



**HAL**  
open science

## Etude structurale et fonctionnelle de la variante d'histone H2AZ

Arnaud Obri

► **To cite this version:**

Arnaud Obri. Etude structurale et fonctionnelle de la variante d'histone H2AZ. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ097 . tel-00912335

**HAL Id: tel-00912335**

**<https://theses.hal.science/tel-00912335>**

Submitted on 2 Dec 2013

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

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

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

## THESE

*Discipline : Sciences du vivant*

*Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Présentée par

**Arnaud OBRI**

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg

### **ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA VARIANTE D'HISTONE H2AZ**

Soutenue le 20 septembre 2012

**THESE dirigée par :**

Dr. Ali HAMICHE

Directeur de recherche, IGBMC, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

Dr. Dimitar ANGELOV

Directeur de recherche, LBMC, Lyon

Dr. Mikhaïl GRIGORIEV

Chargé de recherche, LBME, Toulouse

**AUTRE MEMBRE DE JURY :**

Pr. Bruno CHATTON

Professeur, IREBS, Strasbourg



*À mes parents*



*La vie est un hasard contraire aux destinées.*

***Serge Gainsbourg***



---

# MERCI

---

Je remercie le directeur de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de m'avoir accueilli au sein de cet institut.

Je veux remercier le **Dr. Dimitar ANGELOV**, le **Dr. Mikhaïl GRIGORIEV** et le **Pr. Bruno CHATTON** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir consacré leur temps pour évaluer ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à **Ali HAMICHE**, mon directeur de thèse. Merci Ali de m'avoir donné ma chance et de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire, de m'avoir communiqué ta passion pour l'épigénétique, de m'avoir laissé une liberté d'action tout au long de ces quatre années et d'avoir été présent dans les moments délicats.

Je veux également remercier tous les membres l'équipe qui ont été obligés de me supporter pendant ces quatre années...

Merci **Christophe** pour toute l'aide que tu m'as apporté pendant ma thèse. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi et tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions et m'aider durant ma thèse et en je t'en suis infiniment reconnaissant. Je n'oublierais pas tous les moments que nous avons passé ensemble en dehors du laboratoire à refaire le monde et à inventer de nouvelles théories scientifiques après quelques (beaucoup ?) verres.

Merci aussi à **Julien** que je connais depuis le début de mon arrivée à l'université, mais nous avons appris à nous connaître qu'une fois arrivés dans ce laboratoire. D'une certaine façon, on se sera soutenu mutuellement pendant tous les moments de la thèse. On aura vécu surtout des soirées mémorables et après tout la vie d'artiste c'est pas « easy » ?

Merci aussi à **Khalid** pour tout ce que tu as apporté à ce projet. Tu as vraiment donné de ta personne surtout en initiant le projet et en apportant une contribution énorme alors que tu n'y étais absolument pas obligé. Je remercie aussi tous les autres membres du labo, **Catherine**,

---



**Isabelle, Dorothée, Philippe, Christian, Arnaud, Muhammad, Vivek, Abdul, Guillaume et Mailys.**

Je remercie également le Dr. Christophe ROMIER pour la collaboration et toutes les discussions très bénéfiques que nous avons eu sur le projet

La thèse étant dans la continuité du stage de master je veux remercier toute l'équipe de **Pr. Bruno CHATTON** de l'ancienne UMR 7175 : **Claude, Marc, Mariel, Barbara, Bruno, Ilaria, Adonis, Jessica** et **Kambiz**. Je remercie tout particulièrement **Bruno**, car tu as toujours été disponible pour m'aider même après avoir quitté le labo.


Je souhaite aussi remercier **Alexis et Nico** pour leur soutien lors de ma thèse. Vous êtes mes deux meilleurs amis et je suis très heureux de vous connaître même si ça a été parfois chaotique.

J'ai une pensée en direction de Londres pour **Julien et Mirella**. Je suis très heureux de vous avoir rencontré lors de mon passage à l'ESBS. Je pense qu'avec Julien on aura fait tout et n'importe quoi dans cet institut. Je me souviendrais toujours du 10 rue des Halles où l'ont aura passé des moments inoubliables.

Je veux remercier également tous mes amis dont la présence a toujours été très importante pour moi. Nous avons vécu des soirées et des nuits avec des passages remarquables à Berlin et Barcelone : **Guillaume, Arnaud, Ben, Thomas, Sophie, Marie** et **Stéphanie**.

Pour des raisons biologiques évidentes, je remercie mes parents qui m'ont toujours soutenu lors de ma thèse. Vous ne m'avez jamais rien imposé et vous m'avez laissé choisir ma voie. Je vous dois tout et je vous dédie ce manuscrit.

---



# **TABLE DES MATIÈRES**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>I. STRUCTURE ET ORGANISATION DE LA CHROMATINE.</b>	<b>5</b>
I.1. Le nucléosome.	5
I.2. Les histones du cœur.	6
I.2.1. Structure des histones canoniques.	6
I.2.2. L'histone H1, ou histone de liaison.	7
I.2.3. Expression des gènes codant les histones canoniques.	8
I.3. Structures d'ordres supérieurs de la chromatine.	8
I.4. Les territoires chromatiniens.	11
I.4.1. L'euchromatine.	12
I.4.2. L'hétérochromatine.	12
<b>II. MODIFICATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE.</b>	<b>13</b>
II.1. La méthylation de l'ADN.	13
II.2. Les modifications covalentes des histones.	15
II.2.1. L'acétylation.	16
II.2.1.a. Les acétyltransférases d'histones (HAT).	17
II.2.1.b. Les déacétylases d'histones (HDAC).	18
II.2.2. La méthylation.	19
II.2.2.a. La méthylation des résidus lysines.	20
II.2.2.b. La méthylation des résidus arginines.	22
II.2.2.c. Les déméthylases.	22
II.2.3. La phosphorylation.	23
II.2.4. L'ADP ribosylation.	24
II.2.5. L'ubiquitination et la sumoylation.	24
II.2.6. Les autres modifications.	25
II.2.7. Relation entre les modifications covalentes des histones.	26
II.3. Les complexes de remodelages de la chromatine ATP dépendants (CRC).	28
II.3.1. La famille SWI/SNF.	30
II.3.1.a. Le complexe SWI/SNF de levure.	30
II.3.1.b. Le complexe RSC de levure.	30
II.3.1.c. Les complexes BAP et PBAP de drosophile.	31
II.3.1.d. Les complexes BAF et PBAF humains.	31
II.3.2. La famille ISWI.	32
II.3.2.a. Le complexe ISWI de drosophile.	33
II.3.2.b. Les complexes ISWI de levure.	34
II.3.2.c. Les complexes ISWI humains.	34

II.3.3. La famille CHD/Mi-2.	35
II.3.3.a. CHD1.	36
II.3.3.b. Mi-2/NuRD.	36
II.3.4. La famille INO80.	37
II.3.4.a. Le complexe INO80.	37
II.3.4.b. Le complexe SWR1.	38
II.3.4.c. Le complexe p400/Tip60.	38
II.4. Incorporation de variantes d'histones.	40
II.4.1. Les variantes de l'histone H3.	41
II.4.1.a. CENP-A ou CenH3.	41
II.4.1.b. H3.3.	42
II.4.2. Les variantes de l'histone H2A.	44
II.4.2.a. H2AX.	44
II.4.2.b. MacroH2A.	45
II.4.2.c. H2A.Bbd.	46
II.4.2.d. H2AZ.	47
<b>III. L'ASSEMBLAGE DE LA CHROMATINE.</b>	<b>51</b>
III.1. L'assemblage de la chromatine pendant la réplication.	51
III.1.1. Ségrégation des histones lors de la réplication de l'ADN.	52
III.1.2. Les chaperonnes et les facteurs de remodelage impliqués dans la réplication.	53
III.1.2.a. La nucléoplasmine et N1/N2.	53
III.1.2.b. NAP1.	54
III.1.2.c. CAF-1.	54
III.1.2.d. Asf1.	55
III.2. L'assemblage de la chromatine en dehors de la réplication de l'ADN.	57
<b>RÉSULTATS</b>	<b>58</b>
<b>ARTICLE 1 : Anp32e, a histone chaperone specialized in the removal of H2A.Z from chromatin</b>	
I. CONTEXTE ET QUESTION POSÉE.	59
II. RÉSULTATS ET DISCUSSION.	60
<b>ARTICLE 2 : Structural basis for H2A.Z recognition and nucleosomal removal by human chaperone Anp32e</b>	
I. CONTEXTE ET QUESTION POSÉE.	86
II. RÉSULTATS ET DISCUSSION.	86
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>110</b>
I. ANP32E, UNE CHAPERONNE D'HISTONE SPÉCIALISÉE DANS L'ÉVICTION DE H2AZ.	111
II. LA PROTÉINE ANP32E ET LE COMPLEXE P400/TIP60 SONT ASSOCIÉS À L'ENLÈVEMENT DE H2AZ DE LA CHROMATINE.	112
III. LES COMPLEXES SRCAP ET P400/TIP60 ONT DEUX RÔLES ANTAGONISTES SUR LA DYNAMIQUE DE H2AZ.	113
IV. H2AZ ET SON RÔLE POSITIF ET NÉGATIF SUR LA TRANSCRIPTION.	114

<b>V. UN NOUVEAU RÔLE POUR L'HÉLICE <math>\alpha</math>C DE H2AZ</b>	<b>114</b>
<b>VI. ANP32E ET LES AUTRES FONCTIONS DE H2AZ.</b>	<b>115</b>
VI.1. La réparation de l'ADN.	115
VI.2. L'intégrité du génome.	115
VI.3. Le cancer du sein.	116
<b>VII. CONCLUSION.</b>	<b>117</b>
<b>LISTES</b>	<b>118</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>119</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>123</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>125</b>

---



# **AVANT-PROPOS**

# AVANT-PROPOS

---

Le génome des cellules eucaryotes est organisé sous forme de chromatine qui se compose de protéines histones liées à l'ADN. Cette association permet à la cellule de compacter l'ADN dont la taille est d'environ de deux mètres dans une sphère dont le diamètre est de l'ordre du micromètre. Initialement, les histones ont été considérées comme ayant une fonction uniquement structurale au sein de la chromatine. Depuis plusieurs années de nombreuses études ont établi que la chromatine n'est pas une structure figée et que bien au contraire elle est très dynamique et joue un rôle dans des processus comme la réplication, la régulation génique, la réparation et la ségrégation des chromosomes.

La régulation génique des cellules eucaryotes va être influencée par l'accessibilité des gènes lors de la transcription. La chromatine doit être modifiée afin que les gènes deviennent accessibles aux différentes machineries cellulaires. La méthylation de l'ADN, l'ajout ou l'enlèvement de groupements chimiques sur les histones, le remodelage ATP dépendant de la chromatine et l'incorporation de variantes d'histones par des enzymes spécifiques sont les moyens dont dispose la cellule pour modifier l'accessibilité à l'ADN. La découverte et la caractérisation des variantes d'histones ont permis de mettre en avant un nouvel aspect de la modification de la structure de la chromatine qui va avoir des répercussions épigénétiques très importantes sur la cellule.

H2AZ est l'une des variantes de l'histone H2A qui est connue pour jouer un rôle central dans la régulation transcriptionnelle. Nous savons maintenant que H2AZ orne les promoteurs de manière dynamique, cependant les mécanismes mis en jeu pour sa déposition ou son enlèvement de la chromatine sont à ce jour largement incompris chez les mammifères. Lors de ma thèse, je me suis focalisé sur l'identification de nouvelles chaperonnes d'histones impliquées dans la dynamique de H2AZ au niveau des promoteurs. Nous avons utilisé une approche protéomique pour identifier les partenaires protéiques associés à H2AZ dans le noyau des

cellules HeLa. Notre attention s'est portée sur une nouvelle protéine appelée Anp32e. Anp32e a été initialement mis en évidence pour son rôle régulateur de la protéine phosphatase 2A dans les synapses. D'une manière très inattendue, Anp32e possède une des caractéristiques majeures des chaperonnes d'histones à savoir un pKi très acide et une interaction directe avec H2AZ. Nous avons alors réalisé une cartographie très fine de l'interaction de Anp32e avec H2AZ.

Nos résultats indiquent qu'une petite boîte contenant l'hélice  $\alpha$ C de H2AZ est nécessaire pour l'interaction avec Anp32e. De la même manière, nous avons identifié un nouveau domaine sur Anp32e permettant de reconnaître H2AZ. Cette interaction est soutenue par la résolution de la structure du complexe Anp32e-H2AZ-H2B à 1.48 Å en collaboration avec le Dr. Christophe ROMIER à l'IGBMC.

Nous avons également montré que Anp32e agit avec le complexe de remodelage p400/TIP60. L'inactivation de Anp32e ou de p400 dans les cellules HeLa par ARN interférence entraîne: (i) une diminution de la transcription des gènes cibles de H2AZ (ii) une accumulation de H2AZ sur les promoteurs. Enfin, Anp32e est capable d'enlever le dimère H2AZ-H2B d'une matrice de chromatine reconstituée *in vitro*. Dans l'ensemble, ces travaux identifient Anp32e comme une nouvelle chaperonne, spécifique des mammifères, spécialisée dans l'éviction de H2AZ de la chromatine. L'étude structurale nous a permis de déterminer les bases moléculaires du mécanisme d'éviction de H2AZ du nucléosome par Anp32e.

Afin d'introduire les résultats obtenus lors de ma thèse, la première partie de ce mémoire consiste en une synthèse bibliographique de la structure et de la fonction de la chromatine. La deuxième partie comporte les résultats issus de mes travaux de recherche sur H2AZ. Enfin une dernière partie qui consiste en une discussion des résultats avec la perspective de ce qui reste à être accompli.





# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

---

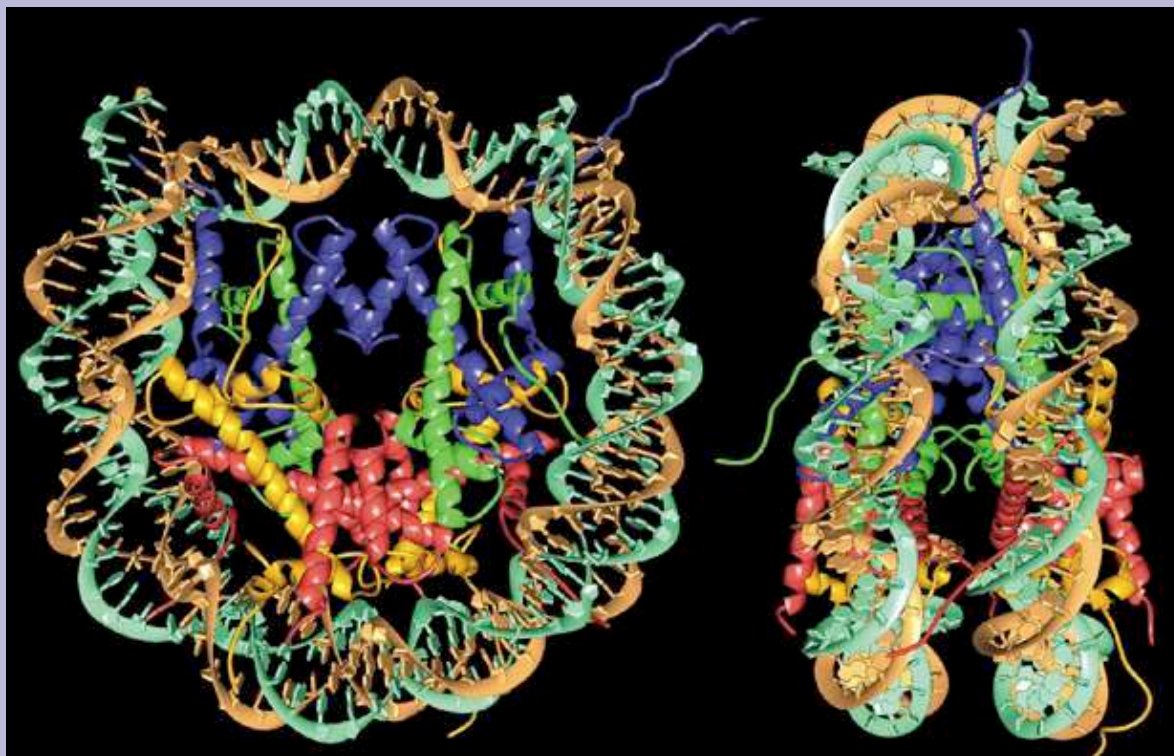
## I. STRUCTURE ET ORGANISATION DE LA CHROMATINE.

### I.1. Le nucléosome.

Le matériel génétique contenu dans les cellules eucaryotes est compacté dans une structure nucléoprotéique appelée chromatine, provenant du grec « khroma » et qui signifie « coloré ». La chromatine a été mise en évidence vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour son affinité envers certains colorants. Elle est porteuse de l'information génétique et se compose d'un complexe nucléoprotéique comprenant l'ADN, les histones et des protéines non-histones. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975) qui consiste en un octamère d'histone renfermant deux copies des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel s'enroule 146 paires de bases (pb) d'ADN ; le tout formant un cylindre de 11 nm de diamètre et 5,5 nm de hauteur. Le nucléosome est le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Il régule l'accès de l'ADN aux processus cellulaires fondamentaux que sont la réplication, la recombinaison, la transcription et la réparation de l'ADN.

La structure du nucléosome a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 7 Å en 1985 (Richmond et al., 1984) et à 2,8 Å (figure 1) une dizaine d'années plus tard (Luger et al., 1997). Le nucléosome forme un cylindre autour duquel s'enroule 1,65 tour d'ADN en une superhélice gauche. Au niveau atomique, les interactions entre l'ADN et les histones sont de type hydrogène faisant intervenir principalement des lysines et des arginines chargées positivement et le squelette phosphate de l'ADN chargé négativement (Richmond et al., 1984; Luger et al., 1997). Le nucléosome est l'un des complexes les plus stables en condition physiologique, mais ceci n'en fait pas une structure statique. Au contraire, il a été démontré dernièrement que cette structure est sujette à des variations dans sa composition et sa conformation, avec parfois une composition et une stœchiométrie d'histones altérées pouvant aller d'un octasome, hexasome, tétrasomes et même un hémisome (Zlatanova et al., 2009). De telles variations vont avoir un formidable impact sur les différents processus cellulaires.

Ainsi le nucléosome n'est plus considéré comme une entité unique, mais comme une famille dont la composition va varier dans la nature en histone ou la stœchiométrie interne en histone (Zlatanova et al., 2009).



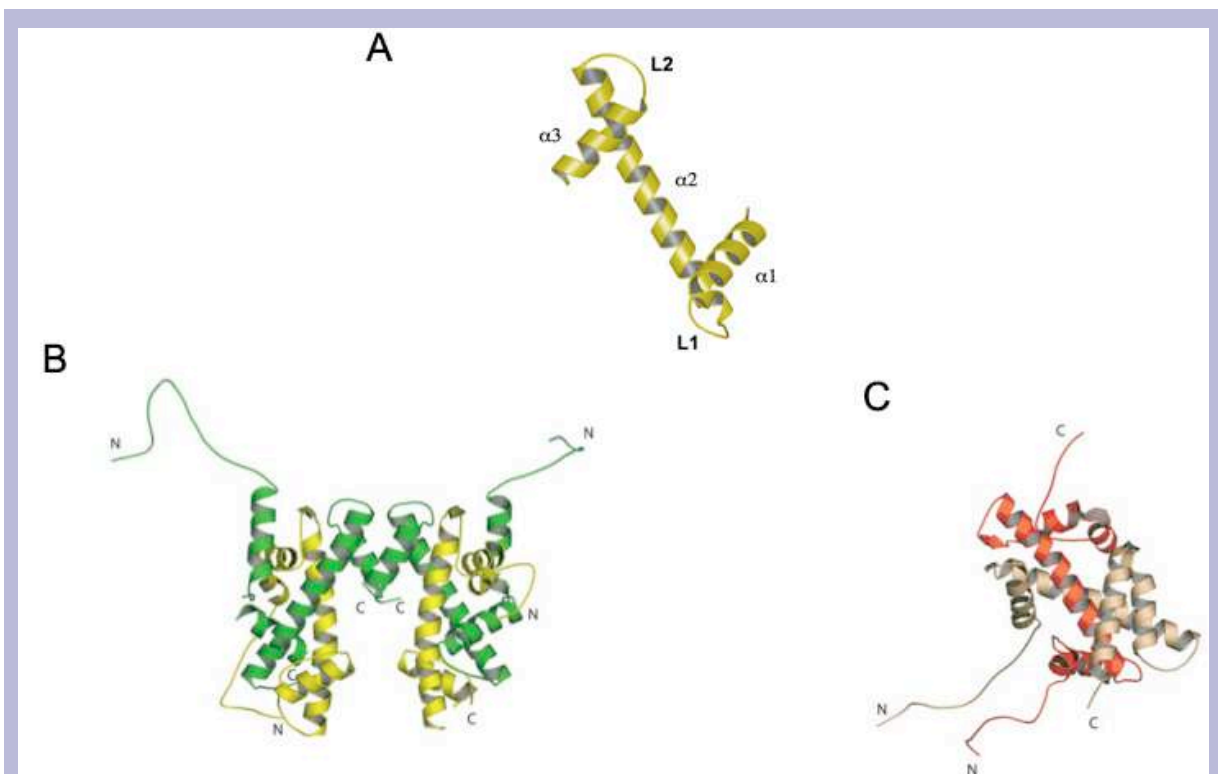
**Figure 1** : Structure cristallographique du nucléosome à 2,8 Å. 146 pb (brun et vert) et 8 histones (H3, bleu ; H4, vert ; H2A, jaune ; H2B, rouge). À gauche, le nucléosome est représenté au dessus de l'axe de l'hélice d'ADN et celui de droite observé depuis le côté perpendiculairement à celui de gauche (Luger et al., 1997).

## 1.2. Les histones du cœur.

### 1.2.1. Structure des histones canoniques.

Les histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 sont de petites protéines dont le poids moléculaire varie entre 11 et 20 kDa et dont la structure primaire est très riche en acides aminés basiques. Elles possèdent deux domaines structurellement et fonctionnements différents : les queues N-terminales et l'histone fold (HFD). Les histones contiennent un domaine globulaire très conservé HFD comprenant 3 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 1-3) reliées entre elles par deux petites boucles (L1 et L2) (Figure 2). Les histones H2A-H2B et H3-H4 dimérisent via leur HFD pour former une structure en « poignée de main » (figure 2). En condition physiologique de sels et en absence d'ADN deux dimères H3-H4 s'associent pour former un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> sur lequel vont se

lier les deux dimères (H2A-H2B) pour former un octamère d'histones  $((H3-H4) + (H2A-H2B))_2$  (Harp et al., 2000; Khorasanizadeh, 2004; Zlatanova et al., 2009).



**Figure 2 : Structure des histones.** (A) Structure de l'histone fold (HFD) suivant l'enchaînement suivant  $\alpha1$ -L1- $\alpha2$ -L2- $\alpha3$  (Harp et al., 2000). (B) Structure du tétramère  $(H3-H4)_2$ , respectivement en vert et jaune (Khorasanizadeh, 2004). (C) Structure du dimère H2A-H2B, respectivement en rouge et violet (Khorasanizadeh, 2004).

Chaque histone possède des régions N-terminales non structurées, appelées queue N-terminales, qui n'apparaissent pas sur les structures cristallographiques publiées. H2A et H2B disposent quant à elles d'une queue C-terminale. Ces régions d'environ 20 à 35 résidus représentent 20 % des résidus totaux des histones. Elles présentent la particularité d'être orientées vers l'extérieur du nucléosome et ne participent pas à sa structure. En revanche, les queues N-terminales de H4 et H2B sont importantes pour la formation de structure d'ordre supérieure de la chromatine (Khorasanizadeh, 2004). Ces régions sont très accessibles et les résidus qui les composent vont être modifiés chimiquement par des enzymes spécifiques. Ces modifications vont avoir un impact sur différents processus biologiques en servant de motif de reconnaissance à différents facteurs ou alors en modifiant la structure de la chromatine.

### 1.2.2. L'histone H1, ou histone de liaison.

L'histone H1 ou histone de liaison diffère des autres histones H2A, H2B, H3 et H4. Elle possède un domaine globulaire d'environ 90 acides aminés et deux extensions non structurées

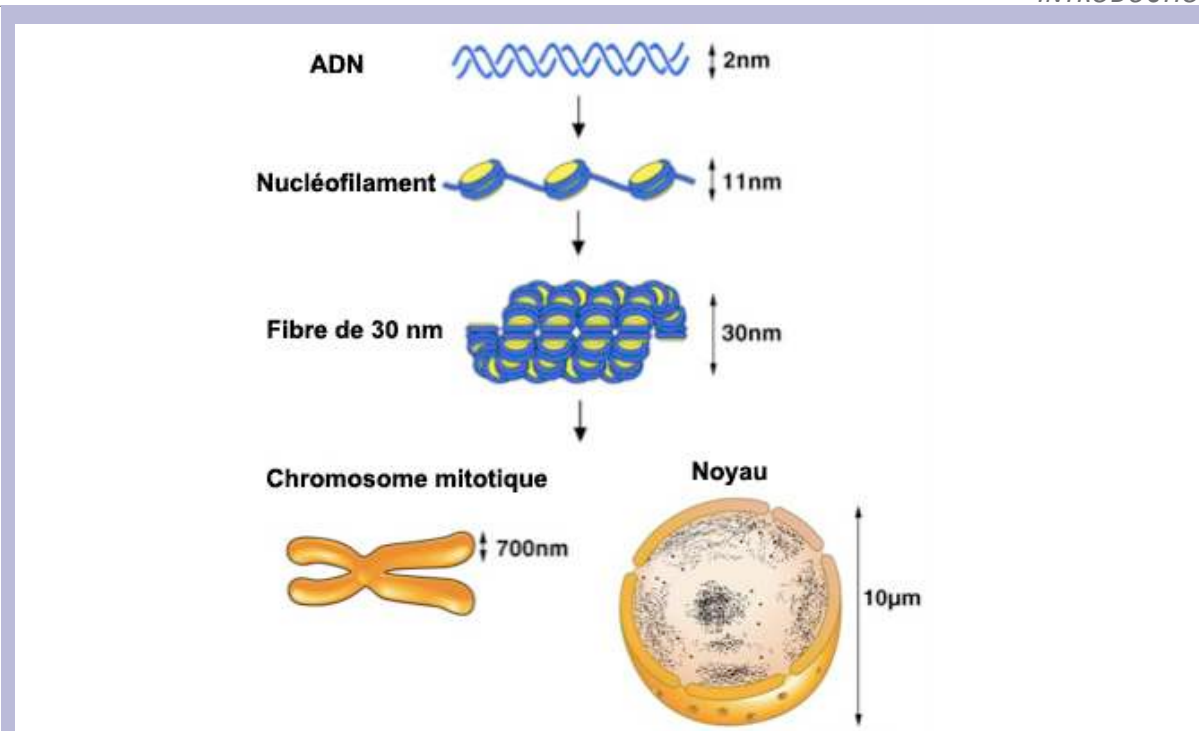
en N- et C-terminale. Il n'y a aucune structure d'un nucléosome contenant l'histone H1, mais elle semble située à l'endroit où l'ADN entre et sort du nucléosome (Zhou et al., 1998). Son invalidation contrairement aux autres histones n'est pas létale, en revanche il en résulte une altération globale de la structure de la chromatine (Fan et al., 2005), suggérant un rôle dans la formation de structures d'ordres supérieurs de la chromatine.

