H3.3 dans des embryons de Xénope conduit à des défauts de gastrulation, et en particulier des défauts d'expression du marqueur mésodermique Xbra. Afin d'étudier la perturbation éventuelle du signal d'induction mésodermique provenant des cellules endodermiques (voir introduction) lui-même, j'ai réalisé deux types d'expériences.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'état d'activation des différentes voies de signalisation par Western Blot, à l'aide d'anticorps reconnaissant les formes activées des différents facteurs de transcription de façon spécifique. Brièvement, (1) Smad1 est un facteur de transcription activé par phosphorylation via la voie BMP (récepteurs de type I) (Graff et al., 1996), (2) Smad2 est un facteur de transcription activé par double phosphorylation en réponse à la signalisation via les récepteurs de type I des TGF-β (Graff et al., 1996) et (3) les protéines Extracellular signal Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1/2) sont quant à elles phosphorylées en réponse à l'activation de la voie FGF (Umbhauer et al., 1995). L'utilisation de deux drogues spécifiques m'a permis d'avoir des contrôles négatifs : SB431542 est un inhibiteur des récepteurs TGFβ de type ALK4, 5 et 7 (Inman et al., 2002), et SU5402 est un inhibiteur spécifique des récepteurs FGFR1 (Mohammadi, 1997). Alors que l'utilisation de ces drogues conduit bien à un défaut de phosphorylation de Smad2 ou ERK1/2, respectivement, l'injection du morpholino H3.3 n'induit pas de défaut d'activation de ces différentes voies au stade de gastrula précoce (stade 9.5-10) (Figure 49). Ces résultats sont cohérents avec les résultats de qRT-PCR (voir manuscrit Figures 3B et S4A) qui montrent l'absence de perturbation de l'expression des gènes d'induction mésodermiques tels que Xnr2 et Derrière.

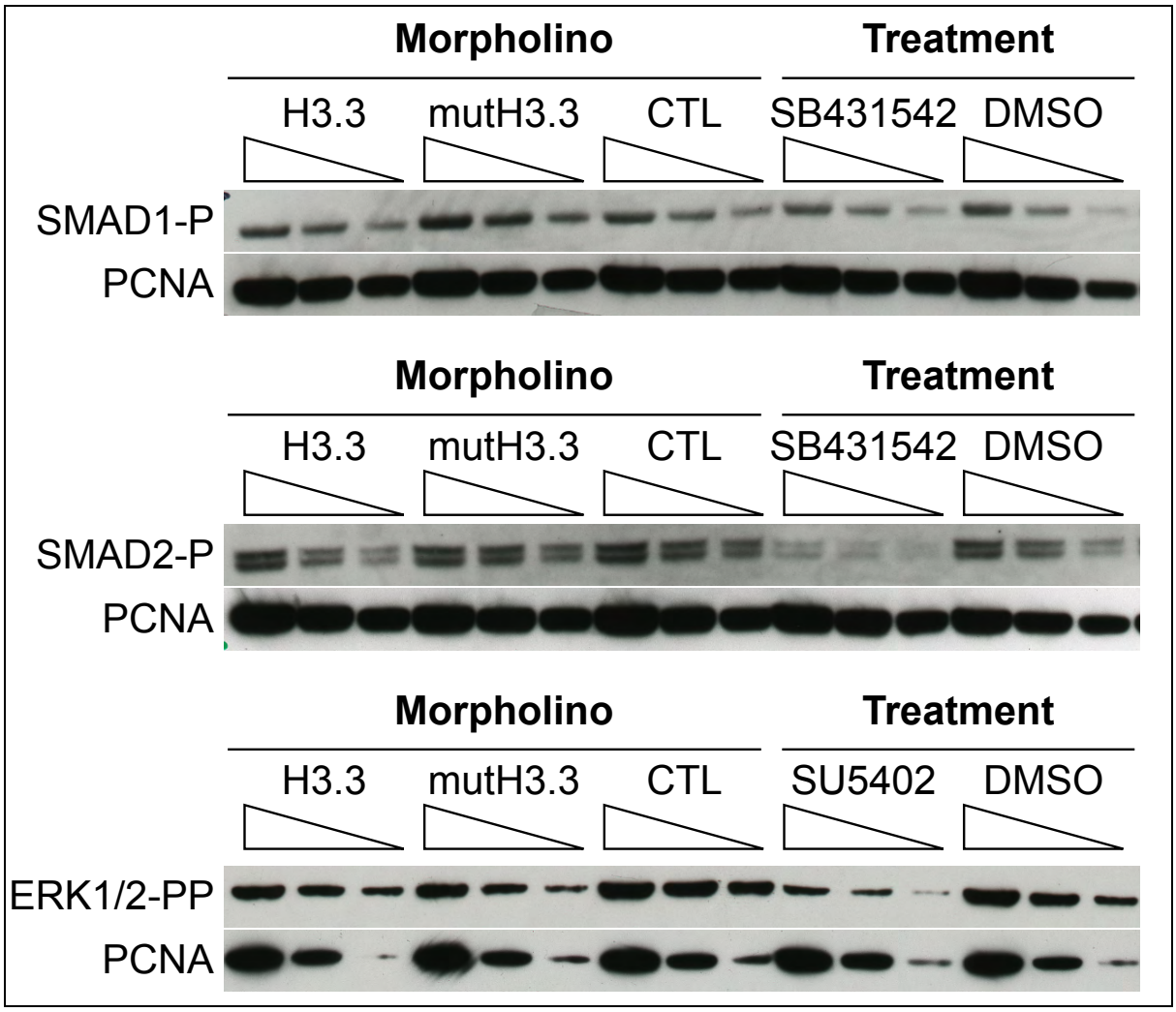


Figure 49 : Analyse des formes activées de Smad1, Smad2 et ERK1/2
Les embryons ont été injectés au stade 1 cellule avec 18,4ng de morpholino CTL, H3.3 ou mutH3.3 ; ou traités dès le stade 1 cellule avec 100μM de SB431542 (inhibiteur des récepteurs TGFβ ALK4, 5 et 7), 50μM de SU5402 (inhibiteur des récepteurs FGFR1) ou DMSO (contrôle négatif). Après extraction des protéines totales des embryons au stade 9,5-10, l'équivalent de 1 – 0,5 – 0,25 embryons (triangle) ont été utilisés pour réaliser un western blot avec les différents anticorps indiqués. PCNA sert de contrôle de charge.

Dans un deuxième temps et dans la même optique, j'ai utilisé un test plus direct pour vérifier la capacité des cellules végétatives d'embryons injectés avec le morpholino H3.3, à être en mesure de produire un signal d'induction mésodermique. Ainsi, j'ai réalisé des conjugaisons de calottes animales / cellules végétatives comme dans l'expérience de Nieuwkoop (Figure 17B, introduction) (voir protocole (Sive et al., 2010)). Dans de telles conditions, une calotte animale de type sauvage subit des mouvements de convergence et d'extension suite à l'induction mésodermique provenant des cellules végétatives. Alors que les calottes animales seules ne s'allongent pas (Figure 50A), les calottes animales injectées avec le MO H3.3 en contact avec des cellules végétatives sauvages subissent des mouvements de convergence et d'extension (Figure 50B). Ces données sont en cohérence avec le test de la calotte animal réalisé avec un inducteur externe (l'Activine), qui démontra la compétence des calottes animales ayant un défaut en H3.3 à répondre correctement au signal d'induction (Figure 4A du manuscrit). De plus, l'utilisation de cellules végétatives déficientes pour H3.3 permet une induction mésodermique normale de calottes animales sauvages (Figure 50C). Ces résultats permettent de conclure que H3.3 n'est pas nécessaire pour la formation du signal d'induction mésodermique directement. Ceci est donc également en accord avec les résultats présentés ci-dessus quant à l'activation normale des différentes voies de signalisation responsables de l'induction mésodermique.

Ainsi, H3.3 ne semble ni requis pour la production du signal d'induction mésodermique ni pour la réponse au signal *in vitro*. Ces données ne sont pas contradictoires avec les résultats *in vivo*, les embryons injectés avec le MO H3.3 présentent en effet une gastrulation ralentie mais dont les défauts majeurs ne se produisent qu'à la fin du processus, au moment de la fermeture du blastopore.

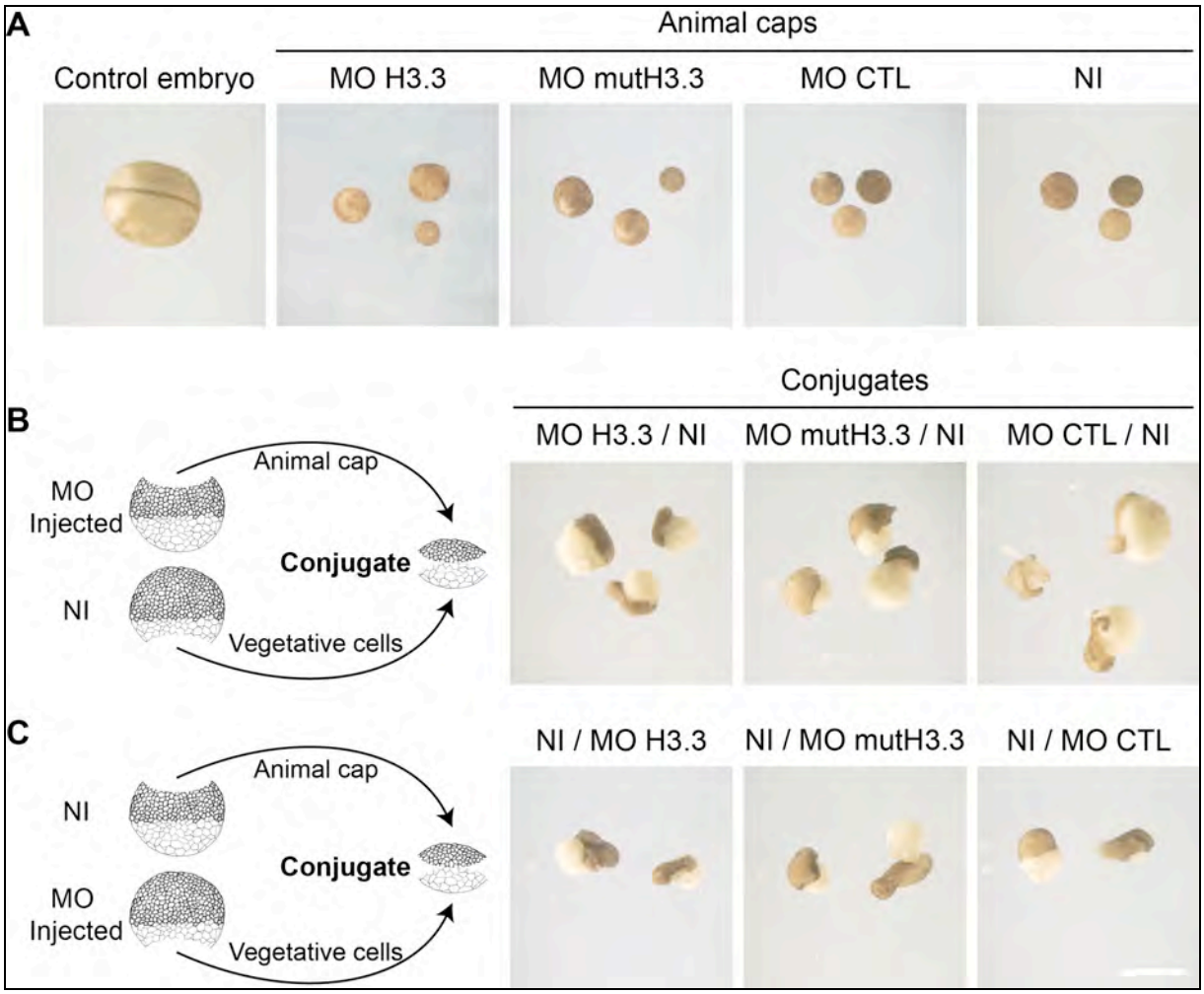


Figure 50 : Expérience de conjugaisons calotte animale / cellules végétatives
Des embryons au stade 2 cellules ont été injectés avec 3,5ng dans chaque cellule (7ng total) de morpholino (MO) CTL, H3.3 ou mutH3.3. Les embryons sont disséqués au stade 8 puis observés au stade neurula (control embryo). (A) Les calottes animales seules (animal caps) servent de contrôle (pas d'élongation) ; tandis que l'association d'un pôle animal avec des cellules végétatives (conjugates) conduit à l'élongation de la calotte animale (induction mésodermique par les cellules végétatives). Différentes conditions ont été utilisées pour tester (B) la compétence des calottes animales injectées et (C) la capacité d'induction des cellules végétatives des embryons injectés. NI : non injectés.

Matériel et Méthodes

Analyse de l'état de phosphorylation des SMAD1, SMAD2 et ERK1/2

Les embryons sont injectés au stade 1 avec 18,4ng de MO CTL, H3.3 ou mutH3.3 ; ou traités avec 100μM de SB431542 (SIGMA #4317, inhibiteur des récepteurs TGFβ ALK4, 5 et 7 (Inman et al., 2002)), 50μM de SU5402 (Merck #572630, inhibiteur des récepteurs FGFR1 (Mohammadi, 1997)) ou DMSO (contrôle négatif). Au stade 10, les embryons sont repris dans 10μL/embryon de tampon d'homogénéisation (voir (Birsoy, 2005)). Après une centrifugation à 13.000g de 10min, le surnageant est récupéré. L'équivalent de 1 – 0,5 – 0,25 embryons est chargé dans des gels 4-12% NuPage (Invitrogen). Les gels sont transférés sur des membranes PROTAN, incubées après blocage avec les anticorps suivants : Anti-Phospho-Smad1 (ser206) (Cell signaling #9553S), Anti-Phospho-Smad2 (ser465/467) (Cell signaling #3101S), Anti-DiPhospho-ERK1/2 (Sigma M9692) et Anti-PCNA (DAKO #M879). Les anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin conjugués à la HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) ont été utilisés puis le signal est révélé avec le kit SuperSignal (ThermoScientific #34087).

Expérience de conjugaisons (Nieuwkoop assay)

Des embryons au stade 2 cellules sont injectés avec 3,5ng dans chaque cellule (7ng total) de morpholino (MO) CTL, H3.3 ou mutH3.3. Les embryons sont disséqués au stade 8 puis l'induction potentielle est observée au stade neurula des embryons contrôles. Des calottes animales seules forment une boule d'ectoderme tandis que l'association (conjugaison) des calottes animales avec des cellules végétatives conduit à l'induction mésodermique de la calotte animale (élongation) par les cellules végétatives (Expérience de Nieuwkoop, voir Introduction Figure 17A). Protocole adapté selon (Sive et al., 2010).

c. D'autres chaperons de l'histone H3.3 sont-ils importants pour le développement embryonnaire ?

Résultats et discussion

Afin de déterminer si l'effet d'interférence avec H3.3 peut être assigné à son incorporation par une voie d'assemblage spécifique, nous avons testé d'autres facteurs que HIRA tels que le facteur de remodelage de la chromatine CHD1 proposé comme ayant un rôle dans l'incorporation d'H3.3 dans le pronoyau mâle chez la drosophile après fécondation (Konev et al., 2007). De façon intéressante, CHD1, tout comme HIRA ou H3.3, est exprimé maternellement et de façon ubiquitaire tout au long du développement embryonnaire (Figure 51A). Nous avons utilisé un morpholino spécifique de CHD1 dont l'efficacité a été testée *in vitro* grâce à la co-injection dans des ovocytes de ce morpholino avec un ARNm étiquetté par l'haemaglutinine (HA) (Figure 51B). Au cours du développement embryonnaire, il est remarquable de noter que la déplétion de CHD1 conduit à des défauts similaires à ceux observés avec les MO H3.3 ou HIRA (Figure 51C). Ces résultats permettent d'emettre l'hypothèse que CHD1 puisse agir en concertation avec HIRA pour la déposition d'H3.3 au moment de la fécondation (Konev et al., 2007) tout comme au cours du développement embryonnaire. Malheureusement, bien qu'ayant passé du temps au cours de ma thèse pour développer des outils pour l'étude de CHD1 chez le Xénope, notamment des anticorps, ces efforts ne se sont pas avérés productifs. Ainsi, des contrôles seraient nécessaires pour démontrer la spécificité du morpholino CHD1 *in vivo* afin de consolider ces résultats prometteurs.

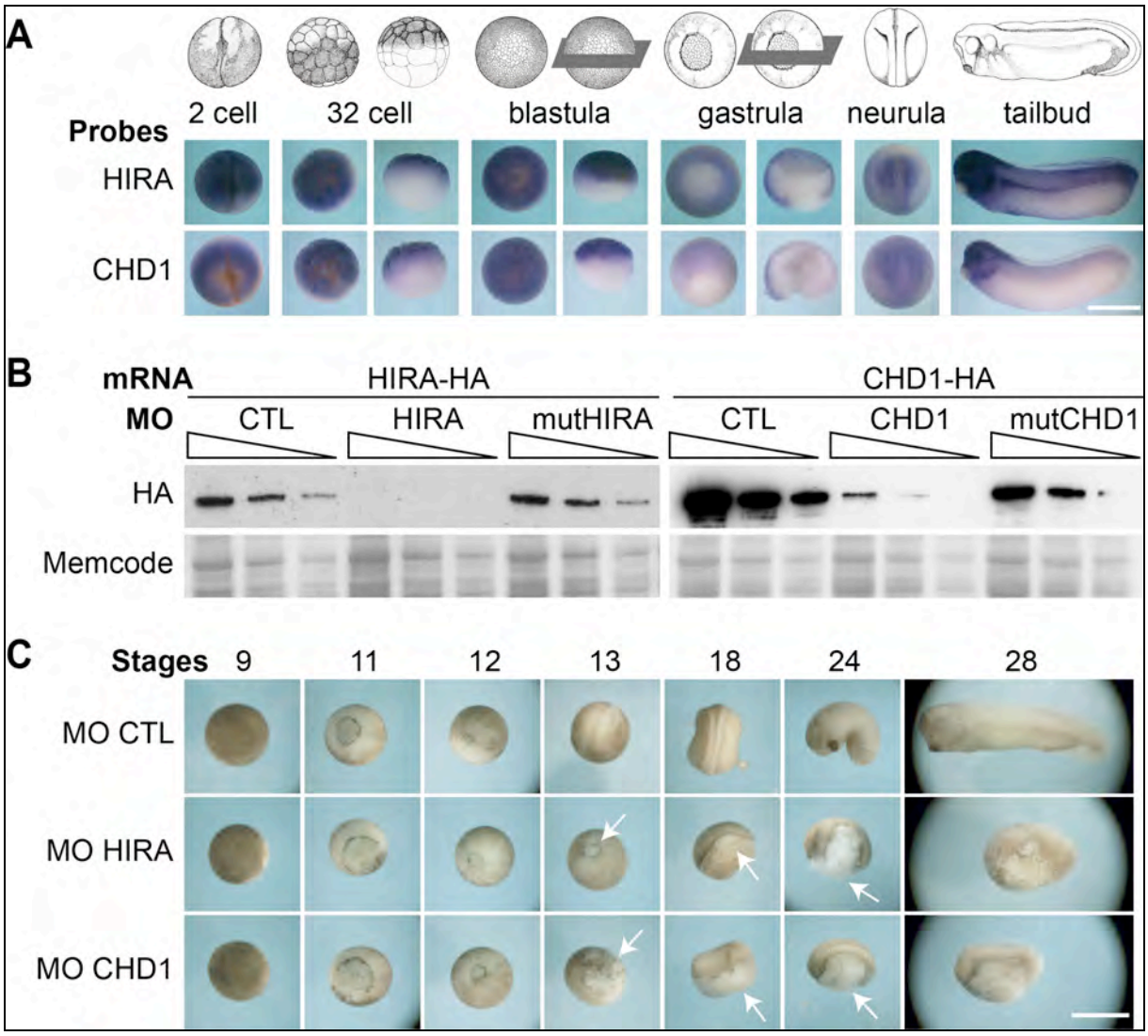


Figure 51 : Étude du facteur CHD1 au cours du développement
(A) Patron d'expression par hybridation *in situ* de CHD1 au cours du développement en comparaison à celui de HIRA (publié). Barre d'échelle : 1mm, dessins des embryons à partir de (Nieuwkoop and Faber, 1956) (B) Test de l'efficacité des morpholinos HIRA et CHD1. Des ovocytes ont été co-injectés avec 46ng de MO CTL, HIRA ou mutHIRA et 5ng d'ARNm HIRA-HA. La même procédure a été utilisée pour CHD1. L'efficacité des morpholinos a été vérifiée après 16h d'incubation par extraction des protéines suivie d'un western blot anti-HA. Le memcode sert de contrôle de charge. (C) Phénotype résultant de l'injection du MO CHD1 en comparaison à celui de HIRA (publié). Les embryons sont injectés dans 1 cellule au stade 2 cellules avec 46ng de chaque MO indiqué. Des photos prises à différents stades permettent de suivre le développement. Les flèches blanches indiquent les défauts de gastrulation des embryons injectés avec les MO HIRA et CHD1. Barre d'erreur : 1mm.

Nous nous sommes également intéressés aux facteurs impliqués dans l'incorporation d'H3.3 au niveau des télomères et régions d'hétérochromatine péricentrique chez la souris, DAXX et ATRX. En ciblant spécifiquement la traduction de ces deux transcrits, nous n'observons aucun phénotype (Figure 52). Bien que des contrôles devront être réalisés pour vérifier l'efficacité des morpholinos *in vivo*, nous pouvons émettre l'hypothèse que les défauts observés en absence d'H3.3 sont spécifiquement liés à sa voie d'assemblage via HIRA et non DAXX/ATRX.

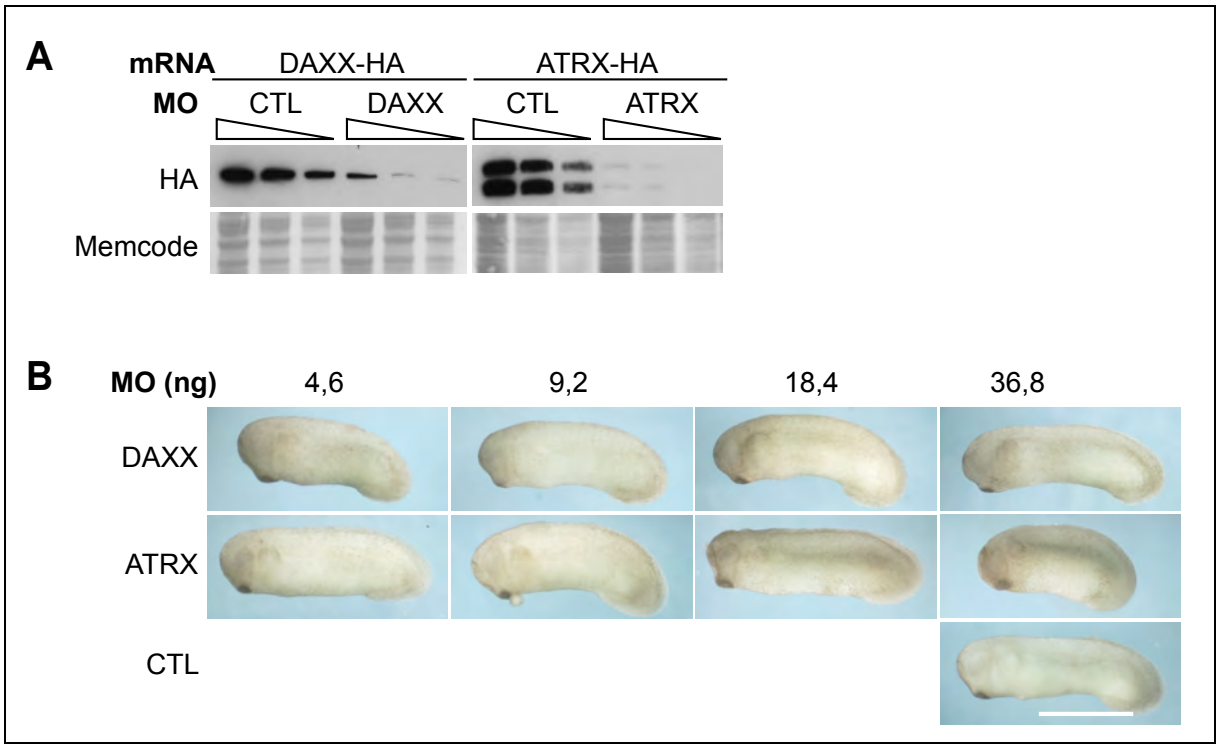


Figure 52 : Étude des facteurs DAXX et ATRX au cours du développement
(A) Test de l'efficacité des morpholinos DAXX et ATRX. Des ovocytes ont été co-injectés avec 46ng de MO CTL ou DAXX et 5ng d'ARNm DAXX-HA. La même procédure a été utilisée pour ATRX. L'efficacité des morpholinos a été vérifiée après 16h d'incubation par extraction des protéines suivie d'un western blot anti-HA. Le memcode sert de contrôle de charge. (B) Phénotype résultant de l'injection du MO DAXX ou ATRX. Les embryons ont été injectés dans 1 cellule au stade 2 cellules avec des quantités croissantes de chaque MO. Les photos ont été prises au stade 28. Barre d'erreur : 1mm.