### *1.2.3. Expression des gènes codant les histones canoniques.*

Les gènes codants pour les histones canoniques sont exprimés uniquement en phase S du cycle cellulaire et de manière réplication dépendante. Elles sont codées par plusieurs gènes et exprimées massivement lors de la phase S afin de répondre à la demande importante en histone résultante de la réplication de l'ADN. L'ARN messenger (ARNm) des gènes d'histones canoniques contient en 5' et 3' des séquences très courtes non traduites et une coiffe en 5' comme tous les ARNm eucaryotes transcrits par l'ARN polymérase II. En revanche ce sont les seuls ARNm ne contenant pas en 3' une queue polyadénylée, ils possèdent à la place une structure secondaire en tige boucle caractéristique et très conservée qui permet leurs régulations. La protéine SLBP (Stem-loop binding protein) cible cette tige boucle et va réguler la traduction et la dégradation des ARNm d'histones (Marzluff et al., 2008).

## **1.3. Structures d'ordres supérieurs de la chromatine.**

L'ADN d'une cellule humaine fait environ deux mètres de long quant il est complètement déroulé. La cellule s'arrange pour compacter cet ADN dans un petit volume d'environ un micron. Cette formidable compaction de l'ADN est rendue possible par une structuration de l'ADN en chromatine. La chromatine est organisée en plusieurs niveaux de compaction allant de la fibre de 11 nm (nucléofilament) au chromosome mitotique (figure 3). Bien que la structure de la fibre de 11 nm soit connue, la forme et la géométrie des structures supérieures de compaction restent à ce jour inconnues. Toutefois, il est admis que la fibre de 11 nm se compacte en une fibre de 30 nm. La structure de la fibre de 30 nm reste un sujet très controversé par la communauté scientifique.

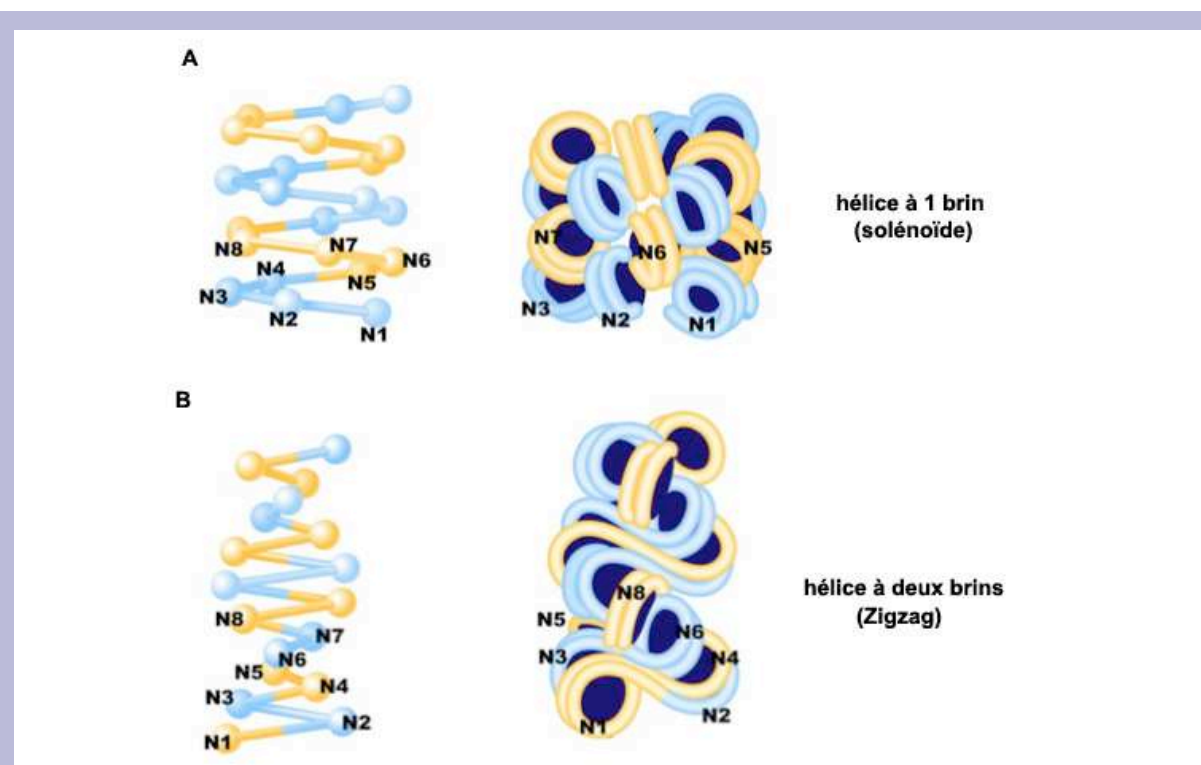


**Figure 3 : Structure d'ordre supérieur de la chromatine.** L'ADN s'enroule autour de l'octamère d'histone pour former le nucléosome qui s'enchaîne sur le brin d'ADN pour former le nucléofilament de 11 nm de diamètre. L'ajout de l'histone de liaison H1 compacte cette structure pour donner la fibre de 30 nm. Après plusieurs niveaux de compaction, la chromatine prend sa structure la plus resserrée : le chromosome mitotique. Adapté de Maeshima et al., 2010.

Au niveau de la fibre de 11 nm, les nucléosomes sont séparés par un ADN espaceur de 10 à 90 pb. (Giannasca et al., 1993). L'ajout de cations divalents organise cette structure en un filament de 30 nm de diamètre (Finch and Klug, 1976) qui est considéré comme la structure secondaire de la chromatine. L'ajout de l'histone H1 stabilise cette structure et détermine la trajectoire d'entrée et de sortie de l'ADN (Thoma et al., 1979; Sivolob and Prunell, 2003). L'histone H1 positionne les nucléosomes sur la fibre de 30 mm et oriente les interactions entre nucléosomes.

Il existe deux modèles pour décrire la structure de la fibre de 30 nm :

- le modèle en solénoïde ou hélice à un brin (figure 4A) est le premier à avoir été décrit où le nucléofilament se courbe en formant une hélice d'un pas de six nucléosomes (Finch and Klug, 1976).
- le modèle en « zigzag » ou hélice à deux brins (figure 4B) dont il existe des variations où essentiellement un nucléosome est attaché à son deuxième voisin et non pas au premier (Woodcock et al., 1984; Bassett et al., 2009).



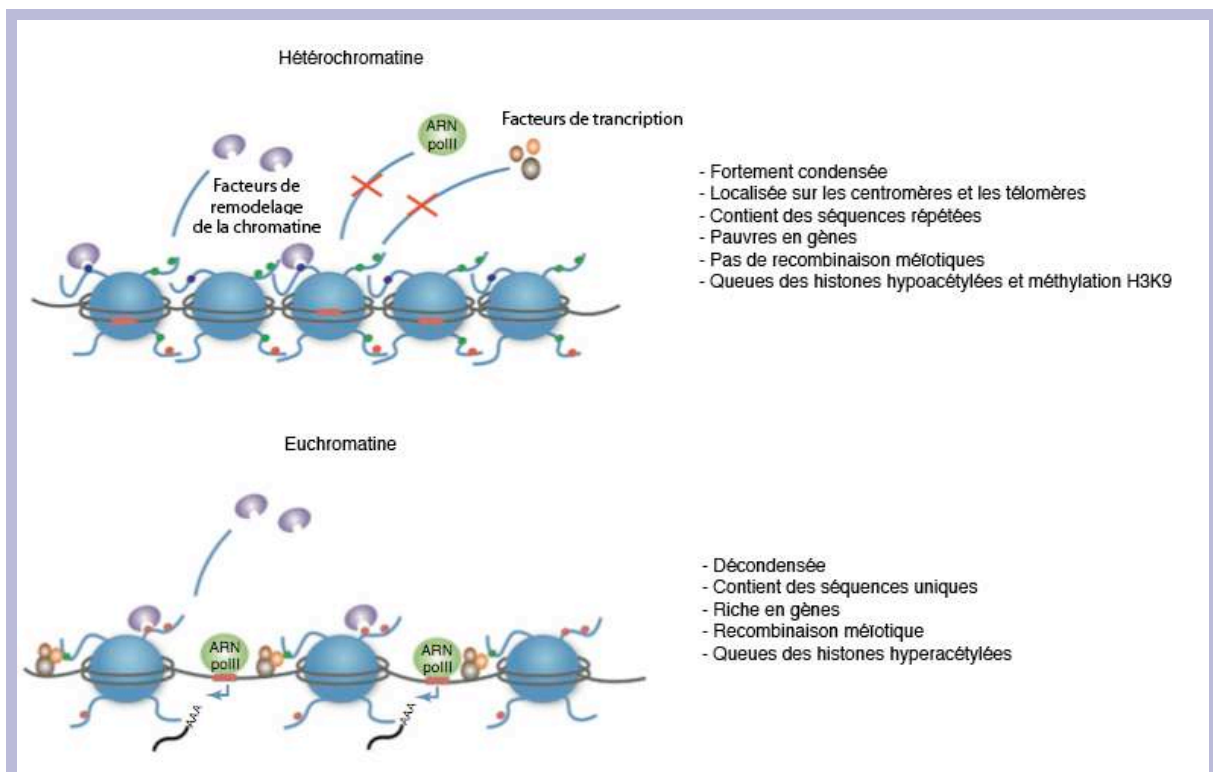
**Figure 4 :** Les différents modèles de structure de la fibre de 30 nm. La position des huit premiers nucléosomes est représentée (N1 à N8). (A) Le modèle de l'hélice à 1 brin ou solénoïde dans lequel un nucléosome interagit avec son 5ème et 6ème voisin. (B) Alors que dans le modèle en « zigzag » ou en hélice à deux brins, un nucléosome interagit avec son 2ème voisin. L'alternance bleue et jaune schématise le pas de l'hélice. Adapté de Maeshima et al., 2010.

Des études de liaison covalentes induites (cross-link) sur une répétition de 12 nucléosomes ainsi que la résolution de la structure à 9 Å d'un tétranucléosome conforte le modèle en « zigzag » (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005). Cependant, la précision de cette structure étant assez faible, la position de l'ADN internucléosomale et des nucléosomes a été faite en utilisant la structure atomique du nucléosome ; ce qui ne conforte pas à 100 % ce modèle. Des images en cryomicroscopie électronique (cryo-EM) sur des fibres de chromatine reconstituée *in vitro* contenant l'histone H5 (un variant du l'histone de liaison H1) confirment le modèle du solénoïde (Robinson and Rhodes, 2006; Robinson et al., 2006). Il semblerait que la fibre de 30 nm adopte une conformation en forme de solénoïde ou un nucléosome interagit avec son 5ème et 6ème voisin et non pas avec son 1er voisin comme proposé initialement (figure 4A). Ces travaux contradictoires ont été réconciliés par une étude qui a démontré que les deux structures peuvent coexister sur la fibre de 30 nm (Grigoryev et al., 2009). À l'inverse, des images sur des cellules vivantes en utilisant la cryomicroscopie électronique en section vitrifiée (CEMOVIS) n'ont jamais permis de visualiser la fibre de 30 nm dans des cellules mitotiques

(Eltsov et al., 2008). Elle est également absente des régions transcriptionnellement actives chez la levure, car la densité de ces régions est plus compacte qu'une fibre de 30 nm (Dekker, 2008). Il existe pourtant des types cellulaires où le noyau contient de la chromatine principalement sous la forme d'une fibre de 30 nm (Woodcock, 1994). La chromatine étant une structure très dynamique, il semblerait que la fibre de 30 nm soit une structure de transition entre un état plus relâché, transcriptionnellement actif, et un état compacté où la chromatine serait sous forme de polymère.

#### I.4. Les territoires chromatiniens.

En 1928, lorsque pour la première fois E. Heitz décrit la présence en interphase de deux formes de chromatine dont l'aspect de compaction est différent : l'hétérochromatine et l'euchromatine (figure 5). Cette division de la chromatine a été la première évidence d'une influence de l'organisation de la chromatine sur la régulation des gènes. Depuis, ce domaine de la recherche a beaucoup avancé et démontre la complexité de ces deux formes.



**Figure 5 : L'hétérochromatine et l'euchromatine.** L'hétérochromatine très condensée et pauvre en gène ne permettant pas la transcription, par opposition à l'euchromatine, très relâchée riche en gène et favorable à la transcription. Adapté de Croken et al., 2012.



#### *1.4.1. L'euchromatine.*

L'euchromatine existe sous deux formes différentes de condensation. La plus relâchée et qui porte une activité transcriptionnelle, ne représente que 10 % de l'euchromatine totale, alors que la plus condensée ne présente aucune activité transcriptionnelle (Lamond and Earnshaw, 1998; Spector, 2001). L'euchromatine va contenir beaucoup de gènes et ne constitue que 4 % du génome des mammifères. Les modifications d'histones majoritaires sont : la méthylation de la lysine 4 (H3K4me) et de la lysine 36 (H3K36me) (Santos-Rosa et al., 2002; Bernstein et al., 2005)(Santos-Rosa et al., 2002; Bernstein et al., 2005)(Santos-Rosa et al., 2002; Bernstein et al., 2005) de l'histone H3 (Santos-Rosa et al., 2002; Bernstein et al., 2005) et l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) (Grunstein, 1997). Elle est ordonnée comme un complexe dynamique et va interagir avec différentes machineries cellulaires (l'ARN polymérase II, les complexes de modification ou de remodelage de la chromatine, etc.) pour permettre la transcription d'ARNm fonctionnels.

#### *1.4.2. L'hétérochromatine.*

L'hétérochromatine est généralement décrite comme transcriptionnellement inactive, contrairement à l'euchromatine qui tend à être associée à la partie active du génome. Cependant, tous les gènes inactifs et les régions non transcrites ne semblent pas appartenir à l'hétérochromatine. Elle nécessite tout de même une transcription à faible niveau pour être formée (Grewal and Elgin, 2007) et va participer à la réplication et la ségrégation des chromosomes (Nagaki et al., 2005). Il a été démontré que l'hétérochromatine était dépourvue d'histones acétylées (Jeppesen et al., 1992). La méthylation des histones est en revanche très importante pour la formation de l'hétérochromatine. La mutation d'une histone méthyltransférase spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 perturbe totalement la formation de l'hétérochromatine chez la drosophile ; ceci a été la première évidence de l'importance de cette modification (Rea et al., 2000). Par la suite, ceci a été généralisé à beaucoup d'organismes comme la levure (sauf *S. cerevisiae*), les mammifères et les plantes (Nakayama et al., 2000; Litt et al., 2001; Taverna et al., 2002). Grâce à des anticorps plus performants, il a été démontré que l'hétérochromatine contient en majorité une triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me<sub>3</sub>) alors que l'euchromatine silencieuse contient une mono/diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me ou H3K9me<sub>2</sub>) (Peters et al., 2003).

On distingue deux types d'hétérochromatine : (i) L'hétérochromatine constitutive, qui est une chromatine silencieuse et fortement condensée contenant des séquences d'ADN répétées

comme les séquences répétées ou les éléments transposables. Elle se situe au niveau des télomères, des centromères et des régions péri-centromériques (Birchler et al., 2000). Cette chromatine est dans un état stable et irréversible qui est transmis à chaque division cellulaire ce qui constitue une forme de mémoire cellulaire. Elle peut aussi affecter l'expression de gènes situés aux alentours (Grewal and Elgin, 2007). (ii) L'hétérochromatine facultative qui se trouve au niveau de loci régulés par le développement où l'état de la chromatine peut changer en réponse aux signaux cellulaires. Ces régions ont la possibilité d'adopter des conformations compactes ou relâchées dans des contextes temporels et spatiaux différents (Trojer and Reinberg, 2007).

## II. MODIFICATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE.

La chromatine n'a pas une structure uniforme, elle est organisée en domaine comme l'euchromatine et l'hétérochromatine qui vont dans certains cas être un obstacle à des processus cellulaires liés à l'ADN (par exemple la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN). Les cellules eucaryotes ont développé des mécanismes pour moduler la structure de la chromatine afin de rendre l'information génétique accessible. La cellule possède plusieurs procédés pour modifier la structure de l'unité de base de la chromatine, le nucléosome. Parmi ces modifications on distingue : les modifications covalentes des histones qui ont lieu principalement sur les queues des histones ; le remplacement des histones canoniques par des variantes, les facteurs de remodelage dépendant de l'ATP, qui altèrent la structure de la chromatine ; la méthylation de l'ADN, qui est une alternative pour intervenir directement sur la double hélice.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire et beaucoup d'autres ont tenté de disséquer ces mécanismes afin de mieux les comprendre.

### II.1. La méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est la seule modification covalente connue de la molécule d'ADN. Chez les procaryotes la méthylation de l'ADN intervient sur les cytosines et les adénines et a pour fonction de protéger l'ADN de mutation lors de la réplication, les brins nouvellement synthétisés ne sont pas immédiatement méthylés. Ils sont d'abord contrôlés puis réparés si nécessaire et enfin méthylés (Noyer-Weidner and Trautner, 1993). Chez les eucaryotes la méthylation a lieu uniquement sur les cytosines dans un contexte CpG et elle est distribuée tout le long de génome à l'exception de certaines régions très riches appelées îlots CpG (Bird, 1986).

En revanche, elle n'est pas présente chez certains eucaryotes comme *Caenorhabditis elegans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki and Bird, 2008). Le plus haut taux de méthylation est observé chez les plantes (environ 50 % des cytosines) (Montero et al., 1992). Il y a des variations importantes au niveau de la localisation de l'ADN méthylé en fonction des organismes. Chez les champignons, il n'y a que les éléments transposables et répétés qui sont méthylés (Selker et al., 2003), alors que chez les mammifères la globalité du génome est méthylée à l'exception de certains îlots CpG (environ 1-2 %) (Bird, 1986; Illingworth et al., 2008).

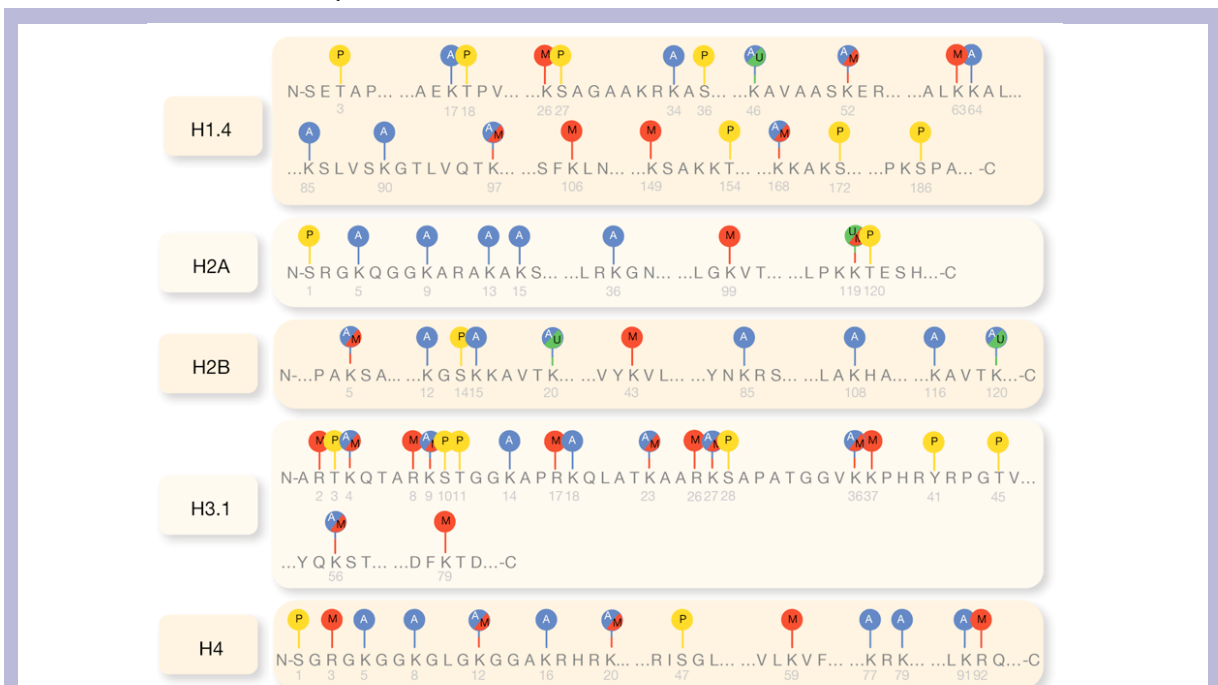
La méthylation de l'ADN est assurée par trois enzymes : Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b. Elles contiennent toutes un motif cytosine méthyltransférase très conservée dans leurs domaines catalytiques. Dnmt1 est exprimé de façon ubiquitaire et permet de maintenir la méthylation de l'ADN après la réplication (Bestor, 1992). Les deux autres, Dnmt3a et Dnmt3b interviennent lors du développement pour amorcer la méthylation de novo (Okano et al., 1999). L'inactivation des gènes codant ces méthyltransférases entraîne une mort embryonnaire chez la souris (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). On ne sait pas comment la méthylation est dirigée sur des endroits spécifiques du génome. Récemment, il a été démontré chez les plantes qu'un petit ARN double brin dirige la méthylation sur les régions contenant des séquences répétées du génome afin de les protéger d'une instabilité génomique. Les mammifères ont également ce genre de petits ARN mais ce genre de processus n'a pas encore été prouvé (Mosher and Melnyk, 2010).

La méthylation de l'ADN entraîne une modification de la structure de la chromatine qui permet le recrutement de facteurs spécifiques (Li, 2002). Plusieurs protéines ont été identifiées comme pouvant cibler les îlots CpG méthylés. MECP2 et les protéines MBD possèdent un domaine de liaison caractéristique à l'ADN méthylé (Bird, 2002). MECP2 est capable de réprimer la transcription de façon méthylation spécifique, en formant un complexe comprenant des histones déacétylases et Sin3a (Nan et al., 1998). MBD3 est une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine Mi-2/NuRD qui réprime la transcription (Wade et al., 1999; Zhang et al., 1999).

D'une manière générale, la méthylation de l'ADN a été reliée à la répression de l'activité transcriptionnelle chez les mammifères et les plantes (Suzuki and Bird, 2008). Lors du développement, la majorité des îlots CpG ne sont pas méthylés. Une partie le deviendra plus tard et sera associée à une répression transcriptionnelle. Au cours de l'inactivation du chromosome X, des centaines d'îlots CpG sont méthylés, ce qui crée une répression globale du chromosome X (Weber et al., 2005).

## II.2. Les modifications covalentes des histones.

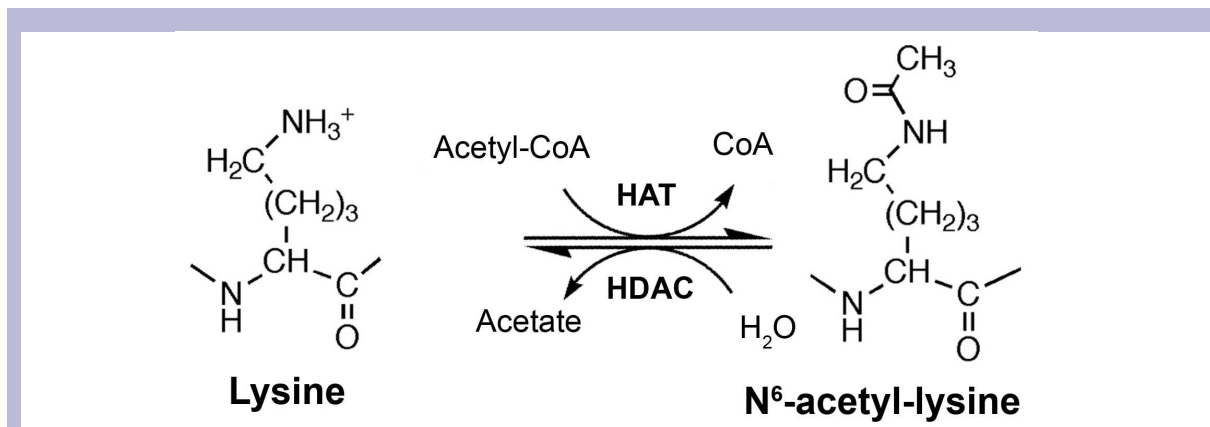
Les histones sont les cibles de multiples modifications post-traductionnelles. C'est dans les années 60 que Vincent Allfrey fait état pour la première fois d'une acétylation et d'une méthylation des histones qui ont un impact sur la transcription (Allfrey et al., 1964). Ces changements sur les histones vont avoir un effet sur la structure de la chromatine et vont permettre le recrutement de manière spécifique de protéines et de complexes enzymatiques qui auront une influence sur des processus cellulaires comme la réplication, la transcription, la réparation... (Bannister and Kouzarides, 2011). Il existe un grand nombre de modifications que l'on retrouve sur les histones comme : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la SUMOylation, l'ADP-ribosylation, déimination, l'isomérisation des prolines et la  $\beta$ -N-acétylglucosamination. La plupart de ces modifications ont lieu sur les queues amino et carboxy terminales des histones canoniques et certaines variantes d'histones. Récemment, il a été décrit la possibilité de modifier des résidus dans le domaine globulaire des histones. On dénombre environ une soixantaine (figure 6) de résidus qui sont modifiés, mais ce chiffre risque d'augmenter dans les années à venir. Un très grand nombre d'enzymes sont responsables de l'ajout de ces groupements chimiques sur les histones et la recherche s'est focalisée sur l'identification de ces enzymes lors de ces dernières années.



**Figure 6 : Les modifications covalentes des histones.** Toutes les histones sont ciblées par des modifications post-traductionnelles qui ont lieu dans les queues des histones. Les principales modifications sont : l'acétylation (bleu), la méthylation (rouge), la phosphorylation (jaune) et l'ubiquitinylation (vert). Les numéros indiquent la position des résidus dans la séquence. Adapté de Alabert and Groth, 2012.

### II.2.1. L'acétylation.

L'acétylation des histones est une modification post-traductionnelle réversible qui a été décrite dans les années 60 (Allfrey et al., 1964). Elle est caractérisée par l'ajout d'un groupement acétylé sur le groupement amine des lysines des queues des histones (figure 7). L'acétylation joue un rôle important dans différents processus cellulaires.



**Figure 7 : L'acétylation des lysines des histones.** L'ajout d'un groupement acétylé (CH<sub>3</sub>-CO-), à partir de l'acétyl-coenzyme A sur une lysine est catalysé par un acétyltransférase d'histone. La déacétylation est catalysée par un déacétylase d'histone. Adapté de Jiang et al., 2007.

L'acétylation intervient dans un premier temps dans l'assemblage de la chromatine. Les histones nouvellement synthétisées sont acétylées puis déacétylées directement après leurs dépositions (Annunziato, 2012). Les lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4 (H4K5, H4K8 et H4K12) sont modifiées chez les eucaryotes (Sobel et al., 1995) et permettent aux chaperonnes d'histones de les reconnaître pour les déposer sur la chromatine. Le complexe humain CAF-1 dépose spécifiquement les histones nouvellement synthétisées, car il s'associe préférentiellement avec H4 acétylé aux positions K5, K8 et K12 (Verreault et al., 1996). De la même manière Asf1 est retrouvé associé avec H3 acétylé aux positions K14, K5 et K12 chez la drosophile (Tyler et al., 1999). Il semble indiquer que l'acétylation permet de discriminer les « nouvelles » histones des anciennes, mais le mécanisme de reconnaissance n'est pas encore connu.

L'acétylation est très importante pour l'assemblage de la chromatine chez la levure, une chaperonne d'histone nommée Hif1 s'associe préférentiellement avec H4 acétylé pour la déposer sur la chromatine (Ai and Parthun, 2004; Poveda et al., 2004). Par ailleurs, Hat1, une acétyltransférase (HAT) spécifique de l'histone H4 et qui est importée dans le noyau avec H3 et H4, joue un rôle important dans la déposition des histones (Ai and Parthun, 2004; Poveda et al., 2004). Il n'existe pas encore d'HAT qui acétyle spécifiquement H3, le seul candidat est un complexe composé de la HAT Gcn5 et la protéine adaptatrice Ada3 qui acétyle H3 *in vitro*

(Sklenar and Parthun, 2004). Les mutations des sites d'acétylation des résidus K5, K8 et K12 de l'histone H4 provoquent un défaut d'assemblage de la chromatine chez la levure (Ma et al., 1998). Initialement, l'acétylation a été identifiée sur les queues des histones or, récemment il a été démontré qu'elle pouvait avoir lieu dans le domaine globulaire des histones (Benson, 2005; Xu et al., 2005; Zhou et al., 2006). La lysine 56 de l'histone H3 est acétylée peu de temps après sa synthèse et interagit avec le complexe CAF-1 et Asf1 (Masumoto et al., 2005; Zhou et al., 2006). La lysine 91 de l'histone H4 est acétylée et serait importante pour l'interaction entre le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et le dimère H2A-H2B (Ye et al., 2005). La mutation de la lysine 91 de H4 chez la levure entraîne une instabilité de la chromatine et une sensibilité aux agents endommageant l'ADN (Ye et al., 2005). Toutes ces données renforcent l'idée de l'importance de l'acétylation dans l'assemblage de la chromatine.

Mais l'acétylation est surtout impliquée dans la régulation génétique. Le modèle actuel de la transcription fait intervenir l'ARN polymérase II, des facteurs généraux de la transcription, des corepresseurs, des coactivateurs et des protéines liant des séquences spécifiques. Les coactivateurs et les corepresseurs contiennent une large gamme de protéine modifiant la chromatine, dont les HAT et les désacétylases d'histones (HDAC) (Bannister and Kouzarides, 2011).

#### *II.2.1.a. Les acétyltransférases d'histones (HAT).*

Toutes les HAT possèdent un domaine acétyltransférase et des domaines additionnels. Généralement, les HAT sont classées en deux groupes : HAT A et HAT B, en fonction du mécanisme de catalyse et de localisation cellulaire. Les HAT de type B jouent essentiellement dans le cytoplasme et dans l'assemblage de la chromatine (voir chapitre B 2.1), Elles sont très conservées et partagent leurs séquences avec le membre fondateur de ce groupe Hat1 de levure (tableau 1) (Parthun, 2007). Les HAT du type A sont plus nombreuses et diverses, elles contiennent les HAT : GNAT, MYST et CBP/p300 (tableau 1) (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). De nombreuses études ont montré que ces enzymes ciblent les queues N-terminales des histones et qu'elles font partie de grands complexes coactivateurs de la transcription. Gcn5, une HAT de du groupe GNAT, est un membre du complexe coactivateur SAGA et acétyle spécifiquement H3 et H2B chez la levure sur les gènes actifs (Kuo et al., 2000; Suka et al., 2001). De même que Esa1, une HAT du groupe MYST, fait partie du complexe NuA4 qui acétyle spécifiquement H4 et H2A chez la levure (Allard et al., 1999; Suka et al., 2001). La neutralisation de charge induite par l'acétylation permet un accès plus aisé aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase

II (Yang and Seto, 2007). Récemment, il a été démontré que l'acétylation de résidus du domaine globulaire était impliqué dans la stabilité du nucléosome. L'acétylation de la lysine 56 de H3 (H3K56) par la HAT humaine Gcn5 déstabilise l'interaction entre les histones et l'ADN (Tjeertes et al., 2009). La délétion du gène de la HAT p300 chez la souris induit une perte de l'acétylation de H3K56, ce qui suggère une implication de cette HAT sur H3K56 (Das et al., 2009). De plus, la délétion de p300 ou de Gcn5 chez la souris (Tjeertes et al., 2009) augmente la sensibilité aux agents endommageant l'ADN.

Famille	Nom	Organisme	Complexes associés	Substrat	Fonctions
<b>GNAT</b>	Gcn5	de la levure à l'homme	SAGA	H3/H2B	coactivateur
	PCAF	mammifères	PCAF	H3/H4	coactivateur
	Hat-1	levure	HATB	H4 K5 K12	acétyles les histones
	Hpa2	levure	Hap2	H3/H4	non caractérisée
	Elp3	levure	elongator	H3	élongation de la transcription
<b>MYST</b>	Tip60	homme	TRRAP	H4/H2A	coactivateur, réparation de l'ADN
	Sas2	levure	SAS	H4	répression
	Sas3	levure	NuA3	H3	répression
	MORF	homme	MOZ/MORF	H3	coactivateur
	Hbo1	homme	HBO1	H3/H4	réplication
	Esa1	levure	NuA4	H4/H2A	progression du cycle cellulaire
	MOF	drosophile et l'homme	MSL	H4	chromosome X
<b>CBP/p300</b>	CBP/p300	de la drosophile à l'homme	CBP/p300	histone de cœur	coactivateur, réplication, réparation

**Tableau 1: Les principales enzymes HAT.**

### II.2.1.b. Les déacétylases d'histones (HDAC).

Les HDAC sont regroupées en quatre classes en fonction de leurs conservations phylogénétiques. La classe I, la classe II et la classe IV (tableau 2) sont respectivement très liées à Rpd3, Hda1 et Hos3 de levure et englobent la superfamille des HDAC zinc dépendant ; par opposition à la classe III (tableau 2) qui contient les HDAC dépendantes du NAD<sup>+</sup> et contient des protéines homologues à la sirtuine Sir2 de levure (Yang and Seto, 2007). Les HDAC ont un effet opposé aux HAT en enlevant le groupement acétylé (figure 7) et en rétablissant la charge positive sur la lysine. Il en résulte une stabilisation de la structure de la chromatine et une inhibition de la transcription. En général, les HDAC ont une spécificité de substrat relativement faible, par exemple Rpd3 déacétyle toutes les histones du cœur alors que Hda1 cible H3 et

H2B, les deux peuvent être dirigés vers des gènes spécifiques par respectivement Ume6 et Tup1 (Rundlett et al., 1998; Wu et al., 2001). Les HDAC sont aussi liées à des corépresseurs de la transcription qui contiennent des domaines SANT qui ont la particularité de fixer les queues des histones non modifiées (la Cruz et al., 2005). Le corépresseur SMRT contient deux domaines SANT ; l'un fixe H4 non modifié et l'autre se lie à HDAC3 ce qui permet d'amplifier la déacétylation le long de la chromatine (Yu et al., 2003; Hartman et al., 2005). Les HDAC auraient un rôle activateur sur la transcription, il semblerait que pour activer la transcription une alternance rapide entre l'acétylation et la déacétylation soit requise. Rpd3 est recruté lors de la transcription de gènes spécifiques en réponse à un stress osmotique ou un choc thermique. L'utilisation de la trichostatine A (un inhibiteur des HDAC) a les mêmes effets dramatiques sur l'activation de la transcription que la délétion d'HDAC comme Rpd3 et Hos1 chez la levure (Bernstein et al., 2000). Le rôle des HDAC sur la transcription est bien plus complexe qu'un simple effet inhibiteur, il faudra encore d'autres travaux pour mieux comprendre l'implication des HDAC sur la transcription.

Classe	homologue de levure	homologue humain	localisation	mode d'action
<b>classe I</b>	Rpd3	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8	noyau	Zn dépendant
<b>classe II</b>	Hda1	HDAC4 HDAC5 HDAC6 HDAC7 HDAC9	noyau et cytoplasme	Zn dépendant
<b>classe III</b>	Sir2	SIRT1 à SIR7	mitochondrie et cytoplasme	NAD+ dépendant
<b>classe IV</b>	Hos3	HDAC11	noyau et cytoplasme	Zn dépendant

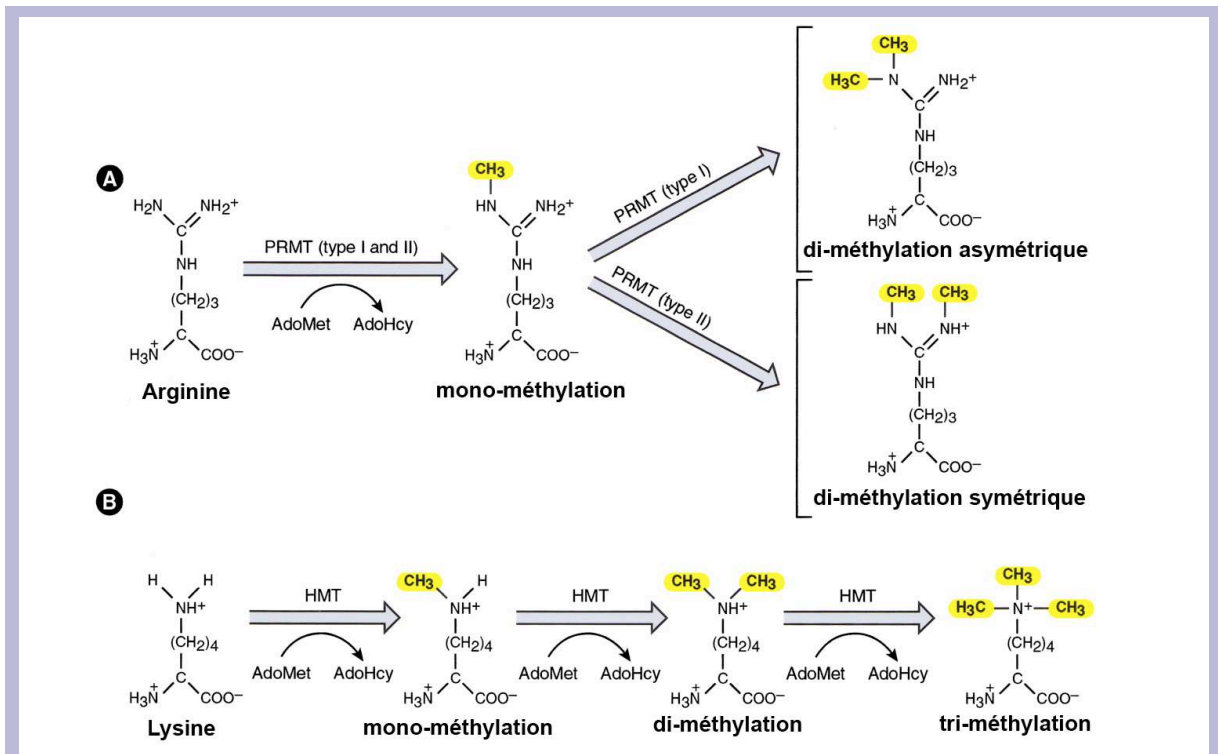
**Tableau 2: Les principales enzymes HDAC.**

### II.2.2. La méthylation.

La méthylation des histones a lieu principalement sur les chaînes latérales des lysines et des arginines. À la différence de l'acétylation et la phosphorylation, elle ne modifie pas la charge de l'histone, mais affecte les propriétés stériques et hydrophobes de la protéine. La méthylation des histones augmente l'affinité pour certaines protéines, comme des facteurs de transcription. Il y a différents niveaux de complexité concernant cette modification qui va



dépendre des propriétés fonctionnelles de la méthyltransférase associée ; les lysines peuvent être mono, di ou triméthylées, alors que les arginines peuvent être monométhylées (d'une façon symétrique ou asymétrique) et diméthylées (figure 11) (Bedford and Clarke, 2009; Ng et al., 2009).

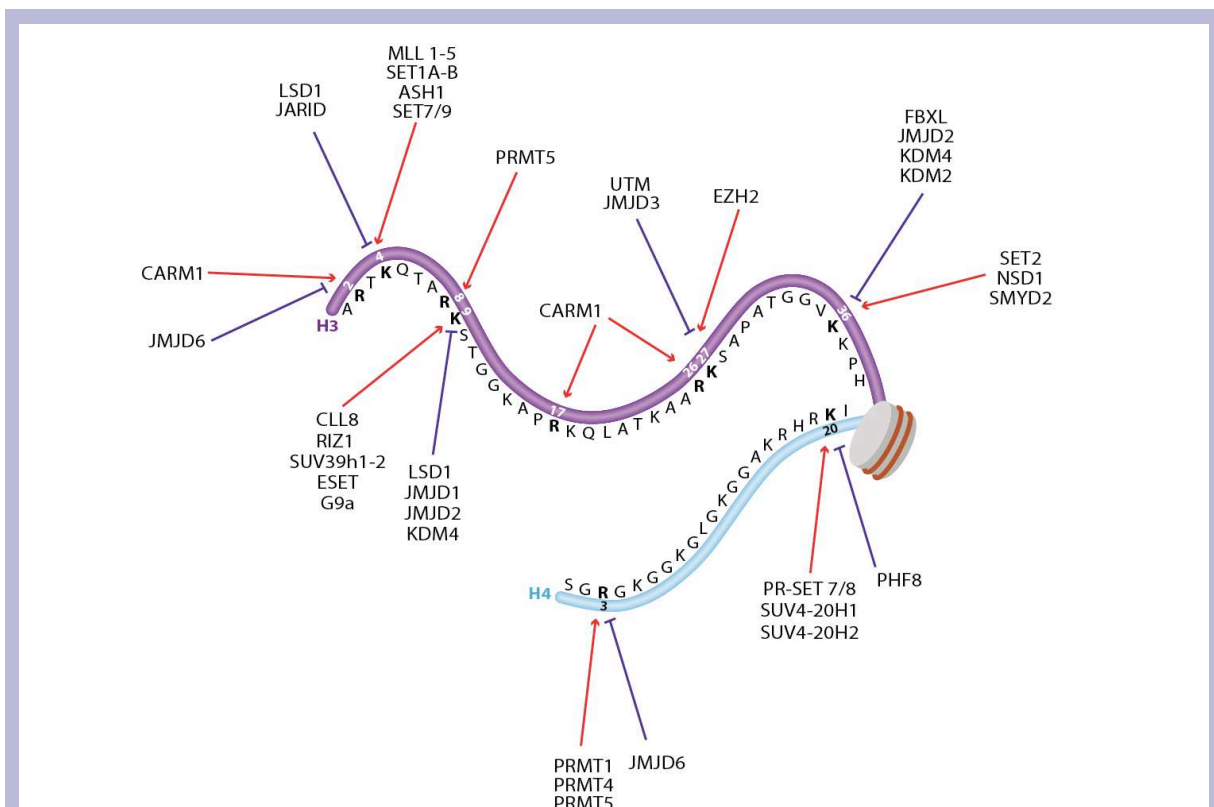


**Figure 8 : La méthylation des lysines et des arginines des histones.** (A) Méthylation des arginines par les PRMT de type I et II. (B) Niveau de méthylation des lysines. Adapté de Zhang and Reinberg, 2001.

### II.2.2.a. La méthylation des résidus lysines.

Les méthyltransférases d'histones (HMT) sont divisées en trois classes : les lysines méthyltransférase (HKMT) contenant un domaine SET, les HKMT n'ont pas un domaine SET et les arginines méthyltransférases (figure 8). Les trois classes utilisent le S-adenosylméthionine (SAM) comme cofacteur pour ajouter des groupements méthyles (Smith and Denu, 2009). Les lysines méthyltransférases (HLMT) ont une spécificité de substrat, elles vont modifier une seule lysine sur une seule histone ce qui conduit à une activation ou une répression de la transcription. SUV39H1 qui cible H3K9 a été la première HKMT identifiée (Rea et al., 2000). Depuis, de nombreuses HKMT ont été identifiées. Elles modifient les lysines des queues N-terminales de H3 et H4 (figure 9). Toutes les HKMT qui méthylent les lysines des queues possèdent un domaine SET. Seule l'enzyme Dot1 qui méthyle H3K79, situé dans le domaine

globulaire de H3, ne possède pas de domaine SET (Steger et al., 2008). On ne sait pas pourquoi cette enzyme est différente des autres, certainement pour avoir un accès à son substrat. La classe des enzymes contenant un domaine SET est la mieux caractérisée actuellement et a été associée à des maladies métaboliques (El-Osta et al., 2008; Lee et al., 2008; Brasacchio et al., 2009). Le domaine SET est très conservé au cours de l'évolution, il a été identifié initialement chez la drosophile sur des protéines du groupe « enhancer of zeste » (Jones and Gelbart, 1993) ou du groupe « trithorax » (Stassen et al., 1995). Le rôle majeur des HKMT va être de moduler l'activité des gènes en méthylant les histones qui induisent une altération de la chromatine (Rea et al., 2000). La méthylation de H3K9 permet de recruter la protéine HP1 pour former



**Figure 9 : Les sites de modifications des méthyltransférases (flèche rouge) et des déméthylases (flèche bleue).** Adapté de Mosammaparast and Shi, 2010.

l'hétérochromatine. HP1 reconnaît les protéines méthylées grâce à un chromodomaine (Santos-Rosa et al., 2002). Ce qui est à l'opposé de la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de H3 qui est associée à l'euchromatine et une activation de la transcription (Lee et al., 2005). Les HKMT peuvent aussi cibler des protéines qui ne sont pas des histones comme p53 (Chuikov et al., 2004), pRb (Munro et al., 2010) et le récepteur aux estrogènes (Subramanian et al., 2008). Ce sont des enzymes relativement très spécifiques. Par exemple chez *Neurospora crassa*, DIM5 méthyle H3K9 alors que SET7/9 cible H3K4. Elles sont aussi spécifiques du niveau de méthylation, DIM5 ne pouvant que triméthyliser H3K9 (Tamaru et al., 2003) alors que SET7/9

monométhyle H3K4 (Xiao et al., 2003). Cette spécificité a été mise en évidence grâce à des études cristallographiques qui ont démontré qu'un résidu essentiel dans le domaine catalytique permet de donner la spécificité à l'enzyme. Une phénylalanine (F281) dans la poche de liaison à la lysine de DIM5 permet la méthylation à tous les niveaux et donc une triméthylation (Zhang and Tang, 2003). C'est une tyrosine (Y305) pour SET7/9 qui en revanche ne permet que la monométhylation (Xiao et al., 2003). La mutation de la F281 en tyrosine sur DIM5 la convertit en une monométhyltransférase tandis que la mutation de la Y305 en une phénylalanine de SET7/9 crée une triméthyltransférase (Zhang and Tang, 2003). D'une manière plus générale, les résidus aromatiques sont responsables du niveau de méthylation des HKMT (Collins et al., 2005).

### *II.2.2.b. La méthylation des résidus arginines.*

Les arginines méthyltransférases sont elles-mêmes divisées en deux classes, les types I qui génèrent des arginines monométhylées et diméthylées (de façon asymétrique) et les types II qui génèrent des arginines monométhylées et diméthylées (de façon symétrique) (figure 8). Ces deux types comportent environ 11 membres et sont dénommés PRMT. Toutes ces enzymes transfèrent un groupement méthyle provenant du cofacteur SAM sur le groupement guanidinium de l'arginine (figure 8). Les arginines méthyltransférases les mieux caractérisées sont les PRMT 1, 4, 5 et 6 (figure 9). Elles sont très différentes des lysines méthyltransférases, car le site de fixation du cofacteur SAM est opposé au site de fixation à l'histone. De cette manière, la molécule de SAM et l'histone arrivent au site catalytique par deux chemins différents, ce qui permettrait de modéliser des drogues pour cibler spécifiquement les arginines méthyltransférases.

### *II.2.2.c. Les déméthylases.*

Pendant de nombreuses années, la méthylation des histones était considérée comme une modification stable. En 2002, il a été suggéré l'existence d'une déméthylation des résidus arginines et lysines (Bannister et al., 2002) qui a été confirmé expérimentalement. La conversion d'une arginine méthylée en citrulline grâce à une réaction de déimination a été la première preuve d'un mécanisme de réversion de la méthylation de l'arginine (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004b). Bien que ce qu'il ne soit par direct, récemment il a été découvert que la protéine jumonji JMJD6 est capable de déméthyle l'histone H3 le passant d'une forme triméthylée à une forme diméthylée (Chang et al., 2007). En 2004, LSD1 a été identifié comme la première

lysine déméthylase qui utilise comme cofacteur le FAD (Shi et al., 2004). La réaction nécessite la présence d'un atome d'azote protoné d'une lysine mono ou diméthylée. La protéine LSD1 peut *in vitro* enlever les groupements méthyles de H3K4 mono ou diméthylée, mais pas dans un contexte d'un nucléosome, alors qu'en présence du complexe corépresseur Co-REST elle peut déméthyliser les histones d'un nucléosome. Ceci suggère que les membres du complexe Co-REST permettent la reconnaissance des histones du nucléosome à LSD1. L'activité de LSD1 peut être modulée, car elle déméthyle H3K9 lorsqu'elle est complexée avec le récepteur aux androgènes (Klose and Zhang, 2007). Depuis, d'autres types de lysines déméthylases ont été identifiées (Tsukada et al., 2006). Certaines enzymes de cette classe sont capables de déméthyliser des lysines triméthylées. Elles utilisent un mécanisme différent de LSD1 en ayant besoin du Fe(II) et du l' $\alpha$ -ketoglutarate comme cofacteurs. JMJD2 déméthyle H3K9 et H3K36 triméthylée grâce à un domaine JmjC jumonji (Chen et al., 2006). De nombreuses lysines déméthylases ont été identifiées et elles contiennent toutes un domaine JmjC jumonji à l'exception de LSD1 (Mosammaparast and Shi, 2010). Toutes ces enzymes comme les méthyltransférases ont une très haute spécificité pour leurs substrats et sont sensibles au niveau de méthylation de leurs substrats. Certaines déméthylases sont capables de déméthyliser uniquement une lysine monométhylée, alors que d'autres ne sont capables que de déméthyliser une lysine triméthylée.

### II.2.3. La phosphorylation.

La phosphorylation des histones est devenue un sujet très important au cours de ces dernières années. La phosphorylation des histones a été associée à une variété de processus cellulaires, y compris la régulation transcriptionnelle, l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la condensation des chromosomes, et la régulation des gènes du développement (Oki et al., 2007). Elle a lieu sur les sérines, les thréonines et les tyrosines des queues N-terminales ainsi que dans les domaines globulaires des histones. Le niveau de phosphorylation est régulé par des kinases et des phosphatases spécifiques (Oki et al., 2007). Toutes les kinases identifiées transfèrent un phosphate provenant de l'ATP sur le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de l'acide aminé cible, ajoutant une charge négative à l'histone, ce qui influence la structure et la fonction de la chromatine. Cependant, il est difficile de savoir comment l'enzyme est recruté sur son site (Oki et al., 2007). De nombreux résidus sont phosphorylés sur les histones du cœur et les variantes d'histones.

La phosphorylation de H3 est l'une des plus étudiées et notamment sur la sérine 10 (H3S10P) qui est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Elle a lieu durant la mitose

par les kinases Ipl1 et Snf-1 chez la levure (Glover et al., 1995; Lo et al., 2001) et par Aurora B, IKK, Rsk2 et AKT chez les mammifères (Prigent and Dimitrov, 2003). Elle commence à s'établir au niveau de l'hétérochromatine péricentrique en fin de phase G2 et se répand sur tout le chromosome lors de la prophase (Hendzel et al., 1997) et disparaît en fin de télophase avec la décondensation des chromosomes (Hendzel et al., 1997). Ceci suggère un rôle de H3S10 lors de la condensation et la ségrégation des chromosomes. H3S10 a aussi un rôle en interphase au niveau de l'activation de la transcription. L'ajout du phosphate permet de charger négativement la queue N-terminale de H3 ce qui a pour conséquence de déstabiliser les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN et de se faire augmenter l'accessibilité à des facteurs de transcription (Cheung et al., 2000).

#### *II.2.4. L'ADP ribosylation.*

Les histones sont mono ou poly ADP-ribosylées sur les résidus glutamate et arginine, cependant on sait très peu de choses sur la fonction de cette modification. La réaction est caractérisée par le transfert d'ADP ribose en provenance du NAD<sup>+</sup> sur un accepteur protéique en libérant la nicotinamide (Hassa et al., 2006). Les protéines peuvent être poly ADP-ribosylées de manière linéaire ou branchée. La réaction est catalysée par une enzyme appelée polyADP-ribose polymérase (PARP) et elle peut être reversée par une enzyme appelée polyADP-ribose glycosylase (PARG) (Hassa et al., 2006). De nombreuses études ont suggéré que les grandes quantités de NAD<sup>+</sup> synthétisé dans le noyau sont impliquées dans la modulation de la structure de la chromatine (Hassa et al., 2006). Le niveau d'histones poly ADP-ribosylées a été corrélé avec une forme de chromatine plus relâchée (Hassa et al., 2006). De plus l'activation de la PARP-1 a été reliée à un fort taux de nucléosomes acétylés (Cohen-Armon et al., 2007). La mono ADP-ribosylation est catalysée par un autre type d'enzyme : les monos ADP-ribosyltransférases. Elle intervient sur toutes les histones et elle augmente significativement lors de réponse aux cassures de l'ADN (Hassa et al., 2006).

#### *II.2.5. L'ubiquitination et la sumoylation.*

Toutes les modifications précédentes font intervenir l'addition de petites molécules sur les chaînes latérales des acides aminés. L'ubiquitination consiste en l'ajout d'un polypeptide de 76 aa sur les lysines par un mécanisme en trois étapes. L'ubiquitine est d'abord activée par une réaction dépendante de l'ATP impliquant une enzyme d'activation d'ubiquitine (E1) suivie par la conjugaison via une liaison thioester à un résidu cystéine d'une enzyme de conjugaison

l'ubiquitine-(E2). Lors de l'étape finale, l'ubiquitine est transférée de l'enzyme E2 vers la lysine cible. Ce transfert est catalysé par une ligase isopeptidique (E3) qui est caractérisée par la présence d'un domaine RING (Hershko and Ciechanover, 1998). Ces différentes enzymes déterminent le site de modification et le niveau d'ubiquitination (mono ou poly). La mono ubiquitination semble être le consensus pour toutes les histones cependant les sites de modifications ne sont pas tous caractérisés. Deux sites sur H2A et H2B sont très bien caractérisés. La mono ubiquitination de la lysine 119 de H2A est effectuée par la ligase RING1B membre du complexe PRC1L qui est impliqué dans la répression des gènes (Wang et al., 2004a). La mono ubiquitination de la lysine 123 de H2B est assurée par RNF20 et permet l'activation de la transcription en recrutant des méthyltransférases nécessaires à l'activation de la transcription (Lee et al., 2007; Kim et al., 2009).