Matériel et Méthodes

Test de l'efficacité des morpholinos dans des ovocytes

Les séquences xHIRA-HA (BC078007), xCHD1aa1-465-HA (BC094093), xATRX-HA (BC094402) and xDAXX-HA (BC079997) ont été clonées dans les vecteurs pCR2.1-TOPO ou pCR4-TOPO pour permettre la production d'ARNm avec le kit mMessage mMachine T7 (Ambion) suivi du kit Poly(A) tailing (Ambion).

Des ovocytes de stade 6 ont été utilisés pour leur compétence de traduction des ARNm *ex vivo* (Gurdon et al., 1971). Ainsi, pour chaque condition, 5ng d'ARNm ont été co-injectés avec 46ng du morpholino correspondant ou le morpholino CTL. Après 16h d'incubation à 18°C, les ovocytes sont lavés puis homogénéisés dans 8µl par ovocyte du tampon suivant : [Hepes pH=7,5 10mM, KCl 70mM, sucrose 5%, DTT 1mM, inhibiteurs de protéases Complete EDTA-free (Roche)1X]. Après centrifugation à 25.000g pendant 30min à 4°C, le surnageant est récupéré. L'équivalent de 1 – 0.5 – 0.25 ovocytes de chaque condition est ensuite chargé sur gels 4-12% NuPage (Invitrogen), puis transférés sur membranes Protran 0,22µm. L'utilisation d'anticorps anti-HA (Roche Diagnostics Clone 3F10) permet la détection des différentes protéines étiquettées.

Nom (NCBI #)	**Séquence du morpholino**
CHD1 (BC094093/4)	TGT CTT CAT CGC TGT GTC CAT T**CA T**
mutCHD1	TGa gTT gAT CcC TGT cTg CAT TCA T
DAXX (BC112947)	TAA TAT CAT CAT CCA CAA GAG C**CA T**
ATRX (BC094402)	TCA TGG GCT CCG CTG T**CA T**CG CTC T

d. H3.3 est-il requis directement au niveau du gène Xbra ?

Résultats et discussion

Nous avons précédemment déterminé l'importance d'H3.3 pour l'expression du marqueur mésodermique Xbra au cours du développement embryonnaire du Xénope. Un grand nombre d'études permettent d'établir un lien entre H3.3 et la transcription (Szenker et al., 2011) et il nous a semblé important de déterminer si H3.3 est directement requis au niveau du promoteur ou du gène Xbra pour maintenir son expression suite à l'induction mésodermique. Pour ce faire, nous avons choisi la méthode d'immunoprécipitaiton de la chromatine (ChIP) pour vérifier la présence d'H3.3 au niveau de régions chromosomiques précises tout au long du développement embryonnaire. Je souhaite présenter ici des résultats prometteurs mais très préliminaires. L'utilisation d'un anticorps spécifique d'H3.3 en comparaison à un contrôle négatif d'IgG de souris, semble montrer un enrichissement d'H3.3 au niveau 5' de la région codante de Xbra aux stades 10 et 11 (Figure 53), au moment même où son expression est activée. Cependant, des contrôles seront nécessaires pour confirmer ce résultat. Notamment il serait intéressant de comparer l'enrichissement de H3.3 par rapport à H3.2. Malheureusement, je n'ai jusqu'à présent pas réussi à faire fonctionner le ChIP suivant ce protocole avec un anticorps H3. De plus, la chromatine des embryons précoces (stade 9) semble contenir une quantité élevée d'H3.3 (Figure 53) ce qui peut perturber l'interprétation. Ainsi, de futures expériences pourraient permettre d'améliorer les conditions du ChIP et ainsi identifier un éventuel lien direct entre H3.3 et le gène Xbra. Aussi, une étude à grande échelle de ChIP on Chip en parallèle d'une analyse du transcriptome (microarray) pourrait permettre d'étendre notre compréhension sur l'importance de l'incorporation d'H3.3 au cours du développement embryonnaire du Xénope.

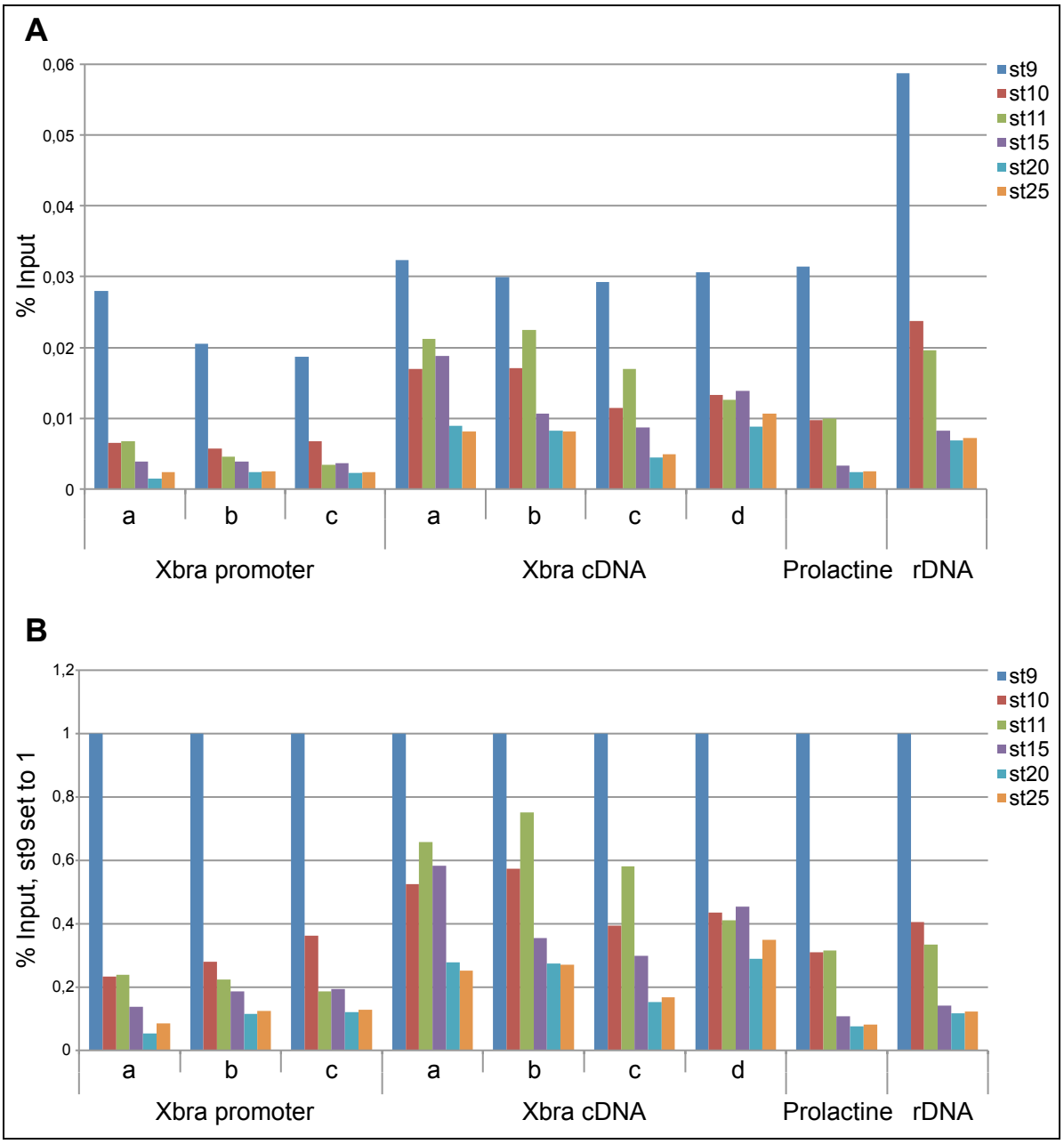


Figure 53 : Immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps H3.3
Représentations de l'enrichissement d'H3.3 à différentes régions du promoteur de Xbra (a, b et c du 5' au 3') et de sa région codante (a, b, c et d du 5' au 3'), ainsi que de la région codante de la prolactine (contrôle négatif) et du rDNA (contrôle positif), à différents stades de développement (couleurs). (A) Représentation de l'enrichissement d'H3.3 par rapport à l'IgG souris en pourcentage de l'input. (B) Mêmes données représentées par rapport aux stades 9 fixés à 1 de façon arbitraire.

Matériel et Méthodes

Immunoprécipitation de la chromatine

J'ai réalisé l'immunoprécipitation de la chromatine à partir d'extraits de chromatine d'embryons en adaptant le protocole (Blythe et al., 2009). Brièvement, des extraits de chromatine digérée à la MNase (voir protocole dans le l'article) ont été réalisés à partir d'embryons à différents stades. Une quantité d'extrait équivalente de 33 embryons, dont la concentration en sel a été préalablement ajustée à 500mM NaCl et en NP40 à 0.5% final, puis incubée avec 2.5 μg d'anticorps anti-H3.3 (Abnova H00003021-M01) ou d'IgG souris (contrôle négatif) sur une roue à 4°C toute la nuit. Ensuite, 50μl de billes Dynabeads Protein G (Life Technologies, 100.04D) préalablement bloquées avec 5% de BSA pendant au minimum 1h à 4°C, ont été rajoutées à l'extrait et incubées pendant 1h à 4°C. Après trois lavages des billes dans le tampon IP suivant [Tris pH7.5 20mM, NaCl 500mM, NP40 0.5%, glycerol 10%, Complete EDTA-free 1X], la fraction liée aux billes a été éluée par l'ajout de 200μl de tampon TES [Tris pH7.5 50mM, EDTA 10mM, SDS 1%] et incubation à 65°C pendant 10min avec agitation. Le surnageant est récupéré et l'ADN (ChIP) purifié après traitement à la proteinase K (Roche Diagnostics #03115879001, 15mg/ml final). L'ADN input a également été purifié à partir d'une quantité de chromatine équivalente à 3,3 embryons (10%). Les ADN input et ChIP ont alors été analysés par qPCR avec les amorces indiquées ci-dessous. La prolactine n'est pas exprimée pendant le développement embryonnaire et est donc utilisée comme contrôle négatif, tandis que le rDNA est un locus connu pour être enrichi en H3.3 (contrôle positif). L'enrichissement d'H3.3 à chaque locus est évalué en relatif au contrôle négatif IgG souris et en pourcentage par rapport à l'input.

Nom	Amorce Forward	Amorce Reverse
Prom Xbra a	GCTGCAGCAATGTATTATCACCTT	GGTTTGTTTCACCCAATATGCACTATAG
Prom Xbra b	ATACATCTGCCATTATACCATTATGTCAT	CACCTGGTCACTTTATCATTCTATATTTTAG
Prom Xbra c	CCGATTAGTGGAAAAGCTGCTAA	CCAGAAAGGGAGGCTTCGTA
cDNA xbra a	CGAGAGCTGCGCCAAGA	CCACAGCGCTGAGAAGATGA
cDNA xbra b	GTGGCAGCCGACAACCA	GCCACCTGGAACCCATTCT
cDNA xbra c	TGGCACCCAGAGAATGATCA	CGGTCACTGCTATGAACTGTGTCT
cDNA xbra d	TTGGAAGCAGCTTTTGTCTGAA	TTAGCTGGGAGAAGTTTGTGGTT
Prolactine	AGCCCAGTCAGCAGATGAAAA	AAGGCAGTGCAGGAGGTTGT
rDNA	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG	CATTCTTGGCAAATGCTTTCG

Références : Séquence du promoteur d'Xbra d'après (Lerchner et al., 2000) et (Latinkić et al., 1997), ADNc Xbra NCBI #NM_001090578, prolactine NCBI #NM_001093017, locus ADNr : NCBI #x02995

4. Rôle d'H3.3 dans la reprogrammation transcriptionnelle après transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope

L'incorporation d'H3.3 via son chaperon HIRA est nécessaire pour la reprogrammation transcriptionnelle après transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope

HIRA-dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes

Jullien J*, Astrand C*, Szenker E, Garrett N, Almouzni G and Gurdon JB.

* contribution équivalente

En révision à Epigenetics & Chromatin

Introduction – La reprogrammation transcriptionnelle par transfert nucléaire

Le succès du clonage animal par transfert nucléaire (NT) dans un œuf énucléé, établi chez le Xénope par John Gurdon (Gurdon, 1962), montre que le noyau d'une cellule somatique adulte différenciée peut retourner à un état de type embryonnaire, lui permettant de repasser par les étapes de développement qui conduisent à la formation d'un animal normal. L'obtention de ces animaux illustre la plasticité extraordinaire du noyau et l'influence de son environnement cytoplasmique sur le profil d'expression des gènes. Ainsi, les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette reprogrammation transcriptionnelle font l'objet de nombreuses études, notamment pour comprendre les modifications des marques épigénétiques et les remaniements de structure chromatinienne impliqués dans cette étape (Gurdon, 1976; Pasque et al., 2011c). L'œuf et l'ovocyte de Xénope représentent un système idéal pour étudier ce processus *in vivo*. Alors que le transfert nucléaire dans des œufs de Xénope permet notamment l'étude des mécanismes induisant l'activation de la réplication des noyaux transférés (Graham et al., 1966), le transfert nucléaire dans des ovocytes arrêtés en prophase I de méiose facilite l'étude de la reprogrammation au niveau transcriptionnel. En effet, l'injection de noyaux différenciés dans le noyau d'un ovocyte (vésicule germinative d'environ 400μm de diamètre), conduit à la réactivation des gènes de pluripotence (De Robertis and Gurdon, 1977). Ce système de transplantation nucléaire dans les vésicules germinatives d'ovocytes de Xénope (Halley-Stott et al., 2010) paraît donc idéal pour étudier les mécanismes sous-jacents au remaniement de la structure chromatinienne conduisant à la réactivation de gènes type embryonnaire. Notamment, le laboratoire de John Gurdon a mis en évidence l'importance de l'incorporation de l'histone de liaison ovocytaire (B4 ou H1.0 chez les mammifères, voir introduction) dans la chromatine des noyaux

somatiques pour la réactivation correcte des gènes de pluripotence (Jullien and Gurdon, 2010; Jullien et al., 2010). Ces données suggèrent que la liaison de l'histone B4 dans la chromatine est un événement crucial pour la reprogrammation des noyaux somatiques transplantés dans les ovocytes. Ceci pourrait s'expliquer par une chromatine plus permissive, plus « ouverte », comme retrouvée dans les cellules souches embryonnaires mammifères (pour revue voir (Meshorer and Misteli, 2006)). A l'opposé, le variant d'histone macroH2A inhibe la reprogrammation transcriptionnelle (Pasque et al., 2011a). L'ensemble de ces données nous a donc incité à étudier l'éventuelle importance du variant d'histone H3.3 dans ce processus, sachant que H3.3 est généralement associé avec l'euchromatine (Ahmad and Henikoff, 2002b). De plus, dans un système de transfert nucléaire dans des œufs de Xénope, H3.3 participe au maintien de l'état actif d'un gène de façon épigénétique (Ng and Gurdon, 2008; Lacoste and Almouzni, 2008).

Résultats principaux (voir manuscrit en annexe)

Afin d'étudier l'importance des variants non centromériques de l'histone H3, notamment H3.2 et H3.3, dans le processus de reprogrammation transcriptionnelle par le cytoplasme ovocytaire après transfert nucléaire (NT), une première étape importante était de connaître la proportion de ces deux types de variants dans les ovocytes. J'ai donc réalisé une expérience d'extraction de vésicules germinatives (GV), contenant le stock protéique majeur en histones des ovocytes (Adamson and Woodland, 1974; 1977). L'analyse des extraits de GV sur gel Triton Acetic acid Urea (TAU) permettant la séparation des variants d'histones (Zweidler, 1978) m'a permis de mettre en évidence que les ovocytes présentent un stock deux fois plus important en histone H3.3 par rapport à H3.2. La situation s'équilibre dans les œufs et s'inverse dans les embryons tardifs jusqu'à un ratio équivalent à ce qui est retrouvé dans les cellules somatiques (Figure 54, Figure1A du manuscrit). Ces résultats mettent en avant l'importance d'H3.3 dans les ovocytes, des cellules différenciées non cyclantes, et suggèrent qu'un grand nombre de molécules d'ARNm codant pour H3.2 est traduit au moment de la maturation ovocytaire.

Afin d'étudier l'incorporation éventuelle des différents variants d'histones d'origine ovocytaire dans la chromatine des noyaux transférés, des versions étiquetées GFP de H3.2 et H3.3 ont été injectées dans les ovocytes avant la procédure de transfert nucléaire. L'étude par western blot des extraits totaux de tels ovocytes m'a permis de montrer que l'injection de 2ng ou 3ng d'ARNm permet d'obtenir des protéines étiquetées d'une quantité comparable aux protéines endogènes pour H3.3 (Figure 55, Figure S1 du manuscrit). La même quantité d'ARNm codant pour H3.2 est injectée et devrait donc représenter une plus grande proportion des protéines H3.2 totales d'après le résultat du gel TAU (Figure 54).

Ces contrôles importants ont permis l'étude de l'incorporation de ces variants d'histones d'origine ovocytaire dans la chromatine de noyaux de cellules ES transférés dans les vésicules germinatives. Une telle expérience a permis de mettre en évidence qu'une fraction significative des histones H3 (H3.2 et H3.3) de la chromatine des noyaux transplantés est fortement remplacée par le variant H3.3 d'origine ovocytaire, en comparaison à H3.2 (voir Figure 1 du manuscrit en annexe). Cette incorporation massive d'H3.3 suite au transfert nucléaire pourrait contribuer au changement du paysage chromatinien permettant la reprogrammation transcriptionnelle.

Pour étudier la reprogrammation transcriptionnelle, une lignée de cellules ES contenant environ 20 copies de la région régulatrice du gène Oct4 fusionnée à un gène rapporteur a été établie (ESC#5). De façon importante, l'inactivation du gène Oct4, et la différenciation de ces cellules, peut être induite par traitement à l'acide rétinoïque (RA-ESC#5). Le transfert nucléaire de telles cellules différenciées est notamment suivi par la réactivation d'un gène rapporteur sous l'influence des régions régulatrices du gène Oct4. L'injection d'ARNm H3.2 ou H3.3 étiquetés HA dans le cytoplasme ovocytaire avant transfert nucléaire (voir également Figure 55) a permis de mettre en évidence par des expériences de ChIP que cette réactivation corrèle avec un enrichissement d'H3.3 par rapport à H3.2 dans cette région. De plus, l'incorporation d'H3.3 semble être un événement très précoce après transfert nucléaire, permettant d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'incorporation d'H3.3 permettrait la réactivation transcriptionnelle (Figure 2 du manuscrit).

Enfin, il était important de déterminer si cette incorporation d'H3.3 était liée à la voie d'assemblage dépendant du chaperon d'histone HIRA. Pour cette étude, l'anticorps dirigé contre xHIRA établi dans notre laboratoire, a pu être utilisé pour immunodépléter HIRA (Ray-Gallet et al., 2002). En effet, ceci a été démontré dans des extraits d'œufs de Xénope mais il était important de vérifier l'effet de cet anticorps lors de l'injection dans des ovocytes. J'ai donc réalisé un test d'assemblage de la chromatine (Roche et al., 2006) grâce à la co-injection d'ADN plasmidique et de sérum contrôle ou anti-xHIRA. J'ai ainsi pu montrer que l'injection d'un sérum anti-HIRA conduit à des défauts d'assemblage du plasmide en chromatine de façon indépendante de la synthèse d'ADN (Figure 56, Figure S4 du manuscrit). Ces données permettent de confirmer l'approche de déplétion de HIRA par injection de sérum anti-HIRA dans les ovocytes.

Ainsi, l'étude de transfert nucléaire dans de tels ovocytes a permis de mettre en évidence que la déplétion de HIRA interfère avec l'incorporation d'H3.3. Ainsi, l'incorporation d'H3.3 suite au transfert nucléaire est dépendante de son chaperon HIRA. De façon remarquable, la déplétion de HIRA semble permettre une incorporation alternative de H3.2 (Figure 3 du manuscrit). Connaître le mécanisme permettant cette incorporation alternative

d'H3.2 dans un système dépourvu de réplication, potentiellement via un mécanisme lié à la réparation de l'ADN, est une question qui devra être adressée dans le futur.

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence l'importance de la voie d'assemblage de H3.3 de façon dépendante de HIRA pour la reprogrammation transcriptionnelle de noyaux différenciés après transfert dans des ovocytes.

Ma contribution

En plus des expériences présentées ci-dessous qui constituent des contrôles importants pour cette étude, j'ai eu un regard critique sur toutes les figures et ai activement participé à la relecture du manuscrit.

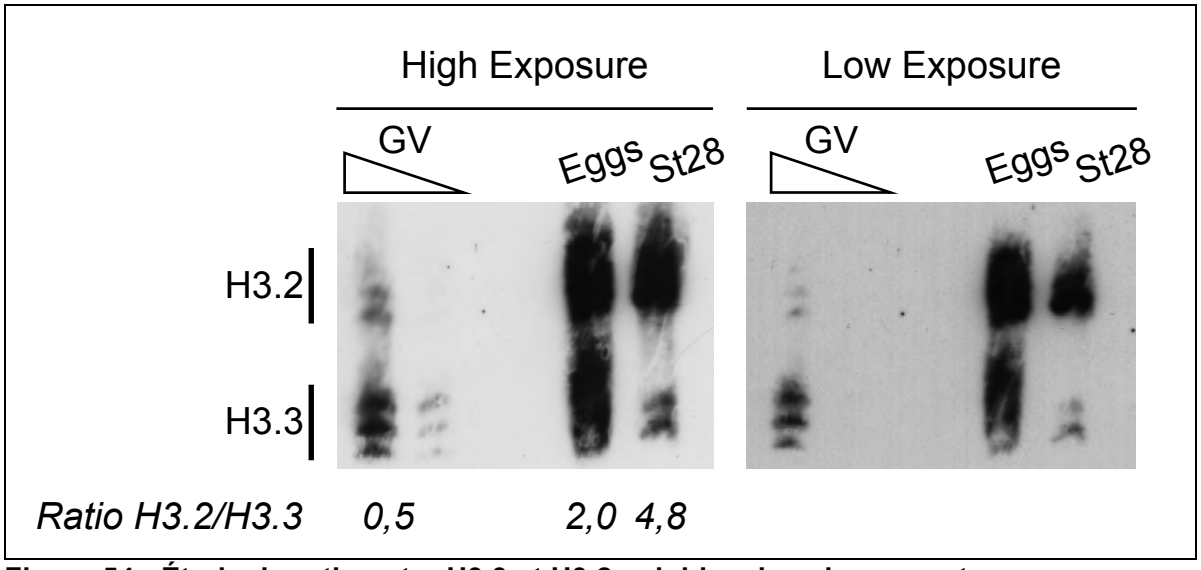


Figure 54 : Étude du ratio entre H3.3 et H3.2 solubles dans les ovocytes
Stock soluble des variants H3.2 et H3.3 dans des GV d'ovocytes, œufs et embryons au stade 28. J'ai analysé les extraits de protéines solubles par électrophorèse d'un gel Triton Acetic Acid Urea (TAU). Ceci a permis de révéler les histones H3.2 et H3.3 avec un anticorps anti-H3 total (voir matériel et méthodes du papier dans Cell Reports). J'ai chargé l'équivalent de 20 et 10 GVs (triangle) et l'équivalent de 2 œufs et 2 embryons au stade 28. La quantification a été réalisée grâce au logiciel QuantityOne.

Matériel et Méthodes

Les vésicules germinatives ont été isolées et l'extrait protéique soluble de celles-ci a été réalisé selon le protocole établi dans le papier suivant (Birkenmeier et al., 1978). Pour les autres types d'extraits (œufs et embryon stade 28) ainsi que l'électrophorèse du gel TAU, se référer au matériel et méthodes du manuscrit publié dans Cell Reports.

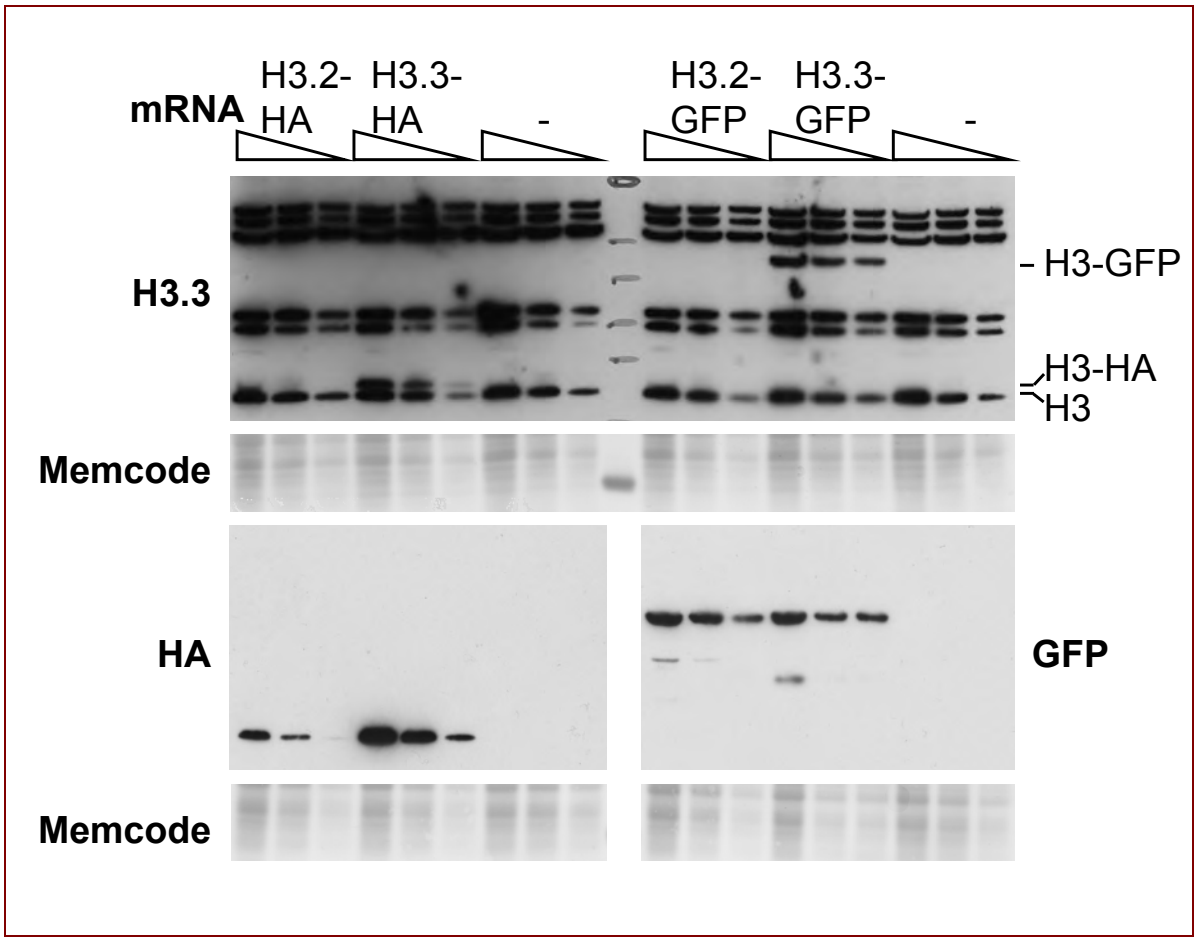


Figure 55 : Niveau d'expression des protéines H3.2 et H3.3 étiquetées HA ou GFP après injection dans des ovocytes

2ng d'ARNm H3.2-HA ou H3.3-HA, ou 3ng d'ARNm codant H3.2-GFP ou H3.3-GFP ont été dans le cytoplasme d'ovocytes de Xénope. 48h après, des extraits totaux ont été réalisés et soumis à une analyse par Western Blot. L'équivalent de 1 – 0,5 – 0,25 ovocyte pour chaque condition a été chargé sur différents gels transférés sur différentes membranes qui ont par la suite été incubées avec un anticorps anti-H3.3, anti-HA ou anti-GFP. Le memcode sert de contrôle de charge.

Matériel et Méthodes

Pour l'étude d'ARNm injectés dans des ovocytes, se référer au matériel et méthodes page 148.

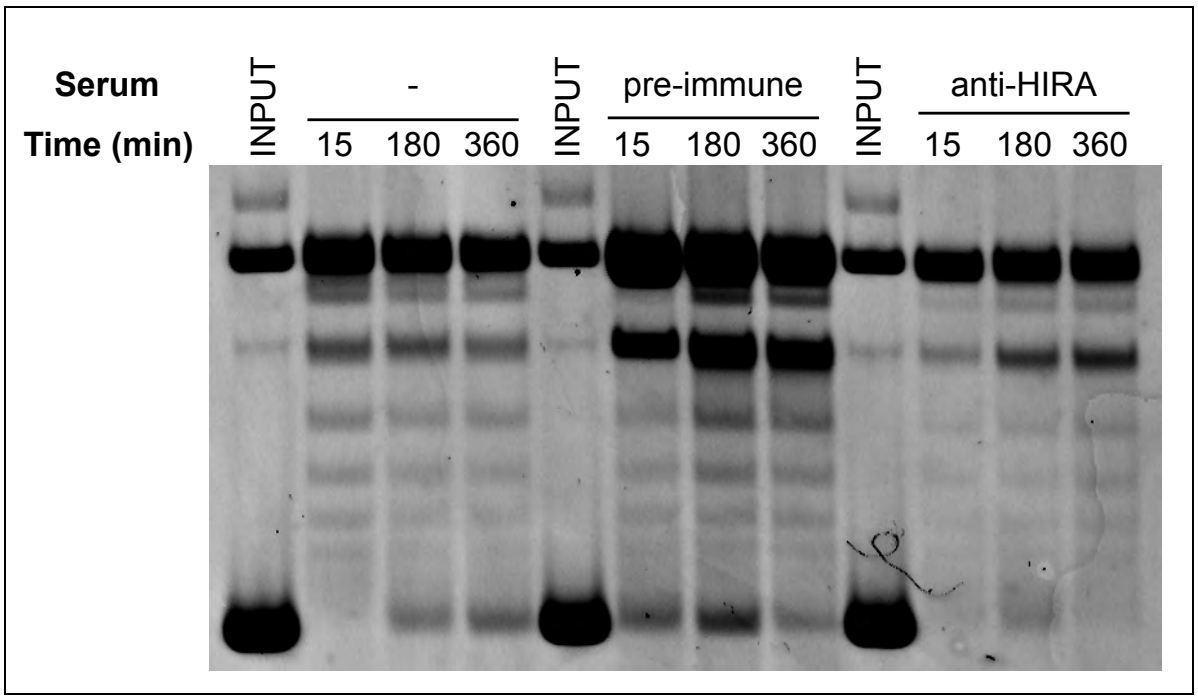


Figure 56 : Test d'assemblage en chromatine d'ADN plasmidique injecté dans des vésicules germinatives avec ou sans anticorps anti-HIRA

10ng d'ADN plasmidique circulaire a été injecté dans des vésicules germinatives d'ovocytes de Xénope avec 16nL d'eau (-), de sérum pré-immum ou de sérum anti-HIRA. L'injection dans les ovocytes permet la décompaction de l'ADN plasmidique (temps 15min par rapport à input) puis l'assemblage en chromatine de façon indépendante de la synthèse d'ADN (temps 180 et 360min). Aux temps indiqués, l'ADN est purifié par déprotéinisation, extraction au chloroforme et précipitation à l'éthanol ; puis est soumis à électrophorèse sur gel d'agarose. Chaque colonne correspond à l'ADN extrait à partir de 25 ovocytes et l'input correspond à environ 150ng d'ADN plasmidique.

Matériel et Méthodes

Le test d'assemblage en chromatine d'ADN plasmidique injecté dans les vésicules germinatives d'ovocytes a été réalisé selon (Roche et al., 2006). L'anticorps anti-xHIRA et le sérum pré-immun correspondant a été décrit dans (Ray-Gallet et al., 2002).

DISCUSSION

Mon travail de thèse a révélé l'importance fonctionnelle de la voie d'assemblage du variant d'histone H3.3 via son chaperon HIRA *in vivo* à l'échelle d'un organisme au cours du développement embryonnaire, grâce au modèle vertébré, *Xenopus laevis*.

L'importance des deux voies d'assemblage de la chromatine

Dans la littérature, un ensemble d'études *in vitro* ou en culture cellulaire, dont celles de notre laboratoire, a permis de dégager un modèle d'assemblage de l'histone H3 selon deux voies principales (Figure 44) (Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004; Ray-Gallet et al., 2011) : (1) l'une couplée à la synthèse d'ADN via le chaperon CAF-1 permettant l'incorporation de H3.1/H3.2 et (2) l'autre non couplé à la synthèse d'ADN via HIRA permettant l'incorporation du variant d'histone H3.3. Néammoins, la question restait ouverte quant à l'importance physiologique de l'incorporation de variants distincts de l'histone H3 selon deux voies distinctes à l'échelle d'un organisme entier. Plus précisément, il s'agissait d'évaluer si ces voies distinctes remplissent des fonctions redondantes durant tout le développement ou bien au contraire si elles s'avèrent absolument requises *in vivo* à des étapes clés ?

Notre approche par perte de fonction via l'injection de morpholinos spécifiques dans les embryons de Xénope s'est avérée particulièrement fructueuse. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'importance fonctionnelle de ces voies distinctes d'assemblage de la chromatine au cours du développement embryonnaire lors d'une étape clé : la gastrulation. L'injection du morpholino p150, en ciblant la grande sous-unité du complexe CAF-1, et du morpholino H3, ciblant à la fois H3.2 et H3.3, conduisent à un arrêt brutal du développement dès le début de la gastrulation, au moment où les réserves en histones et chaperons d'histones accumulées au cours de l'ovogenèse deviennent limitantes. Ces résultats au niveau phénotypique sont à comparer avec ceux résultant de l'injection d'une forme dominante négative de p150 (Quivy et al., 2001), qui elle conduit à des défauts de développement plus précoces en interférant dès les premiers cycles cellulaires avec l'incorporation des histones au cours de la réplication. Cette dernière observation démontre le rôle majeur de la voie d'assemblage via CAF-1 pendant les étapes de clivages rapides. Ces expériences de dominant négatif pour CAF-1 soulèvent la question de l'importance respective de H3.2 et H3.3 pendant cette étape de segmentation. Ceci serait d'autant plus intéressant à envisager à la lumière de nos données mettant en évidence un stockage

massif en protéines H3.3 dans les ovocytes et dans les œufs, en comparaison aux embryons de stades tardifs. La présence de ces protéines H3.3 massivement incorporées au sein de la chromatine des embryons précoces, est un argument supplémentaire permettant de considérer une importance toute particulière au cours de la segmentation lorsque les cycles cellulaires sont rapides et qu'une demande en histone est forte. Il serait donc intéressant de pouvoir, comme pour la p150, développer une approche de dominant négatif interférant directement avec la voie H3.3 en ciblant HIRA, pour déterminer si la mise en place de H3.3 pendant cette étape est elle aussi essentielle. Une possibilité alternative pour vérifier l'importance d'H3.3 et de HIRA plus précocement au cours du développement, serait via l'injection d'anticorps spécifiques afin de neutraliser les protéines maternelles. En outre, en plus de cette comparaison avec le phénotype obtenu après injection du morpholino p150, il serait également important de pouvoir dériver un morpholino spécifique uniquement de H3.2 afin de comparer les phénotypes résultants si H3.3 n'est pas encore épuisé.

L'ensemble de ces données permettrait d'affiner notre évaluation de l'importance fonctionnelle des voies d'assemblage des histones H3.2 et H3.3 au cours du développement très précoce afin de déterminer si ces voies peuvent se compenser l'une de l'autre. Néammoins, nos observations grâce à l'injection du morpholino HIRA et du morpholino spécifique d'H3.3 conduisent clairement à des défauts plus tardifs au cours de la gastrulation, défauts qui se traduisent au moment de la fermeture du blastopore à la fin de ce processus. Il est très important de relever que ces défauts ne sont pas éliminés en ajoutant des histones H3.2 (par injection d'ARN), mais seulement par ajout des histones H3.3, ce qui démontre sans ambiguité la spécificité de ce phenotype. Ainsi, nous avons pu démontrer que la voie d'incorporation d'H3.3 via HIRA est absolument essentielle au cours du développement, lorsque les cycles cellulaires se rallongent avec incorporation des phases G1 et G2 et que le processus de différenciation se met en place. Il est important de noter qu'une mutation de HIRA chez la souris conduit également à des défauts de gastrulation (Roberts et al., 2002) qui pourraient peut être s'expliquer de la même manière par un défaut d'incorporation d'H3.3. Il serait donc intéressant de revisiter ce phénotype chez la souris à la lumière de nos résultats chez le Xénope, résultats qui établissent clairement un lien entre H3.3 et HIRA au cours du développement.

Un rôle spécifique pour H3.3 au cours du développement

Alors que les séquences et structures des histones H3.2 et H3.3 sont très semblables (Tachiwana et al., 2011), une question majeure était en effet de comprendre si ces histones ne sont pas simplement interchangeables ?

Le phénotype observé au cours du développement du Xénope en ciblant uniquement H3.3 suggère une importance spécifique de ce variant d'histone. De plus, comme indiqué ci-

dessus, notre expérience de sauvetage phénotypique met en évidence l'importance spécifique d'H3.3. Sa fonction au cours du développement ne peut donc en aucun cas être remplacée par H3.2. Nous pouvons alors conclure qu'à l'échelle d'un organisme vertébré, la présence de ces deux variants d'histones, bien que très proches en séquence et structure, est essentielle. Néammoins, chez la Drosophile, l'absence d'H3.3 au cours du développement semble pouvoir être partiellement compensée dans certains cas par une surexpression d'H3.2 (Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009). Cependant, chez la souris, une mutation hypomorphique d'un des deux gènes codant pour H3.3 conduit, dans 50% des cas, à une mortalité néonatale dont les causes développementales n'ont pas été établies (Couldrey et al., 1999), soulignant encore une importance particulière du variant H3.3 chez les mammifères. Il serait bien-sûr opportun de déterminer l'impact développemental d'une mutation de chacun des deux gènes H3.3 chez la souris, afin d'examiner si l'importance d'H3.3 au cours de la gastrulation est conservée chez les mammifères.

Enfin, l'expérience de sauvetage phénotypique que nous avons établie non seulement permet de valider la spécificité du phénotype, mais représente également un outil majeur afin d'étudier, grâce à l'injection de mutants, l'importance d'acides aminés particuliers, potentiellement cibles de modifications ou différents entre H3.2 et H3.3. Pour ce qui concerne les résidus distincts entre H3.2 et H3.3, chez la plante, les acides aminés 87 et 90 de H3.3 sont directement impliqués dans son incorporation au niveau de l'ADN ribosomal (Shi et al., 2011) ; et chez la Drosophile, des mutations de la séquence d'H3.2 vers H3.3 semblent en effet permettre une incorporation partielle en dehors de la phase S (Ahmad and Henikoff, 2002b). Il serait intéressant de tester si ces mutations sur H3.2 permettent alors une interaction de cette histone avec HIRA. L'expérience de sauvetage phénotypique pourra également être utilisée pour tester l'importance de différentes modifications post-traductionnelles d'H3.3 au cours du développement précoce du Xénope. Notamment, nous pourrons réévaluer l'importance de la méthylation d'H3K4 qui *a priori* ne nous semble pas essentielle au cours de la gastrulation dans la mesure où sa diminution via l'interférence avec la protéine WDR5 ne produit que des défauts beaucoup plus tardifs. Des données récentes ont mis en lumière l'importance du résidu H3.3K27, dont la méthylation est requise pour la formation de l'hétérochromatine péricentrique du génome paternel après fécondation chez la souris (Santenard et al., 2010). De plus, une mutation de H3.3K27 a récemment été spécifiquement retrouvée dans un sous groupe de glioblastome pédiatrique (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012). L'importance de ce résidu dans un contexte développemental normal reste alors à explorer pour évaluer son importance pour la différenciation et la viabilité cellulaire. Ainsi, notre modèle fourni un système d'étude idéal

pour vérifier l'importance de résidus spécifiques de l'histone H3.3 et leurs modifications associées au cours du développement embryonnaire.

Le variant d'histone H3.3 et la transcription

Plusieurs données dans la littérature sont en faveur d'un lien entre H3.3 et la transcription, mais la question majeure est de savoir s'il s'agit d'un lien causal. H3.3 est en effet enrichi au niveau de régions chromatiniennes transcriptionnellement actives, notamment au niveau des « enhancers », promoteurs, sites de démarrage de la transcription (*Transcription Start Sites* (TSS)) et corps de gènes transcrits (Ahmad and Henikoff, 2002b; Mito et al., 2005; Schwartz, 2005; Mito et al., 2007; Goldberg et al., 2010; Ray-Gallet et al., 2011). De plus, H3.3 est enrichi en modifications post-traductionnelles associées avec l'euchromatine (McKittrick et al., 2004). Il est important de comprendre si ces corrélations sont une conséquence du processus de transcription qui implique l'éviction des histones puis le recyclage ou la mise en place de nouvelles histones, et/ou si elles participent également à entretenir un niveau de transcription élevé. H3.3 étant l'histone de remplacement majeur de l'histone H3 présent tout au long du cycle cellulaire, sa présence au niveau de régions actives pourrait en effet simplement s'expliquer comme étant la conséquence du renouvellement des histones.

Or, un rôle actif d'H3.3 pour le processus de transcription est également à considérer. Notamment, des données récentes dans notre laboratoire ont mis en évidence une interaction directe entre le chaperon HIRA et l'ARN polymérase II (Ray-Gallet et al., 2011) et il était important de savoir si l'incorporation d'H3.3 via son chaperon HIRA était requise pour l'expression des gènes *in vivo.* Nos données par qRT-PCR et hybridation *in situ* confirment l'importance d'H3.3 pour la transcription d'un grand nombre de gènes au cours du développement embryonnaire, notamment lors du processus de différenciation au moment de la gastrulation. Le panel de gènes spécifiquement affecté pourrait être élargi grâce à des approches à grande échelle sur puces à ARN. Néammoins, nous démontrons que les signaux d'induction du mésoderme ne sont pas affectés lorsque nous interférons avec H3.3, et que les cellules ectodermiques sont compétentes à répondre à ce signal d'induction *in vitro*. Ainsi, les défauts d'expression que nous observons *in vivo* suggèrent que c'est le maintien de l'état actif des gènes qui est affecté. Ceci est en accord avec l'importance d'H3.3 pour le maintien de l'expression génique qui a été démontrée au cours du développement d'un embryon issu du transfert d'un noyau différencié dans un œuf de Xénope énucléé (Ng and Gurdon, 2008). Cependant, un besoin plus direct en H3.3 pour l'activation de la

transcription ne peut être exclu dans notre système. Une perte de fonction totale en H3.3 pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Enfin, notre étude en collaboration avec le laboratoire de John Gurdon relève un autre aspect important concernant l'incorporation d'H3.3 dans la chromatine dans le contexte de la reprogrammation nucléaire. En effet, cette incorporation apparaît essentielle pour la réactivation de gènes de pluripotence après transfert nucléaire. Ces données sont donc quant à elles en faveur d'un lien direct entre H3.3 et l'activation de la transcription. De plus, cette propriété semble spécifique du variant H3.3 puisque dans ce système, une incorporation compensatrice d'H3.2 en absence du chaperon HIRA est en effet insuffisante pour permettre la reprogrammation transcriptionnelle.

Des études récentes sont également en faveur d'un rôle actif d'H3.3 dans l'activation de la transcription. A titre d'exemple, une incorporation d'H3.3 au niveau du gène *HSP70* semble capable de stimuler l'activation de la transcription de ce gène après induction par choc thermique (Schwartz, 2005; Kim et al., 2011). De plus, chez la plante, l'incorporation d'H3.3 est associée avec le remodelage transcriptionnel à des étapes clés du développement (Wollmann et al., 2012). De façon remarquable, plusieurs études récentes établissent un lien entre l'incorporation d'H3.3 et la différenciation myogénique de cellules *in vitro.* En effet, une étude sur la différenciation de myoblastes murins C2C12 a mis en évidence l'importance de l'incorporation d'H3.3 via les chaperons HIRA et ASF1a au niveau du promoteur du gène MyoD, pour l'activation de sa transcription et la différenciation des cellules en myotubes (Yang et al., 2011b). Il faut noter que la même équipe a également montré que HIRA interagit dans ce système avec le facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) et participe à l'activation des gènes myogéniques lors de la différenciation musculaire (Yang et al., 2011a; Song et al., 2012). Enfin, une interaction entre MyoD et le facteur de remodelage CHD2 conduisant l'incorporation d'H3.3 au niveau des gènes cibles de MyoD , permettrait de marquer les gènes pour une activation ultérieure lors de la différenciation myogénique. Nos données chez le Xénope permettent d'infirmer l'importance de l'incorporation d'H3.3 via son chaperon HIRA *in vivo* pour l'activation de gènes mésodermiques dès le processus de gastrulation. Des expériences futures d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) seraient à développer plus avant afin d'identifier une éventuelle incorporation direct d'H3.3 au niveau du promoteur de Xbra et/ou MyoD lors de la différenciation. Il est clair que l'incorporation non ciblée via un système de « gap filling » potentiellement important pendant le développement précoce, rend ce genre d'approche très difficile. Une possibilité pour éviter ce problème serait de réaliser un double ChIP, ciblant à la fois les marques de la chromatine active (H3K4me3) et le variant d'intérêt. En conclusion, nos données renforcent l'hypothèse selon laquelle H3.3 jouerait un rôle clé associé à la transcription dans la mise en œuvre d'un programme de différenciation.

Les variants d'histones et le développement embryonnaire

Alors que nous observons un défaut spécifique au moment de la gastrulation, il est important de noter que nous ne pouvons pas exclure qu'H3.3 soit également important à d'autres stades plus tardifs du développement embryonnaire. En revanche, la gastrulation représente une transition clé où les premières étapes de différenciation cellulaire ont lieu. Alors que les cycles se rallongent avec l'incorporation des phases G, une demande en assemblage de la chromatine non couplé à la synthèse d'ADN devient alors plus forte. De plus, une régulation fine de l'expression de gènes zygotiques en réponse aux processus de différenciation nécessite, comme nous l'avons vu, un remodelage de la chromatine important. Il faut relever les changements caractérisés au niveau du statut d'acétylation des histones et de l'incorporation de variants d'histone H1 au cours de ces transitions développementales chez le Xénope (Dimitrov et al., 1993; Almouzni et al., 1994). Notamment, le remplacement progressif du variant H1 embryonnaire (B4) par le variant H1 somatique conduit à la perte de compétence mésodermique à la fin de la gastrulation (Steinbach et al., 1997; Vermaak et al., 1998). Dans ce contexte, il est intéressant de considérer si H3.3 et H1 pourraient agir de façon antagoniste. Une étude à grande échelle réalisée sur des cellules de Drosophile montre en effet une anti-corrélation entre la présence d'H3.3 et H1 dans la chromatine (Braunschweig et al., 2009). L'importance d'un autre variant d'histone au moment de la gastrulation, le variant H2A.Z, a été démontrée chez le Xénope (Ridgway et al., 2004). Alors que la présence d'H3.3 et de H2A.Z au sein d'un même nucléosome réduit sa stabilité, de tels nucléosomes sont spécifiquement retrouvés au niveau des promoteurs actifs et régions régulatrices (Jin et al., 2009). Ainsi, H3.3 et H2A.Z pourraient coopérer pour l'établissement d'une structure chromatinienne permissive à l'expression de gènes spécifiques lors de la différenciation.

En dehors de l'aspect transcriptionnel proprement dit, il faut également considérer que la dynamique de la chromatine qui accompagne la transcription génère une demande importante en histone en dehors de la phase S pour restituer une organisation nucleosomale compromise. Ainsi, la voie d'assemblage d'H3.3 via HIRA pourrait participer au maintien de l'intégrité de la chromatine et ainsi potentiellement participer à une protection du génome. Cette hypothèse est favorisée par la récente démonstration d'une interaction directe entre HIRA et l'ADN (Ray-Gallet et al., 2011) qui permettrait une incorporation d'H3.3 à tout endroit de la chromatine nécessitant une incorporation d'histone de façon non couplée à la synthèse d'ADN. Les défauts globaux de la chromatine des embryons déficients pour H3.3 ou HIRA visualisés dans notre système (expériences de digestion à la MNase) sont effectivement en faveur d'un besoin important de cette voie d'assemblage pour le maintien de l'intégrité de la chromatine.

L'importance d'autres facteurs d'assemblage de H3.3

Nos données sur l'importance fonctionnelle du facteur HIRA pour l'incorporation d'H3.3 dans la chromatine au cours du développement embryonnaire vertébré soulèvent d'autres facettes concernant le rôle de ses partenaires. Des données récentes ont montré que la protéine HIRA est présente sous la forme d'un complexe comprenant la calcineurin-binding protein 1 (Cabin1) et ubinuclein 1 (UBN1) dans les cellules humaines (Balaji et al., 2009; Banumathy et al., 2009; Rai et al., 2011; Ray-Gallet et al., 2011). Ainsi, il serait opportun d'étudier l'importance respective de ces protéines, qui sont conservées chez le Xénope, dans un contexte développemental. D'une manière intriguante, chez la Drosophile, H3.3 est correctement détectée dans la chromatine d'embryons et de tissus adultes en l'absence de protéine HIRA (Bonnefoy et al., 2007). Ces données suggèrent que chez la Drosophile, d'autres voies d'assemblage de H3.3 indépendantes de HIRA peuvent être en jeu. Ceci pourrait impliquer un mécanisme passif de diffusion, l'intervention de Cabin1 ou UBN1 de façon indépendante de HIRA ou encore l'importance d'autres facteurs.

Notamment, un autre facteur qui pourrait fonctionner avec les chaperons est le facteur de remodelage CHD1 dont l'importance est démontrée dans le contexte de l'incorporation d'H3.3 dans le génome paternel après fécondation (Konev et al., 2007). Mes données préliminaires suggèrent que CHD1 est essentiel également au moment de la gastrulation, tout comme HIRA et H3.3. Des expériences complémentaires pourraient permettre dans le futur d'établir l'importance relative de CHD1 pour l'incorporation d'H3.3 au cours du développement embryonnaire du Xénope, potentiellement en synergie avec HIRA.

Dans ce contexte, il semble essentiel d'étudier également l'importance du facteur ASF1 (ASF1a et ASF1b) qui est à l'interface entre les deux voies d'assemblage, couplé ou non couplé à la synthèse d'ADN (Tagami et al., 2004; Groth et al., 2007). Notamment, ASF1b est impliqué dans la prolifération cellulaire et est un marqueur pronostique dans le cancer du sein (Corpet et al., 2011). De plus, ASF1a est essentiel pour l'incorporation du variant H3.3 via HIRA lors de la différenciation myogénique des cellules C2C12 (Yang et al., 2011b). Ainsi, connaître l'importance relative de ASF1a et de ASF1b au cours du développement embryonnaire est un enjeu pour les années à venir.