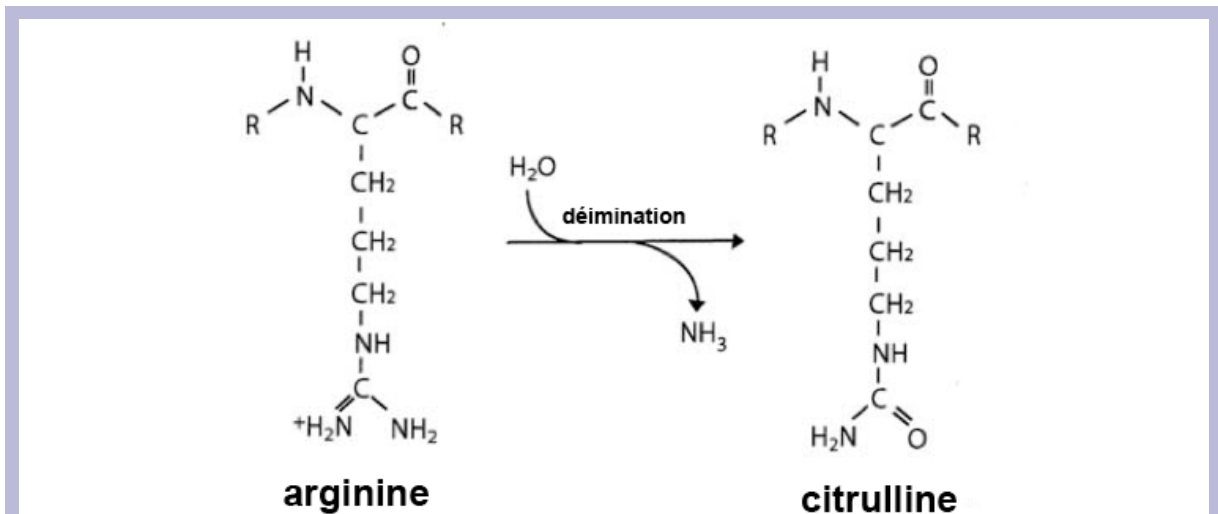
La sumoylation est une modification apparentée à l'ubiquitination. Elle est caractérisée par l'ajout d'un polypeptide SUMO d'environ 100 aa sur une lysine au niveau d'une séquence consensus  $\Phi$ KxE (ou  $\Phi$  est une isoleucine, une leucine ou une valine et x est un acide aminé quelconque). L'attachement de SUMO est effectué par une cascade de réactions enzymatiques similaires à celles de la voie d'ubiquitylation, mais les enzymes des deux voies sont totalement différentes (Seeler and Dejean, 2003). La sumoylation des histones a été détectée sur les toutes les histones et est associée à une répression transcriptionnelle (Shiio and Eisenman, 2003). La protéine HP1 et certaines HDAC seraient recrutées à la chromatine grâce à cette modification (Shiio and Eisenman, 2003). Il reste encore à élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la sumoylation des histones.

#### *II.2.6. Les autres modifications.*

La déimination est une réaction qui permet la conversion d'une arginine en une citrulline (figure 10). La réaction est catalysée par une peptidyl déiminase PAID4 (Cuthbert et al., 2004). L'effet majeur de cette modification est la perte d'une charge positive, car le groupement amine est enlevé.

La délétion des queues N-terminales des histones est un autre mécanisme radical pour enlever les modifications résidantes sur les histones. Elle a été démontrée pour la première fois chez *Tetrahymena* en 1980 où les six premiers acides aminés de H3 sont clivés (Allis et al., 1980). Depuis cette activité a été observée chez la levure et la souris où les vingt et un premiers acides aminés de H3 sont supprimés (Santos-Rosa et al., 2009). C'est la Cathepsin L qui clive la partie N-terminale de H3 lors de la différenciation des cellules ES chez la souris (Duncan et al.,

2008). Il existe d'autres types de modifications comme la glycosylation (Liebich et al., 1993), la carbonylation (G T Wondrak, 2000) et la biotinylation (Hymes et al., 1995).



**Figure 10 : Déimination des résidus arginines des histones.** Le groupement amine de l'arginine est substitué par une peptidyl déiminase ce qui a pour conséquence la génération d'une citrulline. Adapté de Cuthbert et al., 2004.

### II.2.7. Relation entre les modifications covalentes des histones.

Les modifications covalentes des histones montrent encore une fois que le nucléosome n'est pas juste une structure protéique servant à enrouler l'ADN, mais qu'il peut être modifié par des groupements chimiques ou protéiques et ajoute encore un niveau de complexité à la dynamique de la chromatine. La présence de ces modifications sur la même histone ou celle qui est adjacente permet une relation entre elles qui est appelée « cross talk » en anglais. Une modification va favoriser d'une manière positive ou négative une autre en fonction du processus cellulaire engagé (Bannister and Kouzarides, 2011) ; en voici quelques exemples (figure 11) :

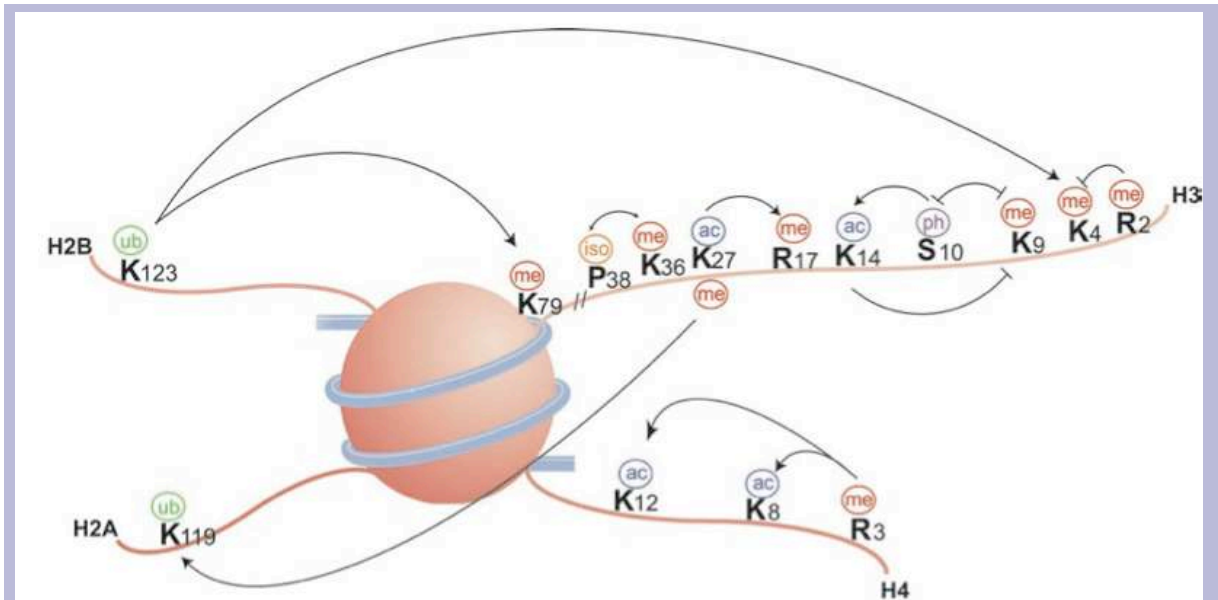
- Il y a une compétition entre modifications si elles ont lieu sur le même résidu. C'est le cas pour les lysines qui peuvent être acétylées, méthylées, ubiquitinyllées ou SUMOylées. Ces modifications s'excluent entre elles (figure 6).
- Dans certains cas, une modification va être dépendante d'une autre située sur la même ou une autre histone. Un très bon exemple chez la levure où l'on observe que la méthylation de H3K4 et H3K79 qui est dépendante de l'ubiquitination de H2BK123 (Lee et al., 2007) et dont le mécanisme est conservé chez les eucaryotes supérieurs (Kim et al., 2009).
- Le site d'attachement d'une protéine à une modification des histones peut être

altéré par une modification voisine. La fixation de HP1 sur H3K9 di- ou triméthylées peut être perturbée par la phosphorylation de H3S10 (Fischle et al., 2003).

- Il peut exister une coopération entre plusieurs modifications qui augmente la reconnaissance par d'autres protéines. Par exemple, PHF8 fixe spécifiquement H3K4 triméthylée grâce à son domaine PHD, cette interaction est renforcée si les lysines 9 et 14 de H3 sont méthylées (Vermeulen et al., 2010).

- Une relation entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN a été observée avec UHRF1 qui est une protéine qui fixe les nucléosomes contenant H3K9 triméthylés. Cette interaction est d'autant plus stimulée lorsque l'ADN nucléosomal est méthylé (Bartke et al., 2010).

- Une modification peut recruter des facteurs de modification de la chromatine qui vont à leur tour ajouter des modifications sur les histones. Yng1, un membre du complexe NuA3, reconnaît grâce à son domaine PHD H3K4 méthylée et apporte par l'intermédiaire de NuA3 une acétyltransférase pour acétyler H3K14 (Martin et al., 2006; Taverna et al., 2006). ING2 fixe H3K4 méthylée ce qui permet le recrutement d'une déacétylase par l'intermédiaire de ING2 (Shi et al., 2006).



**Figure 11 : Relation entre les modifications covalentes des histones.** Une modification peut affecter de manière positive (flèche) ou négative (flèche barrée) d'autres modifications. Adapté de Bannister and Kouzarides, 2011.

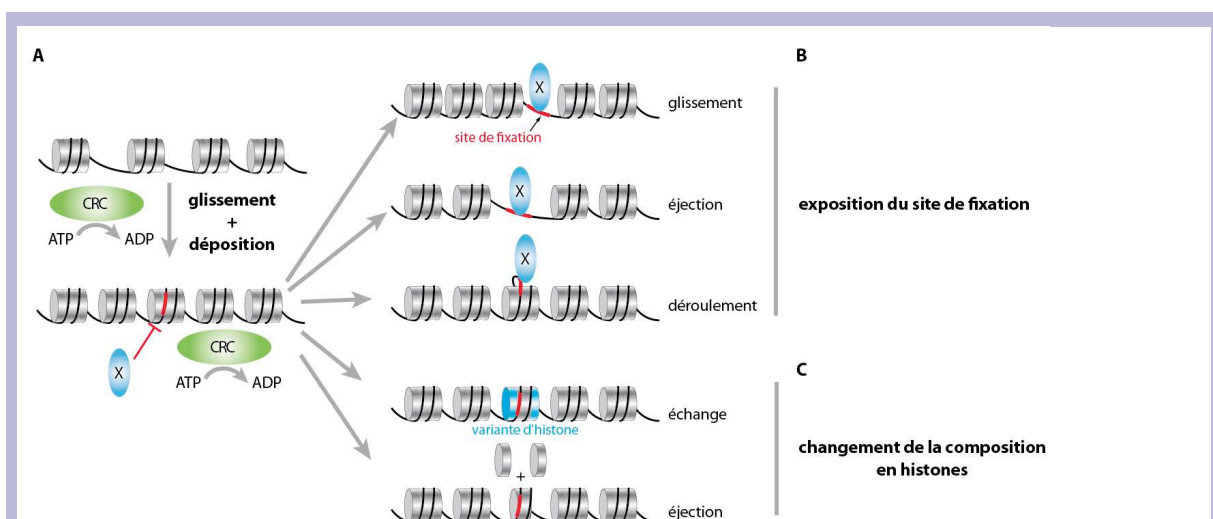
Nous avons vu à travers ce chapitre que les nucléosomes sont affectés par plusieurs modifications covalentes interconnectées entre elles. Celles-ci sont conservées au cours de l'évolution et ont un effet sur la structure et la fonction de la chromatine. Ces modifications



constituent un code épigénétique hérité d'une génération cellulaire à une autre. La grande variété de ces modifications et leurs implications dans les processus cellulaires a fait émerger l'idée d'un code histone (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000) porté par les queues N-terminales et les domaines globulaires des histones. Ce code histone est établi par diverses enzymes épigénétiques et il est interprété par des protéines spécifiques. Ces dernières vont agir comme une machinerie de traduction pour décoder l'information épigénétique dans les modifications d'histones. Ces marques épigénétiques sur les histones constituent un mécanisme de stockage de l'information sur tout le génome qui commence seulement à être décrypté. Il est de plus en plus évident que le code histone est un moyen potentiel d'étendre et de compléter l'information contenue dans le code génétique.

### II.3. Les complexes de remodelages de la chromatine ATP dépendants.

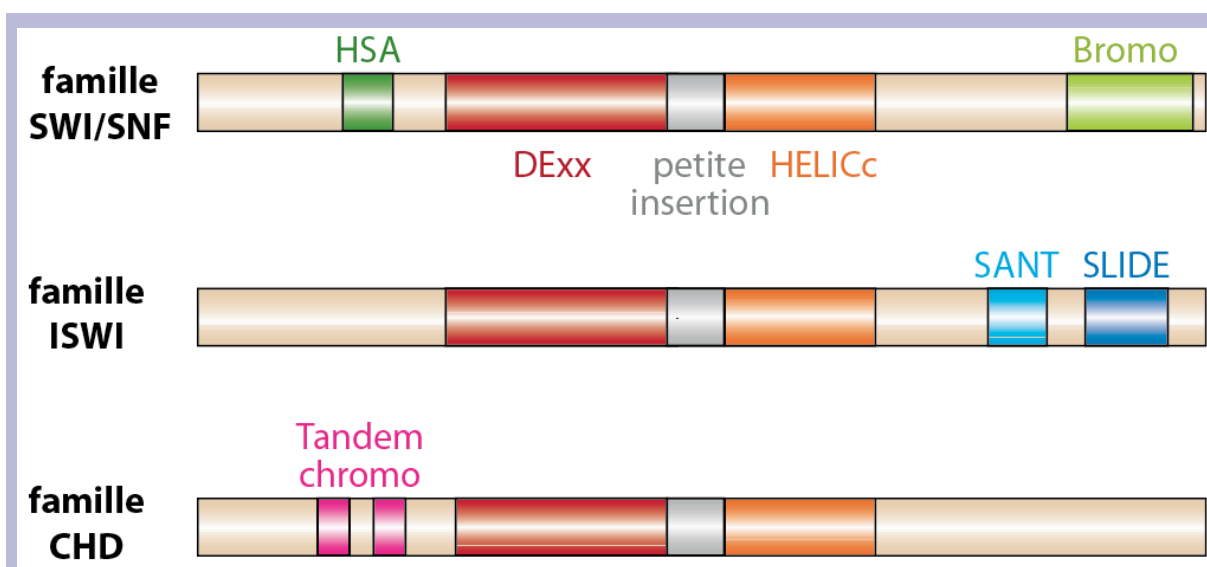
Le remodelage des nucléosomes est un mécanisme d'altération de l'interaction entre les histones et l'ADN qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP. L'accès à l'ADN est augmenté durant ce mécanisme, permettant à des facteurs spécifiques d'atteindre leurs séquences cibles lors de processus cellulaires importants comme la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN, etc. Les complexes de remodelages de la chromatine (CRC) ont la possibilité d'agir sur les nucléosomes de plusieurs façons (figure 12) :



**Figure 12 : Mode d'action des complexes de remodelages de la chromatine.** (A) Les CRC (en vert) peuvent assister l'assemblage de la chromatine en déplaçant les octamères d'histones existants pour créer de la place pour une nouvelle déposition. Les CRC peuvent agir de deux manières sur les nucléosomes : (B) l'exposition du site de fixation (en rouge) d'une protéine X (en bleu), initialement masqué par un octamère d'histone, par un glissement de nucléosome, une éjection du nucléosome ou un déroulement locale de l'ADN. (C) Ils peuvent aussi changer la composition en histones soit par un échange ou une éjection de dimères. Adapté de Clapier and Cairns, 2009.

- Les CRC assistent l'assemblage de la chromatine en déplaçant les octamères d'histones déjà déposés afin de créer de nouvelles zones de déposition (figure 12A).
- Le site de fixation d'une protéine sur l'ADN peut être inaccessible. Les CRC peuvent faire glisser ou éjecter les nucléosomes pour rendre le site de fixation accessible. Ils peuvent aussi dérouler localement l'ADN pour permettre à la protéine cible de fixer son site sur l'ADN (figure 12B).
- Les CRC peuvent incorporer des variantes d'histones par échange ou éjection des dimères d'histones préexistants (figure 12C).

Il y a actuellement quatre familles de CRC qui sont définies par leurs domaines ATPase: la famille SWI/SNF, la famille ISWI, la famille CHD/Mi-2 et la famille INO80 (figure 13). Les CRC sont tous spécialisés dans des processus cellulaires spécifiques grâce à une composition en sous-unité unique et un domaine ATPase unique (Becker and Hörz, 2002; Tsukiyama, 2002; Eberharter and Becker, 2004). Ces CRC vont partager plusieurs propriétés : une affinité pour les nucléosomes, un domaine de reconnaissance des modifications covalentes des histones (bromodomaine ou chromodomaine), un domaine ATPase similaire et un domaine ou des sous-unités régulant leurs activités. Chaque famille de CRC est conservée au cours de l'évolution avec de petites variations en composition en fonction des espèces.



**Figure 13** : Les familles de complexes de remodelages de la chromatine. Toutes les familles contiennent un domaine ATPase qui est séparé en deux parties par une insertion plus ou moins grande : DExx (rouge) et HELICc (orange). Chaque famille est caractérisée par des domaines spécifiques comme : HSA (vert foncé), bromodomaine (vert clair), chromodomaine en tandem (magenta), SANT (bleu clair) et SLIDE (bleu foncé). Adapté de Clapier and Cairns, 2009.

### *II.3.1. La famille SWI/SNF.*

La famille SWI/SNF a été initialement identifiée chez la levure et se compose de deux sous-familles très conservées au cours de l'évolution. La première contient les complexes : SWI/SNF de levure, BAP de drosophile et BAF humain. Alors que la deuxième compte les complexes : RSC de levure, PBAP de drosophile et PBAF humain (tableau 3). La caractéristique de ces CRC est la présence d'un bromodomaine sur la sous-unité ATPasique qui est spécialisée dans la reconnaissance des histones acétylées (Zeng and Zhou, 2002).

#### *II.3.1.a. Le complexe SWI/SNF de levure.*

C'est le premier CRC à avoir été identifié par deux études indépendantes. Les gènes SWI ont été mis en évidence pour leurs rôles dans la régulation de la transcription des gènes HO, qui encode des enzymes impliquées dans l'interconversion sexuelle chez la levure (Stern et al., 1984; Breeden and Nasmyth, 1987). Les gènes SNF ont été décrits comme nécessaires pour la transcription du gène *suc2* (Neigeborn and Carlson, 1984). Plus tard une partie des gènes *swi* et *snf* se sont avérés coder pour des sous-unités du complexe SWI/SNF. Une partie des gènes *snf*, comprenant SWI/SNF2, SNF5 et six autres gènes, sont impliqués dans la transcription des LTR du rétrotransposon Ty (Happel et al., 1991). La délétion du complexe SWI/SNF a un effet sur un petit ensemble des gènes de levure. Ce complexe serait impliqué soit dans l'activation ou la répression de ces gènes (Sudarsanam et al., 2000).

La purification du complexe SWI/SNF montre qu'il est composé de onze sous-unités (tableau 3) en incluant la sous-unité ATPasique Swi2/Snf2 (Côté et al., 1994; Peterson et al., 1994; Peterson, 1998). Les souches mutantes pour *swi/snf* ont montré une altération de la structure de la chromatine sur le promoteur du gène *suc2*, indépendamment du niveau de transcription du gène (Hirschhorn et al., 1992). Des mutations des gènes de H3 et H4 peuvent supprimer en partie les effets des mutants *swi/snf*. Ces mutations peuvent affecter la stabilité du nucléosome et permettre l'accès aux facteurs de transcription (Kurumizaka and Wolffe, 1997; Wechser et al., 1997). Ces études constituent un lien entre le complexe SWI/SNF et la chromatine

#### *II.3.1.b. Le complexe RSC de levure.*

Il existe un autre complexe très proche de SWI/SNF chez la levure qui a été décrite en 1994 (Cairns et al., 1994; 1999). Le complexe RSC contient quinze sous-unités, dont deux identiques

et au moins quatre homologues au complexe SWI/SNF (tableau 3) (Cairns et al., 1999; Wang, 2003). Les deux complexes partagent deux protéines apparentées à l'actine Arp7 et Arp9.

Le complexe RSC joue un rôle plus important dans la cellule par rapport au complexe SWI/SNF. Il est plus abondant que ce dernier, environ dix fois plus par cellule. La plupart des sous-unités du complexe RSC sont essentielles incluant la sous-unité ATPasique Sth1 (Wang, 2003). Les mutations de celles-ci entraînent des problèmes de ségrégation des chromosomes. Le complexe RSC interviendrait dans la configuration des centromères, mais n'est pas impliqué dans la déposition de variantes d'histones centromériques (Jing-mei Hsu, 2003).

#### *II.3.1.c. Les complexes BAP et PBAP de drosophile.*

Des études chez la drosophile ont identifié, le complexe BAP comprenant la sous-unité ATPasique BRM ou Brahma qui est l'homologue de Swi2/Snf2 et Sth1 de levure (tableau 3) (Tamkun et al., 1992; Papoulas et al., 1998). Le complexe BAP de 2MDa contient également des protéines associées à BRM (tableau 3) dont BAP-111 une protéine comportant une boîte HMG qui pourrait orienter ce complexe vers la chromatine (Papoulas et al., 1998). Le complexe BAP est très exprimé chez la drosophile et surtout pendant le développement. L'expression d'un dominant négatif de BRM conduit à des problèmes dans l'organogénèse et une diminution de la viabilité (Elfring et al., 1998). Un autre complexe PBAP a été mis en évidence, il possède la plupart des sous-unités de BAP sauf OSA et une sous-unité particulière BAP170 (tableau 3) (Mohrmann et al., 2004). BAP170 serait l'homologue de Rsc9 du complexe RSC de levure. La drosophile a deux complexes BAP et PBAP apparentés à SWI/SNF mais avec une sous-unité ATPasique unique. Il a été montré que ces complexes facilitent la transcription des gènes par l'ARN polymérase II et qu'ils soient impliqués dans la transcription de nombreux gènes des chromosomes polytènes (Armstrong et al., 2002).

#### *II.3.1.d. Les complexes BAF et PBAF humains.*

On retrouve aussi deux complexes apparentés à SWI/SNF chez l'homme : BAF qui contient la sous-unité ATPasique hBRM ou BRG1 et PBAF qui contient uniquement BRG1 (Khavari et al., 1993; Muchardt and Yaniv, 1993; Chiba et al., 1994; Wang et al., 1996). C'est deux complexes vont partager au moins cinq sous-unités homologues à SWI/SNF. BAF présente une sous unique BAF250 qui est l'homologue de Swi1 (Nie et al.), alors que PBAF possède une sous-unité spécifique BAF180 qui est structurellement proche de Rsc1, Rsc2 et Rsc4. Les protéines BRG1 et hBRM sont très similaires au niveau de leurs structures, mais elles ont des

fonctions très différentes (tableau 3). La délétion du gène correspondant à BRG1 est létale chez la souris (Bultman et al., 2000) et plusieurs mutations sont retrouvées sur BRG1 dans des lignées cellulaires tumorales (Liu et al., 2001). En revanche, la délétion de hBRM chez la souris est viable (Reyes et al., 1998). BRG1 lie les protéines à doigts de zinc grâce à un domaine unique en N-terminal. BRM peut interagir avec des protéines contenant des répétitions ankyrines qui sont des composants clés de la voie de transduction Notch (Kadam and Emerson, 2003). Les complexes associés à BRG1 et BRM sont impliqués dans des processus cellulaires différents. PBAF est nécessaire à la transactivation ligand dépendante des récepteurs nucléaires de la vitamine D et l'acide rétinoïque (Lemon et al., 2001) alors que BAF serait requis pour la transcription dépendante des récepteurs aux glucocorticoïdes (Trotter and Archer, 2004).

Complexe	levure		drosophile		homme	
	SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
<b>ATPase</b>	Swi2/snf2	Sth1	BRM/Brahma		hBRM ou BRG1	BRG1
<b>sous-unités non catalytiques</b>	Swi/Adr6		OSA		BAF250	
				Polybromo BAP170		BAF180 BAF200
	Swi3	Rsc8/Swh3	MOR/BAP155		BAF155, BAF170	
	Swp73	Rsc6	BAP60		BAF60a,b,c	
	Snf5	Sfh1	SNR1/BAP45		hSNF5/BAF47/INI1	
			BAP111/dalao		BAF57	
	Arp7 et Arp9		BAP55 ou BAP47		BAF53a, b	
			Actin		Actin	
Swp82, Taf14, Snf6/11	Rsc1-10/30					

**Tableau 3: Composition des CRC de la famille SWI/SNF.**

### II.3.2. La famille ISWI.

La seconde famille de CRC est caractérisée pour sa capacité à réarranger la chromatine en ordonnant de façon régulière les nucléosomes. Elle comprend les complexes ISWI 1 et 2 de levure (Tsukiyama et al., 1999; Vary et al., 2003; Iida and Araki, 2004), les complexes CHRAC, NURF et ACF de drosophile (Becker et al., 1994; Tsukiyama et al., 1994; Tsukiyama and Wu, 1995; Tsukiyama et al., 1995; Ito et al., 1997) et les complexes humains RSF (LeRoy, 1998; Loyola et al., 2003), hACF/WCRF (Bochar et al., 2000; LeRoy et al., 2000), hWICH (Bozhenok et al., 2002), hCHRAC (Poot et al., 2000), NoRC (Strohner et al., 2001) et hNURF (Barak et al., 2003) (tableau 4).

Les CRC de cette famille ont tous une sous unité ATPase ISWI très conservée et ont été

identifiés pour la première fois chez la drosophile (ACF, CHRAC et NURF). Le domaine ATPase de cette famille contient un domaine SANT-SLIDE qui permet la reconnaissance du nucléosome. À l'inverse des autres ATPase des CRC, ISWI ne possède aucun domaine de liaison aux histones modifiées.

### *II.3.2.a. Le complexe ISWI de drosophile.*

La sous-unité ATPasique ISWI est commune aux trois complexes ACF, CHRAC et NURF chez la drosophile. Des études biochimiques ont mis en évidence la fonction de facteur remodelage ATP dépendant de ISWI. Son activité est fortement stimulée par le nucléosome et très peu par l'ADN (Corona et al., 1999). ISWI peut réorganiser des nucléosomes irrégulièrement répartis sur l'ADN en les ordonnant régulièrement sur l'ADN (Hamiche et al., 1999; Längst et al., 1999). Ce mécanisme est réalisé selon deux scénarios :

- les nucléosomes glissent le long de l'ADN sans être désassemblés.
- les nucléosomes sont désassemblés et réassemblés de manière régulière.