Récemment, d'autres facteurs importants pour la mise en place d'H3.3 spécifiquement au niveau de l'hétérochromatine péricentrique et des télomères ont été mis en évidence chez la souris (Drane et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Lewis et al., 2010). Il s'agit des facteurs *death domain-associated protein* (DAXX) et *alpha-thalassemia / mental retardation X-linked syndrome protein* (ATRX) (revue (Szenker et al., 2011)). Mes données préliminaires ne permettent pas de révéler une importance fonctionnelle de ces facteurs au cours du développement embryonnaire du Xénope, mais de futures expériences contrôles permettront d'établir leur implication pour l'incorporation d'H3.3 dans ce contexte particulier.

Conclusions générales

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis d'établir l'importance fonctionnelle de la voie d'assemblage du variant d'histone H3.3 via son chaperon HIRA à l'échelle d'un organisme pluricellulaire au cours du développement embryonnaire. Dans ce contexte, j'ai pu montrer que l'incorporation d'H3.3 via HIRA est importante non seulement pour l'expression de gènes spécifiques lors de la différenciation au cours de la gastrulation, mais également pour le maintien de l'intégrité de la chromatine. Des expériences à grande échelle permettront d'établir un lien direct entre l'incorporation d'H3.3 et l'expression de gènes clés au moment de la gastrulation. De plus, notre système permettra dans le futur d'étudier l'importance fonctionnelle de résidus spécifiques tels que les quatre différences entre H3.2 et H3.3 et certains résidus qui sont ciblés par des modifications post-traductionnelles tels que H3K4, H3K9 ou encore H3K27. Enfin, l'étude d'autres facteurs importants pour la dynamique d'H3.3 nous permettra d'améliorer notre compréhension de la régulation de la chromatine au cours du développement embryonnaire.

ANNEXE

L'incorporation d'H3.3 via son chaperon HIRA est nécessaire pour la reprogrammation transcriptionnelle après transfert nucléaire dans des ovocytes de Xénope

HIRA-dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes

Jullien J.*, Astrand C.*, Szenker E., Garrett N., Almouzni G. and Gurdon J.B.

* contribution équivalente

En révision à Epigenetics & Chromatin

HIRA-dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes.

J. Jullien[1,3], C. Astrand[1,3], E. Szenker[2], N. Garrett[1], G. Almouzni[2], and J.B. Gurdon[1]

1. The Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute,
The Henry Wellcome building of Cancer and Developmental Biology,
University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QN United Kingdom, and Departement of Zoology, Cambridge.
2. Institut Curie Section de Recherche UMR 218
26 rue d'Ulm, 75248 Paris, Cedex 05 France
3. The two authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Nuclear reprogramming is potentially important as a route to cell replacement and drug discovery, but little is known about its mechanism. Nuclear transfer to eggs and oocytes attempts to identify the mechanism of this direct route towards reprograming by natural components. Here we analyze how the reprogramming of nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes exploits the incorporation of the histone variant H3.3. After nuclear transplantation, oocyte-derived H3.3, but not H3.2, is deposited on several regions of the genome including rDNA, major satellite repeats, and the regulatory regions of Oct4. This major H3.3 deposition occurs in absence of DNA replication, and is HIRA- and transcription-dependent. It is necessary for the shift from a somatic- to an oocyte-type of transcription after nuclear transfer. We conclude that the incorporation of histone H3.3 is an early and necessary step in the direct reprogramming of somatic cell nuclei by oocyte.

HIGHLIGHTS

- Specific incorporation of histone H3.3 onto nuclei transplanted to *Xenopus* oocyte
- HIRA-dependent H3.3 deposition is necessary for transcriptional reprogramming
- HIRA-mediated H3.3 deposition and transcription are interdependent

INTRODUCTION

Nuclear reprogramming is characterized by a global shift in gene expression. The mechanisms underlying this phenomenon are not well understood but are likely to involve changes to chromatin. For example, an increase in histone H3K4 methylation has been observed in nuclei following nuclear transfer (NT) and during iPS production[1,2]. Alternatively, the incorporation of histone variants into chromatin can provide another way to drastically alter the structure of chromatin. Nucleosomes containing core histone variants H3.3 or macroH2A have been associated with the active and inactive states of a gene, respectively. MacroH2A restricts the reactivation of pluripotency genes from mouse nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes[3]. In nuclear transfer to *Xenopus* eggs, histone H3.3 participates in the transmission of an active state of a gene, even in embryonic lineages where genes should be silenced[4]. Furthermore, histone variants are also positively involved in the mechanism of transcriptional reprogramming. We have previously shown that the incorporation of histone B4, an oocyte specific linker histone variant, is a necessary step for nuclear reprogramming following nuclear transfer[5]. A number of histone changes are already known to be associated with nuclear reprogramming by eggs and oocytes. While those observed in eggs may well be related to DNA synthesis and cell replication coupled events during the cell cycle, those that take place in somatic nuclei transplanted to oocytes which do not replicate DNA and are arrested in prophase I of meiosis are associated essentially with new transcription and are independent of cell cycle progression.

Here we investigate the dynamics of histone H3 variants in the reprogramming of mammalian nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes. In this type of reprogramming there is no cell division and new cell types are not derived. However, the transplanted nuclei undergo dramatic changes in their pattern of gene expression so that transcription is switched directly from a somatic to an oocyte type. The evolutionarily conserved histone variant H3.3 has been found to be especially enriched in the coding region of transcriptionally active genes as well as in gene regulatory elements[6]. This histone is often associated with histone modifications related to gene activation[7,8]. Histone H3.3 can be incorporated into chromatin throughout the cell cycle in a replication independent manner by the histone chaperone HIRA[9,10], which is also found to be required for global H3.3 deposition in the male pronucleus after fertilization in Drosophila[11]. This association between histone H3.3 and the HIRA deposition pathway has been further demonstrated to play a critical role during a major change in gene expression at gastrulation in *Xenopus*[12]. Finally, early work showed that plasmid DNA injected to oocytes is differently transcribed depending on whether its chromatin has been assembled in a DNA synthesis dependent or independent manner[13].

Together these findings prompted us to investigate the importance of the histone variant H3.3 and its deposition in transcriptional reprogramming of nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes. We demonstrate that the deposition of H3.3 by HIRA is necessary for transcriptional reprogramming. We also observe that HIRA mediated H3.3 deposition and transcription are interdependent in somatic nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

Gain and loss of histone H3 variants

In order to investigate the mechanism of transcriptional reprogramming by oocytes, we have first monitored the transfer of histone variants between the oocyte and the transplanted nuclei. We have focused our analysis on histone H3.2 and H3.3, the two non-centromeric histone H3 variants known to be present in *Xenopus*. Triton Acetic acid Urea (TAU) gel analysis indicates that in the *Xenopus* oocyte, the ratio of histone H3.3 to that of histone H3.2 is much higher than in somatic cells (Fig1A). Indeed TAU analysis shows that cells of Stage 28 *Xenopus* embryo contain ~5 times less H3.3 than H3.2, whereas the *Xenopus* oocyte germinal vesicle (GV) exhibits a two-fold excess of H3.3 over H3.2. Thus, the *Xenopus* oocyte GV is characterized by an unusually high proportion of histone H3.3 variant. We have asked whether core histone variants originating from the oocyte can be deposited onto the chromatin of transplanted nuclei. For that purpose we have expressed in the oocyte, by mRNA injection, fluorescently tagged histone H3.2 and H3.3 (Fig1B). Forty-eight hours after mRNA injection, tagged histones are expressed in the oocyte at a similar level to their endogenous counterparts (FigS1 and Fig1A). ES nuclei expressing H3.2-cherry are then transplanted into these oocytes, and incubated for another day, when their germinal vesicles containing transplanted nuclei were isolated and analyzed by confocal microscopy (Fig1C). H3.2-cherry marks the location of donor nuclei and 48h after nuclear transfer, we observe an accumulation of oocyte H3.3 in transplanted chromatin an effect not seen with oocyte H3.2 (Fig1C). When monitored by confocal analysis in real time, the incorporation of oocyte H3.3 onto transplanted chromatin is readily detectable 10h after nuclear transfer. H3.3 incorporation steadily increases and is observed in all transplanted nuclei 15 hours after nuclear transplantation (FigS2, oocyte H3.3). We conclude from these experiments that following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes, a high incorporation of H3.3 compared to H3.2, is observed in transplanted chromatin.

We have then asked whether the loading of oocyte H3.3 onto transplanted chromatin is associated with the loss of H3.2 or H3.3 from donor nuclei. For that purpose we have used donor nuclei containing cherry labeled H3.2 or H3.3. Quantitation of the level of cherry labeled histones that remain associated with donor nuclei after transplantation to oocytes

was done by confocal microscopy. We observed that during the first 12 hours after nuclear transfer 15% and 19% of H3.2-cherry or H3.3-cherry, respectively, are lost from transplanted nuclei (Fig1D). This suggests that following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes, a significant fraction of H3.2 and H3.3 in donor nuclei is replaced by oocyte H3.3. The mobility of core histones on the chromatin of nuclei transplanted to *Xenopus* oocytes is not known. Changes in histone mobility have been proposed to account for plasticity in transcription[14] and could therefore account for the change in gene expression observed after nuclear transfer. We therefore investigated whether histone H3.3 incorporated after transplantation corresponds to a fraction of the transplanted nuclear core histone that has become highly mobile. When tested by FRAP analysis over a period of 20 min, we observed that oocyte derived H3.3 loaded onto transplanted chromatin does not recover above the level of H3.3 found in the surrounding germinal vesicle (Fig1E). By contrast oocyte derived HP1-alpha fully recovers within the 20 minutes following photo-bleaching, indicating that within the imaging conditions used some chromatin associated protein exhibits rapid turn over. We therefore conclude that, once incorporated into transplanted nuclei, the newly loaded H3.3 is not turning over rapidly. Thus transplanted nuclei incorporate H3.3 readily from the oocyte, thereby changing their chromatin landscape and possibly reprogramming transcription.

Timing of H3.3 incorporation and transcription

We have investigated how the association of histone H3.3 with transplanted nuclei relates to transcriptional reprogramming. Work in cultured cells has shown that H3.3 is present in specific parts of the genome. It is enriched in heterochromatic regions such as telomeres and satellite repeats found at pericentric chromatin[6], as well as on ribosomal genes[15]. Lastly, H3.3 is accumulated on transcription factor binding sites in the regulatory regions of most genes as well as on the coding regions of transcribed genes in cultured mouse ES cells[6], and in cultured human HeLa cells[16]. We have therefore focused our analysis of H3.3 binding following nuclear transfer specifically to parts of the genome that reflect genomic H3.3 distribution in the cultured cells. We have thus monitored rDNA 28S genes (100 copies per genome) and major satellite repeats (3% of the mouse genome)[17]. Additionally, we have established a mouse embryonic cell line containing an array of 20 copies of the 3.6 kB regulatory region of the Oct4 promoter fused to the coding region of neomycin resistance as reporter, here called ESC #5 (Fig2A). Using that array we can monitor, by ChIP analysis, histone variant binding to a reporter gene. Induction of differentiation by retinoic acid (RA) treatment of ES cells is known to repress pluripotency gene transcription and to specifically invoke epigenetic changes resembling those of silent heterochromatin over the Oct4 gene[18], and we have taken advantage of this system to analyze silent chromatin reactivation after NT.

By qRT-PCR we have confirmed that 4-day retinoic acid (RA) treatment of the reporter ES cell line ESC#5 (RA-ESC #5) induces silencing of the endogenous pluripotency genes Sox2 and Oct4 as well as of the Oct4 transgene (FigS3). To confirm that the oocyte successfully reactivates the Oct4 transgene, a transcription analysis was carried out with RA-ESC #5 nuclei carrying the silent Oct4 array analyzed at various times after NT. We observe transcription of the rDNA 28S, major satellite repeat, as well as the previously silent Oct4 reporter within 12 to 20 hours after nuclear transfer (Fig2B). The level of all three kinds of transcript is greatly increased from 20h to 48h after transplantation. In particular, we note that transcripts from the rDNA and major satellite regions are accumulated to levels that largely exceed those observed in the donor nuclei immediately after nuclear transfer (at least 20 fold, Fig2B, compare 0h and 48h after transplantation). The observed increase in rRNA and major satellite transcripts after nuclear transfer suggests transcriptional reprogramming of these parts of the genome too. However since both rDNA and pericentric heterochromatin can be transcribed in cultured cells, the observed accumulation of transcripts from these regions following nuclear transfer (Fig2B) could result from a somatic type of transcription associated with increased transcript stability in the oocyte.

To confirm transcriptional reprogramming of these genomic regions we have directly measured whether their rate of transcription from transplanted nuclei changes after nuclear transfer. In order to measure changes in rate of transcription we have labelled new transcripts produced from transplanted nuclei by injecting BrUTP into the oocyte (Fig2C). BrUTP was injected at different times after nuclear transfer and oocytes collected 12 hours after injection. In that way the transcripts are labeled with BrUTP for 12-hour periods covering the 48 after nuclear transplantation. The labeled transcripts are then immunoprecipitated with an anti-BrdUTP antibody and analyzed by qRT-PCR, providing a measurement of transcript production per 12h period. We observe that the rate of transcription from rDNA and major satellites increases 5 times between the 12h-24h and 24h-36h periods that follow nuclear transplantation (Fig2C). Therefore the reprogramming of transplanted nuclei to an oocyte type of transcription includes reactivation of silent genes such as Oct4, and an increased transcription of rDNA and pericentric chromatin. We point out that transcription of the latter has been observed in several instances, especially at the time of early embryonic development when heterochromatin is established [19,20].

We then compared the extent of the oocyte-expressed H3.3 and H3.2 incorporation into the transplanted chromatin analyzing different regions of the transplanted nuclei. For this purpose we expressed in the oocyte HA tagged H3.3 or H3.2 prior to nuclear transfer. The level of HA-H3 and HA-H3.3 obtained by mRNA injection is similar to that of their

endogenous counterpart stored in the oocyte (FigS1 and Fig1A). At 24h after nuclear transfer of RA-ESC #5, the oocytes were cross-linked and analyzed by ChIP with an antibody recognizing the HA-tag in order to determine the extent of incorporation of histones from the oocyte. We found that HA-H3.3 was incorporated with an 8-10 fold higher efficiency compared to the background level of HA-H3.2, not only over the Oct4 promoter but also over the major satellite region and ribosomal DNA (Fig2D). Therefore the incorporation of oocyte H3.3 as opposed to H3.2 into transplanted nuclear chromatin as seen by immunofluorescence analysis (Fig1C) is also observed by ChIP analysis. We conclude that H3.3 but not H3.2 is preferentially deposited on transplanted nuclear chromatin including regulatory regions such as in the Oct4 promoter.

Our results so far indicate that H3.3 deposition is an early event following NT but do not show whether it precedes or follows the switch from somatic type to oocyte type transcription. To address this we focused on Oct4 reactivation and investigated the time at which various parts of the Oct4 regulatory region exhibit histone H3.3 incorporation. The oocytes were injected with mRNA encoding HA-H3.3 as before and the next day RA ESC #5 nuclei were used for NT. The oocytes were then incubated and cross-linked at indicated time points prior to ChIP analysis for the well conserved proximal promoter (PP), proximal enhancer (PE) and the distal enhancer (DE) of Oct4. We found that histone H3.3 incorporation increased greatly during the first 20 hours and then reached a plateau around 24 hours after NT (Fig2E). No difference in the extent of H3.3 incorporation between the promoter and enhancers was seen for up to 72 hours, indicating a uniform exchange over the entire regulatory region of Oct4 after NT. At 20h after nuclear transfer, both gene reactivation (qRT-PCR, Fig2B), and H3.3 incorporation can be detected (ChIP, Fig2E). However, whereas H3.3 incorporation on Oct4 regulatory regions reaches a maximum level around 24h after nuclear transfer (Fig2E), the quantity of accumulated Oct4 transcript increases massively after that time (Fig2B). This observation is consistent with the hypothesis whereby H3.3 is incorporated onto a gene (and reach a maximum plateau level) while enabling activation and subsequent continuous accumulation of the transcribed mRNAs.

H3.3 incorporation requires HIRA

We have next investigated whether H3.3 deposition on transplanted nuclei is a pre-requirement or a consequence of transcriptional reprogramming. We have first asked whether HIRA, known to be required for H3.3 incorporation into the paternal genome after fertilization[11] is also required for H3.3 deposition on nuclei following transplantation into the *Xenopus* oocyte. Recent studies describe a HIRA dependency for genome-wide H3.3

enrichment over transcribed regions of active genes in mouse ES or human HeLa cells[6,16]. However this incorporation of H3.3 seems not to be required for the maintenance of ongoing transcription in the ESCs[6,16]. HIRA dependent H3.3 deposition in transplanted nuclei was analyzed using a protein knockdown approach previously described and based on the co-injection of polyclonal antibodies together with the donor nuclei[5,21]. We used a polyclonal antibody that recognizes *Xenopus* HIRA and that has been previously used to immunodeplete HIRA protein from egg extract[9]. We verified that this antibody, when injected to the oocyte, was efficiently affecting DNA synthesis-independent chromatin assembly on plasmid DNA (Fig S4). Oocytes expressing either HA-H3.3 or HA-H3.2 were then used as recipients for nuclear transfer. Retinoic acid-differentiated reporter ES cell nuclei were transplanted into oocytes, with the co-injection of an anti-HIRA antibody (to inhibit HIRA) or alpha-amanitin (to inhibit transcription). Twenty-four hours after nuclear transfer the oocytes were analyzed by ChIP and qRT-PCR. We observed that upon anti HIRA antibody injection, the deposition of maternally expressed HA-H3.3 on the Oct4 regulatory regions, rDNA, and major satellite repeats of the transplanted nuclei is reduced (Fig3A, compare lane 2 with lane 4). This indicates that HIRA promotes histone H3.3 incorporation over the genomic region that we have analyzed in the transplanted nuclei.

Interestingly when HIRA mediated H3.3 deposition is inhibited an increased deposition of H3.2 is observed (Fig3A, compare lane 5 with lane 7). In the presence of alpha-amanitin, neither H3.3 nor H3.2 is deposited onto transplanted chromatin (Fig3A). We conclude that following nuclear transfer, H3.3 deposition on the tested genomic region is a HIRA- and transcription- dependent process. We have conducted a complementary analysis of H3.3 loading, this time on a global level, by monitoring H3.3-GFP accumulation onto transplanted chromatin by confocal microscopy. Similar to the ChIP analysis, we observed that H3.3 deposition is inhibited by both anti-HIRA antibody and alpha-amanitin injection (Fig3B). The alternative deposition of H3.2 in response to anti-HIRA injection is also observed on a global nuclear level when monitored by confocal microscopy, albeit on a subset of transplanted nuclei only (FigS5). Together these data demonstrate that H3.3 deposition on a global nuclear level is HIRA- and largely transcription-dependent.

H3.3 incorporation and transcription are interdependent

We next ask whether HIRA mediated H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming. Inhibition of HIRA by antibody injection greatly impairs transcriptional reprogramming as shown by the reduced expression of Oct4 reporter, rDNA and major satellite from transplanted nuclei (qRT-PCR analysis, Fig3C). Overexpression of HIRA by mRNA injection into oocytes prior to anti-HIRA antibody injection and nuclear transfer partially rescues the effect of antibody injection (Fig3D and 3E). This observation confirms

that the antibody effect is through inhibition of HIRA. We conclude that HIRA is required for the reprogramming from a somatic to an oocyte type of transcription. The alternative H3.2 deposition observed when HIRA is inhibited (Fig3A) is not sufficient to promote transcriptional reprogramming (Fig3C). This indicates that a specific deposition of H3.3 is required for efficient reprogramming.

From a mechanistic point of view the requirement for H3.3 is mediated by HIRA. H3.3 incorporation and transcription seem to act in a cooperative and interdependent way. In cultured cells, inhibition of HIRA does not interfere with transcription[6]. However in the context of the developing embryo, HIRA activity is necessary at gastrulation where cell lineages are determined [12]. Together with these findings, our results reveal an involvement of this histone chaperone in the genome wide remodeling of transcription associated with major transition between cell states. Importantly, a physical interaction between HIRA and the transcription machinery has recently been observed[16]. A requirement for H3.3 deposition in the reprogramming of somatic nuclei to an oocyte type of transcription may depend on an interaction between RNA polymerase II and HIRA.

METHODS

Nuclear transfer procedure

Nuclei preparation, live confocal imaging and ChIP analysis of transplanted nuclei have been previously described[22,5,23].

TAU gel analysis

We prepared germinal vesicles (GV) soluble extracts [24], and soluble fractions from eggs and stage 28 embryos using the High Speed Egg (HSE) extract protocol[25]. We analyzed those extracts by electrophoresis in a Triton Acetic acid Urea (TAU) gel that separate histone subtypes [26].

Antibodies

We used the following primary antibodies: anti- H3 (Abcam ab1791; 1:1,000 dilution), anti- H3.3 (Abnova H00003021-M01; 1:40), anti- HA (Roche Diagnostics Clone 3F10; 1:1,000), anti- xHIRA ([27]; 1:2,000), anti- GFP (SantaCruz #SC8334; 1:500), anti- actin (SIGMA; AC15, 1:5000).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: H3.3 but not H3.2 is accumulated in transplanted nuclei.

(A) H3.2 versus H3.3 content in oocyte GVs, eggs and st28 embryos. Soluble pool of H3.2 and H3.3 were separated by Triton Acid Urea (TAU) gel electrophoresis and analyzed by Western blot with an anti-H3 antibody. We loaded the equivalent of 20 and 10 GV, and about 2 eggs or st28 embryos. (B) Schematic outline of injection procedure, where mRNAs coding for tagged *Xenopus* histones are injected into oocyte cytoplasm 1 day before injection of donor nuclei. Oocytes containing transplanted nuclei are then incubated for 1-2 days and submitted to live imaging, ChIP, or qRT-PCR analysis. (C) H3.2-cherry labelled ESC nuclei were transplanted to the germinal vesicle of H3.2-GFP or H3.3-GFP containing oocytes. 48h hours after transplantation germinal vesicles were isolated and analyzed by confocal microscopy. Images are projection of Z-stack. (D) Quantification of H3.3-Cherry or H3.2-Cherry loss from transplanted nuclei. Donor ESC nuclei expressing H3.3-Cherry or H3.2-Cherry were transplanted to GVs isolated in oil and were imaged immediately (0h) or 12h after transplantation. The histogram shows fluorescently labelled histone signal averaged from 40 nuclei in each condition (Error bars indicate s.e.m). ✶ Indicate p-value<0.05, (T-TEST). (E) FRAP analysis of oocyte H3.3 and HP1alpha bound to transplanted nuclei. ESC nuclei were transplanted to H3.3-Cherry and GFP-HP1-alpha expressing oocytes. Forty-eight hours after transplantation, GVs were isolated and H3.3-cherry and GFP-HP1alpha accumulated on transplanted chromatin was subjected to FRAP analysis. Images show a clump of labeled nuclei at various time points during the FRAP procedure. The graph indicates fluorescence intensity changes over the tested chromatin region as well as in the surrounding GVplasm.

Figure 2: Kinetics of transcription and H3.3 incorporation following nuclear transplantation to *Xenopus* oocytes.

(A) Schematic representation of the Oct4 transgene composed of a 20-copy array in the embryonic stem cells used in this study (ESC #5). PP, Proximal promoter; PE, Proximal enhancer; DE, distal enhancer. (B) qRT-PCR analysis of transcription during a 48h period following nuclear transplantation of 4 day-retinoic acid differentiated ESC #5 nuclei. Error bars indicate s.e.m. (n=3). (C) Analysis of rDNA and major satellite transcription rates. Oocytes were transplanted with RA-ESCs and injected with BrUTP at various times after nuclear transfer (at 0, 12, 24, or 36 h). Oocytes were then collected 12h after the time of BrUTP injection. In that way, the different samples collected will contain transcripts produced by the transplanted nuclei and labeled by BrUTP during a 12-hour period (T12-24h, T24-36h, T36-48h). After mRNA extraction BrUTP labeled transcripts are purified by

immunoprecipitation with an anti-BrdUTP antibody and analyzed by qRT-PCR. Error bars indicate s.e.m. (n=3). (D) ChIP analysis of histone incorporation 24h after NT in oocytes preinjected with mRNA for HA-H3.3 and HA-H3.2, performed over the Oct4 reporter promoter, major satellite and ribosomal DNA genes respectively. The total amount of incorporated H3.3 is set to 1. Error bars indicate standard deviation (n=3). (E) Analysis of histone incorporation kinetics over Oct4 regulatory regions after NT. Four day retinoic acid treated ESC #5 were transplanted in oocytes preinjected with mRNA for HA-H3.3 and HA-H3.2, collected over a 48h time course and analyzed by ChIP with an HA antibody.

Figure 3: A HIRA- and transcription- dependent H3.3 incorporation onto transplanted chromatin is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer.