ISWI peut aussi assister des facteurs de transcription et d'autres protéines pour fixer leurs séquences cibles (Corona et al., 1999). ISWI possède quasiment toutes les propriétés des complexes ACF, CHRAC et NURF mais ISWI interagit toujours avec différentes sous-unités en condition *in vivo* pour former des complexes distincts, l'activité d'ISWI est alors plus intense lorsqu'il est intégré dans un complexe (Eberharter et al., 2001). La purification des protéines associées à ISWI chez la drosophile a permis d'identifier trois complexes distincts :

#### **- NURF**

NURF est un complexe de 500 kDa composé de quatre sous-unités dont : ISWI qui porte l'activité ATPasique (Tsukiyama et al., 1994; Khorasanizadeh, 2004)(Tsukiyama et al., 1994; Khorasanizadeh, 2004)(Tsukiyama et al., 1994; Khorasanizadeh, 2004)(Tsukiyama et al., 1994; Khorasanizadeh, 2004), NURF38 qui possède une activité phosphatase, NURF55 une protéine contenant des répétitions WD40 et NURF301 (Tsukiyama and Wu, 1995; Xiao et al., 2001). NURF a d'abord été identifié comme un facteur facilitant la fixation de GAGA sur le promoteur de hsp70 (Tsukiyama et al., 1994). Le complexe NURF est capable de catalyser le glissement du nucléosome en présence d'ATP (Hamiche et al., 1999) et nécessite la partie N-terminale de H4 (Xiao et al., 2001).

---

- **ACF**

ACF est un complexe de 220 kDa composé de deux sous-unités: ISWI et ACF1 une protéine contenant un doigt PHD et un bromodomaine. La sous-unité ACF1 montre des similarités avec la sous-unité NURF301 du complexe NURF (Xiao et al., 2001). Le complexe ACF est capable d'assembler régulièrement des nucléosomes en coopérant avec NAP1 et CAF-1 (Ito et al., 1997). Il a aussi la possibilité d'induire le glissement de nucléosome et d'activer la transcription *in vitro* en facilitant la fixation de GAL4-VP16 sur de la chromatine reconstituée *in vitro* (Eberharter et al., 2001).

- **CHRAC**

CHRAC est un complexe de 670 kDa composé de quatre sous-unités dont ISWI, ACF1, CHRAC14-16, et la topoisomérase II (Varga-Weisz et al., 1997; Corona et al., 2000). De la même manière que ACF, CHRAC est impliqué dans l'assemblage et le désassemblage de la chromatine *in vitro* (Varga-Weisz et al., 1997). CHRAC14 et 16 sont des petites protéines contenant un domaine HFD certainement pour orienter le complexe vers des endroits spécifiques du génome.

*II.3.2.b. Les complexes ISWI de levure.*

La recherche d'homologue de ISWI chez la levure conduit à deux enzymes Isw1 et Isw2 (Tsukiyama et al., 1999). Les deux enzymes sont présentes dans des complexes différents. Isw1 est présent dans deux complexes ISW1a et ISW1b. Le complexe ISW1a est un hétérodimère entre Isw1 et loc3 alors que le complexe ISW1b contient Isw1, loc2 et loc4 (Vary et al., 2003). loc2 possède un domaine PHD caractéristique des protéines associées à la chromatine et loc4 a un motif PWWP qui lie l'ADN. Le complexe ISW2 est un dimère avec Itc1 qui est similaire à la protéine ACF1 de drosophile (Gelbart et al., 2001). De la même façon que chez la drosophile, ces complexes facilitent l'assemblage de la chromatine en coopération avec les chaperonnes d'histones NAP1 et CAF-1 en condition *in vitro* (Corona et al., 1999; Tsukiyama et al., 1999).

*II.3.2.c. Les complexes ISWI humains.*

Le génome humain code pour deux enzymes SNF2H et SNF2L qui sont apparentées à ISWI (Okabe et al., 1992; Aihara et al., 1998; Lazzaro and Picketts, 2001). SNF2H est exprimé ubiquitairement et fait partie des complexes : RSF (LeRoy, 1998; Loyola et al., 2003), hACF/WCRF (Bochar et al., 2000; LeRoy et al., 2000), hWICH (Bozhenok et al., 2002), hCHRAC (Poot et al., 2000) et NoRC (Strohner et al., 2001). L'ATPase SNF2L est seulement retrouvée dans le complexe hNURF qui est l'homologue du complexe NURF de drosophile (Barak et al., 2003).

RSF est présent uniquement chez l'humain et a la capacité d'assembler et d'organiser la chromatine *in vitro* sans l'assistance d'une chaperonne d'histone (Loyola et al., 2001), à la différence de ACF et CHRAC qui nécessite la chaperonne NAP1 (Ito et al., 1999). hACF/WCRF et hCHRAC sont impliqués dans la réplication de l'hétérochromatine (Collins et al., 2002). La délétion de hACF1, une sous-unité commune à hCHRAC et hACF/WCFR, par ARN interférence (ARNi) bloque la réplication de l'hétérochromatine péricentrique. L'utilisation d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN permet de reverser cet effet en permettant la décondensation de l'ADN, ce qui suggère que ACF/CHRAC facilite la progression de la fourche de réplication à travers l'hétérochromatine. Le complexe hWICH se localise au niveau de l'hétérochromatine de la même manière que hACF1, mais son rôle dans la réplication reste à déterminer (Bozhenok et al., 2002).

Le complexe NoRC possède une sous-unité Tip5 qui s'associe avec SIN3 et HDAC1 permettant la répression de la transcription de l'ADN ribosomique par l'ARN polymérase I (Zhou et al., 2002).

hNURF est également impliqué dans la transcription. La délétion par ARNi de la sous-unité ATPasique SNF2L réduit l'expression des gènes en-1 et en-2 (Barak et al., 2003) qui sont importants dans le développement du cerveau (Morgan, 2006).

Complexe	levure			drosophile			homme		
	ISW1a	ISW1b	ISW2	NURF	CHRAC	ACF	hNURF	hCHRAC	hACF/WCRF
<b>ATPase</b>	Isw1		Isw2	ISWI			SNF2L	SNF2H	
<b>sous-unités non catalytiques</b>			Itc1	NURF 301	ACF1		BPTF	hACF1	
					CHRAC14 CHRAC16			CHRAC17 CHRAC15	
				NURF55			RbAp46 /48		
<b>sous-unités uniques</b>	loc3	loc2/4		NURF38					a

**Tableau 4: Composition des CRC de la famille ISWI.** (a) SNF2H s'associe respectivement avec Tip5, RSF1 et WSTF pour former les complexes **NoRC**, **RSF** et **WICH**.

### II.3.3. La famille CHD/Mi-2.

Les CRC de la famille CHD/Mi-2 possèdent une ATPase Chd1/Mi-2 qui comporte un chromodomaine en tandem caractéristique. Ce dernier est un motif très conservé au cours de l'évolution qui a été mis en évidence sur les protéines HP1 et Polycomb chez la drosophile



(Woodage and Basrai, 1997). Ce domaine est également présent sur les HAT, les HMT et d'autres CRC. La famille CHD/Mi-2 comprend les complexes CHD1 et Mi-2/NuRD (tableau 5).

### *II.3.3.a. CHD1.*

L'ATPase Chd1 est retrouvé dans plusieurs organismes dont la levure, la drosophile et l'homme (Delmas et al., 1993; Woodage and Basrai, 1997; McDaniel et al., 2008). Une analyse biochimique de Chd1 chez la levure a mis en évidence que son activité ATPasique affecte l'interaction entre l'ADN et le nucléosome d'une façon différente de SWI/SNF (Tran et al., 2000). Chd1 montre une relocalisation préférentielle des nucléosomes au centre du fragment d'ADN (Stockdale et al., 2006). Chd1 de drosophile est capable d'assembler la chromatine en l'absence de H1 *in vitro* (Lusser and Urwin, 2005) suggérant un rôle dans l'assemblage de la chromatine transcriptionnellement active. Chd1 humain possède un domaine PHD qui permet de cibler H3K4 triméthylé et s'associe avec des facteurs de préinitiation pour faciliter l'élongation de la transcription (Sims, 2005; Sims et al., 2007). Une étude récente a démontré que CHD1 est impliqué dans la déposition de la variante d'histones H3.3 chez la drosophile (Konev et al., 2007).

### *II.3.3.b. Mi-2/NuRD.*

Le complexe Mi-2/NuRD est présent uniquement chez les eucaryotes supérieurs, (Kehle et al., 1998; Xue et al., 1998; Wade et al., 1999) mais absents de la levure. Ces complexes sont caractérisés par la présence d'une sous-unité ATPasique Mi-2 chez la drosophile et Mi-2 $\alpha$  et Mi-2 $\beta$  chez l'homme contenant un domaine PHD et des doigts de zinc (Woodage and Basrai, 1997). L'activité ATPasique de Mi-2 est stimulée uniquement par la chromatine ou le nucléosome mais pas par l'ADN libre (Wade et al., 1999). À l'origine Mi-2 a été découvert en tant qu'autoantigène dans des maladies de la peau comme la dermatomyosite, 25% des patients atteints par cette maladie présentent des anticorps contre Mi-2 (Ge et al., 1995; Seelig et al., 1995).

Le complexe Mi-2/NuRD comprend un domaine de remodelage de la chromatine et une activité HDAC. Il est constitué de sept protéines ayant un rôle dans la répression de la transcription : HDAC1 et 2, RbAp48 et 46, MTA1 à 3 et MBD3 (Wade et al., 1999). Il a été suggéré que MBD3 permet de cibler NuRD sur des régions d'ADN méthylé pour induire un remodelage de la chromatine et une déacétylation d'histones localisée (Denslow and Wade, 2007).

Mi-2/NuRD est recruté sur les sites de cassure de l'ADN grâce à la PARP (Chou et al., 2010; Polo et al., 2010) puis il est phosphorylé par ATM et favoriserait l'ubiquitination de  $\gamma$ -H2AX par

RNF8/RNF168. La perte de Mi-2 $\beta$  entraine une mauvaise réparation de l'ADN et un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Larsen et al., 2010; Smeenk et al., 2010).

Complexe	levure	drosophile		homme	
	CHD1	CHD1	Mi-2/NuRD	CHD1	Mi-2/NuRD
ATPase	Chd1	Chd1	Mi-2	Chd1	Mi-2 $\alpha$ +Mi-2 $\beta$
sous-unité non catalytique			dMBD2/3		MBD3
			dMTA		MTA1,2,3
			dRPD3		HDAC 1,2
			p55		RbAp46 ou 48
			p66/68		p66 $\alpha$ , $\beta$

Tableau 5: Composition des CRC de la famille Mi-2/NuRD.

#### II.3.4. La famille INO80.

Cette dernière famille est la plus récente à avoir été identifiée. Elle est caractérisée par la présence d'une grande insertion dans le domaine ATPasique et par des sous-unités en commun dont les hélicases Rvb1/2 et des protéines apparentées à l'actine (ARP) (Bao and Shen, 2007). La famille INO80 comprend les complexes suivants : INO80 et SWR1 de levure (Shen et al., 2000; Mizuguchi et al., 2004) ; INO80, SRCAP et p400/Tip60 de mammifères (Ikura et al., 2000; Jin et al., 2005; Ruhl et al., 2006) ; et dINO80 et Domino de drosophile (Kusch et al., 2004; Klymenko et al., 2006) (tableau 6).

##### II.3.4.a. Le complexe INO80.

Le complexe INO80 a été identifié lors de la recherche d'homologue des protéines ISWI et lors d'un criblage génétique des mutants affectant la biosynthèse de l'inositol chez la levure (Ebbert et al., 1999; Shen et al., 2000). Il a été purifié pour la première fois chez la levure. Il comprend quinze sous-unité ayant une stoechiométrie équivalente à l'exception des deux sous-unités Rvb1 et Rvb2 qui ont une stoechiométrie de 6 :1 par rapport aux autres sous-unités (Shen et al., 2000) (tableau 6). L'étude biochimique de ce complexe montre une activité hélicases 3'-5' (Shen et al., 2000). INO80 a la capacité de faire glisser les nucléosomes *in vitro* (Shen et al., 2003; Cai et al., 2006) et influence leurs évictions *in vivo* (Tsukuda et al., 2005; van Attikum et al., 2007), le glissement serait une étape qui précède l'éviction des nucléosomes. L'activité de remodelage de INO80 est fortement régulée par les ARP présentent dans le complexe (Shen et al., 2003).

La délétion de *ino80* chez la levure induit une dérégulation de plusieurs gènes. INO80 réprime le gène *pho5* et stimule le gène *pho85* au niveau de leurs promoteurs respectifs, indiquant que INO80 est nécessaire à la régulation de la transcription (Ebbert et al., 1999).

En plus de son implication dans la transcription, INO80 joue un rôle dans la réparation de l'ADN. La mutation du gène *ino80* chez la levure engendre une sensibilité accrue aux radiations ionisantes, aux ultraviolets et aux agents alkylants (Shen et al., 2000; 2003). INO80 est recruté au niveau des sites de cassure grâce à la sous-unité Nhp10 qui fait le lien avec  $\gamma$ -H2AX (une variante de H2A impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN) (Downs et al., 2004; Morrison et al., 2004; van Attikum et al., 2004). INO80 assure également l'éviction des nucléosomes aux environs du site de cassure et cette activité est régulée par le complexe MRN connu pour être impliqué dans la réparation de l'ADN (Tsukuda et al., 2005).

Il a été récemment démontré que INO80 est impliqué dans l'éviction de la variante d'histone H2AZ dans le corps des gènes, cette activité serait à l'origine pour corriger une mauvaise localisation de H2AZ (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Cette activité INO80 envers H2AZ reste controversée, car elle nécessite des quantités élevées en substrats.

#### *II.3.4.b. Le complexe SWR1.*

Le complexe SWR1 a été identifié à l'origine chez la levure par trois laboratoires différents (Krogan et al., 2003; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). La caractérisation de ce complexe montre qu'il contient quatorze sous-unités (tableau 6) dont des sous-unités partagées avec INO80 (Ruvb1/2, Arp4 et l'actine) et le complexe NuA4 (Arp4, Swc4 et Yaf9). La sous-unité ATPasique Swr1 possède une grande insertion dans le domaine ATPasique de la même manière que Ino80. SWR1 et son homologue chez les mammifères prennent en charge l'échange de H2A par la variante d'histone H2AZ (Mizuguchi et al., 2004; Ruhl et al., 2006). Il est intéressant de noter que la drosophile ne possède pas de complexe équivalent à SWR1.

Il devient évident que SWR1 est impliqué dans la réparation de l'ADN comme INO80. La délétion de *swr1* chez la levure entraîne une sensibilité importante aux agents endommageant l'ADN et qu'il soit recruté au niveau des cassures de l'ADN (Downs et al., 2004; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004).

#### *II.3.4.c. Le complexe p400/Tip60.*

Le complexe p400/Tip60 ou son homologue Domino chez la drosophile est composé de seize sous-unités (tableau 6) (Ikura et al., 2000; Kusch et al., 2004). En analysant la composition des sous-unités partagées avec d'autres complexes de la même famille, il semblerait que p400/Tip60 soit une fusion entre SWR1 et le complexe HAT NuA4 de levure. Il est composé entre autres d'une sous-unité ATPasique p400 apparentée à Swr1 et Tip60 qui est l'homologue

de Kat5 du complexe NuA4 chez la levure ce qui confère à p400/Tip60 une activité HAT et ATPasique (Ikura et al., 2000; Fuchs et al., 2001; Cai, 2003; Doyon et al., 2004).

Le complexe Domino est responsable de l'échange entre H2A et la variante d'histone H2Av (Kusch et al., 2004) ; de plus grâce à la sous-unité Tip60 il acétyle spécifiquement la forme phosphorylée de H2Av et facilite l'échange avec la forme non modifiée de H2Av au niveau des sites de cassures de l'ADN (Kusch et al., 2004). Tip60 acétyle ATM qui permet d'activer cette kinase et d'initier le processus de réparation de l'ADN (Sun et al., 2009).

En plus de son rôle dans la réparation de l'ADN, Tip60 semble réguler plusieurs autres voies critiques pour la viabilité cellulaire. Avec Brg1, Tip60 a été identifié dans un criblage de facteurs affectant la morphologie et le renouvellement des cellules ES. Dans cette même étude, il a été observé que le complexe p400/Tip60 est présent sur 55% des régions promotrices de gènes actifs et silencieux (Fazio et al., 2008).

La perturbation du ratio entre p400 et Tip60 par une surexpression ou l'utilisation de l'ARNi engendre une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération de cellules dérivées d'un cancer du côlon, cette observation suggère que ces deux protéines sont cruciales lors de la progression du cancer (Mattera et al., 2009).

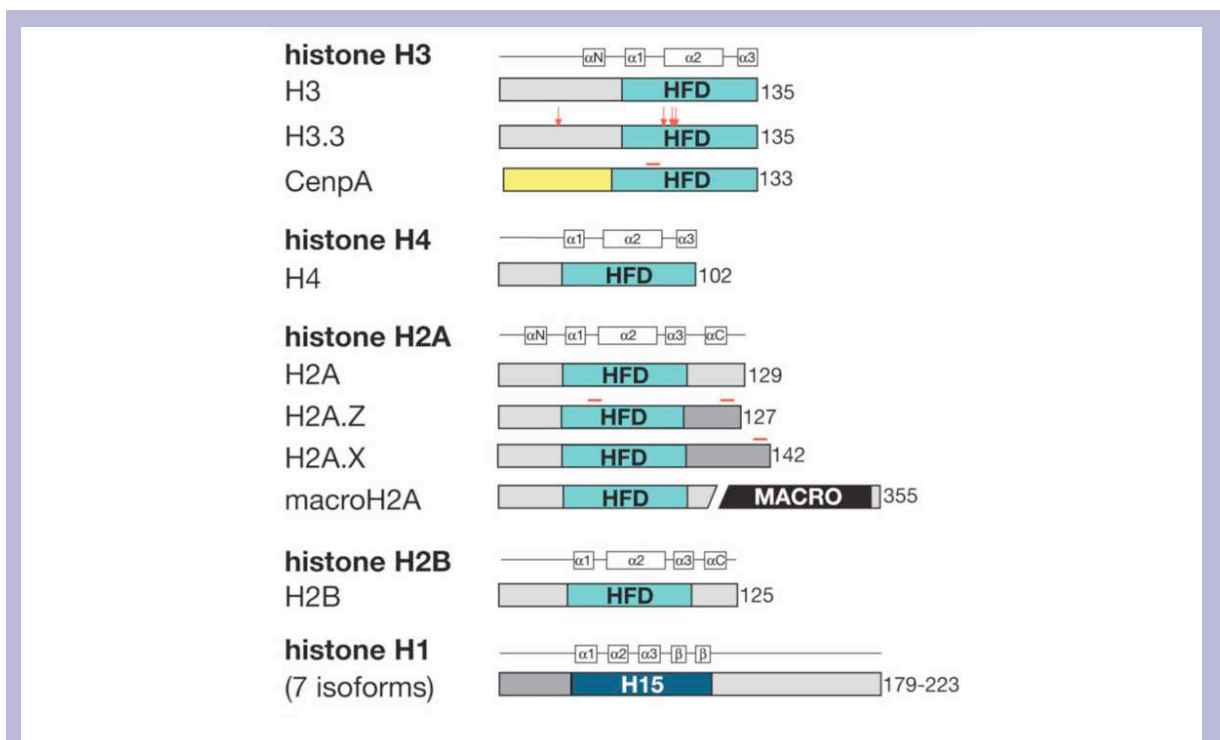
TRRAP est une autre sous-unité importante du complexe p400/Tip60, car elle fait partie d'autres complexes acétyltransférases impliqués dans la transcription comme p300/CBP (Carrozza et al., 2003).

	levure		drosophile		homme		
Complexe	INO80	SWR1	dINO80	Domino	INO80	SRCAP	p400/Tip60
ATPase	Ino80	swr1	dino80	Domino	hIno80	Srcap	p400
sous-unités non catalytiques	Rvd1,2		Reptin, Pontin		Tip49a,b		
	Arp5,8	Arp6	dArp5, 8	BAP55	BAF53a		
	Arp4, Actin1		dActin1	Actin87E	Arp5,8	Arp6	Actin
	Taf14	Yaf9		dGAS41	GAS41		
	les 2,6				hles 2,6		
		Swc4		dDMAP1	DMAP		
		Swc2		dYL1	YL1		
		Bdf1		dBrd8		Brd8	
		H2AZ/H2B		H2Av/H2B		H2AZ/H2B	
		Swc6				ZnF-HIT1	
				dTra1		TRRAP	
				dTip60		Tip60	
				dMRG15		MRG15, MRGX	
			dEaf6		FLJ11730		
			dMRGBP		MRGBP		
			E(Pc)		EPC1,2		
			dING3		ING3		
sous-unités uniques	les1, les3-5, Nhp10	Swc3,5,7	Pho		a		

**Tableau 6 : Composition des CRC de la famille INO80. (a) Amida, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309.**

## II.4. Incorporation de variantes d'histones.

L'étude de la chromatine comme porteuse de l'information épigénétique s'est surtout concentrée sur la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Un niveau de complexité a été ajouté au cours de ces dernières années avec la découverte de versions alternatives des histones canoniques. Ces paralogues, qui sont appelés variantes d'histones, partagent globalement la même structure que les histones canoniques ; en revanche leurs séquences primaires sont relativement différentes (figure 14). Les variantes d'histones sont retrouvées chez tous les eucaryotes et semblent avoir des rôles particuliers au niveau des régions spécifiques du génome. À la différence des histones canoniques qui sont déposées derrière la fourche de réplication, les variantes d'histones sont impliquées dans un processus de remplacement dans des conditions très particulières. Certaines variantes sont incorporées à des sites spécifiques pour remplacer des histones canoniques. Leurs dépositions sont effectuées d'une manière indépendante de la réplication, en dehors de la phase S du cycle cellulaire. La substitution d'une histone canonique par une variante d'histone crée un nucléosome variant possédant une structure et des propriétés physico-chimiques différentes.



**Figure 14: Structures des principales variantes d'histones.** Les différences présentes sur les variantes d'histones sont indiquées en rouge. Adapté de Allis, 2007

### *II.4.1. Les variantes de l'histone H3.*

Le nombre de variantes de l'histone H3 diffère en fonction des espèces. On distingue cinq variantes chez les mammifères : H3.1 et H3.2 sont les formes répliquatives de H3, H3.3 est une forme de remplacement qui est exprimée en dehors de la phase S du cycle cellulaire, CENP-A est un paralogue de H3 retrouvé dans les régions centromériques (Palmer et al., 1991) et H3t qui est une variante spécifique des testicules et n'est pas retrouvée dans les cellules somatiques (Govin et al., 2005). H3.1 et H3.2 humaines sont à 99% identiques alors que H3.3 est à 96% identique à H3.1, divergeant de cinq acides aminés seulement. CENP-A humaine est très divergente et partage seulement 46% d'identité avec H3.1 (Hamiche and Shuaib, 2012).

#### *II.4.1.a. CENP-A ou CenH3.*

Lors de la mitose, la ségrégation des chromosomes nécessite un alignement de tous les chromosomes à l'équateur de la cellule. Cet alignement est dû à l'attachement des microtubules du fuseau mitotique aux centromères et ce processus est contrôlé par les kinétochores. Aucune séquence d'ADN consensus n'a pu être identifiée sur les régions centromériques. Toutefois, les variantes de l'histone H3 de la famille CenH3 dont CENP-A chez l'homme, Cid chez la drosophile et Cse4p chez la levure ont été trouvées dans tous les centromères chez les eucaryotes. Par ailleurs, l'inactivation de CENP-A conduit à une mauvaise formation des kinétochores et des problèmes de ségrégation des chromosomes chez la levure, la drosophile et les mammifères (Sullivan, 2002). L'invalidation de CENP-A chez la souris provoque des problèmes en mitose et une létalité embryonnaire ce qui plaide en faveur d'un rôle important de cette variante en mitose (Howman et al., 2000). Malgré d'importantes divergences de séquences au niveau de l'ADN centromérique à travers les organismes, la famille CenH3 est très conservée (Malik and Henikoff, 2009). Les nucléosomes centromériques sont composés de huit histones, et la plupart sont des octamères homotypiques contenant deux copies de CENP-A. Une étude a montré qu'environ 10% des nucléosomes centromériques humains sont hétérotypiques (Foltz et al., 2006).

Tous les membres de la famille CenH3 ont une partie C-terminale très conservée et une partie N-terminale variable. La partie C-terminale semble être à l'origine du ciblage de CENP-A vers la chromatine centromérique (Sullivan et al., 1994; Henikoff et al., 2000) alors que la partie N-terminale est impliquée dans l'interaction avec les kinétochores (Chen et al., 2000).

CENP-A est déposé indépendamment de la réplication, il en résulte une répartition aléatoire de CENP-A sur les chromosomes filles. On ne sait pas comment est distribué CENP-A sur le centromère fille. En revanche, il existe plusieurs facteurs qui vont cibler CENP-A sur le centromère. Le CATD est un domaine dans la région HFD de CENP-A qui la dirige vers le centromère (Black et al., 2004; 2007) et le CRC RSF est nécessaire à la localisation de CENP-A sur les centromères (Perpelescu et al., 2009). Récemment, plusieurs équipes ont identifié HJURP comme la chaperonne spécifique de CENP-A chez l'humain. HJURP interagit directement avec CENP-A et une diminution de la quantité de cette chaperonne par ARNi entraîne une mauvaise ségrégation des chromosomes ainsi qu'un défaut de localisation de CENP-A (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Shuaib et al., 2010).

#### *II.4.1.b. H3.3.*

La variante d'histone H3.3 est très proche de l'histone canonique H3, il n'y a que quatre acides aminés différents chez la drosophile et respectivement cinq et quatre acides aminés différents avec H3.2 et H3.1 chez les mammifères. H3.3 est déposé durant tout le cycle cellulaire alors que H3 est déposé lors de la réplication, ce qui suggère une fonction différente (Ahmad and Henikoff, 2002).

#### *H3.3 s'accumule sur les sites actifs de transcription.*

On retrouve H3.3 sur des loci transcriptionnellement actifs chez la drosophile (Ahmad and Henikoff, 2002) et dans le macronucleus *Tetrahymena thermophila* (Allis and Wiggins, 1984) ce qui permet de penser que H3.3 est associé à la chromatine transcriptionnellement active. H3 et H3.3 partagent les mêmes sites de modifications post-traductionnelles, mais ils ne sont pas associés avec le même type de modification ; H3.3 contient des modifications typiques de la chromatine active comme la méthylation de K4 et K79 et l'acétylation de K9 et K14 (McKittrick et al., 2004). De la même manière, H3.1, H3.2 et H3.3 ne présentent pas les mêmes modifications chez les mammifères. H3.3 est aussi associé avec des marques spécifiques de la chromatine active (méthylation de K4 et K79, acétylation de K14, K18 et K23) comme chez la drosophile (Hake and Allis, 2006), alors que H3.2 est associé à des modifications de la chromatine silencieuse (Hake and Allis, 2006). En revanche, H3.1 combine les deux types de modifications, ces données permettent de penser que H3.1 et H3.2 ne sont pas équivalents.