(A) ChIP analysis of H3.2 and H3.3 incorporation onto transplanted chromatin following NT to oocytes under conditions where transcription or HIRA is inhibited. Recipient oocytes were preinjected with no, HA-H3.2, or HA-H3.3 mRNA. RA-ESC #5 nuclei were then co-injected in the GV with or without co-injection of either alpha amanitin (RNA Polymerase II inhibition) or anti-HIRA Antibody (HIRA inhibition). 24h after transplantation, H3.2 and H3.3 incorporation onto various genomic regions was measured by ChIP analysis. Error bars indicate s.e.m. (n=3). (B) Confocal analysis of H3.3 accumulation onto transplanted chromatin following NT to oocytes in conditions where transcription or HIRA is inhibited. Oocytes were preinjected with H3.3-GFP mRNA. H3.2-cherry expressing ESC #5 nuclei were then transplanted to the oocyte in the presence of alpha amanitin (RNA Polymerase II inhibition), anti-HIRA Antibody (HIRA inhibition), or control Antibody. 48h after transplantation, H3.3-GFP loading onto chromatin was analyzed by confocal imaging of isolated GVs. Graphs show fluorescence intensity of donor H3.2-cherry (red) and oocyte H3.3-GFP (green) across a section of the image (black arrow). (C) qRT-PCR analysis of transcription 24h following NT of RA-ESC #5 nuclei in the presence of either alpha amanitin, anti-HIRA Antibody, or control Antibody. Error bars indicate s.e.m. (n=3) (D) Western Blot analysis of *Xenopus* HIRA expression 48h following injection of HIRA mRNA to the oocytes. (E) qRT-PCR analysis of transcription 24h following the transfer of RA-ESC #5 nuclei in the presence or absence of anti-HIRA antibody in GVs of oocytes pre-injected with various doses of HIRA mRNA. Error bars indicate s.e.m. (n=3). ✶ indicate p-value<0.05, (T-TEST).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Level of GFP and HA tagged H3.2 or H3.3 expressed in *Xenopus* oocyte following mRNA injection.

2ng of mRNAs encoding H3.2-HA or H3.3-HA, or 3ng of H3.2-GFP or H3.3-GFP mRNAs were injected to the cytoplasm of *Xenopus* oocyte. Forty-eight hours after injection, proteins were extracted from the oocyte and subjected to WB analysis. We loaded the equivalent of 1 – 0,5 – 0,25 oocyte for each condition. Membranes were probed with antibodies specific for H3.3, HA or GFP tags. Memcode staining served as a loading control.

Figure S2: Kinetics of H3.3 deposition into transplanted nuclei.

A time-lapse analysis was performed on H3.2-cherry expressing ESC nuclei transplanted into H3.3 GFP expressing oocyte germinal vesicles. Twenty-four hours after H3.3-GFP mRNA injection to the oocyte cytoplasm, the oocyte germinal vesicle (GV) was isolated in oil. H3.2-cherry ESC nuclei were then transplanted to these oil-GVs and analyzed by confocal microscopy for a period of 15 hours.

Figure S3: qRT-PCR analysis of gene expression in reporter ESCs with or without retinoic acid differentiation.

ESCs containing an Oct4 reporter (ESC #5) were cultured either in the presence of LIF or in the absence of LIF and with retinoic acid (1mM) for a period of 5 days. Cells were then collected, mRNA extracted, and gene expression was measured by qRT-PCR.

Figure S4: DNA synthesis independent chromatin assembly on plasmid DNA injected to oocyte is inhibited by anti-HIRA antibody.

We performed *in vivo* chromatin assembly according to Roche *et al*, Methods Mol Biol., 129-47, 2006. Circular dsDNA plasmid pBS0 (10ng) was injected to *Xenopus* oocyte germinal vesicle together with 16nL of water (-), preimmune serum, or anti-HIRA antibody solutions. DNA synthesis independent chromatin assembly was then allowed to proceed by incubating the oocyte for different amount of time (from 15 to 360 minutes), after which plasmid DNA was recovered, deproteinized, and analyzed by electrophoresis. For each condition, we loaded the purified DNA from 25 oocytes and input corresponds to 150ng of pBS0. The presence of the anti-HIRA antibody inhibits chromatin assembly on the injected plasmid, as shown by reduced supercoiling.

Figure S5: Confocal analysis of H3.3 or H3.2 accumulation onto transplanted

chromatin following nuclear transfer to oocytes in conditions where HIRA is inhibited. Oocytes were preinjected with H3.3-GFP or H3.2-GFP mRNA. H3.2-cherry expressing ESC #5 nuclei were then transplanted to the oocyte in the presence of anti-HIRA Antibody or control Antibody. Forty-eight hours after transplantation, H3.3-GFP (top panel) or H3.2-GFP (bottom panel) loading onto chromatin was analyzed by confocal imaging of isolated GVs. Images are Z-stacks projection.

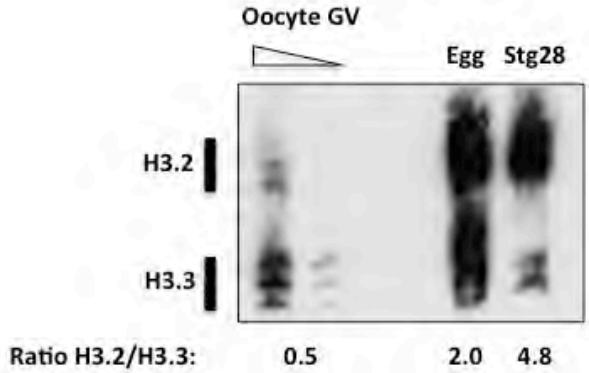
REFERENCES

1. Koche, R.P. *et al.* Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell* **8**, 96-105 (2011).
2. Murata, K., Kouzarides, T., Bannister, A.J. & Gurdon, J.B. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin* **3**, 4 (2010).
3. Pasque, V., Gillich, A., Garrett, N. & Gurdon, J.B. Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *EMBO J* **30**, 2373-87 (2011).
4. Ng, R.K. & Gurdon, J.B. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* **10**, 102-9 (2008).
5. Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N. & Gurdon, J.B. Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5483-8 (2010).
6. Goldberg, A.D. *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**, 678-91.
7. Schwartz, B.E. & Ahmad, K. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* **19**, 804-14 (2005).
8. Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. & Almouzni, G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell* **24**, 309-16 (2006).
9. Ray-Gallet, D. *et al.* HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* **9**, 1091-100 (2002).
10. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61 (2004).
11. Loppin, B. *et al.* The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* **437**, 1386-90 (2005).
12. Szenker E., Lacoste N. & G., A. A Developmental Requirement for HIRA-Dependent H3.3 Deposition Revealed at Gastrulation in Xenopus *Cell Reports* **1**, 730-740 (2012).
13. Almouzni, G. & Wolffe, A.P. Replication-coupled chromatin assembly is required for the repression of basal transcription in vivo. *Genes Dev* **7**, 2033-47 (1993).
14. Meshorer, E. *et al.* Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* **10**, 105-16 (2006).
15. Ahmad, K. & Henikoff, S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**, 1191-200 (2002).

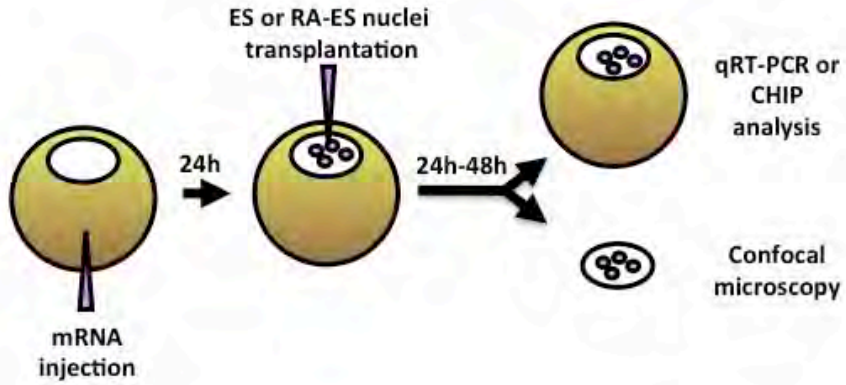
16. Ray-Gallet, D. *et al.* Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol Cell* **44**, 928-41 (2011).
17. Martens, J.H. *et al.* The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* **24**, 800-12 (2005).
18. Feldman, N. *et al.* G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* **8**, 188-94 (2006).
19. Probst, A.V. *et al.* A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* **19**, 625-38 (2010).
20. Santenard, A. *et al.* Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* **12**, 853-62 (2010).
21. Miyamoto, K., Pasque, V., Jullien, J. & Gurdon, J.B. Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes *Genes Dev* **25**, 946-58 (2011).
22. Halley-Stott, R.P. *et al.* Mammalian nuclear transplantation to Germinal Vesicle stage Xenopus oocytes - a method for quantitative transcriptional reprogramming. *Methods* **51**, 56-65 (2010).
23. Astrand, C., Belikov, S. & Wrange, O. Histone acetylation characterizes chromatin presetting by NF1 and Oct1 and enhances glucocorticoid receptor binding to the MMTV promoter. *Exp Cell Res* **315**, 2604-15 (2009).
24. Birkenmeier, E.H., Brown, D.D. & Jordan, E. A nuclear extract of Xenopus laevis oocytes that accurately transcribes 5S RNA genes. *Cell* **15**, 1077-86 (1978).
25. Ray-Gallet, D. & Almouzni, G. DNA synthesis-dependent and -independent chromatin assembly pathways in Xenopus egg extracts. *Methods Enzymol* **375**, 117-31 (2004).
26. Zweidler, A. Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. *Methods Cell Biol* **17**, 223-33 (1978).
27. Ray-Gallet, D. *et al.* HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Molecular cell* **9**, 1091-100 (2002).

FIGURES

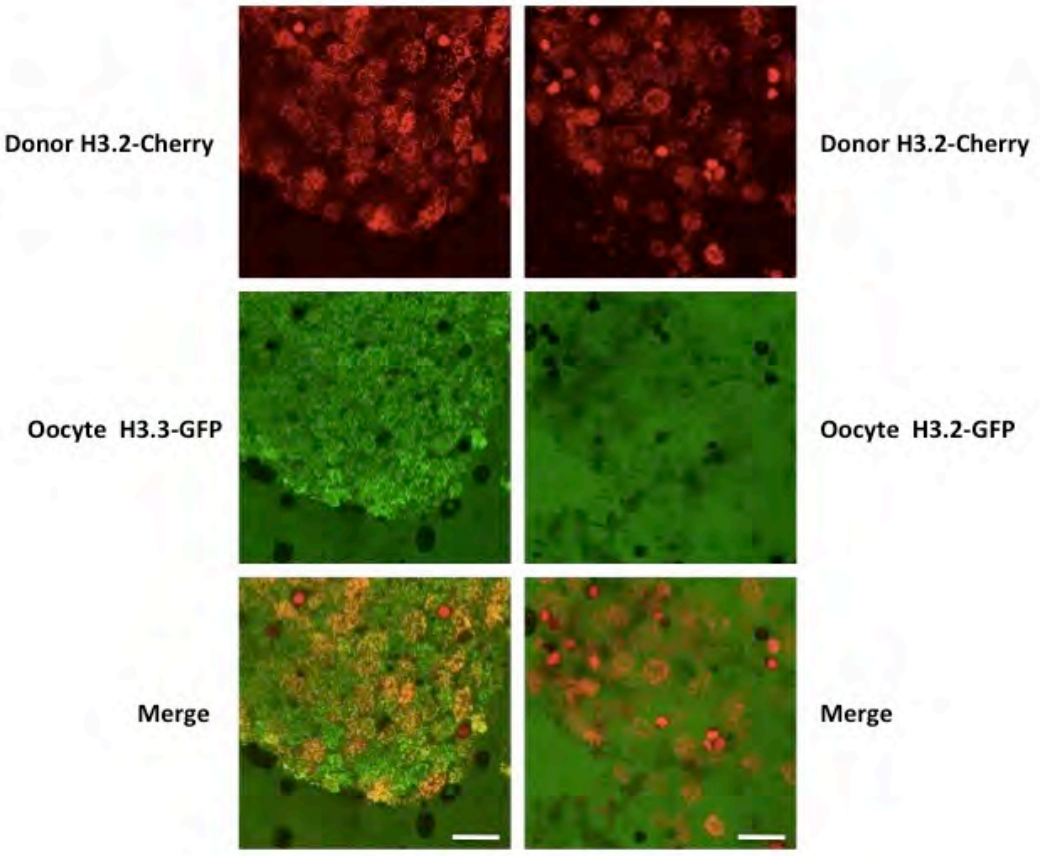
1-A



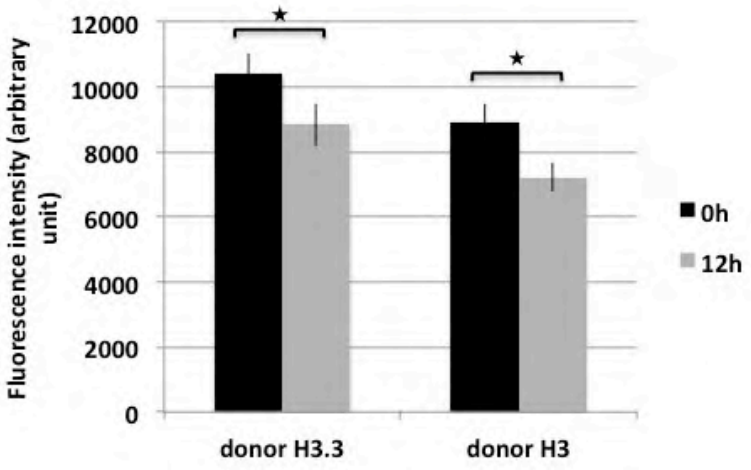
1-B

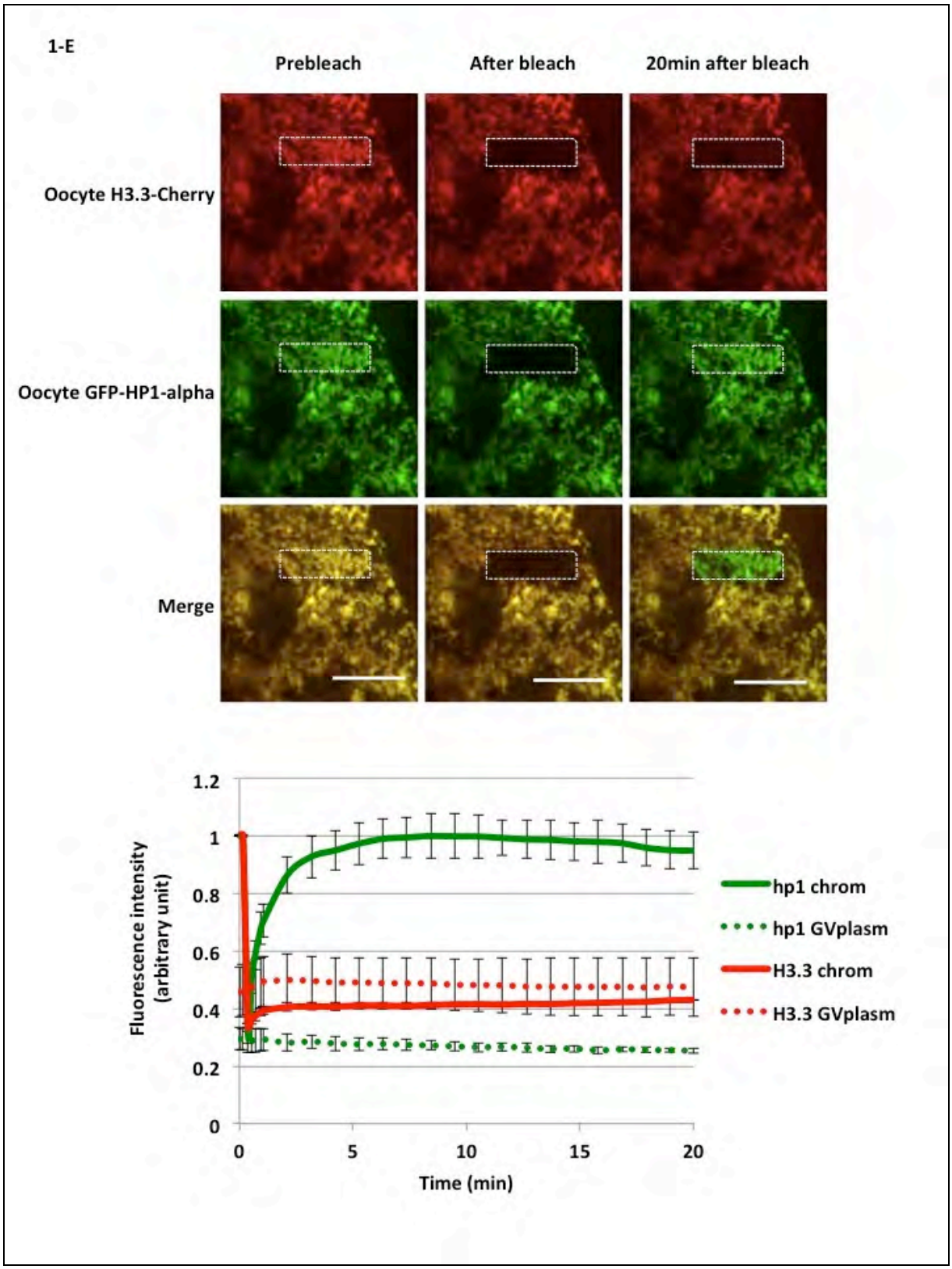


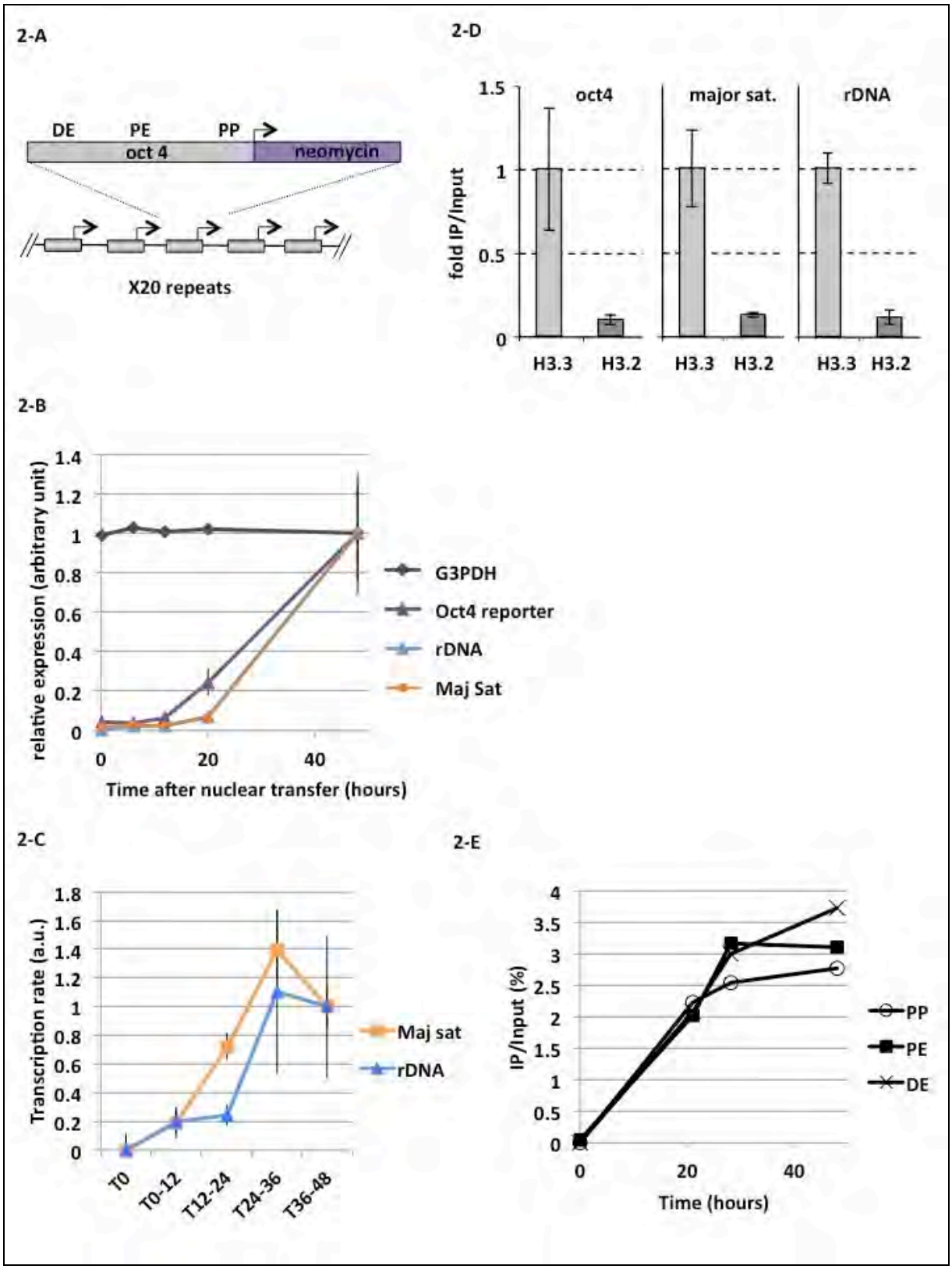
1-C

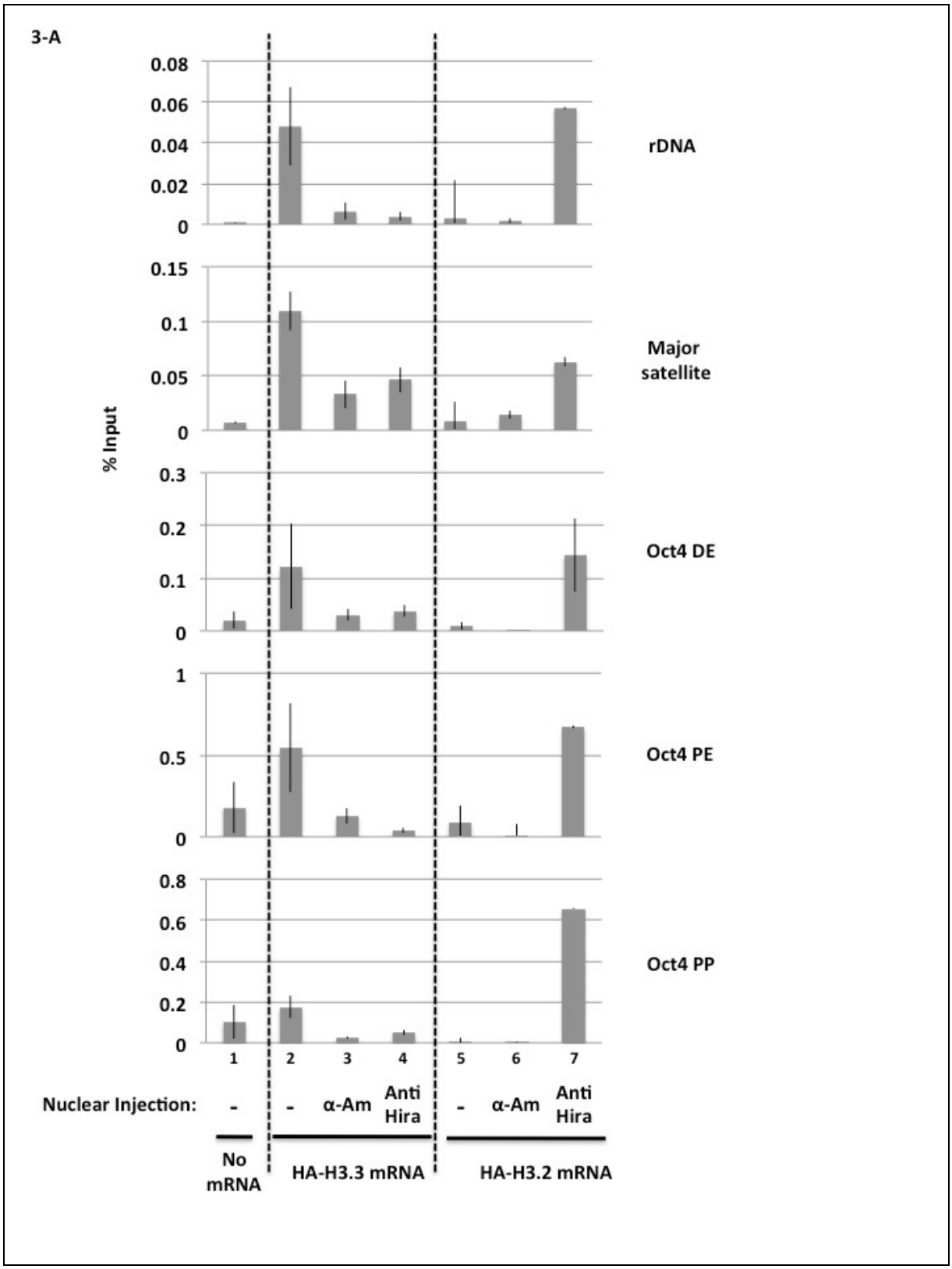

Donor H3.2-Cherry
Donor H3.2-Cherry
Oocyte H3.3-GFP
Oocyte H3.2-GFP
Merge
Merge

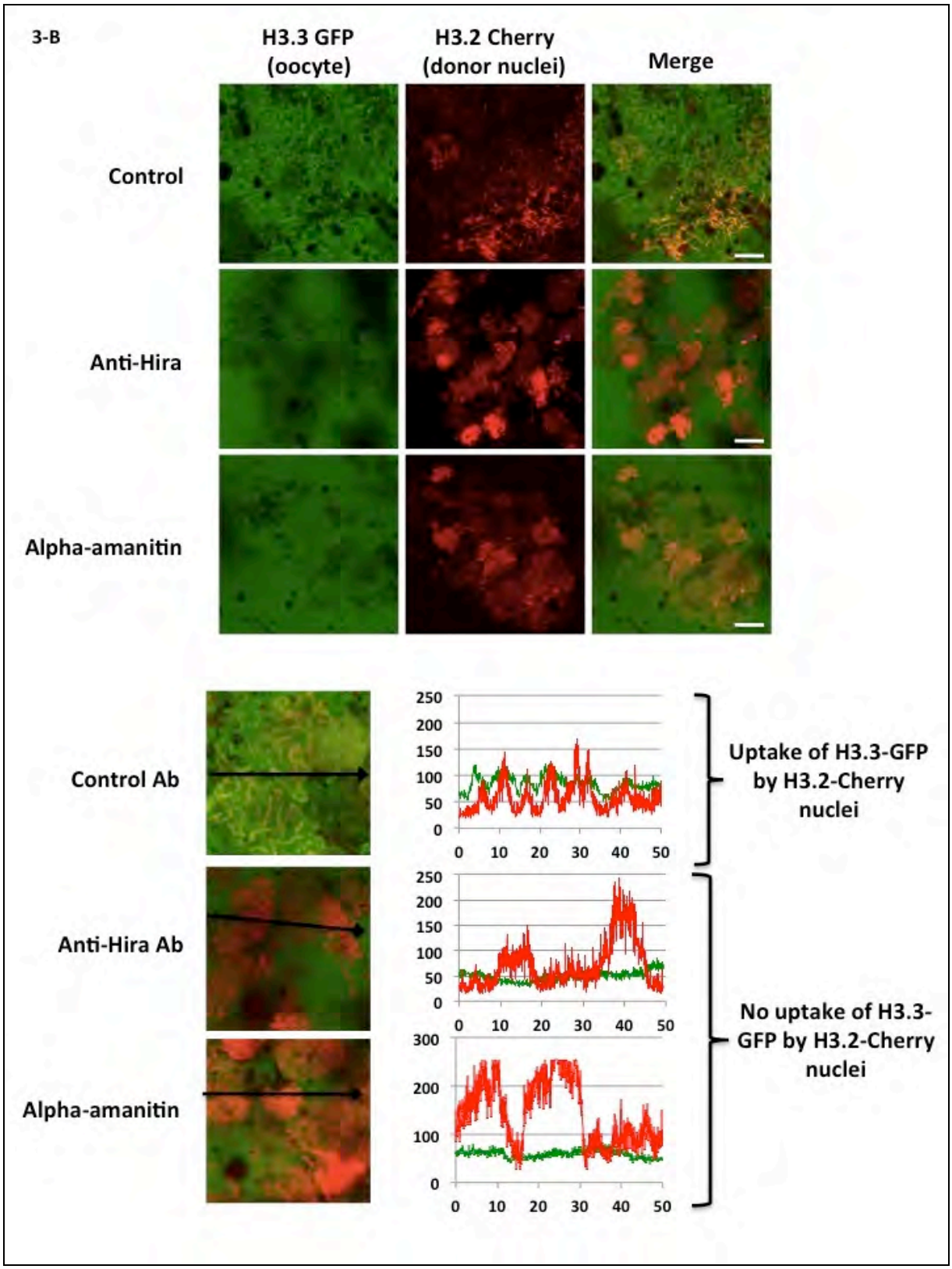
1-D


Fluorescence intensity (arbitrary unit)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
donor H3.3
donor H3
0h
12h