L'accumulation de ces données renforce l'idée que H3.3 est important dans l'activation de la transcription, cependant H3.3 est également la variante de H3 majoritaire dans les

cellules différenciées ne se divisant pas chez les vertébrés (Piña and Suau, 1987). Alors que chez la drosophile il représente 25% du H3 total. En considérant qu'un petit pourcentage du génome est activement transcrit, H3.3 ne s'accumule pas uniquement sur des sites actifs de transcription.

La déposition de H3.3 dans les cellules germinales a lieu de manière indépendante de la réplication. H3.3 est déposé au cours de décondensation du noyau des spermatozoïdes chez la drosophile et la souris (Loppin et al., 2005; Torres-Padilla et al., 2006). Récemment, H3.3 a été trouvé au niveau des télomères et de l'hétérochromatine péricentrique dans les cellules ES de souris et de cellules MEF (Wong et al., 2009; Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Santenard et al., 2010). La connaissance des mécanismes de déposition à ces sites particuliers de H3.3 permettra d'assimiler les fonctions précises de H3.3 à ces sites.

### ***Déposition de H3.3.***

HIRA a été la première chaperonne décrite à être responsable de la déposition de H3.3. La purification des protéines associées à H3.1 et H3.3 dans les cellules de mammifères révèle la présence de deux chaperonnes différentes : CAF-1 pour l'assemblage de H3.1 lors de la réplication et HIRA pour H3.3 (Tagami et al., 2004). Le complexe de prédéposition de H3.3 contient en plus de HIRA, Cabin1 et Ubn1/2 (Balaji et al., 2009). Asf1 est une protéine partagée entre H3.1 et H3.3 et qui délivre les histones aux chaperonnes respectives (Tagami et al., 2004). HIRA est impliqué dans la déposition de H3.3 au cours de la décondensation du noyau des spermatozoïdes chez la drosophile (Loppin et al., 2005), mais n'est pas requis pour la déposition de H3.3 dans les embryons ou de cellules adultes (Loppin et al., 2005; Bonnefoy et al., 2007). Une étude récente montre que l'enrichissement de H3.3 au niveau des promoteurs et dans le corps des gènes des cellules ES est dépendante de HIRA (Goldberg et al., 2010). Ceci confirme l'idée que la déposition de H3.3 se fait par deux voies distinctes.

DAXX a été identifié comme une autre chaperonne de H3.3 et cette déposition est facilitée par ATRX (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010). Le complexe DAXX-ATRX dépose H3.3 au niveau des télomères et de l'hétérochromatine péricentrique par opposition aux régions ciblées par HIRA (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010). DAXX-ATRX semble réguler la transcription au niveau de ces sites, mais le mécanisme n'est pas encore connu.



#### *11.4.2. Les variantes de l'histone H2A.*

Cette famille de variantes contient au moins quatre sous-familles qui diffèrent en terme de séquence et de longueur. Chez les mammifères, la première sous-famille englobe H2A.1 et H2A.2 qui sont synthétisées lors de la phase S du cycle cellulaire en parallèle de la réplication. Les deux autres sous familles H2AX et H2AZ sont synthétisées pendant tout le cycle cellulaire, mais à un niveau très bas. La dernière sous-famille comprenant macroH2A.1 et macroH2A.2 dont la taille est approximativement trois fois celle de H2A.

À la différence des gènes encodant les histones canoniques, H2AX, H2AZ et macroH2A sont codés par des gènes uniques et contenant des introns. La transcription de ces gènes produit des ARNm polyadénylés ayant des régions non traduites plus longues que les histones canoniques.

##### *11.4.2.a. H2AX.*

H2AX est une variante de H2A qui est présente chez une grande variété d'organismes comme les mammifères, les plantes, les champignons et les protozoaires ; elle a une fonction très importante. Cette variante de H2A est caractérisée par la présence d'un motif conservé SQ(E,D)(I,L,F,Y) dans sa partie C-terminale.

##### *H2AX dans la réparation de l'ADN.*

H2AX est la cible de plusieurs modifications covalentes comme l'acétylation, l'ADP-ribosylation et la phosphorylation. La phosphorylation de la sérine 139 est importante pour la réparation par NHEJ (Rogakou et al., 1998). La création de cassures doubles brins sur l'ADN par des radiations ionisantes conduit à une phosphorylation rapide de H2AX ( $\gamma$ -H2AX) au niveau des sites de lésions. Il en résulte un recrutement spécifique des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme le complexe MRN (Mrell/rad50/Nbs1), BRCA1 et p53BP1 (Schultz et al., 2000). L'utilisation d'un inhibiteur de kinase empêche le recrutement de ces protéines, ce qui suggère que  $\gamma$ -H2AX est nécessaire à ce processus (Paull et al., 2000). La cinétique de phosphorylation de H2AX est similaire à celle du recrutement des protéines de la réparation. La phosphorylation de H2AX est assurée par des kinases de la famille PIKK : ATM et DNA-PK, qui sont utilisés lors de cassures par des radiations ionisantes (Stiff et al., 2004) et ATR en réponse à des radiations aux UV (Ward and Chen, 2001). La phosphorylation de H2AX n'affecte pas la stabilité du nucléosome, mais à un rôle dans la localisation des facteurs impliqués dans la réparation. Récemment, il a été observé qu'un autre site (Y182) est phosphorylé sur H2AX par

WSRF (un membre du complexe WICH). Elle est très importante pour ajuster la structure de la chromatine et maintenir la phosphorylation de la S139 (Xiao et al., 2009).

La phosphorylation de H2AX induit un recrutement de MDC1 qui permet l'arrivée d'un complexe d'ubiquitine ligase UBC13/RNF8 sur la cassure. L'ubiquitination de H2AX et H2A est initiée par ce complexe et amplifiée par RNF168 (Doil et al., 2009; Stewart et al., 2009). Mais c'est l'ubiquitination de H2A qui est cruciale pour la réparation de l'ADN (Doil et al., 2009).

### ***H2AX dans la recombinaison de l'ADN.***

En mettant de côté les dommages de l'ADN provenant d'agents extérieurs, H2AX est aussi requis lors de la recombinaison. Des foyers de  $\gamma$ -H2AX ont été observés sur des cassures doubles brins lors de la méiose dans des cellules germinales (Mahadevaiah et al., 2001). De la même manière  $\gamma$ -H2AX s'accumule dans les noyaux des cellules B et T lors du développement du système immunitaire. Il cible le locus du récepteur  $\alpha$  qui est sujet à la recombinaison V(D) J pour former les régions variables des anticorps (Soulas-Sprauel et al., 2007). La délétion chez la souris du gène codant pour H2AX conduit à une altération de ces recombinaisons ce qui laisse penser que H2AX est important lors de ces processus (Petersen et al., 2001). Enfin, l'accumulation de H2AX a également été observée dans les premiers stades de la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose.

En plus des processus de réplifications indépendants décrits ci-dessus, H2AX pourrait prendre part dans le contrôle de la réplication de l'ADN. Lorsque cette dernière est inhibée par l'hydroxyurée, H2AX est phosphorylée par ATR et s'accumule au niveau des fourches de réplication arrêtées (Ward and Chen, 2001).

### ***II.4.2.b. MacroH2A.***

La variante macroH2A diffère des autres variantes de H2A par sa taille inhabituelle, 372 acides aminés, qui est environ trois fois plus grande que histone H2A canonique. La caractéristique principale de cette variante d'histone est le domaine globulaire macro en C-terminale. MacroH2A est le membre fondateur d'une grande famille de protéines contenant des macro domaines. MacroH2A peut être divisé en deux parties; le premier tiers de la protéine contient le HFD et partage une homologie de 64% avec la séquence de H2A. Les deux tiers restants de la protéine sont caractérisés par l'absence de HFD. Deux sous-types de macroH2A ont été identifiés à ce jour; macroH2A1 et macroH2A2, chacun codé par un gène unique contenant huit exons. Le gène codant pour macroH2A1 produit deux isoformes, nommées macroH2A1.1

et macroH2A1.2, résultant d'un épissage alternatif. MacroH2A1 et macroH2A2 partagent 84% d'homologie dans le domaine histones, et 68% dans le domaine non-histones. Les séquences de macroH2A1.1 et 1.2 affichent seulement une vingtaine d'acides aminés différents dans le domaine non-histones. La région non histones des variantes macroH2A est caractérisé par la présence d'un motif de glissière à leucine (leucine zipper), qui se trouve également sur des facteurs de transcription, suggérant un rôle potentiel de ces variantes dans le contrôle de la transcription (Pehrson et al., 1997).

MacroH2A1.1 se trouve dans les cellules quiescentes, tandis que macroH2A1.2 est généralement exprimé dans des cellules en prolifération, ce qui implique une fonction différente pour ces sous-types (Pehrson et al., 1997). De plus, macroH2A, qui est présent à la fois dans les noyaux cellulaires mâles et femelles, semble être plus concentré dans la région du chromosome X inactif des cellules femelles (Mermoud et al., 1999). L'association de macroH2A avec le chromosome X inactif semble se produire après le mécanisme d'extinction. Une perte de macroH2A au niveau du chromosome X inactif a été signalée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales, ce qui indique un rôle potentiel dans le maintien de l'état inactif du chromosome X.

Des études récentes ont montré l'implication de macroH2A dans la répression de la transcription. La partie macro de macroH2A réprime la transcription lorsqu'il est à proximité d'un promoteur actif (Ouararhni et al., 2006; Buschbeck et al., 2009). MacroH2A empêche le recrutement de facteurs de transcription et le remodelage par SWI/SNF lorsqu'il est incorporé dans les nucléosomes (Angelov et al., 2003).

#### *II.4.2.c. H2A.Bbd.*

À la différence de macroH2A qui possède un grand domaine en C-terminal, H2A.Bbd (Barr body-deficient) contient un domaine C-terminal très court et un domaine d'ancrage tronqué. Il est à 48% identique à H2A et ne possède pas certains résidus conservés par les autres variantes de H2A. H2A.Bbd est absent du chromosome X inactif des fibroblastes et se localise dans des zones enrichies en H4 acétylé sur la lysine 12, ce qui évoque un rôle dans l'activation de la transcription (Chadwick and Willard, 2001).

Dans les cellules A431, H2A.Bbd est échangé plus rapidement que H2A (Gautier et al., 2004), alors qu'*in vitro* NAP1 assure l'échange de H2A.Bbd pour H2A sur des nucléosomes reconstitués (Okuwaki et al., 2005). Les nucléosomes contenant H2A.Bbd sont relativement plus relâchés et ne sont pas sensibles au remodelage par le complexe SWI/SNF certainement

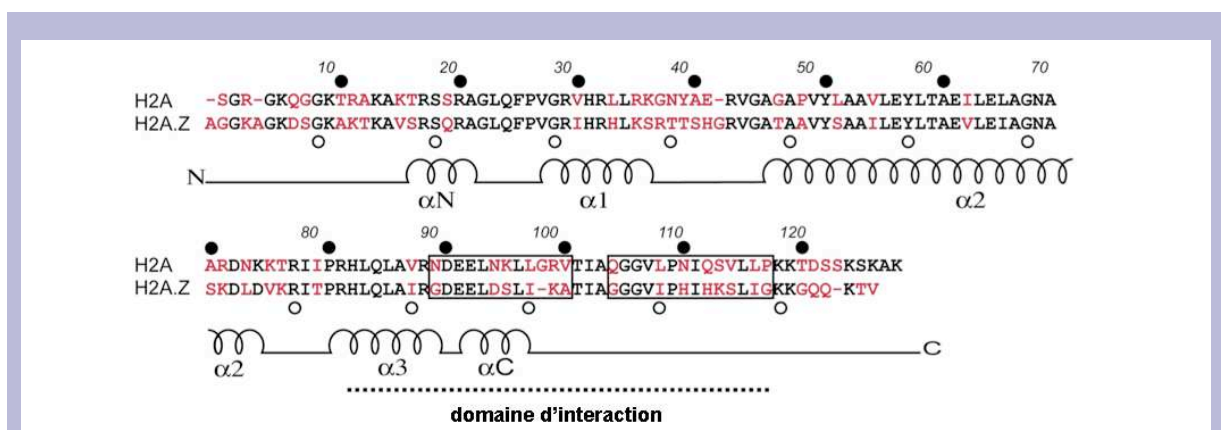
à cause du domaine d'ancrage particulier de H2A.Bbd (González-Romero et al., 2008). H2A.Bbd a une zone acide plus petite que H2A ce qui va inhiber la formation de la fibre de 30 nm et réduit sa capacité à empêcher la transcription (Zhou et al., 2007). Il a été démontré très récemment que H2A.Bbd était associé avec les gènes actifs (Tolstorukov et al., 2012). Ces nouvelles données renforcent le concept que H2A.Bbd est associé avec une chromatine permissive pour la transcription.

Malgré l'accumulation de donnée démontrant que H2A.Bbd forme une chromatine favorisant la transcription, on ne connaît pas la fonction exacte de H2A.Bbd.

Des analyses phylogénétiques sur les histones canoniques et les variantes ont révélé que H2A.Bbd est une histone qui a évolué très rapidement chez les mammifères, ce qui n'est pas le cas pour les autres histones (Malik and Henikoff, 2003). L'incorporation de H2A.Bbd dans le nucléosome conduit à une structure plus instable de la même manière qu'un nucléosome hyperacétylé. H2A.Bbd n'est pas affecté par l'hyperacétylation des autres histones du nucléosome. Il semblerait que H2A.Bbd constitue un autre mécanisme pour déstabiliser le nucléosome qui ne dépend pas de l'acétylation (Eirín-López et al., 2008).

#### II.4.2.d. H2AZ.

La variante d'histone H2AZ a été trouvée dans des organismes allant des protistes comme *Tétrahymena* aux eucaryotes supérieurs, avec environ 90 % d'homologie à travers ces organismes. Toutefois, en dépit d'une structure similaire, la séquence peptidique de H2AZ présente seulement 60 % homologie avec l'histone H2A (figure 15). La variante H2AZ est dénommée HV1 chez *Tétrahymena*, HTZ1 ou HTA3 chez la levure, H2AvD chez la drosophile, H2AZ/F chez l'homme. H2AZ sera utilisé pour la suite pour plus de clarté.

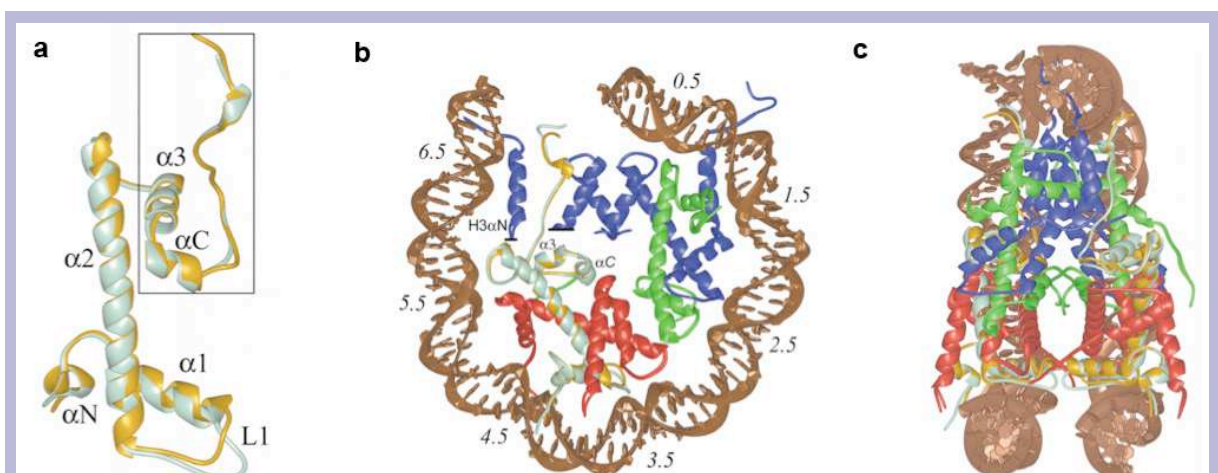


**Figure 15 :** Alignement des séquences en acides aminés de H2A et H2AZ. La structure secondaire est représentée en dessous des séquences. Adapté de Suto et al., 2000.

### Caractéristiques structurales de H2AZ.

La structure cristallographique d'un nucléosome contenant H2AZ a été résolue et montre des similitudes à celle d'un nucléosome contenant H2A, bien que les deux protéines possèdent de nombreuses différences dans leurs séquences peptidiques (Suto et al., 2000). Il existe de petites différences entre ces structures et notamment au niveau du domaine d'interaction au tétramère H3-H4. Dans les nucléosomes contenant H2AZ, la forme globale du domaine d'interaction au tétramère est conservée, ainsi que la plupart des liaisons hydrogènes intermoléculaires, mais la substitution d'une glutamine 104 par une glycine provoque la perte de trois liaisons hydrogènes, déstabilisant l'interaction entre H2AZ et H3. A la différence de H2A, H2AZ présente deux résidus histidines, capables de se lier à un ion métallique dans le domaine d'interaction au tétramère situé à la surface du nucléosome. La présence de cet ion est susceptible de créer une interaction avec des partenaires spécifiques de H2AZ. D'autres différences existent au niveau de la zone acide formée par les acides aminés du domaine de fixation au dimère H2A/H2AZ-H2B situé en surface du nucléosome. Cette zone acide est probablement impliquée dans des interactions protéine-protéines et avec la queue basique de l'histone H4 voisin (Luger and Richmond, 1998). Dans le cas de H2AZ cette zone semble plus étendue, il en résulte une surface acide plus importante dans les octamères contenant H2AZ (figure 16) (Suto et al., 2000).

H2AZ semble jouer un rôle essentiel dans tous les organismes. L'inactivation du gène codant pour H2AZ conduit à un taux de croissance diminué chez la levure et à la mort chez *Tetrahymena*, la drosophile, la souris et le xénope (Liu et al., 1996; Clarkson and Saint, 1999;



**Figure 16 : Comparaison des nucléosomes contenant H2A ou H2AZ.** (a) Superposition de H2A et H2AZ. H2A est en jaune et H2AZ en gris. Le domaine d'interaction est encadré. (b-c) Superposition des nucléosomes contenant H2AZ ou H2A vus respectivement depuis l'axe de la double hélice d'ADN ou de côté. H3 est en bleu, H4 en vert, H2B en rouge et l'ADN en brun. Adapté de Suto et al., 2000.

Jackson and Gorovsky, 2000; Faast et al., 2001; Ridgway et al., 2004). Le remplacement du domaine d'ancrage du tétramère de H2AZ par celui de H2A nuit au développement de la drosophile ce qui met en avant les différences structurales majeures entre H2AZ et H2A. Des embryons de drosophile ne possédant pas H2AZ peuvent être sauvés en exprimant des constructions chimériques, y compris le domaine d'ancrage au tétramère de H2AZ (Clarkson et al., 1999). Toutes ces données démontrent que ce domaine est crucial dans le développement.

Des études chez *Tetrahymena* ont montré l'importance de l'acétylation de la queue N-terminale de H2AZ, qui comprend six lysines au lieu de trois normalement présentes sur H2A. Le remplacement des résidus lysines par des arginines, ce qui empêche l'acétylation, ou par glutamines, imitant lysines acétylées, est létale ou conduit à un taux de croissance réduit, indiquant la nécessité de l'acétylation de H2AZ pour assurer ses fonctions cellulaires (Ren and Gorovsky, 2001; 2003). En raison de la proximité des lysines de la queue N-terminale de H2AZ, il a été émis l'hypothèse que ce domaine pourrait se comporter comme un patch chargé. La réduction de la charge positive de la queue des histones par acétylation pourrait se traduire par une association réduite de la queue de H2AZ avec de l'ADN, ce qui la rend plus accessible pour les protéines liant l'ADN. L'analyse par sédimentation et ultra-centrifugation sur de la chromatine reconstituée suggère que H2AZ a un effet déstabilisateur sur les interactions histone-histone intranucléosomales (Abbott, 2001).

Le domaine de la boucle L1, qui module les interactions avec H2A dans le nucléosome même, est modifié dans le cas d'H2AZ de telle manière qu'elle peut favoriser l'interaction avec une autre molécule H2AZ. L'appariement d'un dimère H2A-H2B et d'un dimère H2AZ-H2B dans le même nucléosome pourrait conduire à des problèmes stériques, et aucune stabilisation entre les deux molécules ne peut être formée (Suto et al., 2000). Il a été démontré récemment que les nucléosomes contenant H2AZ sont exclusivement homotypiques (Luk et al., 2010; Weber et al., 2010), ce qui démontre encore une fois qu'un nucléosome contenant H2A et H2AZ est très peu stable.

### ***H2AZ et l'activation de la transcription.***

Les premières observations chez *Tetrahymena* ont montré que H2AZ était présent dans les macronucleus transcriptionnellement actifs et absent des micronucleus. Au début de la conjugaison, H2AZ est détecté dans les micronucleus juste avant l'activation transcriptionnelle, ce qui fait le lien entre H2AZ et la chromatine active (Stargell et al., 1993). Des expériences d'immunofluorescences sur des chromosomes polytènes et des immunoprécipitations de la

chromatine chez la drosophile ont montré que H2AZ est distribué le long de génome, mais pas de façon aléatoire. H2AZ est localisé sur l'euchromatine et l'hétérochromatine au niveau des chromocentres des chromosomes polytènes. L'analyse par CHIP montre que H2AZ est associé avec des gènes transcrits et non transcrits de l'euchromatine et de l'hétérochromatine non codantes (Leach, 2000). Une étude similaire chez la levure a démontré que H2AZ est localisé préférentiellement sur les promoteurs de PHO5 et GAL1 (Santisteban et al., 2000b). H2AZ a été retrouvé spécifiquement à ces sites dans des conditions répressives, mais fortement diminuée ou disparaît après l'activation de la transcription, ce qui suggère un rôle pour H2AZ dans l'établissement de la transcription. De plus la délétion du gène codant pour H2AZ compromet l'activation de la transcription. D'autres expériences, dans les souches dépourvues du gène de H2AZ, ont montré un défaut de recrutement de l'ARN polymérase II et la protéine liant la TATA boxe au niveau du promoteur GAL1, plaidant pour un rôle de H2AZ dans le recrutement de la machinerie basale de transcription et dans la mise en place de celle-ci. (Adam et al., 2001).

Selon ces observations, H2AZ pourrait participer, avec des complexes ATP-dépendants de remodelage de la chromatine et des complexes de modification des histones, dans l'établissement de structures favorables à l'activation de la transcription. H2AZ pourrait également servir à recruter le complexe de transcription basale.

### ***H2AZ et la répression de la transcription.***

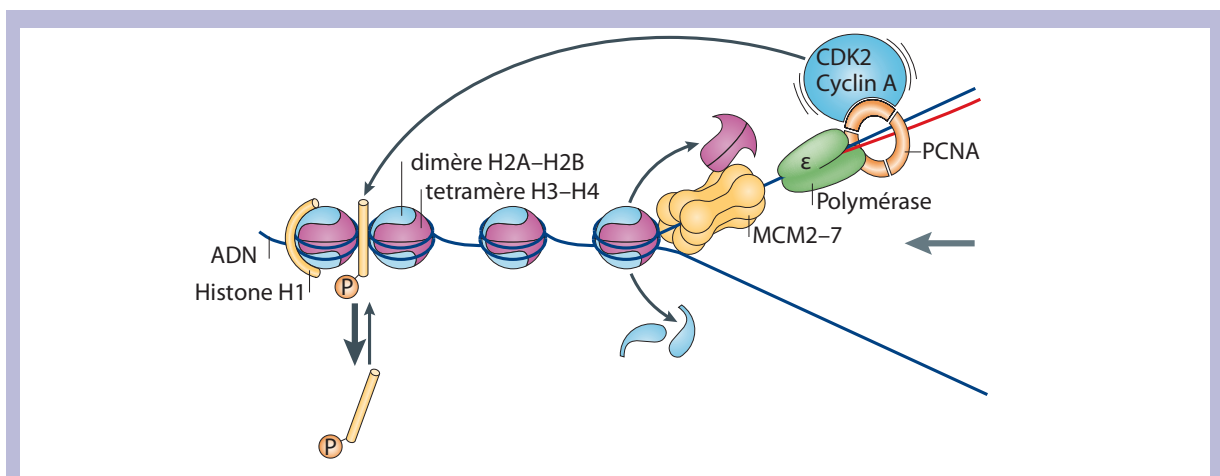
Étonnamment, H2AZ a également été impliqué dans la répression transcriptionnelle (Svotelis et al., 2009). La surexpression de H2AZ est capable de restaurer le « silencing » dans les cellules où Sir1 est réduit. Des études de CHIP ont montré la présence de H2AZ sur le locus HMR et les télomères ; la délétion du gène codant pour H2AZ entraîne une perte de la répression de ces loci (Dhillon and Kamakaka, 2000). Ces résultats sont cohérents avec la présence de H2AZ dans les régions non transcrites et dans les régions non codantes hétérochromatiques chez la drosophile (Leach, 2000) et dans l'hétérochromatine péricentrique au cours du début du développement chez les mammifères (Rangasamy et al., 2003). Il est donc probable que H2AZ soit impliqué dans l'activation et la répression génique. Les nucléosomes contenant H2AZ seraient plus stables que les nucléosomes contenant uniquement les histones canoniques, ce qui pourrait atténuer les processus de transcription en empêchant le déplacement d'un dimère d'histone (Park et al., 2004). Cependant, la fonction exacte de H2AZ dans l'activation et la répression transcriptionnelle reste à être déterminée.

### III. L'ASSEMBLAGE DE LA CHROMATINE.

Lors de processus cellulaires tels que la réplication, la transcription ou la réparation de l'ADN, la chromatine doit être réorganisée. La synthèse d'ADN lors de la réplication nécessite la déposition d'histones sur le brin néo-synthétisé alors que le nucléosome constitue une barrière pour l'ARN polymérase II lors de la transcription. On distingue deux types d'assemblage de la chromatine : l'une dépendante de la réplication et l'autre indépendante de la réplication principalement impliquée lors de la transcription ou de la réparation. Il y a donc toute une machinerie d'assemblage de la chromatine qui va faire intervenir des complexes de remodelages de la chromatine ATP dépendants et des chaperonnes d'histones.

#### III.1. L'assemblage de la chromatine pendant la réplication.

Le réplisome eucaryote est un complexe multiprotéique constitué d'hélicases répliquatives (MCM 2-7, CDC45 et GINS) pour dérouler la double hélice d'ADN et de polymérase qui synthétisent l'ADN de 5' en 3' (Johnson and O'Donnell, 2005). La réplication est effectuée à une vitesse de 2 à 3 kb (Méchali, 2010) par minutes ce qui suggère que 10 à 15 nucléosomes sont désorganisés par minute pour chaque réplisome. L'arrivée de la fourche de réplication au niveau d'un nucléosome entraîne une déstabilisation de ce dernier. L'élément déclencheur serait la phosphorylation de l'histone H1 par la cycline A-CDK2 (figure 17) qui fait partie du réplisome en se liant directement à MCM7 et au PCNA lors de la phase S du cycle cellulaire (Thomson



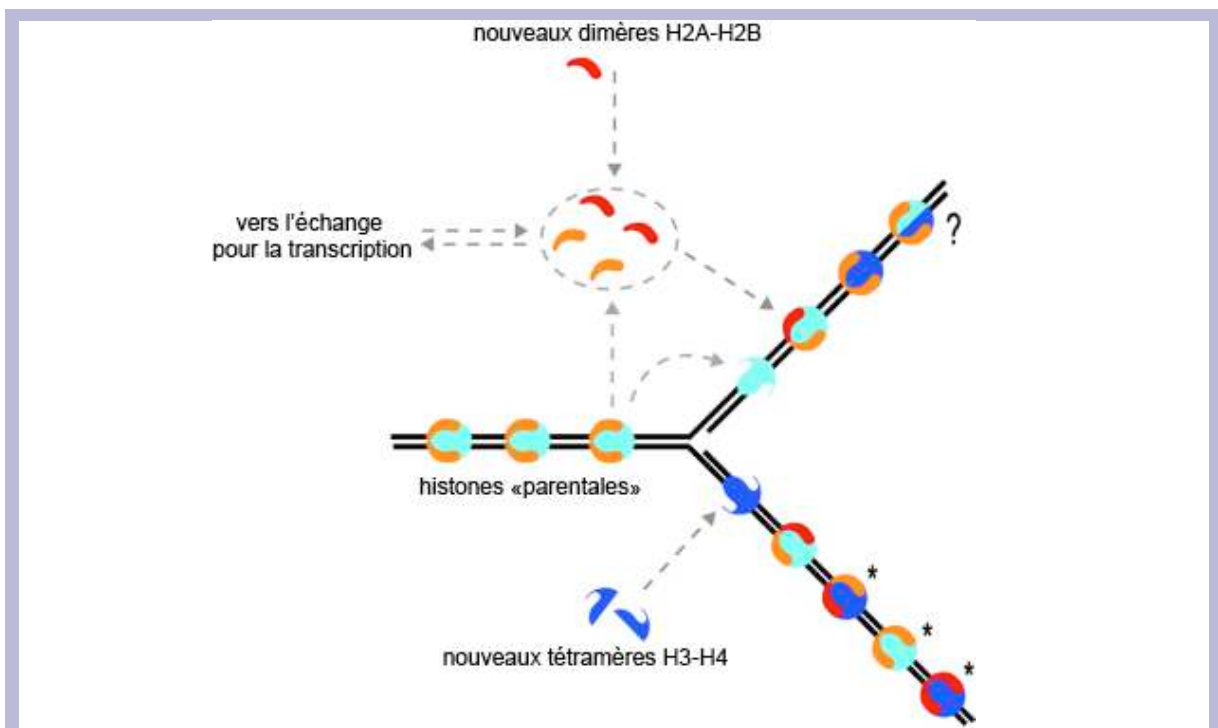
*Figure 17 : Le désassemblage de la chromatine durant la réplication. L'éviction de H1 après sa phosphorylation par la cycline A-CDK2 lors de la phase S du cycle cellulaire permet d'initier le désassemblage de la chromatine lors du passage de la fourche de réplication. Il en résulte la libération du tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et deux dimères H2A-H2B. Adapté de Alabert and Groth, 2012.*



et al., 2010). La phosphorylation de H1 augmente sa mobilité et promeut la décondensation de la chromatine et en quelque sorte la déstabilisation des nucléosomes (Contreras et al.). Ce modèle n'expliquerait pas tout et il y a certainement d'autres facteurs impliqués dans la désorganisation du nucléosome.

### III.1.1. Ségrégation des histones lors de la réplication de l'ADN.

L'assemblage des nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé a été débattu pendant très longtemps. Il se fait de manière très rapide et hiérarchique, les nouveaux tétramères (H3-H4)<sub>2</sub> sont directement déposés sur l'ADN répliqué (Crémisi et al., 1977; Senshu et al., 1978; Worcel et al., 1978; Jackson and Chalkley) puis viennent les dimères H2A-H2B et enfin les histones H1 (Hendzel et al., 2000; Misteli et al., 2000; Hiroshi Kimura, 2001).



**Figure 18 : Ségrégation des histones lors de l'assemblage de la chromatine pendant la réplication.** En astérisque sont représentées des combinaisons qui n'ont pas été observées et dont l'existence est sujette à débat. Adapté de Groth, 2009.

L'arrivée de la fourche va provoquer la déstabilisation du nucléosome et libérer un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et deux dimères H2A-H2B (Jackson, 1990). Ces histones « parentales » vont être recyclées sur les nouveaux brins synthétisés. La ségrégation des tétramères (H3-H4)<sub>2</sub> déjà présents sur la chromatine se fait de façon aléatoire sur les deux brins filles (figure 18) (Lew et al., 2008). Des tétramères (H3-H4)<sub>2</sub> hybrides contenant à la fois des histones « anciennes » et « nouvelles » n'ont jamais été détectés (Prior et al., 1980), mais de récents travaux ont remis en cause cette affirmation par la découverte de l'existence de dimères H3-H4 solubles dans le

noyau (figure 18) (Tagami et al., 2004; Benson, 2005; Loyola et al., 2006). En revanche, très peu de choses sont connues sur le recyclage des dimères H2A-H2B car étant plus dynamiques et aussi requis pour des réactions d'échanges lors de la transcription. Il existe, par contre des nucléosomes contenant des tétramères parentaux avec des dimères H2A-H2B nouvellement synthétisés (figure 18), l'inverse n'étant pas démontré (Jackson, 1987; 1988).

### *III.1.2. Les chaperonnes et les facteurs de remodelage impliqués dans la réplication.*

L'assemblage de ces nucléosomes fait intervenir des facteurs intimement liés aux histones :

- Les facteurs de remodelage ATP dépendant sont de grands complexes protéiques. Il en existe beaucoup qui ont été caractérisés (chapitre B.1), mais seuls les facteurs de remodelage hCHRAC et hACF/WCRF ont été impliqués dans l'assemblage de la chromatine pendant la réplication chez la drosophile (Collins et al., 2002).
- Les chaperonnes d'histones sont des protéines associées aux histones et qui catalysent leur transfert (déposition ou éviction) sans faire partie du produit final (De Koning et al., 2007). L'assemblage en condition *in vitro* ne peut se réaliser en mélangeant de l'ADN et des histones, leurs affinités pour l'ADN étant très importantes il y aurait formation d'agrégats. La reconstitution *in vitro* se réalise en présence d'une forte concentration de sels et d'urée suivie d'une dialyse permettant la formation de structures ordonnées. Il est évident que la cellule utilise un mécanisme différent, c'est pourquoi l'effort de recherche dans ce domaine s'est orienté vers la découverte et l'identification de ces chaperonnes d'histones.

#### *III.1.2.a. La nucléoplasmine et N1/N2.*

Des extraits d'œufs et d'ovocytes de xénope capables d'assembler des nucléosomes sur de l'ADN purifié ont été utilisés pour rechercher des protéines facilitant la déposition des histones sur l'ADN (Laskey et al., 1977; 1978). Ces travaux ont permis d'identifier la nucléoplasmine comme la première chaperonne d'histones. La nucléoplasmine est une protéine acide majoritaire dans les ovocytes et les œufs de xénope. Elle a la capacité de fixer et de déposer les histones du cœur *in vitro* (Laskey et al., 1978; Earnshaw et al., 1980; Sealy et al., 1986). Cependant, on a d'abord pensé que la nucléoplasmine était aussi responsable du stockage des histones. Il a été établi, par la suite que deux autres chaperonnes d'histones N1 et N2 étaient à l'origine du stockage de H3 et H4 (Bonner, 1975; De Robertis et al., 1978) et que la nucléoplasmine s'occupait de H2A et H2B (Kleinschmidt and Franke, 1982; Kleinschmidt

et al., 1985) et que ces deux complexes ensemble participent à l'assemblage du nucléosome (Dilworth et al., 1987; Kleinschmidt et al., 1990). La nucléoplasmine fait partie d'une famille de phosphoprotéines impliquées dans l'assemblage du ribosome, et le métabolisme de la chromatine dont les nucléophosmines NPM1 et NPM3 (Frehlick et al., 2006). D'autre part, les chaperonnes d'histones N1/N2 qui sont apparentés à NASP et qui ont des homologues chez la levure (Ai and Parthun, 2004; Dunleavy et al., 2007), les mammifères (O'Rand et al., 1992; Richardson et al., 2000; 2006; Finn et al., 2008) et chez *C.elegans*. NASP serait une chaperonne de H1 (Richardson et al., 2000; 2006; Finn et al., 2008) et aussi de H3-H4 en corrélation avec la fonction de N1/N2 chez le xénope (Wang et al., 2008; Osakabe et al., 2010).

### III.1.2.b. NAP1.

NAP1 a été identifié comme ayant la capacité d'assembler des nucléosomes *in vitro* (ISHIMI et al., 1984; 1987). D'autres protéines homologues à NAP1 ont été découvertes comme NAP1L1 et NAP1L4. Les protéines de cette famille sont caractérisées par la présence d'un domaine central très conservé de 300 aa qui est suffisant pour assembler des nucléosomes et nécessaire à la dimérisation de NAP1 (Fujii-Nakata et al., 1992; Park and Luger, 2006). La partie C-terminale très acide permet l'enlèvement du dimère H2A-H2B et le glissement des nucléosomes (Park et al., 2005). La protéine NAP1 montre une liaison préférentielle pour H2A-H2B par rapport à H3-H4 *in vivo* chez les eucaryotes confirmant son rôle de chaperonne d'histone (figure 19) (ISHIMI et al., 1983; Ito et al., 1996; Dong et al., 2005), cependant ce mécanisme n'est pas connu, car la structure de NAP1 complexé aux histones n'est pas encore connue. NAP1 permet aussi le transport de H2A-H2B du cytoplasme vers le noyau grâce à son interaction avec une importine Kap114 (figure 19) (Mosammamarast et al., 2002; 2005). NAP1 a aussi la capacité de faciliter la transcription *in vitro* (Walter et al., 1995; Levchenko et al., 2005; Park et al., 2005) et *in vivo* lors d'échanges avec la variante d'histone H2AZ (Paolo Piatti, 2011).

### III.1.2.c. CAF-1.

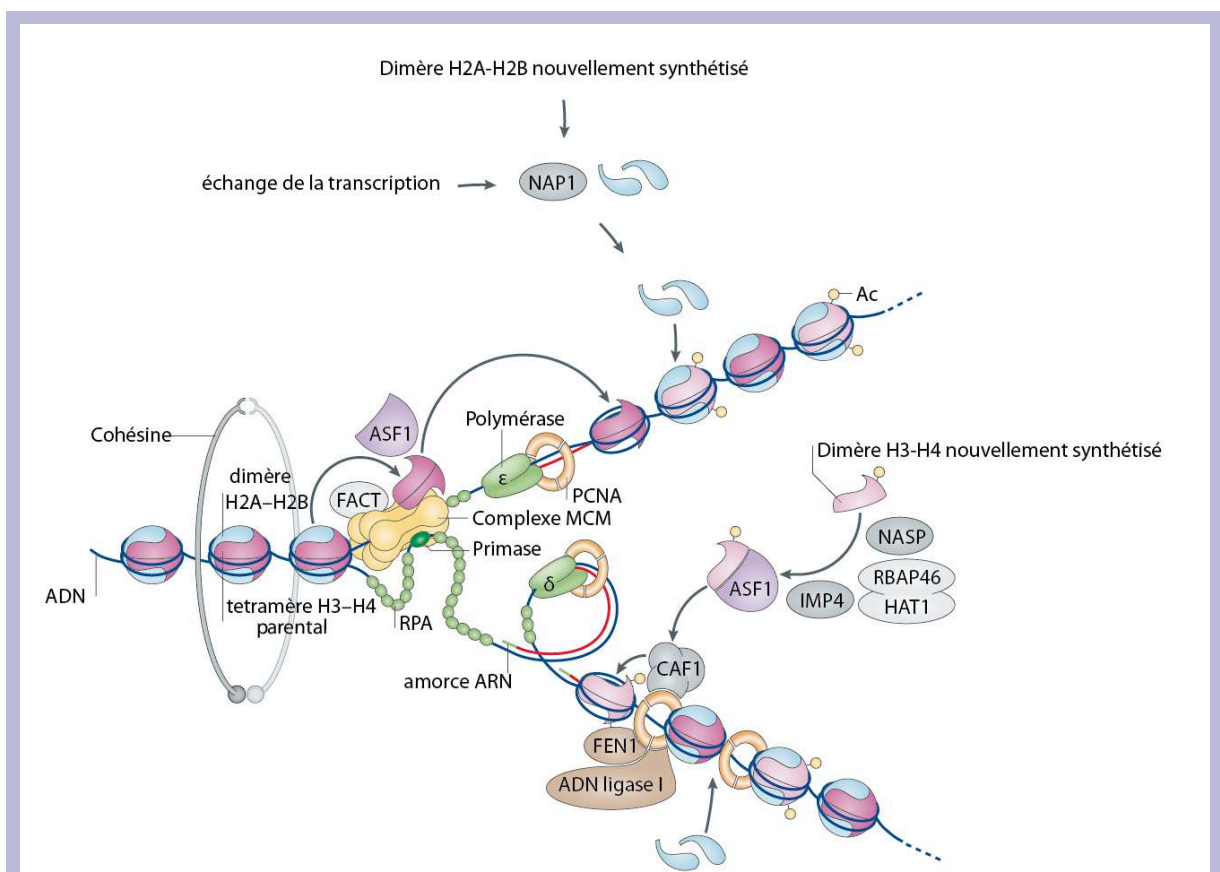
La découverte de CAF-1 découle directement d'un effort de recherche pour identifier des facteurs impliqués dans l'assemblage de la chromatine lors de réplication. CAF-1 a été mis en évidence dans des systèmes *in vitro* pour étudier la réplication de plasmide contenant l'origine de réplication du SV40 en présence de l'antigène T. Il a été démontré également que CAF-1 permet l'assemblage de nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé (Stillman, 1986; Smith and Stillman, 1989). Des homologues ont ensuite été identifiés chez la drosophile (Kamakaka

et al., 1996; Tyler et al., 1996; 2001) et la levure (Enomoto et al., 1997; Kaufman et al., 1997), ce qui indique que CAF-1 est conservé au cours de l'évolution. CAF-1 est une chaperonne de H3-H4 et un complexe de trois protéines p150, p60 et p48 (Kaufman et al., 1995). La sous-unité p48 seule peut suffire à la fixation de H3-H4. CAF-1 est capable de cibler spécifiquement H3-H4 nouvellement synthétisé pour les déposer sur l'ADN nouvellement répliqué grâce à l'interaction entre la sous-unité p150 et le PCNA (figure 19) (Shibahara and Stillman, 1999; Moggs et al., 2000). Le complexe CAF-1-H3-H4 est alors nommé CAC et présente des modifications spécifiques des histones nouvellement synthétisées c'est-à-dire une mono et di acétylation des lysines 5, 8 et 12 (figure 19) (Sobel et al., 1995; Verreault et al., 1996). CAF-1 est également important dans la formation de l'hétérochromatine, car il se lie à la protéine HP1 (Murzina et al., 1999; Quivy et al., 2004) et au complexe MBD1-SETDB1 (Sarraf and Stancheva, 2004) qui sont impliqués dans la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la méthylation de l'ADN.

#### *III.1.2.d. Asf1.*

Asf1 est une chaperonne d'histone essentielle ayant un double rôle dans l'assemblage et le désassemblage des nucléosomes ; elle est surtout une chaperonne des histones H3-H4 nouvellement synthétisées. Asf1 a été identifié d'abord chez la levure (Le et al., 1997; Singer et al., 1998) et ensuite chez la drosophile (Tyler et al., 1999) en complexe avec CAF-1 et les histones H3-H4. C'est une petite protéine contenant une région N-terminal ayant un repliement de type immunoglobuline suffisant pour la fonction de chaperonne et une partie C-terminal variable suivant les espèces (Daganzo et al., 2003). Asf1 interagit avec les histones H3-H4 nouvellement synthétisées qui sont importées grâce à une série d'autres chaperonnes comme NASP, RBAP46 et HAT1 et l'importine 4 (figure 19) (Campos et al., 2010; Jasencakova et al., 2010; Alvarez et al., 2011; Cook et al., 2011). Il est admis que le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> est déjà formé lors de sa déposition sur l'ADN, cependant il a été montré que CAF-1 et Asf1 sont associés à des dimères H3-H4 (Tagami et al., 2004; English et al., 2005) ce qui remet en cause le mode d'assemblage du tétramère sur l'ADN. Une fois que Asf1 a fixé le dimère H3-H4, il va interagir avec CAF-1 par l'intermédiaire de la sous-unité p60 (figure 19) (Mello et al., 2002), là encore on ne sait pas si Asf1 aide CAF-1 à déposer H3-H4 ou s'il s'agit juste d'un donneur d'histone. Récemment, Asf1 a été impliqué dans le désassemblage de la chromatine au niveau de la fourche de réplication et donc du recyclage des histones « parentales ». Initialement, Asf1 a été identifié comme ayant la capacité d'enlever H3-H4 des promoteurs lors de la transcription chez la levure (Schwabish and Struhl, 2006). Asf1 (Groth et al., 2007) et FACT (Gambus et al., 2006; Tan et al., 2006)

interagissent avec le complexe MCM au niveau de la fourche de réplication (figure 19). FACT est composé de deux protéines SSRP1 et Spt16 et se comporte comme une chaperonne des histones H2A-H2B. On suppose qu'il enlève les deux dimères H2A-H2B lors du passage de la fourche de réplication (figure 19) comme cela est le cas lors de la transcription (Reinberg, 2004). L'enlèvement du dimère H2A-H2B expose la queue C-terminale de H4 et permet à Asf1 de fixer le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> (figure 19). Il est très probable que Asf1 joue un rôle important dans le recyclage des tétramères (H3-H4)<sub>2</sub>, cependant il reste des zones d'ombres : il faut notamment clarifier le rôle de FACT dans la réplication et également la dynamique entre le tétramère et Asf1 au niveau de la fourche de réplication (English et al., 2006).



**Figure 19 : Modèle de réplication couplé à l'assemblage de la chromatine.** Les nouvelles histones sont prises en charge par différents chaperonnes. H2A-H2B est assisté par NAP1 qui va les déposer sur le tétramère H3-H4. Asf1 récupère les dimères H3-H4 grâce à NASP, RBAP46, HAT1 et l'importine 4 (IMP4) pour assister CAF-1 dans leur déposition de la chromatine. Au niveau de la fourche, FACT et Asf1 vont assister le complexe MCM dans le désassemblage des nucléosomes, mais leurs rôles restent à préciser. Adapté de Alabert and Groth, 2012.

### III.2. L'assemblage de la chromatine en dehors de la réplication de l'ADN.

Les études sur les variantes d'histones ont permis d'arriver à la conclusion que ces histones alternatives sont incorporées dans le nucléosome et participent à la régulation de la structure de la chromatine. La synthèse des variantes d'histones a lieu en dehors de la phase S du cycle cellulaire à la différence des histones canoniques qui sont couplées à la réplication.

L'assemblage de la chromatine pendant la réplication fait intervenir toute une machinerie qui semble agir en deux étapes : elle déposerait d'abord le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et ensuite les deux dimères H2A-H2B. H3 et H4 sont déposés sous forme de dimère par un complexe spécifique contenant les chaperonnes d'histones CAF-1 et Asf1 pendant la réplication uniquement. En accord avec ces données, H3.3 ne s'associe pas avec ce complexe, mais avec deux autres complexes en fonction de la région où il doit être déposé. Au niveau des gènes, H3.3 est déposé par HIRA (Tagami et al., 2004) alors que Daxx et ATRX le déposent au niveau des télomères et de l'hétérochromatine péricentrique (Drané et al., 2010).

H2AZ-H2B a été retrouvé associé avec la chaperonne d'histone NAP1 et Chz1 chez la levure (Luk et al., 2007). H2AZ fait aussi partie du CRC SWR1 chez la levure. Des expériences de CHIP ont démontré l'importance de SWR1 dans la localisation de H2AZ (Li, 2005; Luk et al., 2010). Le remplacement de H2A par H2AZ sur des nucléosomes reconstitués est catalysé par SWR1 de manière ATP dépendante (Mizuguchi et al., 2004). SRCAP qui est l'homologue de SWR1 chez les mammifères a aussi été impliqué dans la déposition de H2AZ (Ruhl et al., 2006), en revanche aucune chaperonne spécifique de H2AZ n'a été identifiée chez les mammifères.

L'échange de H2AZ catalysé par un CRC de manière ATP dépendante permet de penser qu'un mécanisme similaire existe pour incorporer toutes les autres variantes d'histones en dehors de la phase S du cycle cellulaire. Il reste encore à identifier et caractériser ces mécanismes pour les autres variantes d'histones.

La variété de la structure de la chromatine et des modifications des histones récapitulée ici reflète la complexité de l'information épigénétique et notre connaissance limitée de ces mécanismes. La partie expérimentale de ce manuscrit décrit un effort de recherche pour la caractérisation et l'identification de nouveaux partenaires protéiques impliqués dans la dynamique de la variante d'histone H2AZ chez les mammifères.



# RÉSULTATS

# RÉSULTATS

## ARTICLE 1

---

### I. CONTEXTE ET QUESTION POSÉE.

La régulation des gènes nécessite une reconfiguration locale de la chromatine qui permet de créer des domaines accessibles aux éléments régulateurs. La modification de la structure de la chromatine est régulée par trois processus :

- Les modifications covalentes des queues N-terminales des histones comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation.
- Les complexes de remodelage de la chromatine ATP dépendant qui sont capables de faire glisser et déstabiliser les nucléosomes.
- Les chaperonnes d'histones qui vont réguler l'assemblage et le désassemblage de la chromatine.

Les variantes d'histones permettent de former de nouveaux domaines à des endroits spécifiques du génome. Cette incorporation est réalisée avec l'assistance de complexes de remodelage de la chromatine ATP dépendant et de chaperonnes d'histones spécifiques.

Notre équipe s'intéresse tout particulièrement aux variantes d'histones. Au cours de ma thèse, je me suis focalisé, sur H2AZ qui est une variante de l'histone H2A. H2AZ est impliqué dans plusieurs processus cellulaires comme la ségrégation des chromosomes (Rangasamy et al., 2003), la réparation de l'ADN (Kalocsay et al., 2009), la formation de l'hétérochromatine (Meneghini et al., 2003), la progression du cycle cellulaire (Dhillon et al., 2005) et la transcription des gènes (Santisteban et al., 2000a). La distribution de H2AZ semble être majoritairement au niveau des promoteurs, de part et d'autre d'une région ne contenant pas de nucléosome (Zlatanova and Thakar, 2008). Il est nécessaire de déposer H2AZ à des sites spécifiques pour qu'il assure ses fonctions. Chez la levure H2AZ est déposé par la chaperonne d'histone Chz1 (Luk et al., 2007) qui fait partie du complexe de remodelage SWR1 capable d'échanger H2AZ pour H2A de manière ATP dépendante (Krogan et al., 2003; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). SRCAP, l'homologue humain de SWR1, est aussi responsable de la déposition de H2AZ



(Ruhl et al., 2006), mais aucune chaperonne d'histone n'a été caractérisée à ce jour pour H2AZ chez les vertébrés.

**→ Quelles sont les chaperonnes de la variante d'histone H2AZ chez les vertébrés ?**

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires impliqués dans la dynamique de H2AZ, nous avons purifié le complexe de prédéposition de H2AZ à partir d'extrait nucléaire soluble de cellule HeLa. Nous avons mis en évidence Anp32e qui est un nouveau partenaire spécifique de H2AZ et qui possède les caractéristiques d'une chaperonne d'histone. Ensuite, nous avons cartographié l'interaction entre ces deux protéines et enfin nous avons testé la capacité d'Anp32e d'agir sur la déposition ou sur l'éviction de H2AZ de la chromatine.

## II. RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Nos résultats sont présentés dans la publication ci-après : « Anp32e, a histone chaperone specialized in the removal of H2A.Z from chromatin ».

# ANP32E, A HISTONE CHAPERONE SPECIALIZED IN THE REMOVAL OF H2A.Z FROM CHROMATIN.

Arnaud Obri<sup>1</sup>, Khalid Ouararhni<sup>1</sup>, Christophe Papin<sup>1</sup>, Christophe Romier<sup>2</sup>,  
Stefan Dimitrov<sup>3</sup> and Ali Hamiche<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Département de Génomique Fonctionnelle et Cancer, <sup>2</sup>Département de Biologie Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UDS, CNRS, INSERM, 1 rue Laurent Fries, B.P. 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

<sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Joseph Fourier—Grenoble 1; Institut Albert Bonniot, U823, Site Santé-BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

§ To whom correspondence should be addressed. e-mail:hamiche@igbmc.fr

## ABSTRACT

H2A.Z is an essential histone variant implicated in the regulation of several epigenetic phenomena. Despite the numerous efforts invested, the vertebrate chaperones responsible for H2A.Z deposition and removal from chromatin remain still unknown. Here we have identified the protein Anp32e as a H2A.Z chaperone. We show that Anp32e is a member of the presumed H2A.Z histone-exchange complex p400/TIP60. Anp32e interacts with a short region (containing the  $\alpha$ C helix) of the docking domain of H2A.Z. This interaction is achieved via a novel Anp32e motif, termed ZID. Depletion of Anp32e interferes with both the de-repression of hormone dependent genes and H2A.Z removal from their promoter upon hormone treatment. *In vitro* experiments using highly purified proteins illustrate the ability of Anp32e to remove the H2A.Z/H2B dimer, but not the conventional H2A/H2B dimer, from the nucleosomes. All these data reveal that Anp32e is a histone chaperone specialized in the removal of H2A.Z from chromatin.

## INTRODUCTION

Histone variants are non-allelic isoforms of conventional histones. Each conventional histone, except H4, possesses histone variants. H2A.Z, a histone variant from the H2A family, is found in all eukaryotes. H2A.Z is highly conserved (90% identity) between different organisms but shares only limited conservation (60% identity) with conventional H2A<sup>1</sup>. The available data show that H2A.Z is implicated in key biological processes, including transcription<sup>2-11</sup>, repair<sup>12</sup>, genomic stability<sup>13,14</sup> and cancer initiation and progression<sup>9,15</sup>.