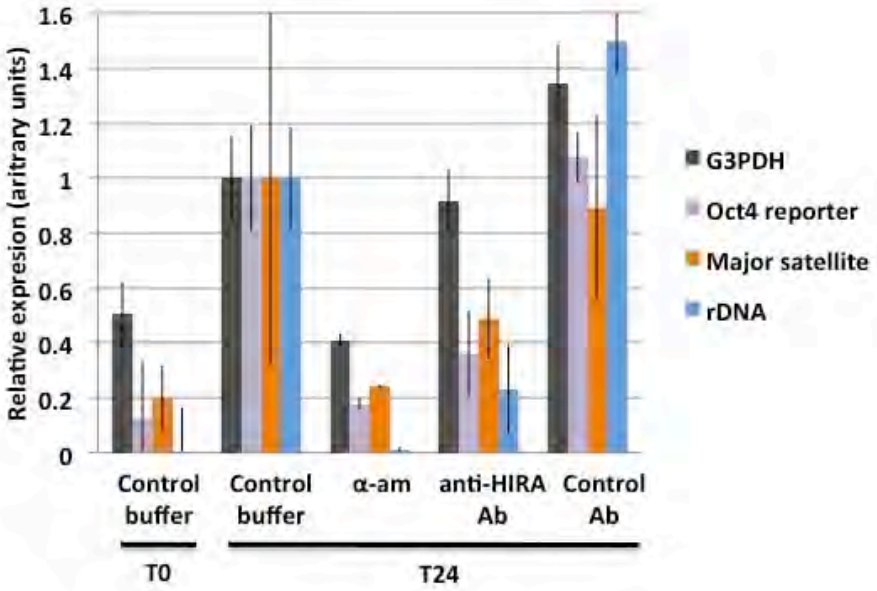

1-E
Prebleach
After bleach
20min after bleach
Oocyte H3.3-Cherry
Oocyte GFP-HP1-alpha
Merge
Fluorescence intensity (arbitrary unit)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
5
10
15
20
Time (min)
hp1 chrom
hp1 GVplasm
H3.3 chrom
H3.3 GVplasm


2-A
DE
PE
PP
oct 4
neomycin
X20 repeats
2-D
oct4
major sat.
rDNA
fold IP/Input
1.5
1
0.5
0
H3.3
H3.2
H3.3
H3.2
H3.3
H3.2
2-B
relative expression (arbitrary unit)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
Time after nuclear transfer (hours)
G3PDH
Oct4 reporter
rDNA
Maj Sat
2-C
Transcription rate (a.u.)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T0
T0-12
T12-24
T24-36
T36-48
Maj sat
rDNA
2-E
IP/Input (%)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
Time (hours)
PP
PE
DE


3-A
% Input
rDNA
Major satellite
Oct4 DE
Oct4 PE
Oct4 PP
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.15
0.1
0.05
0.3
0.2
1
0.5
0.8
0.6
0.4
1 2 3 4 5 6 7
Nuclear Injection: - - α-Am Anti Hira - α-Am Anti Hira
No mRNA
HA-H3.3 mRNA
HA-H3.2 mRNA


3-B
H3.3 GFP (oocyte)
H3.2 Cherry (donor nuclei)
Merge
Control
Anti-Hira
Alpha-amanitin
Control Ab
Anti-Hira Ab
Alpha-amanitin
Uptake of H3.3-GFP by H3.2-Cherry nuclei
No uptake of H3.3-GFP by H3.2-Cherry nuclei

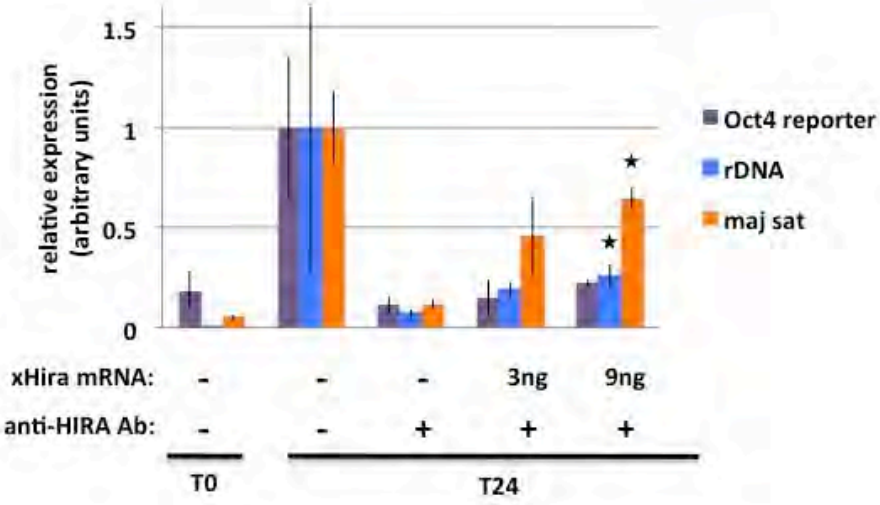
3-C


Relative expresion (aritrary units)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
G3PDH
Oct4 reporter
Major satellite
rDNA
Control buffer
Control buffer
α-am
anti-HIRA Ab
Control Ab
T0
T24

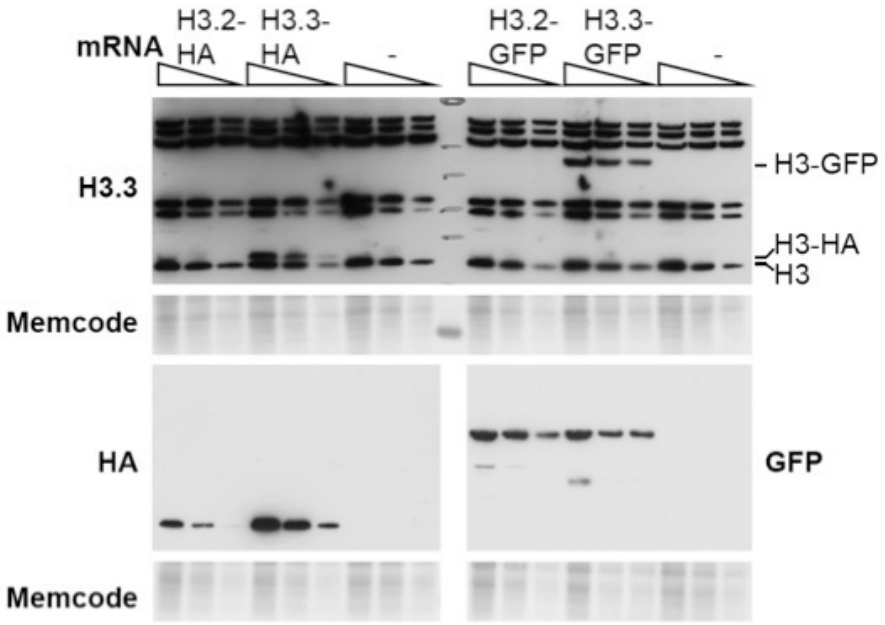
3-D


mRNA: - xHira
Anti-Hira
Anti -Actin

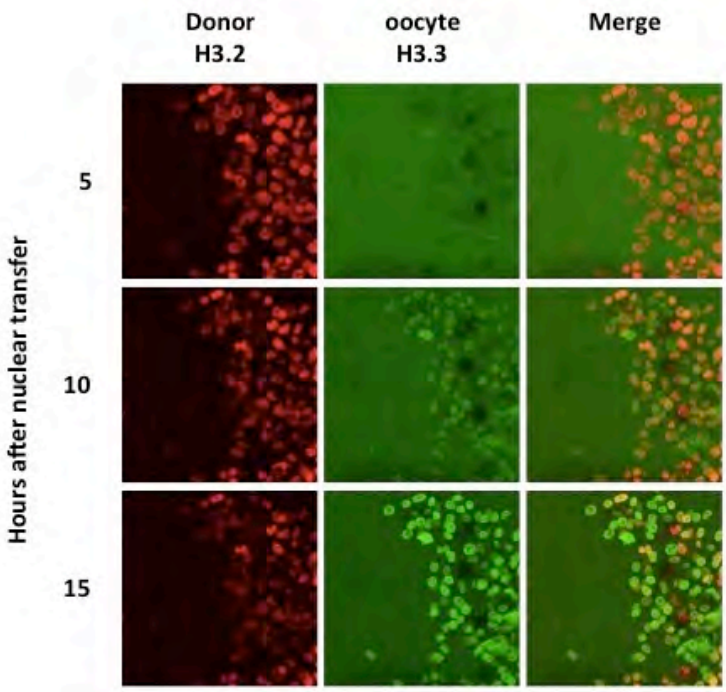
3-E


relative expression (arbitrary units)
1.5
1
0.5
0
Oct4 reporter
rDNA
maj sat
xHira mRNA: - - - 3ng 9ng
anti-HIRA Ab: - - + + +
T0
T24

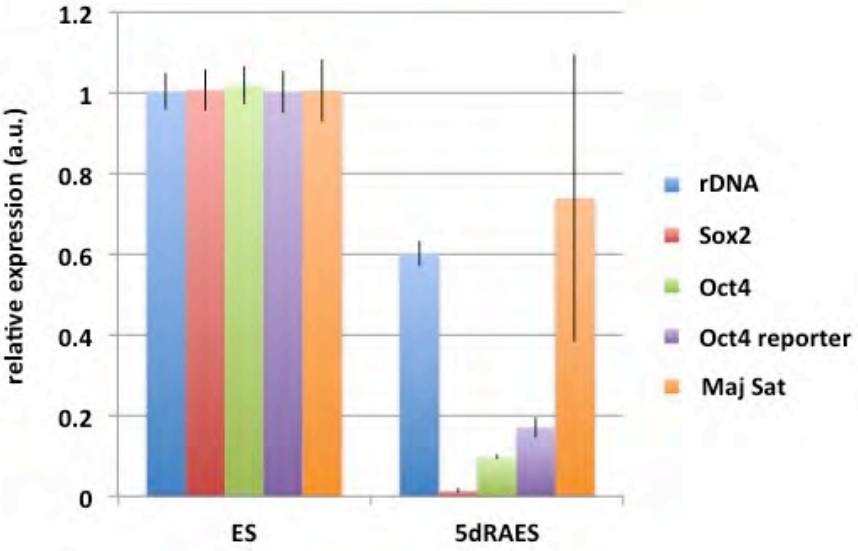
S1


mRNA
H3.2-HA
H3.3-HA
-
H3.2-GFP
H3.3-GFP
-
H3.3
H3-GFP
H3-HA
H3
Memcode
HA
GFP
Memcode

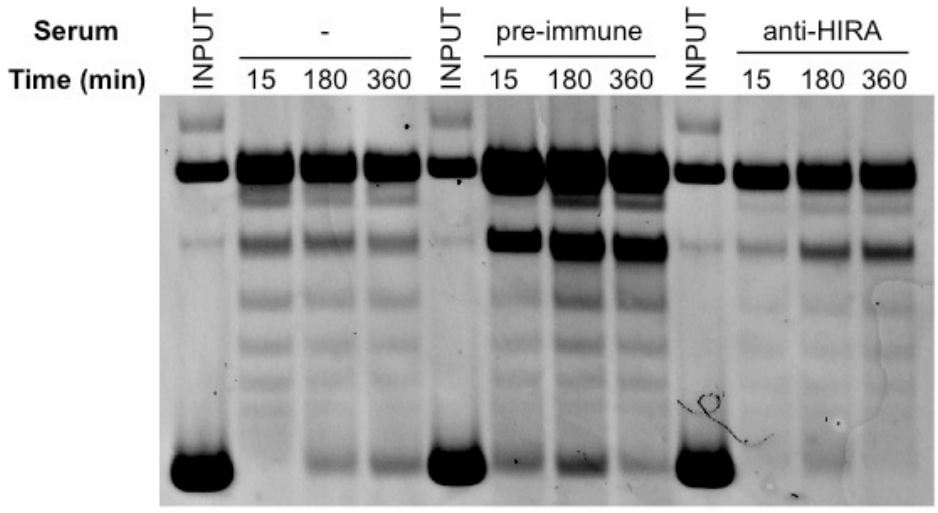
S2


Donor
H3.2
oocyte
H3.3
Merge
Hours after nuclear transfer
5
10
15

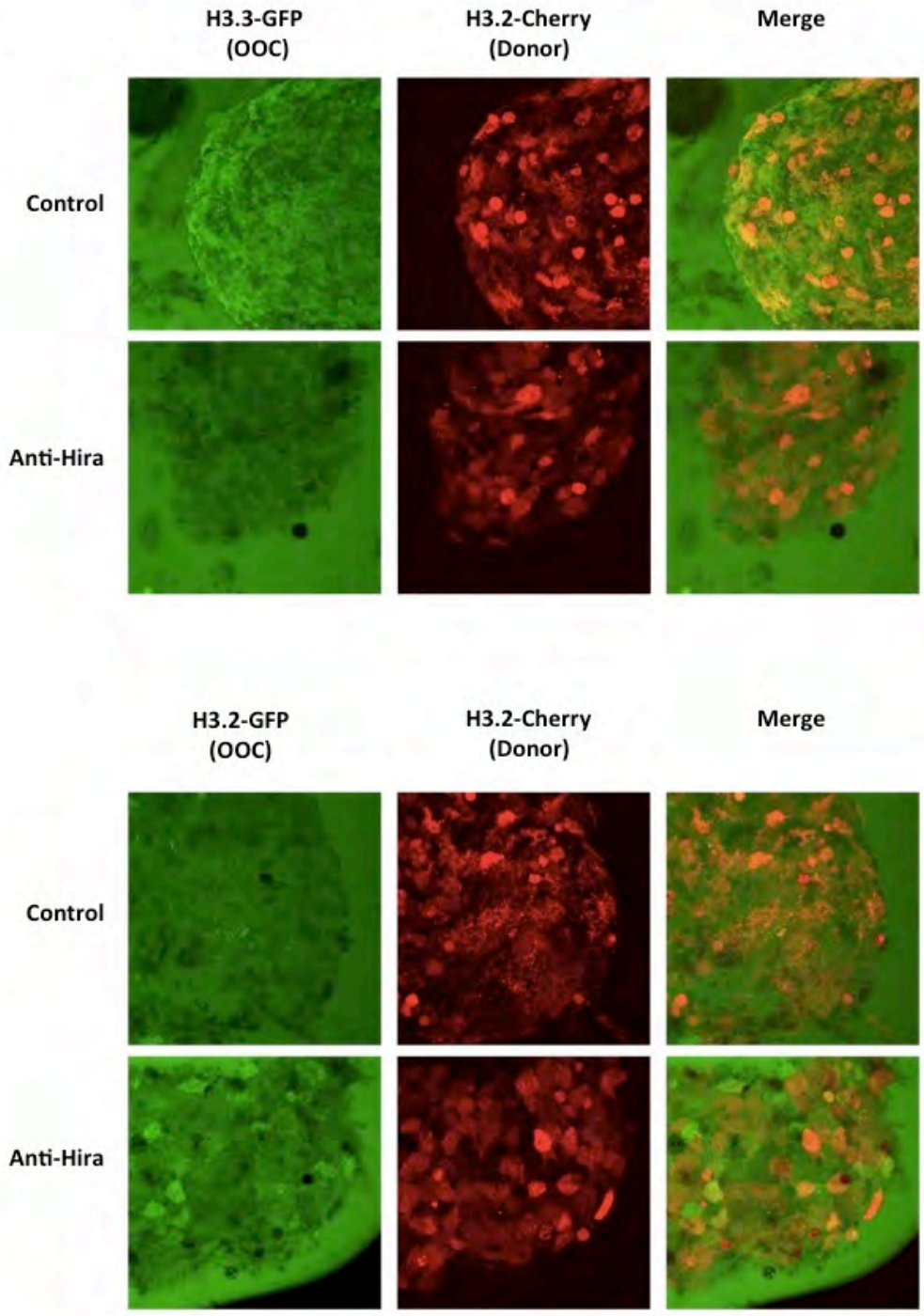
S3


relative expression (a.u.)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ES
5dRAES
rDNA
Sox2
Oct4
Oct4 reporter
Maj Sat

S4


Serum
Time (min)
INPUT
-
15 180 360
INPUT
pre-immune
15 180 360
INPUT
anti-HIRA
15 180 360

S5


H3.3-GFP
(OOC)
H3.2-Cherry
(Donor)
Merge
Control
Anti-Hira
H3.2-GFP
(OOC)
H3.2-Cherry
(Donor)
Merge
Control
Anti-Hira

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamson, E.D., and Woodland, H.R. (1974). Histone synthesis in early amphibian development: histone and DNA syntheses are not co-ordinated. Journal of Molecular Biology *88*, 263–285.

Adamson, E.D., and Woodland, H.R. (1977). Changes in the rate of histone synthesis during oocyte maturation and very early development of Xenopus laevis. Developmental Biology *57*, 136–149.

Agger, K., Christensen, J., Cloos, P.A.C., and Helin, K. (2008). The emerging functions of histone demethylases. Current Opinion in Genetics & Development *18*, 159–168.

Agius, E., Oelgeschläger, M., Wessely, O., Kemp, C., and De Robertis, E.M. (2000). Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in Xenopus. Development *127*, 1173–1183.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002a). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *99 Suppl 4*, 16477–16484.

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

Ahmed, E.A., Philippens, M.E.P., Kal, H.B., de Rooij, D.G., and de Boer, P. (2010). Genetic probing of homologous recombination and non-homologous end joining during meiotic prophase in irradiated mouse spermatocytes. Mutat. Res. *688*, 12–18.

Akhtar, A., and Gasser, S.M. (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. Nat Rev Genet *8*, 507–517.

Akkers, R.C., van Heeringen, S.J., Jacobi, U.G., Janssen-Megens, E.M., FranCoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., and Veenstra, G.J.C. (2009). A Hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 Acquisition in Spatial Gene Regulation in Xenopus Embryos. Developmental Cell *17*, 425–434.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acethylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *51*, 786–794.

Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? Nat Rev Genet *9*, 923–937.

Almouzni, G., and Probst, A.V. (2011). Heterochromatin maintenance and establishment: Lessons from the mouse pericentromere. Nucleus *2*, 332–338.

Almouzni, G., and Wolffe, A.P. (1995). Constraints on transcriptional activator function contribute to transcriptional quiescence during early Xenopus embryogenesis. Embo J. *14*, 1752–1765.

Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S., and Wolffe, A.P. (1994). Histone acetylation influences both gene expression and development of Xenopus laevis. Developmental Biology *165*, 654–669.

Amaya, E., Musci, T.J., and Kirschner, M.W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in Xenopus embryos. Cell *66*, 257–270.

Ancel, P., and Vintemberger, P.C. (1948). Recherches sur le déterminisme de la symétrie bilatérale dans l'œuf des amphibiens.

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

Antequera, F., and Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *90*, 11995–11999.

Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *92*, 11170–11174.

Aristote (343AD). Traité de la génération des animaux (Traduit pour la première fois par J. Barthélemy Saint Hilaire en 1887, Librairie Hachette).

Augui, S., Nora, E.P., and Heard, E. (2011). Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. Nat Rev Genet *12*, 429–442.

Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types (J. Exp. Med.).

Bachvarova, R., Davidson, E.H., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E. (1966). Activation of RNA synthesis associated with gastrulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *55*, 358–365.

Baer, von, K.E. (1828). Über die Entwickelungsgeschichte der Thiere.

Bakos, M.A., Kurosky, A., and Hedrick, J.L. (1990). Physicochemical characterization of progressive changes in the Xenopus laevis egg envelope following oviductal transport and fertilization. Biochemistry *29*, 609–615.

Balaji, S., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2009). HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. Mol. BioSyst. *5*, 269.

Baldessari, D., Shin, Y., Krebs, O., König, R., Koide, T., Vinayagam, A., Fenger, U., Mochii, M., Terasaka, C., and Kitayama, A. (2005). Global gene expression profiling and cluster analysis in Xenopus laevis. Mechanisms of Development *122*, 441–475.

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

Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrake, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R., and Adams, P.D. (2009). Human UBN1 Is an Ortholog of Yeast Hpc2p and Has an Essential Role in the HIRA/ASF1a Chromatin-Remodeling Pathway in Senescent Cells. Molecular and Cellular Biology *29*, 758–770.

Bazett-Jones, D.P. (1992). Electron spectroscopic imaging of chromatin and other nucleoprotein complexes. Electron Microsc. Rev. *5*, 37–58.

Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. Annu. Rev. Biochem. *71*, 333–374.

Bergink, E.W., and Wallace, R.A. (1974). Precursor-product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. J. Biol. Chem. *249*, 2897–2903.

Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., and Schreiber, S.L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *99*, 8695–8700.

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., and Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. Journal of Molecular Biology *203*, 971–983.

Bhaumik, S.R., Smith, E., and Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. Nat Struct Mol Biol *14*, 1008–1016.

Billon, P., and Côté, J. (2012). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. BBA - Gene Regulatory Mechanisms *1819*, 290–302.

Bird, A., Tate, P., Nan, X., Campoy, J., MEEHAN, R., Cross, S., Tweedie, S., Charlton, J., and Macleod, D. (1995). Studies of DNA methylation in animals. J. Cell Sci. Suppl. *19*, 37–39.

Bird, A.P. (1993). Functions for DNA methylation in vertebrates. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *58*, 281–285.

Bird, A.P. (1995). Gene number, noise reduction and biological complexity. Trends in Genetics *11*, 94–100.

Birkenmeier, E.H., BROWN, D.D., and Jordan, E. (1978). A nuclear extract of Xenopus laevis oocytes that accurately transcribes 5S RNA genes. Cell *15*, 1077–1086.

Birsoy, B. (2005). XPACE4 is a localized pro-protein convertase required for mesoderm induction and the cleavage of specific TGF proteins in Xenopus development. Development *132*, 591–602.

Blythe, S.A., Reid, C.D., Kessler, D.S., and Klein, P.S. (2009). Chromatin immunoprecipitation in early Xenopus laevisembryos. Dev. Dyn. *238*, 1422–1432.

Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. PLoS Biol *3*, e157.

Bonnefoy, E., Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2007). The Essential Role of Drosophila HIRA for De Novo Assembly of Paternal Chromatin at Fertilization. PLoS Genet *3*, e182.

Bonnell, B.S., and Chandler, D.E. (1996). Egg jelly layers of Xenopus laevis are unique in ultrastructure and sugar distribution. Mol. Reprod. Dev. *44*, 212–220.

Bonner, W.M. (1975). Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. The Journal of Cell Biology *64*, 421–430.

Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2008). A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. Cell Cycle *7*, 3499–3502.

Bouvet, P., Dimitrov, S., and Wolffe, A.P. (1994). Specific regulation of Xenopus chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1. Genes & Development *8*, 1147–1159.

Boveri, T. (1909). Die blastomerenkerne von ascaris megalocephala und die theorie

der chromosomenindividualität. Archiv Für Zellforschung 181–268.

Boyarchuk, E., Montes de Oca, R., and Almouzni, G. (2011). Cell cycle dynamics of histone variants at the centromere, a model for chromosomal landmarks. Current Opinion in Cell Biology.

Boyes, J., and Bird, A. (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. Cell *64*, 1123–1134.

Brachet, J. (1977). An old enigma: the gray crescent of amphibian eggs. Current Topics in Developmental Biology *11*, 133–186.

Brannon, M., and Kimelman, D. (1996). Activation of Siamois by the Wnt pathway. Developmental Biology *180*, 344–347.

Braunschweig, U., Hogan, G.J., Pagie, L., and van Steensel, B. (2009). Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. Embo J. 1–11.

Briggs, R.R., and King, T.J.T. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *38*, 455–463.

Brown, D. (1967). The genes for ribosomal RNA and their transcription during amphibian development. Current Topics in Developmental Biology *2*, 47–73.

Brown, D., and Dawid, I.B. (1968). Specific gene amplification in oocytes. Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA. Science *160*, 272–280.

Brown, D.T. (2001). Histone variants: are they functionally heterogeneous? Genome Biol. *2*, 1–6.

Brown, S.W. (1966). Heterochromatin. Science *151*, 417–425.

Busa, W.B., and Nuccitelli, R. (1985). An elevated free cytosolic Ca2+ wave follows fertilization in eggs of the frog, Xenopus laevis. The Journal of Cell Biology *100*, 1325–1329.

Buschbeck, M., Uribesalgo, I., Wibowo, I., Rué, P., Martin, D., Gutierrez, A., Morey, L., Guigó, R., López-Schier, H., and Di Croce, L. (2009). The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. Nat Struct Mol Biol *16*, 1074–1079.

Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2005). How to pack the genome for a safe trip. Prog Mol Subcell Biol *38*, 65–89.

Casey, E.S., O'Reilly, M.A., Conlon, F.L., and Smith, J.C. (1998). The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. Development *125*, 3887–3894.

Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. The Journal of Cell Biology *152*, 375–384.

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

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

Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M. (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the Xenopus homeobox gene goosecoid. Cell *67*, 1111–1120.

Choi, S.-C., and Sokol, S.Y. (2009). The involvement of lethal giant larvae and Wnt signaling in bottle cell formation in Xenopus embryos. Developmental Biology *336*, 68–75.

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

Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M., and Smith, J.C. (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. Development *122*, 2427–2435.

Cooper, D.L., Lahue, R.S., and Modrich, P. (1993). Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. J. Biol. Chem. *268*, 11823–11829.

Corpet, A., and Almouzni, G. (2009). Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. Trends in Cell Biology *19*, 29–41.

Corpet, A., De Koning, L., Toedling, J., Savignoni, A., Berger, F., Lemaître, C., O'Sullivan, R.J., Karlseder, J., Barillot, E., Asselain, B., et al. (2011). Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation,

is predictive of outcome in breast cancer. Embo J. *30*, 480–493.

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

Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H., and 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*, 2489–2495.

Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. The Journal of Cell Biology *145*, 1119–1131.

Cunliffe, V., and Smith, J.C. (1992). Ectopic mesoderm formation in Xenopus embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. Nature *358*, 427–430.

Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. Curr. Biol. *13*, 2148–2158.

Dale, L., and Slack, J.M. (1987). Regional specification within the mesoderm of early embryos of Xenopus laevis. Development *100*, 279–295.

Dale, L., Howes, G., Price, B.M., and Smith, J.C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early Xenopus development. Development *115*, 573–585.

Danilchik, M.V., and Gerhart, J.C. (1987). Differentiation of the animal-vegetal axis in Xenopus laevis oocytes. I. Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient. Developmental Biology *122*, 101–112.

Darribère, T. (2002). Introduction à la biologie du développement (Belin).

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution†. Journal of Molecular Biology *319*, 1097–1113.

Dawid, I.B. (1966). Evidence for the mitochondrial origin of frog egg cytoplasmic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *56*, 269–276.

De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. Nat Struct Mol Biol *14*, 997–1007.

De Robertis, E.M. (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. Mechanisms of Development *126*, 925–941.

De Robertis, E.M., and Gurdon, J.B. (1977). Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *74*, 2470–2474.

Dent, J.A., Polson, A.G., and Klymkowsky, M.W. (1989). A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in Xenopus. Development *105*, 61–74.

Dilworth, S.M., Black, S.J., and Laskey, R.A. (1987). Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in Xenopus egg extracts. Cell *51*, 1009–1018.

Dimitrov, S., ALMOUZNI, G., Dasso, M., and Wolffe, A.P. (1993). Chromatin transitions during early Xenopus embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. Developmental Biology *160*, 214–227.

Dobrovolskaïa-Zavadskaïa, N. (1927). Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire “on-viable.” C. R. Seances SOc. Biol. Fil. 114–116.

Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in Xenopus. Development *124*, 2325–2334.

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

Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. Genes & Development *24*, 1253–1265.

Driesh, H. (1894). *Analytische Theorie der organischen Entwicklung* or *Analytic Theory of Organic Development*.

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. *136*, 153–179.

Dunican, D.S., Ruzov, A., Hackett, J.A., and Meehan, R.R. (2008). xDnmt1 regulates transcriptional silencing in pre-MBT Xenopus embryos independently of its catalytic function. Development *135*, 1295–1302.

Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. Cell *137*, 485–497.

Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D., and Newport, J. (1988). The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell *54*, 423–431.

Elinson, R.P., and Rowning, B. (1988). A transient array of parallel microtubules in frog eggs: potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. Developmental Biology *128*, 185–197.

Elinson, R.P.R. (1975). Site of sperm entry and a cortical contraction associated with egg activation in the frog Rana pipiens. Developmental Biology *47*, 257–268.

Eltsov, M., Maclellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 19732–19737.

Fagotto, F., Guger, K., and Gumbiner, B.M. (1997). Induction of the primary dorsalizing center in Xenopus by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. Development *124*, 453–460.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. Nature *421*, 448–453.

Ferrell, J.E.J., Wu, M.M., Gerhart, J.C.J., and Martin, G.S.G. (1991). Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs. Molecular and Cellular Biology *11*, 1965–1971.

Félix, M.A., Antony, C., Wright, M., and Maro, B. (1994). Centrosome assembly in vitro: role of gamma-tubulin recruitment in Xenopus sperm aster formation. The Journal of Cell Biology *124*, 19–31.

Filion, G.J., van Bemmel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., et al. (2010). Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in Drosophila Cells. Cell *143*, 212–224.

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

Fisher, M.E., Isaacs, H.V., and Pownall, M.E. (2002). eFGF is required for activation of XmyoD expression in the myogenic cell lineage of Xenopus laevis. Development *129*, 1307–1315.

Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.

Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. Cell *137*, 472–484.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *102*, 10604–10609.

Frank, D., and Harland, R.M. (1991). Transient expression of XMyoD in non-somitic mesoderm of Xenopus gastrulae. Development *113*, 1387–1393.

Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. Nature *266*, 273–275.

Fussner, E., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Living without 30nm chromatin fibers. Trends in Biochemical Sciences *36*, 1–6.

Gaillard, P.H., Martini, E.M., Kaufman, P.D., Stillman, B., Moustacchi, E., and ALMOUZNI, G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. Cell *86*, 887–896.

Gall, J.G. (1968). Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oögenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *60*, 553–560.

Gamble, M., and Kraus, W.L. (2010). Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: From genomics to cell biology. Cell Cycle *9*, 70–69.

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. Nat Rev Mol Cell Biol *12*, 36–47.

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason, M.J., Heidersbach, A., Ramalho-Santos, J., McManus, M.T., Plath, K., Meshorer, E., et al. (2009). Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. Nature *460*, 863–868.

Gautier, J., and Maller, J.L. (1991). Cyclin B in Xenopus oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. Embo J. *10*, 177–182.

Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P., and Maller, J. (1989). Dephosphorylation and activation of Xenopus p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. Nature *339*, 626–629.

Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. Cell *54*, 433–439.

Gawantka, V., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene Xvent-1. Embo J. *14*, 6268–6279.

Gebauer, F., Xu, W., Cooper, G.M., and Richter, J.D. (1994). Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. Embo J. *13*, 5712–5720.

Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B., and Stewart, R. (1989). Cortical rotation of the Xenopus egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. Development *107 Suppl*, 37–51.

Gilbert, S.F. (2010). Developmental Biology. 711.

Gimlich, R.L., and Gerhart, J.C. (1984). Early cellular interactions promote embryonic axis formation in Xenopus laevis. Developmental Biology *104*, 117–130.

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., and Li, X. (2010). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. Cell *140*, 678–691.

Gont, L.K.L., Steinbeisser, H.H., Blumberg, B.B., and De Robertis, E.M.E. (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the Xenopus tailbud derive from the late blastopore lip. Development *119*, 991–1004.

Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. European Journal of Biochemistry *271*, 3459–3469.

Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. The Journal of Cell Biology *176*, 283–294.

Graff, J.M., Bansal, A., and Melton, D.A. (1996). Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. Cell *85*, 479–487.

Graham, C.F., Arms, K., and Gurdon, J.B. (1966). The induction of DNA synthesis by frog egg cytoplasm. Developmental Biology *14*, 349–381.

Green, J. (1999). The animal cap assay. … In Molecular Biology-Clifton Then Totowa.

Green, J.B., New, H.V., and Smith, J.C. (1992). Responses of embryonic Xenopus cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. Cell *71*, 731–739.

Grewal, S.I.S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. Nat Rev Genet *8*, 35–46.

Grey, R.D., Bastiani, M.J., Webb, D.J., and Schertel, E.R. (1982). An electrical block is required to prevent polyspermy in eggs fertilized by natural mating of Xenopus laevis. Developmental Biology *89*, 475–484.

Grey, R.D., Wolf, D.P., and Hedrick, J.L. (1974). Formation and structure of the fertilization envelope in Xenopus laevis. Developmental Biology *36*, 44–61.

Grey, R.D., Working, P.K., and Hedrick, J.L. (1976). Evidence that the fertilization envelope blocks sperm entry in eggs of Xenopus laevis: interaction of sperm with isolated envelopes. Developmental Biology *54*, 52–60.

Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J.L., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. Science *318*, 1928–1931.

Grunwald, D., Lawrence, J.J., and Khochbin, S. (1995). Accumulation of histone H1(0) during early Xenopus laevis development. Experimental Cell Research *218*, 586–595.

Guillemette, B., and Gaudreau, L. (2006). [H2A.Z: a histone variant that decorates gene promoters]. Med Sci (Paris) *22*, 941–946.

Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J Embryol Exp Morphol *10*, 622–640.

Gurdon, J.B. (1976). Injected nuclei in frog oocytes: fate, enlargement, and chromatin dispersal. J Embryol Exp Morphol *36*, 523–540.

Gurdon, J.B., and Hopwood, N. (2000). The introduction of Xenopus laevis into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. Int. J. Dev. Biol. *44*, 43–50.

Gurdon, J.B., and Uehlinger, V. (1966). “Fertile” intestine nuclei. Nature *210*, 1240–1241.

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature *233*, 177–182.

Haeckel, E. (1874). Anthropogenie oder Entwickelungsgeschichte des Menschen. Engelmann, Leipzig.

Hake, S.B. (2005). Expression Patterns and Post-translational Modifications Associated with Mammalian Histone H3 Variants. Journal of Biological Chemistry *281*, 559–568.

Halley-Stott, R.P., Pasque, V., Astrand, C., Miyamoto, K., Simeoni, I., Jullien, J., and Gurdon, J.B. (2010). Mammalian nuclear transplantation to Germinal Vesicle stage Xenopus oocytes - a method for quantitative transcriptional reprogramming. Methods *51*, 56–65.

Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature *460*, 473–478.

Happel, N., and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. Gene *431*, 1–12.

Harada, A., Okada, S., Konno, D., Odawara, J., Yoshimi, T., Yoshimura, S., Kumamaru, H., Saiwai, H., Tsubota, T., Kurumizaka, H., et al. (2012). Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. Embo J.

Hardin, J., and Keller, R. (1988). The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of Xenopus laevis. Development *103*, 211–230.

Harland, R.M. (1982). Inheritance of DNA methylation in microinjected eggs of Xenopus laevis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *79*, 2323–2327.

Harland, R.M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos. Methods Cell Biol. *36*, 685–695.

Harvey, W. (1651). Disputations Touching the Generation of Animals (Traduit par G. Whitteridge en 1981).

Hayes, J.J., and Wolffe, A.P. (1993). Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *90*, 6415–6419.

Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1994). Contacts of the globular domain of histone H5 and core histones with DNA in a "chromatosome". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *91*, 7817–7821.

Heasman, J. (2002). Morpholino Oligos: Making Sense of Antisense? Developmental Biology *243*, 209–214.

Heasman, J. (2006a). Maternal determinants of embryonic cell fate. Seminars in Cell & Developmental Biology *17*, 93–98.

Heasman, J. (2006b). Patterning the early Xenopus embryo. Development *133*, 1205–1217.

Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C.,

Noro, C.Y., and Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos. Cell *79*, 791–803.

Heasman, J., Kofron, M., and Wylie, C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: a novel antisense approach. Developmental Biology *222*, 124–134.

Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. Nat Genet *39*, 311–318.

Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. Jahrbuch Wiss Botanik 762–818.

Hellsten, U., Harland, R.M., Gilchrist, M.J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N.H., Shu, S., Taher, L., et al. (2010). The Genome of the Western Clawed Frog Xenopus tropicalis. Science *328*, 633–636.

Hemmati-Brivanlou, A., Frank, D., Bolce, M.E., Brown, B.D., Sive, H.L., and Harland, R.M. (1990). Localization of specific mRNAs in Xenopus embryos by whole-mount in situ hybridization. Development *110*, 325–330.

Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., and Lehrach, H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. Nature *343*, 617–622.

Hertwig, O. (1891). Traité d“embryologie; ou, Histoire du développement de l”homme et des vertébrés.

Hödl, M., and Basler, K. (2009). Transcription in the Absence of Histone H3.3. Current Biology 1–6.

Hogben, L. (1946). History of the Hogben test. Br Med J *12*, 554.

Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. Science *238*, 163–170.

Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W., and Woodcock, C.L. (1994). The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. The Journal of Cell Biology *125*, 1–10.

Houliston, E., and Elinson, R.P. (1991). Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in Xenopus laevis eggs. Development *112*, 107–117.

Howe, J.A., Howell, M., Hunt, T., and Newport, J.W. (1995). Identification of a developmental timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation. Genes & Development *9*, 1164–1176.

Hukriede, N.A., Tsang, T.E., Habas, R., Khoo, P.-L., Steiner, K., Weeks, D.L., Tam, P.P.L., and Dawid, I.B. (2003). Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation. Developmental Cell *4*, 83–94.

Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., and Hill, C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. Mol. Pharmacol. *62*, 65–74.

Isaacs, H.V., Pownall, M.E., and Slack, J.M. (1994). eFGF regulates Xbra expression during Xenopus gastrulation. Embo J. *13*, 4469–4481.

Ishibashi, T., Li, A., Eirin-Lopez, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J., and Ausio, J. (2010). H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. Nucleic Acids Research *38*, 1780–1789.

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., and Kishimoto, T. (2002). Coordinated regulation of M phase exit and S phase entry by the Cdc2 activity level in the early embryonic cell cycle.

Developmental Biology *243*, 34–43.

Jares, P., and Blow, J.J. (2000). Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. Genes & Development *14*, 1528–1540.

Jayaramaiah Raja, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by Drosophila melanogaster Protamines and Mst77F of Histones during Chromatin Condensation in Late Spermatids and Role of 0*25*, 6165–6177.

Jessus, C.C., Rime, H.H., Haccard, O.O., Van Lint, J.J., Goris, J.J., Merlevede, W.W., and Ozon, R.R. (1991). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of Xenopus oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. Development *111*, 813–820.

Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant–containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. Nature Publishing Group *41*, 941–945.

Jones, C.M.C., and Smith, J.C.J. (1998). Establishment of a BMP-4 morphogen gradient by long-range inhibition. Developmental Biology *194*, 12–17.

Joseph, E.M., and Melton, D.A. (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in Xenopus embryos. Development *125*, 2677–2685.

Jullien, J., and Gurdon, J.B. (2010). A natural oocyte component required for the reprogramming of somatic cell nuclei. Cell Cycle *9*, 2261–2262.

Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (2010). Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 5483–5488.

Kang, B., Pu, M., Hu, G., Wen, W., Dong, Z., Zhao, K., Stillman, B., and Zhang, Z. (2011). Phosphorylation of H4 Ser 47 promotes HIRA-mediated nucleosome assembly. Genes & Development *25*, 1359–1364.

Karaiskou, A. (2004). Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. Development *131*, 1543–1552.

Katagiri, C., and Ohsumi, K. (1994). Remodeling of sperm chromatin induced in egg extracts of amphibians. Int. J. Dev. Biol. *38*, 209–216.

Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. Cell *81*, 1105–1114.

Keller, R.E. (1975). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. Developmental Biology *42*, 222–241.

Keller, R.E. (1976). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of Xenopus laevis. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. Developmental Biology *51*, 118–137.

Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., and Shih, J. (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of Xenopus laevis. J Embryol Exp Morphol *89 Suppl*, 185–209.

Kessler, D.S., and Melton, D.A. (1994). Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning. Science *266*, 596–604.

Khochbin, S. (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. Gene

271, 1–12.

Khochbin, S., and Wolffe, A.P. (1994). Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. Eur. J. Biochem. *225*, 501–510.

Kim, H., Heo, K., Choi, J., Kim, K., and An, W. (2011). Histone variant H3.3 stimulates HSP70 transcription through cooperation with HP1. Nucleic Acids Research.

Kim, S.H., Li, C., and Maller, J.L. (1999). A maternal form of the phosphatase Cdc25A regulates early embryonic cell cycles in Xenopus laevis. Developmental Biology *212*, 381–391.

Kimelman, D., and Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early Xenopus embryo. Cell *51*, 869–877.

Kimelman, D., Kirschner, M., and Scherson, T. (1987). The events of the midblastula transition in Xenopus are regulated by changes in the cell cycle. Cell *48*, 399–407.

King, T., Beddington, R.S., and Brown, N.A. (1998). The role of the brachyury gene in heart development and left-right specification in the mouse. Mechanisms of Development 79, 29–37.

Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. Development *127*, 791–800.

Kitaguchi, T., Mizugishi, K., Hatayama, M., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2002). Xenopus Brachyury regulates mesodermal expression of Zic3, a gene controlling left-right asymmetry. Dev. Growth Differ. *44*, 55–61.

Kitaguchi, T., Nagai, T., Nakata, K., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2000). Zic3 is involved in the left-right specification of the Xenopus embryo. Development *127*, 4787–4795.

Kleinschmidt, J.A., and Franke, W.W. (1982). Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of Xenopus laevis oocytes. Cell *29*, 799–809.

Kline, D. (1988). Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. Developmental Biology *126*, 346–361.

Klotz, C., Dabauvalle, M.C., Paintrand, M., Weber, T., Bornens, M., and Karsenti, E. (1990). Parthenogenesis in Xenopus eggs requires centrosomal integrity. The Journal of Cell Biology *110*, 405–415.

Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1999). Mesoderm induction in Xenopus is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGFbeta growth factors. Development *126*, 5759–5770.

Konev, A.Y., Tribus, M., Park, S.Y., Podhraski, V., Lim, C.Y., Emelyanov, A.V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J.T., Lusser, A., et al. (2007). CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. Science *317*, 1087–1090.

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science *184*, 868–871.

Kossel, A. (1911). Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. Munchen Med. Wochenschrift *58*, 65–69.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693–705.

Kruithof, M., Chien, F.-T., Routh, A., Logie, C., Rhodes, D., and van Noort, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. Nat Struct

Mol Biol *16*, 534–540.

Kurth, T. (2005). A cell cycle arrest is necessary for bottle cell formation in the early Xenopus gastrula: Integrating cell shape change, local mitotic control and mesodermal patterning. Mechanisms of Development *122*, 1251–1265.

Kurth, T., and Hausen, P. (2000). Bottle cell formation in relation to mesodermal patterning in the Xenopus embryo. Mechanisms of Development *97*, 117–131.

Kwan, K.M. (2003). Xbra functions as a switch between cell migration and convergent extension in the Xenopus gastrula. Development *130*, 1961–1972.

Lacoste, N., and Almouzni, G. (2008). Epigenetic memory: H3.3 steps in the groove. Nature Publishing Group *10*, 7–9.

Lamond, A.I., and Earnshaw, W.C. (1998). Structure and function in the nucleus. Science *280*, 547–553.

Larabell, C.A., Torres, M., Rowning, B.A., Yost, C., Miller, J.R., Wu, M., Kimelman, D., and Moon, R.T. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in Xenopus embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. The Journal of Cell Biology *136*, 1123–1136.

Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature *275*, 416–420.

Latham, J.A., and Dent, S.Y.R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. Nat Struct Mol Biol *14*, 1017–1024.

Latinkić, B.V., Umbhauer, M., Neal, K.A., Lerchner, W., Smith, J.C., and Cunliffe, V. (1997). The Xenopus Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. Genes & Development *11*, 3265–3276.

Lerchner, W., Latinkić, B.V., Remacle, J.E., Huylebroeck, D., and Smith, J.C. (2000). Region-specific activation of the Xenopus brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. Development *127*, 2729–2739.

Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Noh, K.-M., Stadler, S.C., and Allis, C.D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 14075–14080.

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. Science *326*, 289–293.

Lindsay, L.L., and Hedrick, J.L. (1989). Proteases released from Xenopus laevis eggs at activation and their role in envelope conversion. Developmental Biology *135*, 202–211.

Lindsay, L.L., Peavy, T.R., Lejano, R.S., and Hedrick, J.L. (2003). Cross-fertilization and structural comparison of egg extracellular matrix glycoproteins from Xenopus laevis and Xenopus tropicalis. Comp. Biochem. Physiol., Part a Mol. Integr. Physiol. *136*, 343–352.

Lohka, M.J., and Masui, Y. (1983). Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. Science *220*, 719–721.

Lohka, M.J., Hayes, M.K., and Maller, J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *85*, 3009–3013.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., and Couble, P. (2005). The histone

H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. Nature Publishing Group *437*, 1386–1390.

Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. Molecular Cell *24*, 309–316.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature *389*, 251–260.

Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? Current Opinion in Cell Biology *22*, 291–297.

Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol *5*, 296–305.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. Nat. Struct. Biol. *10*, 882–891.

Maller, J., Poccia, D., Nishioka, D., Kidd, P., Gerhart, J., and Hartman, H. (1976). Spindle formation and cleavage in Xenopus eggs injected with centriole-containing fractions from sperm. Experimental Cell Research *99*, 285–294.

Mann, M., Risley, M.S., Eckhardt, R.A., and Kasinsky, H.E. (1982). Characterization of spermatid/sperm basic chromosomal proteins in the genus Xenopus (Anura, Pipidae). J Exp Zool *222*, 173–186.

Marchant, L., Linker, C., and Mayor, R. (1998). Inhibition of mesoderm formation by follistatin. Dev. Genes Evol. *208*, 157–160.

Marikawa, Y., and Elinson, R.P. (1999). Relationship of vegetal cortical dorsal factors in the Xenopus egg with the Wnt/beta-catenin signaling pathway. Mechanisms of Development *89*, 93–102.

Marrari, Y., Clarke, E.J., Rouvière, C., and Houliston, E. (2003). Analysis of microtubule movement on isolated Xenopus egg cortices provides evidence that the cortical rotation involves dynein as well as Kinesin Related Proteins and is regulated by local microtubule polymerisation. Developmental Biology *257*, 55–70.

Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2002). Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. Current Opinion in Cell Biology *14*, 692–699.

Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. Nat Rev Genet *9*, 843–854.

Masui, Y., and Markert, C. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool *177*, 129–145.

McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *101*, 1525–1530.

Meaburn, K.J., and Misteli, T. (2007). Cell biology: chromosome territories. Nature *445*, 379–781.

Mello, J.A., Silljé, H.H.W., Roche, D.M.J., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. EMBO Rep *3*, 329–334.

Melton, D.A. (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of Xenopus oocytes. Nature *328*, 80–82.

Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen Des Naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV Für Das Jahr 1865, Abhandlungen, 3–47.

Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 540–546.

Meyerhof, P.G., and Masui, Y. (1979). Properties of a cytostatic factor from Xenopus laevis eggs. Developmental Biology *72*, 182–187.

Miescher, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Hoppe-Seyer, Med. Chem. Unters *4*, 441–460.

Milet, C., and Monsoro-Burq, A.H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. Developmental Biology *366*, 22–33.

Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L., and Moon, R.T. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. The Journal of Cell Biology *146*, 427–437.

Mills, A.D., Laskey, R.A., Black, P., and De Robertis, E.M. (1980). An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in Xenopus oocyte nuclei. Journal of Molecular Biology *139*, 561–568.

Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. Nat Genet *37*, 1090–1097.

Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2007). Histone Replacement Marks the Boundaries of cis-Regulatory Domains. Science *315*, 1408–1411.

Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J.P., Jónsson, Z.O., Hübscher, U., Becker, P.B., and ALMOUZNI, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. Molecular and Cellular Biology *20*, 1206–1218.

Mohammadi, M. (1997). Structures of the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor in Complex with Inhibitors. Science *276*, 955–960.

Montellier, E., Rousseaux, S., Zhao, Y., and Khochbin, S. (2012). Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: post-meiotic male-specific gene expression. Bioessays *34*, 187–193.

Moon, R.T., and Kimelman, D. (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in Xenopus. Bioessays *20*, 536–545.

Morgan, T.H. (1911). Chromosomes and associative inheritance. Science *34*, 636–638.

Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T., and Horikoshi, M. (2000). A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. Genes Cells *5*, 221–233.

Murakami, M.S. (2004). Morphogenesis during Xenopus gastrulation requires Wee1-mediated inhibition of cell proliferation. Development *131*, 571–580.

Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature *339*, 275–280.

Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature *339*, 280–286.

Murray, K. (1964). The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. Biochemistry *3*, 10–15.

Müller, W.P. (1974). The lampbrush chromosomes of Xenopus laevis (Daudin). Chromosoma *47*, 283–296.

Nakayama, T., and Grainger, R.M. (2003). Generation and Characterization of Developmental

Mutations in Xenopus tropicalis. Issn: 1389-2029 *4*, 673–685.

Newport, J., and Kirschner, M. (1982a). A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell *30*, 675–686.

Newport, J., and Kirschner, M. (1982b). A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription. Cell *30*, 687–696.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. Molecular Cell *11*, 709–719.

Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2008). Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. Nature Publishing Group *10*, 102–109.

Nieuwkoop, P. (1969). The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. Dev. Genes Evol. *162*, 341–373.

Nieuwkoop, P., and Faber, J. (1956). Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.

Nieuwkoop, P., and Faber, J. (1994). Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing Inc, New York.

Nieuwkoop, P.D. (1973). The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. Adv Morphog *10*, 1–39.

Noll, M., and Kornberg, R.D. (1977). Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. Journal of Molecular Biology *109*, 393–404.

Noordermeer, J.J., Klingensmith, J.J., Perrimon, N.N., and Nusse, R.R. (1994). dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in Drosophila. Nature 367, 80–83.

Noyer-Weidner, M., and Trautner, T.A. (1993). Methylation of DNA in prokaryotes. Exs *64*, 39–108.

Oelgeschläger, M., Kuroda, H., Reversade, B., and De Robertis, E.M. (2003). Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in Xenopus embryos. Developmental Cell *4*, 219–230.

Okabayashi, K., Shoji, H., Nakamura, T., Hashimoto, O., Asashima, M., and Sugino, H. (1996). cDNA cloning and expression of the Xenopus laevis vitellogenin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications *224*, 406–413.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell *99*, 247–257.

Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). Science *183*, 330–332.

Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 809–814.

Olson, J.H., and Chandler, D.E. (1999). Xenopus laevis egg jelly contains small proteins that are essential to fertilization. Developmental Biology *210*, 401–410.

Onichtchouk, D., Gawantka, V., Dosch, R., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1996). The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controling] dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm. Development *122*, 3045–3053.

Onichtchouk, D., Glinka, A., and Niehrs, C. (1998). Requirement for Xvent-1 and Xvent-2 gene function in dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm. Development *125*, 1447–1456.

Opresko, L.K., and Wiley, H.S. (1987). Receptor-mediated endocytosis in Xenopus oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system. J. Biol. Chem. *262*, 4109–4115.

Osada, S.I., and Wright, C.V. (1999). Xenopus nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. Development *126*, 3229–3240.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. Cell *4*, 281–300.

Palecek, J., Ubbels, G.A., and Rzehak, K. (1978). Changes of the external and internal pigment pattern upon fertilization in the egg of Xenopus laevis. J Embryol Exp Morphol *45*, 203–214.

Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G., and Boncinelli, E. (1995). The Xenopus homologue of Otx2 is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. Development *121*, 707–720.

Papin, C., van Grunsven, L.A., Verschueren, K., Huylebroeck, D., and Smith, J.C. (2002). Dynamic regulation of Brachyury expression in the amphibian embryo by XSIP1. Mechanisms of Development *111*, 37–46.

Pasque, V., Gillich, A., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (2011a). Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. Embo J. *30*, 2373–2387.

Pasque, V., Halley-Stott, R.P., Gillich, A., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (2011b). Epigenetic stability of repressed states involving the histone variant macroH2A revealed by nuclear transfer to Xenopus oocytes. Nucleus *2*, 533–539.

Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R.P., and Gurdon, J.B. (2011c). Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. Trends in Genetics *27*, 516–525.

Patterton, D., and Wolffe, A.P. (1996). Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. Developmental Biology *173*, 2–13.

Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. Cell *125*, 703–717.

Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 72–75.

Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. Science *257*, 1398–1400.

Persson, J., and Ekwall, K. (2010). Chd1 remodelers maintain open chromatin and regulate the epigenetics of differentiation. Experimental Cell Research *316*, 1316–1323.

Philpott, A., Leno, G.H., and Laskey, R.A. (1991). Sperm decondensation in Xenopus egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. Cell *65*, 569–578.

Philpott, A.A., and Leno, G.H.G. (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in Xenopus egg extracts. Cell *69*, 759–767.

Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. Cell *86*, 589–598.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. Cell *122*, 517–527.

Polo, S., and Almouzni, G. (2006). Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. Current Opinion in Genetics & Development *16*, 104–111.

Posada, J.J., Sanghera, J.J., Pelech, S.S., Aebersold, R.R., and Cooper, J.A.J. (1991). Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. Molecular and Cellular Biology *11*, 2517–2528.

Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., and Grant, P.A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. Nature *433*, 434–438.

Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., and Agre, P. (1992). Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science *256*, 385–387.

Prioleau, M.N., Huet, J., Sentenac, A., and Méchali, M. (1994). Competition between chromatin and transcription complex assembly regulates gene expression during early development. Cell *77*, 439–449.

Probst, A.V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 192–206.

Quivy, J.P., Grandi, P., and ALMOUZNI, G. (2001). Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during Xenopus early development. Embo J. *20*, 2015–2027.

Rabl, C. (1885). Uber Zellteilung. Morph. Jb 214–311.

Rai, T.S., Puri, A., McBryan, T., Hoffman, J., Tang, Y., Pchelintsev, N.A., van Tuyn, J., Marmorstein, R., Schultz, D.C., and Adams, P.D. (2011). Human CABIN1 Is a Functional Member of the Human HIRA/UBN1/ASF1a Histone H3.3 Chaperone Complex. Molecular and Cellular Biology *31*, 4107–4118.

Ramakrishnan, V. (1997). Histone H1 and chromatin higher-order structure. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. *7*, 215–230.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. Embo J. *22*, 1599–1607.

Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. Nat Struct Mol Biol *11*, 650–655.

Rao, B.J., Brahmachari, S.K., and Rao, M.R. (1983). Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. J. Biol. Chem. *258*, 13478–13485.

Rathke, C., Baarends, W.M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in Drosophila. J. Cell. Sci. *120*, 1689–1700.

Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2004). DNA synthesis-dependent and -independent chromatin assembly pathways in Xenopus egg extracts. Meth. Enzymol. *375*, 117–131.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.-P., Scamps, C., Martini, E.M.-D., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. Molecular Cell *9*, 1091–1100.

Ray-Gallet, D., Quivy, J.-P., Silljé, H.W.W., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2007). The histone chaperone Asf1 is dispensable for direct de novo histone deposition in Xenopus egg extracts. Chromosoma *116*, 487–496.

Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., et al. (2011). Dynamics of Histone H3 Deposition In Vivo Reveal a Nucleosome Gap-Filling Mechanism for H3.3 to Maintain Chromatin Integrity. Molecular Cell

44, 928–941.

Razin, A., and Cedar, H. (1993). DNA methylation and embryogenesis. Exs *64*, 343–357.

Redshaw, M.R., and Follett, B.K. (1971). The crystalline yolk-platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, Xenopus laevis. Biochem. J. *124*, 759–766.

Reinhart, D., Ridgway, J., and Chandler, D.E. (1998). Xenopus laevis fertilisation: analysis of sperm motility in egg jelly using video light microscopy. Zygote *6*, 173–182.

Reversade, B. (2005). Depletion of Bmp2, Bmp4, Bmp7 and Spemann organizer signals induces massive brain formation in Xenopus embryos. Development *132*, 3381–3392.

Reversade, B., and De Robertis, E.M. (2005). Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at Opposite Embryonic Poles Generates a Self-Regulating Morphogenetic Field. Cell *123*, 1147–1160.

Ridgway, P. (2004). Unique Residues on the H2A.Z Containing Nucleosome Surface Are Important for Xenopus laevis Development. Journal of Biological Chemistry *279*, 43815–43820.

Ridgway, P., Rangasamy, D., Berven, L., Svensson, U., and Tremethick, D.J. (2004). Analysis of histone variant H2A.Z localization and expression during early development. Meth. Enzymol. *375*, 239–252.

Riggs, A., and Russo, V.E.A. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).

Roberts, C., Sutherland, H.F., Farmer, H., Kimber, W., Halford, S., Carey, A., Brickman, J.M., Wynshaw-Boris, A., and Scambler, P.J. (2002). Targeted Mutagenesis of the Hira Gene Results in Gastrulation Defects and Patterning Abnormalities of Mesoendodermal Derivatives Prior to Early Embryonic Lethality. Molecular and Cellular Biology *22*, 2318–2328.

Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the “30nm” chromatin fibre: A key role for the linker histone. Current Opinion in Structural Biology *16*, 336–343.

Roche, D., Almouzni, G., and Quivy, J.-P. (2006). Chromatin assembly of DNA templates microinjected into Xenopus oocytes. Methods Mol. Biol. *322*, 139–147.

Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. The Journal of Cell Biology *146*, 905–916.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. *273*, 5858–5868.

Rosa, F., Roberts, A.B., Danielpour, D., Dart, L.L., Sporn, M.B., and Dawid, I.B. (1988). Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF-beta 2-like factors. Science *239*, 783–785.

Rousseaux, S., Boussouar, F., Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Curtet, S., Vitte, A.-L., and Khochbin, S. (2011). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. Syst Biol Reprod Med *57*, 50–53.

Routh, A., Sandin, S., and Rhodes, D. (2008). Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 8872–8877.

Roux, W. (1890). *Über die Entwicklungsmechanik der Organismen*.

Rowning, B.A., Wells, J., Wu, M., Gerhart, J.C., Moon, R.T., and Larabell, C.A. (1997). Microtubule-mediated transport of organelles and localization of beta-catenin to the future dorsal side of Xenopus eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *94*, 1224–1229.

Ruffini, A. (1907). Contributo alla conoscenza della ontogenesi degli Anfibi anuri ed urodeli. Arch. Ital. Anat. Embriol 129–156.

Rückert, J. (1892). Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern. Anat an 107–158.

Rzehak, K. (1972). Changes in the pigment pattern of eggs of Xenopus laevis following fertilization. Folia Biol. (Krakow) *20*, 409–416.

Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S., and Ahmad, K. (2009). Transcriptional and Developmental Functions of the H3.3 Histone Variant in Drosophila. Current Biology 1–5.

Salic, A., Lee, E., Mayer, L., and Kirschner, M.W. (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. Molecular Cell *5*, 523–532.

Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.-E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. Nature Publishing Group *12*, 853–862.

Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 139–149.

Sasai, Y.Y., Lu, B.B., Steinbeisser, H.H., Geissert, D.D., Gont, L.K.L., and De Robertis, E.M.E. (1994). Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. Cell *79*, 779–790.

Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. Nature *436*, 138–141.

Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. Chromosoma.

Schulte-Merker, S., and Smith, J.C. (1995). Mesoderm formation in response to Brachyury requires FGF signalling. Curr. Biol. *5*, 62–67.

Schwartz, B.E. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. Genes & Development *19*, 804–814.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature 1–7.

Shechter, D., Nicklay, J.J., Chitta, R.K., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2008). Analysis of Histones in Xenopus laevis: I. A distinct index of enriched variants and modifications exists in each cell type and is remodeled during developmental transitions. Journal of Biological Chemistry *284*, 1064–1074.

Sheets, M.D.M., Wu, M.M., and Wickens, M.M. (1995). Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. Nature *374*, 511–516.

Shelby, R.D., Monier, K., and Sullivan, K.F. (2000). Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. The Journal of Cell Biology *151*, 1113–1118.

Shi, L., Wang, J., Hong, F., Spector, D.L., and Fang, Y. (2011). Four amino acids guide the assembly or disassembly of Arabidopsis histone H3.3-containing nucleosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences.

Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. Cell *96*, 575–585.

Shook, D.R., Majer, C., and Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, Xenopus laevis and Xenopus tropicalis. Developmental Biology *270*, 163–185.

Simpson, R.T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. Biochemistry *17*, 5524–5531.

Sims, R.J., III, Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., and Reinberg, D. (2007). Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. Molecular Cell *28*, 665–676.

Sims, R.J., Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends in Genetics *19*, 629–639.

Sive, H.L., Grainger, R.M., and Harland, R.M. (2010). Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual. 338.

Slack, J.M., Darlington, B.G., Heath, J.K., and Godsave, S.F. (1987). Mesoderm induction in early Xenopus embryos by heparin-binding growth factors. Nature *326*, 197–200.

Smith, J.C. (1987). A mesoderm-inducing factor is produced by Xenopus cell line. Development *99*, 3–14.

Smith, J.C., and Slack, J.M. (1983). Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in Xenopus laevis. J Embryol Exp Morphol *78*, 299–317.

Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D., and Herrmann, B.G. (1991). Expression of a Xenopus homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. Cell *67*, 79–87.

Smith, J.C., Price, B.M., Van Nimmen, K., and Huylebroeck, D. (1990). Identification of a potent Xenopus mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. Nature *345*, 729–731.

Smith, L.D.L., and Ecker, R.E.R. (1971). The interaction of steroids with Rana pipiens Oocytes in the induction of maturation. Developmental Biology *25*, 232–247.

Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. Cell *58*, 15–25.

Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell *70*, 829–840.

Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. Nat Struct Mol Biol *19*, 25–30.

Sokol, S.Y., Klingensmith, J., Perrimon, N., and Itoh, K. (1995). Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed Xenopus homolog of dishevelled. Development *121*, 1637–1647.

Song, T.-Y., Yang, J.-H., Park, J.-Y., Song, Y., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2012). The role of histone chaperones in osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications 1–7.

Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. Molecular Cell *46*, 722–734.

Spemann, H. (1903). Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei III (Roux Arch. f. Entw. Mech.).

Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Über induktion von embryonalanlagen

durch implantation artfremder organisatoren. Wilhelm Roux Arch Entw Mech 599–638.

Stancheva, I. (2002). DNA Methylation at Promoter Regions Regulates the Timing of Gene Activation in Xenopus laevis Embryos. Developmental Biology *243*, 155–165.

Stancheva, I., and Meehan, R.R. (2000). Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in Xenopus embryos. Genes & Development *14*, 313–327.

Steinbach, O.C., Wolffe, A.P., and Rupp, R.A. (1997). Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in Xenopus. Nature *389*, 395–399.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64*, 435–459.

Stewart-Savage, J., and Grey, R.D. (1982). The temporal and spatial relationships between cortical contraction, sperm trail formation, and pronuclear migration in fertilizedXenopus eggs. Dev. Genes Evol. *191*, 241–245.

Stewart-Savage, J., and Grey, R.D. (1987). Loss of functional sperm entry into Xenopus eggs after activation correlates with a reduction in surface adhesivity. Developmental Biology *120*, 434–446.

Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., and Allis, C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *96*, 14967–14972.

Strausfeld, U.U., Labbé, J.C.J., Fesquet, D.D., Cavadore, J.C.J., Picard, A.A., Sadhu, K.K., Russell, P.P., and Dorée, M.M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. Nature *351*, 242–245.

Sutton, W.S. (1902). On the morphology of the chromosome group in Brachystola magna. Biol. Bull. 24–39.

Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet *9*, 465–476.

Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. Cell Res. *21*, 421–434.

Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T., and Kishimoto, T. (2000). c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a. *97*, 14301–14306.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. Acta Cryst (2011). D67, 578-583 [Doi:10.1107/S0907444911014818] 1–6.

Tada, M., and Smith, J.C. (2000). Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. Development *127*, 2227–2238.

Tada, M., O'Reilly, M.A., and Smith, J.C. (1997). Analysis of competence and of Brachyury autoinduction by use of hormone-inducible Xbra. Development *124*, 2225–2234.

Tadjuidje, E., Cha, S.-W., Louza, M., Wylie, C., and Heasman, J. (2011). The functions of maternal Dishevelled 2 and 3 in the Early Xenopus embryo. Dev. Dyn. *240*, 1727–1736.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. Cell *116*, 51–61.

Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J., and Asashima, M.

(2000). Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in Xenopus Nieuwkoop center. Development *127*, 5319–5329.

Talbert, P.B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausio, J., Berger, F., Bhalla, P.L., Bonner, W.M., Cande, W.Z., Chadwick, B.P., Chan, S.W.L., et al. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. Epigenetics Chromatin *5*, 7.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. Cell *146*, 1016–1028.

Tanabe, H., Habermann, F.A., Solovei, I., Cremer, M., and Cremer, T. (2002). Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. Mutat. Res. *504*, 37–45.

Tang, Y., Poustovoitov, M.V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. Nat Struct Mol Biol *13*, 921–929.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. Nat Struct Mol Biol *14*, 1025–1040.

Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W., and Melton, D.A. (1990). Activins are expressed early in Xenopus embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. Cell *63*, 485–493.

Thuret, G. (1854). Recherches sur la fécondation des fucacées. Ann. Sci. Nat. (Bot) 197–214.

Tian, J., Gong, H., Thomsen, G.H., and Lennarz, W.J. (1997). Xenopus laevis sperm-egg adhesion is regulated by modifications in the sperm receptor and the egg vitelline envelope. Developmental Biology *187*, 143–153.

Tinsley, R.C., and Kobel, H.R. (1996). Allopolyploid speciation. In The biology of Xenopus (Oxford University Press, USA).

Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K., and Bremer, J.W. (1982). Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. J. Biol. Chem. *257*, 5560–5567.

Turner, P.C., and Woodland, H.R. (1983). Histone gene number and organisation in Xenopus: Xenopus borealis has a homogeneous major cluster. Nucleic Acids Research *11*, 971–986.

Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. Nature *402*, 555–560.

Umbhauer, M., Marshall, C.J., Mason, C.S., Old, R.W., and Smith, J.C. (1995). Mesoderm induction in Xenopus caused by activation of MAP kinase. Nature *376*, 58–62.

Valles, J.M., Wasserman, S.R.R.M., Schweidenback, C., Edwardson, J., Denegre, J.M., and Mowry, K.L. (2002). Processes that occur before second cleavage determine third cleavage orientation in Xenopus. Experimental Cell Research *274*, 112–118.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. Trends in Cell Biology *19*, 207–217.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A.H.A., Muller, S., Berden, J.H.M., Braat, D.D.M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in Histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. Mechanisms of Development

122, 1008–1022.

Van Evercooren, A., and Picard, J.J. (1978). Surface changes during development and involution of the cement gland of Xenopus laevis. Cell Tissue Res. *194*, 303–313.

Vermaak, D., Steinbach, O.C., Dimitrov, S., Rupp, R.A., and Wolffe, A.P. (1998). The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early Xenopus embryos. Curr. Biol. *8*, 533–536.

Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. Cell *87*, 95–104.

Verschueren, K., Remacle, J.E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B.S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.T., Bodmer, R., et al. (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. J. Biol. Chem. *274*, 20489–20498.

Vincent, J.P., Oster, G.F., and Gerhart, J.C. (1986). Kinematics of gray crescent formation in Xenopus eggs: the displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Developmental Biology *113*, 484–500.

Vogt, W. (1929). Gestalunganalyse am Amphibienkeim mit örtlicher vitalfärbung. II. Teil. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Whilhem Roux Arch. Entwick. Mech. Org. 384–706.

Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. Endeavour 18–20.

Wallace, R.A., and Dumont, J.N. (1968). The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in Xenopus laevis. J Cell Physiol *72*, Suppl1:73–Suppl1:89.

Wallace, R.A., and Jared, D.W. (1969). Studies on amphibian yolk. 8. The estrogen-induced hepatic synthesis of a serum lipophosphoprotein and its selective uptake by the ovary and trasformation into yolk platelet proteins in Xenopus laevis. Developmental Biology *19*, 498–526.

Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T., and Jared, D.W. (1972). Studies on amphibian yolk. X. The relative roles of autosynthetic and heterosynthetic processes during yolk protein assembly by isolated oocytes. Developmental Biology *29*, 255–272.

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., et al. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. Science *293*, 853–857.

Wang, Z.F., Ingledue, T.C., Dominski, Z., Sanchez, R., and Marzluff, W.F. (1999). Two Xenopus proteins that bind the 3' end of histone mRNA: implications for translational control of histone synthesis during oogenesis. Molecular and Cellular Biology *19*, 835–845.

Ward, W.S.W., and Coffey, D.S.D. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod *44*, 569–574.

Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. Molecular and Cellular Biology *23*, 5293–5300.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature *171*, 737–738.

Weaver, C. (2003). GBP binds kinesin light chain and translocates during cortical rotation in Xenopus eggs. Development *130*, 5425–5436.

Weaver, C. (2004). Move it or lose it: axis specification in Xenopus. Development *131*, 3491–3499.

Weissman, A. (1892). La prétendue transmission héréditaire des mutilations. Essais 441.

Wiedemann, S.M., Mildner, S.N., Bonisch, C., Israel, L., Maiser, A., Matheisl, S., Straub, T., Merkl, R., Leonhardt, H., Kremmer, E., et al. (2010). Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. The Journal of Cell Biology *190*, 777–791.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. Nature *343*, 657–659.

Wilson, P.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. Nature *376*, 331–333.

Winklbauer, R., and Schürfeld, M. (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in Xenopus. Development *126*, 3703–3713.

Witt, O., Albig, W., and Doenecke, D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. Experimental Cell Research *229*, 301–306.

Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Lett. *277*, 8–21.

Wolf, D.P., Nishihara, T., West, D.M., Wyrick, R.E., and Hedrick, J.L. (1976). Isolation, physicochemical properties, and the macromolecular composition of the vitelline and fertilization envelopes from Xenopus laevis eggs. Biochemistry *15*, 3671–3678.

Wolff, C.F. (1759). Theoria Generationis (Traduit et édité par Dr. Paul Samassa en 1896).

Wollmann, H., Holec, S., Alden, K., Clarke, N.D., Jacques, P.-E., and Berger, F. (2012). Dynamic deposition of histone variant h3.3 accompanies developmental remodeling of the Arabidopsis transcriptome. PLoS Genet *8*, e1002658.

Woodland, H.R. (1980). Histone synthesis during the development of Xenopus. FEBS Lett. *121*, 1–10.

Woodland, H.R., and Adamson, E.D. (1977). The synthesis and storage of histones during the oogenesis of Xenopus laevis. Developmental Biology *57*, 118–135.

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nat Genet *44*, 251–253.

Wu, R.S., and Bonner, W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. Cell *27*, 321–330.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development. Cell *121*, 859–872.

Xanthos, J.B., Kofron, M., Wylie, C., and Heasman, J. (2001). Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in Xenopus laevis. Development *128*, 167–180.

Yang, J. (2002). beta-Catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. Development *129*, 5743–5752.

Yang, J.-H., Choi, J.-H., Jang, H., Park, J.-Y., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011a). Histone chaperones cooperate to mediate Mef2-targeted transcriptional regulation during skeletal myogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications *407*, 541–547.

Yang, J.-H., Song, Y., Seol, J.-H., Park, J.-Y., Yang, Y.-J., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011b). Myogenic transcriptional activation of MyoD mediated by replication-independent histone deposition. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 85–90.

Yost, C., Farr, G.H., Pierce, S.B., Ferkey, D.M., Chen, M.M., and Kimelman, D. (1998). GBP, an

inhibitor of GSK-3, is implicated in Xenopus development and oncogenesis. Cell *93*, 1031–1041.

Zalensky, A.O. (2002). Human Testis/Sperm-specific Histone H2B (hTSH2B). MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION. Journal of Biological Chemistry *277*, 43474–43480.

Zhang, J., and King, M.L. (1996). Xenopus VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. Development *122*, 4119–4129.

Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos. Cell *94*, 515–524.

Zhao, Z.-K., Li, W., Wang, M.-Y., Zhou, L., Wang, J.-L., and Wang, Y.-F. (2011). The role of HIRA and maternal histones in sperm nucleus decondensation in the gibel carp and color crucian carp. Mol. Reprod. Dev. *78*, 139–147.

Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., and Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell *86*, 599–606.

Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T., and Zimmer, J. (1979). Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. Experimental Cell Research *124*, 111–119.

Zorn, C., Cremer, T., Cremer, C., and Zimmer, J. (1976). Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. Hum Genet *35*, 83–89.

Zweidler, A. (1978). Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. Methods Cell Biol. *17*, 223–233.