The overall crystal structure of the H2A.Z nucleosome is similar to the conventional one<sup>16</sup>. However, the H2A.Z nucleosome exhibits an altered H2A.Z/H2B dimer interface and an extended accessible acidic surface, the acidic patch<sup>16</sup>. These structural modifications are believed to play key role in the differential stability of the canonical and variant nucleosomes<sup>17,18</sup>. The acidic patch, determined by the negative charge of the docking domain of H2A.Z, regulates both the assembly of higher H2A.Z chromatin structure and H2A.Z chromatin fiber interactions with HP1<sup>19,20</sup>. Intriguingly, a small part of the docking domain of H2A.Z (containing its  $\alpha$ C helix and known as the M6 box) is required for H2A.Z specific functions and *Drosophila* survival<sup>21</sup>.

The proper incorporation of conventional and variant histones into the nucleosome is achieved via specific histone chaperones (for a review see<sup>22</sup>). Recently, HJURP and DAXX were identified in mammalian cells as chaperones for the histone variants CENP-A and H3.3, respectively<sup>23,24</sup>. The incorporation of yeast H2A.Z into chromatin is mediated by the histone chaperone Chz1<sup>25-27</sup> and the histone-exchanging nucleosome remodeling complex SWR1<sup>28-30</sup>. Two SWR1-related multiprotein complexes, SRCAP and p400, were described in higher eucaryotes<sup>31-36</sup>. However, no H2A.Z specific histone chaperone has been identified so far in metazoan.

Here, by using a double immunoaffinity procedure, we have isolated the H2A.Z predeposition complex from HeLa cells. We identified the acidic nuclear phosphoprotein 32 kilodalton  $\epsilon$  (Anp32e) as a member of this complex. We show that Anp32e is a H2A.Z

chaperone, able to specifically remove H2A.Z from the nucleosome.

## RESULTS

### Anp32e is a member of the H2A.Z predeposition complex.

The aim of this work is to identify a H2A.Z specific chaperone and to analyze how it functions. We reasoned that the H2A.Z chaperone, as the chaperones for both H3.3 (DAXX, <sup>24</sup>) and CENP-A (HJURP, <sup>23</sup>) should be a member of a soluble predeposition complex. With this in mind we have established stable HeLa cell lines expressing conventional H2A (e-H2A) or H2A.Z (e-H2A.Z) histones fused to N-terminal double HA and FLAG tags (**Figure 1a**). We next purified from these cell lines the respective predeposition complexes (e-H2A.com and e-H2A.Z.com) by double immunoaffinity <sup>24</sup>. The purified complexes were run on an SDS PAGE and their members were identified by mass spectrometry (**Figure 1b,c**). The e-H2A.Z.com contains several specific protein subunits (p400, TRRAP, SRCAP, Brd8, Tip60, YL1, ING3, etc.), which are not present within the conventional e-H2A.complex (**Figure 1b, c and Supplementary Table 1**). Of note, these subunits are also part of either the SRCAP or the p400/TIP60 complexes, which are believed to exchange H2A for H2A.Z in chromatin <sup>28-32,35,36</sup>. Intriguingly, the major interactive specific partner within the e- H2A.Z.com was a 32 kD protein, which we identified as the Anp32e protein (**Figure1c and Supplementary Table 1**). This was further confirmed by Western blotting using anti-Anp32e antibody (**Figure 1d**).

To additionally study the physical association of the different components of the e-H2A.Z.com, the purified complex was fractionated on a 15-35% glycerol gradient (**Figure 2**). The different fractions were then run on a denaturing 4-12% gradient gel, and the proteins were silver-stained. Three distinct subcomplexes with different molecular masses were identified (**Figure 2, upper panel**). Western blotting revealed the presence of selected distinct e-H2A.Z.com members within the fractions (**Figure 2, lower panel**). Of note, the e-H2A.Z high molecular weight subcomplex (HMWC), running close to the bottom of the gradient, contains all the e-H2A.Z members analyzed by the Western blotting. Importantly, Anp32e and p400 were clearly identified within the HMWC. The low molecular weight subcomplex (LMWC)

contains mainly Anp32e and H2A.Z/H2B dimers while the Middle molecular weight subcomplex (MMWC) is enriched in DNA repair proteins like XRCC5 and XRCC6. These results were further confirmed by mass spectrometry analysis (**Supplementary Table 2**). We conclude that Anp32e is part of three different H2A.Z multiprotein complexes.

## Identification of the Anp32e domain responsible for the specific interaction with H2A.Z

Anp32e is a highly conserved vertebrate protein belonging to the ANP32 family<sup>37</sup>. The proteins from the ANP32 family exhibit two highly conserved regions: the leucine-rich N-terminal part and the C-terminal tail<sup>37</sup>. The human Anp32e N-terminal part contains four leucine rich repeats (LRR), while its C-terminus comprises an unusually long (>100 amino acids) acidic region (**Figure 3a** and<sup>37</sup>). This latter feature of Anp32e as well as the finding that it is the major member of the e-H2A.Z.com (**Figure 1c**) make it a good candidate for a H2A.Z chaperone. If this was the case, Anp32e should specifically interact with H2A.Z. To test this we have carried out a series of *in vitro* and *in vivo* experiments (**Figure 3b-f**). GST-pull down experiments using purified GST-Anp32e as bait shows that Anp32e binds to the variant H2A.Z/H2B dimer, but not to the conventional H2A/H2B dimer (**Figure 3b**). This interaction is highly specific and very stable since it is not affected by treatment with 1M NaCl (**Figure 3b**). As expected, the acidic region (AA 151-268) of Anp32e was required for the binding of Anp32e to the H2A.Z/H2B dimer (**Figure 3c**). Further deletion analysis of Anp32e shows that a shorter sequence (AA 195-268) of Anp32e was sufficient for the recognition and binding to the variant H2A.Z/H2B dimer (**Figure 3d**). Alignment of the sequences of the Anp32e from different species identifies the presence of highly conserved region (spanning AA 215-240 in human Anp32e) within its C-terminal acidic tail (**Figures 3a, g**) suggesting that this region is determinant for the binding to H2A.Z. Indeed, deletion of this region, termed ZID (H2A.Z Interacting Domain), abolishes completely the *in vitro* binding of Anp32e to H2A.Z/H2B dimer (**Figure 3e and accompanying paper**).

The *in vivo* association of Anp32e with H2A.Z was studied by using HeLa cell lines stably expressing double HA and FLAG fusion of Anp32e (e-Anp32e). The purified soluble nuclear e-Anp32e complex (e-Anp32e.com) from these cells contained large amount of H2A.Z as evidenced by mass spectrometry (**Figure 3f and Supplementary Table 3a/b**) and

immunoblotting (**Figure 3f, right panel**). Several other proteins (p400, TRRAP, Brd8, Tip60, Tip49 a,b, ING3, etc.) were identified as members of the e-Anp32e.com (**Figure 3f and Supplementary Table 3b**). Importantly, SRCAP was not found associated with the e-Anp32e.com. Taken as a whole, the described data reveal that: (i) Anp32e binds specifically both *in vitro* and *in vivo* to H2A.Z via the novel Anp32e-ZID domain and, (ii) Anp32e is a member of the p400, but not of the SRCAP complex.

### The $\alpha$ C helix of the docking domain of H2A.Z is required for binding to Anp32e.

The very strong and specific interaction between H2A.Z and Anp32e suggests, in addition to the presence of the Anp32e-ZID in Anp32e, the existence within H2A.Z of a sequence via which this interaction is realized. Such sequence should be highly specific for H2A.Z and crucial for its function. The M6 H2A.Z region (encompassing AA 89-100) was identified in the past to exhibit these features (**Figure 4a** and <sup>21,38,39</sup>). We hypothesized that the M6 H2A.Z region was determinant for the binding of H2A.Z to Anp32e. Pull down experiments using GST-Anp32e shows that the aminoacid sequence encompassing AA 92-114, and thus containing the M6 region (**Figure 4a**), is necessary for the binding of Anp32e to H2A.Z (**Figure 4b**). The major difference between the M6 sequence of conventional H2A and H2A.Z resides within the small  $\alpha$ C helix (**Figure 4c**) suggesting that the H2A.Z  $\alpha$ C helix is required for the binding to Anp32e. The GST-Anp32e pull-down experiments using H2B-H2AZNKLLG (a H2A.Z swapped  $\alpha$ C H2A mutant, which contains the  $\alpha$ C helix of H2A) demonstrate that this is indeed the case (**Figure 4d**). To analyze if the  $\alpha$ C helix of H2A.Z is also essential for its binding to Anp32e *in vivo*, we have purified from HeLa stable cell lines expressing the double HA-and FLAG fusion of H2A.ZNKLLG (e-H2A.ZNKLLG) the nuclear soluble e-H2A.ZNKLLG complex (e-H2A.ZNKLLG.com). The members of the e-H2A.ZNKLLG.com were identified by both mass spectrometry and Western blotting (**Figure 4e and Supplementary Table 4**). Both techniques showed that Anp32e was absent, as expected, from the e-H2A.ZNKLLG.com. Of note, p400, TRRAP, Tip60 and Brd8 were also not found associated with the e-H2A.ZNKLLG.com (**Figure 4e, right panel and Supplementary Table 4**). These data demonstrate that the  $\alpha$ C helix of H2A.Z is essential for the *in vivo* binding of Anp32e to H2A.Z and the subsequent Anp32e-mediated incorporation of H2A.Z in the p400 complex. Interestingly, YL1, Tip49b, SRCAP were part of the e-H2A.ZNKLLG.com (**Figure 4e**), thus suggesting the  $\alpha$ C helix of H2A.Z might not be a key player for the

incorporation of H2A.Z within the SRCAP complex.

### **Anp32e-mediated H2A.Z removal from the *cyp24A1* promoter is required for *cyp24A1* activation.**

All the above-presented data evidence that Anp32e is a H2A.Z specific chaperone. A H2A.Z specific chaperone should be involved in the *in vivo* either deposition or removal (or both) of H2A.Z from the nucleosome. To analyze how Anp32e function *in vivo* we have used the *CYP24A1* gene as a model system (**Figure 5**). This gene, whose basal expression is very low, is upregulated by the active form of vitamin D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )<sup>40</sup>. In agreement with the available data, treatment of HeLa cells with vitamin D resulted in a drastic (50-80 fold) increase of the expression of the *CYP24A1* gene (**Figure 5a, left upper and lower panels**). However, shRNA-mediated depletion of either Anp32e (**Figure 5a, upper right panel**) or p400 (**Figure 5a, lower right panel**) severely impaired the capacity of vitamin D to induce the expression of this gene (**Figure 5a, left lower and upper panels**). Interestingly, very similar dramatic effects (**Figure 5a, middle upper and lower panels**) were also observed for the transcriptional derepression of the retinoic acid (RA) dependent *STRA6* gene<sup>41</sup> when either Anp32e or p400 were depleted (**Figure 5a, right upper and lower panels**) by specific shRNAs.

We next asked why the depletion of Anp32e or p400 affected so strongly the hormone dependent induction of gene transcription. We focused on the *CYP24A1* gene. We addressed this question by using ChIP (**Figure 5b**). ChIP analysis showed that the non-induced *CYP24A1* gene promoter contains H2A.Z nucleosomes (**Figure 5b, left panel**). Treatment with vitamin D of the naïve HeLa cells resulted in a removal of H2A.Z from the promoter of *CYP24A1* and a strong recruitment of Polymerase II (**Figure 5b**). However, the depletion of the expression of either Anp32e or p400 led to loss of the cell capacity to remove (upon vitamin D treatment) the H2A.Z nucleosomes from the promoter of the *CYP24A1* (**Figure 5b, left panel**). This was accompanied by the lack of recruitment of PolII to the *CYP24A1* promoter (**Figure 5b, right panel**). All this suggests that the removal of the *CYP24A1* promoter H2A.Z nucleosome(s) via the p400 complex and in particular via its Anp32e subunit is a *conditio sine qua non* for the vitamin D-dependent up-regulation of the *CYP24A1* gene.

To analyze the ability of Anp32e to directly remove H2A.Z from the nucleosomes we carried out *in vitro* experiments. Conventional and H2A.Z nucleosomes were reconstituted on a mini-circle DNA<sup>23,42</sup> and both samples were incubated with increasing amount of highly purified Anp32e. As seen (**Figure 5c, left panel**), the presence of Anp32e in the H2A.Z nucleosome reaction mixture resulted in the appearance of (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer particle, which amount is increasing upon increase of the amount of Anp32e. We attributed this effect to the Anp32e-induced eviction of the H2A.Z-H2B dimer from the H2A.Z nucleosome. And indeed, the 2D SDS-PAGE analysis showed that the nucleosome-like particle with lower mobility generated by the treatment with Anp32e contains only H3 and H4 (**Figure 5c, right panel**). No such effect was, however, observed when either conventional H2A nucleosomes or nucleosomes reconstituted with the H2A.Z-NKLLG mutant were used as substrates (**Figure 5c, left and right panels**). Therefore, Anp32e through its specific interaction domain (ZID) is able to directly remove H2A.Z from the nucleosome particle.

## CONCLUDING REMARKS

Histone chaperones are histone-binding proteins responsible for the safe delivery of histones to DNA as well as for histone storage, transfer, exchange and removal. They recognize and bind specific histone interface. In this work, we show that Anp32e, a member of the presumed p400/TIP60 H2A.Z histone variant exchange complex, exhibits these characteristics. We identified within Anp32e a novel unique motif, ZID, which was required for the specific interaction of Anp32e with H2A.Z. We also found that a short region of the docking domain of H2A.Z (including its  $\alpha$ C helix) determines H2A.Z ability to bind to Anp32e. In addition, we found that Anp32e alone and in the absence of ATP, was able to remove *in vitro* H2A.Z from the variant H2A.Z nucleosome. All these data define Anp32e as a H2A.Z specific chaperone implicated in the removal of H2A.Z from nucleosomal templates.

This conclusion is further supported by the 1.48 Å crystal structure of the Anp32e/H2A.Z-H2B complex we solved and the detailed analysis of the interactions between wild-type and point-mutated Anp32e and H2A.Z-H2B dimers (see accompanying paper). In addition, the crystal structure of the Anp32e/H2A.Z-H2B complex suggests a very intriguing mechanism of H2A.Z/H2B eviction implying a shielding of one of the H2A.Z/H2B DNA-interacting region from



---

DNA binding and a large extension of the  $\alpha$ C helix generated by Anp32e interaction with the nucleosome (see accompanying paper).

The ChIP experiments illustrate that Anp32e is also required for the H2A.Z eviction *in vivo*, since upon induction of hormone dependent genes no H2A.Z nucleosome removal was observed in the absence of Anp32e. Anp32e crucial role in the de-repression of these genes was further highlighted by the inability of the hormones to de-repress them in HeLa cells depleted of Anp32e.

Importantly, the H2A.Z  $\alpha$ C helix was shown in the past to be essential for the formation of the distinct extended acidic patch on the H2A.Z histone octamer and to play a key role in both H2A.Z chromatin fiber structure<sup>19,20</sup>, fly survival<sup>21</sup> and H2A.Z deposition and function in yeast<sup>38,39</sup>. In this work we described a novel function of H2A.Z  $\alpha$ C helix, namely its key role in H2A.Z removal and subsequent H2A.Z nucleosome de-assembly. Since Anp32e is a member of the p400/TIP60, but not of the SRCAP complex, we speculate that the p400 complex is “specialized” in the removal of H2A.Z, while the SRCAP complex would be implicated in the incorporation of H2A.Z into chromatin. We predict that a non-identified member of the SRCAP complex would be the “deposition” chaperone for H2A.Z into chromatin.

The presented data suggest a “bound to be removed” role for the H2A.Z promoter nucleosome, which in turn indicates why and how the overexpression of H2A.Z is associated with cancer initiation and progression<sup>9,15</sup>. For example, in human breast cancer the MYC dependent overexpression of H2A.Z<sup>15</sup> may lead to the mis-incorporation of H2A.Z in the promoter of multiple genes (including genes important for both proliferation and differentiation) and make them “poised” for quick activation. Consequently, some of these genes would be aberrantly expressed via, among other, the help of the p400/TIP60 complex and the cells may lose the control of proliferation and differentiation and thus, acquire some cancer phenotype features.

---

## METHODS

Full details on stable cell line establishment, purification of protein complexes and recombinant proteins, pull-down assays, DNA substrate preparations, retrotranscription, quantitative PCR and CHIP assay are provided in Supplementary Information.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNRS, INSERM, INCA “INCa\_4496”, ANR “VariZome”, ANR “Nucleoplat” NT09\_476241, the Association pour la Recherche sur le Cancer, La Fondation pour la Recherche Medicale, and La Ligue Nationale contre le Cancer, Equipe labellisée (S.D.). A.O. acknowledges the Association pour la Recherche sur le Cancer for Financial support.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- 1 Louzalen, N., Moreau, J. & Mechali, M. H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res* 24, 3947--3952 (1996).
- 2 Billon, P. & Cote, J. Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 290--302, (2012).
- 3 Mavrich, T. N. et al. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* 18, 1073--1083, (2008).
- 4 Raisner, R. M. et al. Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin. *Cell* 123, 233--248 (2005).
- 5 Zhang, H., Roberts, D. N. & Cairns, B. R. Genome--Wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant that Poises Repressed/Basal Promoters for Activation through Histone Loss. *Cell* 123, 219--231 (2005).

- 6 Barski, A. et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823--837 (2007).
- 7 Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* (2008).
- 8 Weber, C. M., Henikoff, J. G. & Henikoff, S. H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. *Nature structural & molecular biology* 17, 1500--1507, (2010).
- 9 Conerly, M. L. et al. Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res*, (2010).
- 10 Guillemette, B. et al. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384, (2005).
- 11 Santisteban, M. S., Kalashnikova, T. & Smith, M. M. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411--422 (2000).
- 12 Kalocsay, M., Hiller, N. J. & Jentsch, S. Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 33, 335--343, (2009).
- 13 Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. & Tremethick, D. J. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J* 22, 1599--1607 (2003).
- 14 Rangasamy, D., Greaves, I. & Tremethick, D. J. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 650--655 (2004).
- 15 Hua, S. et al. Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol* 4, 188 (2008).
- 16 Suto, R. K., Clarkson, M. J., Tremethick, D. J. & Luger, K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nature Struct. Biol.* 7, 1121-1124 (2000).
- 17 Jin, C. & Felsenfeld, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1519--1529 (2007).
- 18 Jin, C. et al. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* 41, 941--945, (2009).
- 19 Fan, J. Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J. C. & Tremethick, D. J. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9, 172--176 (2002).

- 20 Fan, J. Y., Rangasamy, D., Luger, K. & Tremethick, D. J. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 $\alpha$ -mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* 16, 655--661 (2004).
- 21 Clarkson, M. J., Wells, J. R., Gibson, F., Saint, R. & Tremethick, D. J. Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694--697 (1999).
- 22 Hamiche, A. & Shuaib, M. Chaperoning the histone H3 family. *Biochim Biophys Acta* 1819, 230--237, (2012).
- 23 Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S. & Hamiche, A. HJURP binds CENP--A via a highly conserved N--terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1349--1354, (2010).
- 24 Drane, 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* 24, 1253--1265, (2010).
- 25 Luk, E. et al. Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell* 143, 725--736, (2010).
- 26 Luk, E. et al. Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell* 25, 357--368, (2007).
- 27 Zhou, Z. et al. NMR structure of chaperone Chz1 complexed with histones H2A.Z-- H2B. *Nature structural & molecular biology* 15, 868--869, (2008).
- 28 Mizuguchi, G. et al. ATP--Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. *Science* (2003).
- 29 Kobor, M. S. et al. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2--related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131 (2004).
- 30 Krogan, N. J. et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12, 1565--1576 (2003).
- 31 Cai, Y. et al. The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* 280, 13665--13670, (2005).
- 32 Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S. & Cote, J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology* 24, 1884--1896 (2004).
- 33 Kusch, T. et al. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084--2087 (2004).
- 34 Ikura, T. et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463--473 (2000).
- 35 Choi, J., Heo, K. & An, W. Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z

---

exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res* 37, 5993--6007, (2009).

36 Ruhl, D. D. et al. Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45,5671--5677, (2006).

37 Matilla, A. & Radrizzani, M. The Anp32 family of proteins containing leucine--rich repeats. *Cerebellum* 4, 7--18, (2005).

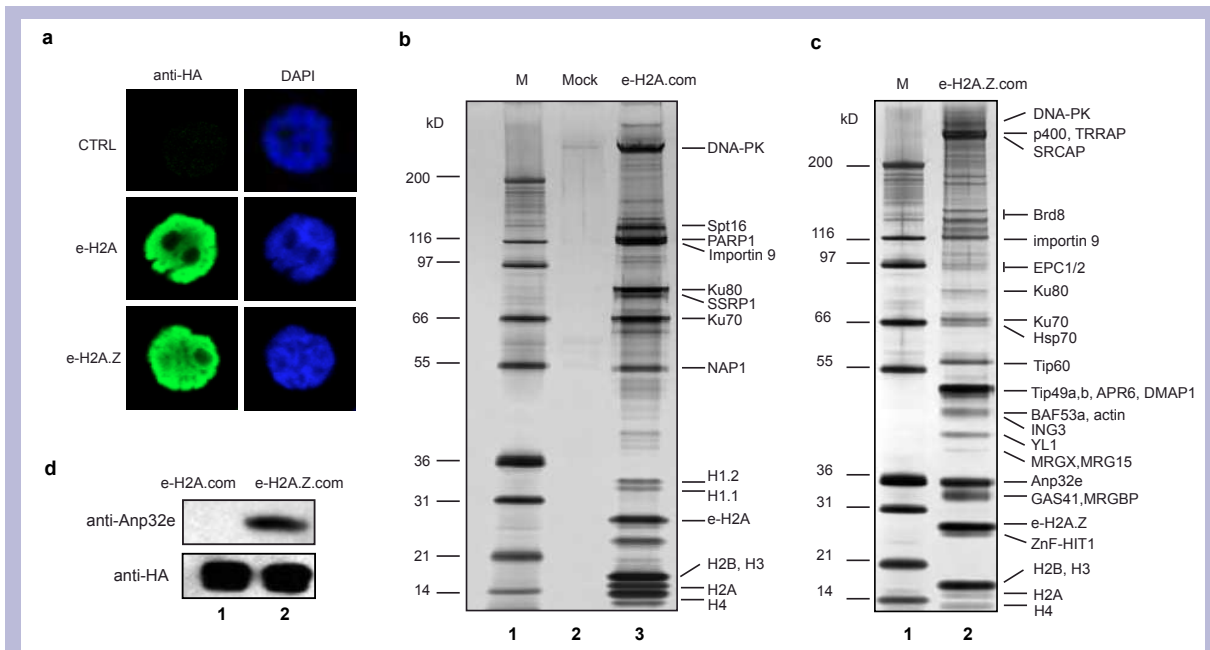
38 Jensen, K., Santisteban, M. S., Urekar, C. & Smith, M. M. Histone H2A.Z acid patch residues required for deposition and function. *Mol Genet Genomics* 285, 287--296, (2011).

39 Wu, W. H. et al. Swc2 is a widely conserved H2AZ--binding module essential for ATP--dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064--1071, (2005).

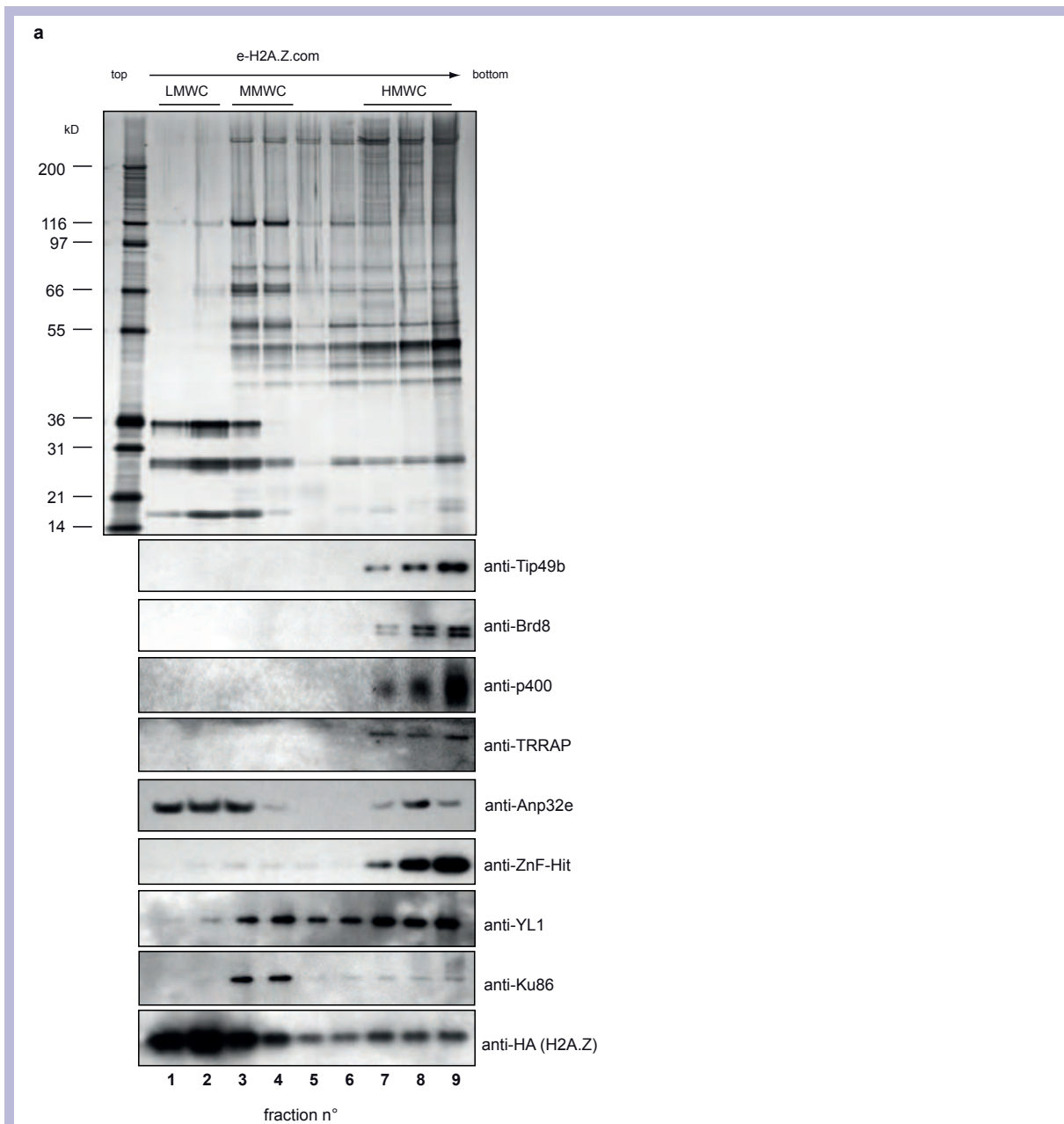
40 Chen, K. S. & DeLuca, H. F. Cloning of the human 1 alpha,25--dihydroxyvitamin D-3 24--hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D--responsive elements. *Biochimica et biophysica acta* 1263, 1--9 (1995).

41 Kawaguchi, R. et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315, 820--825, (2007).

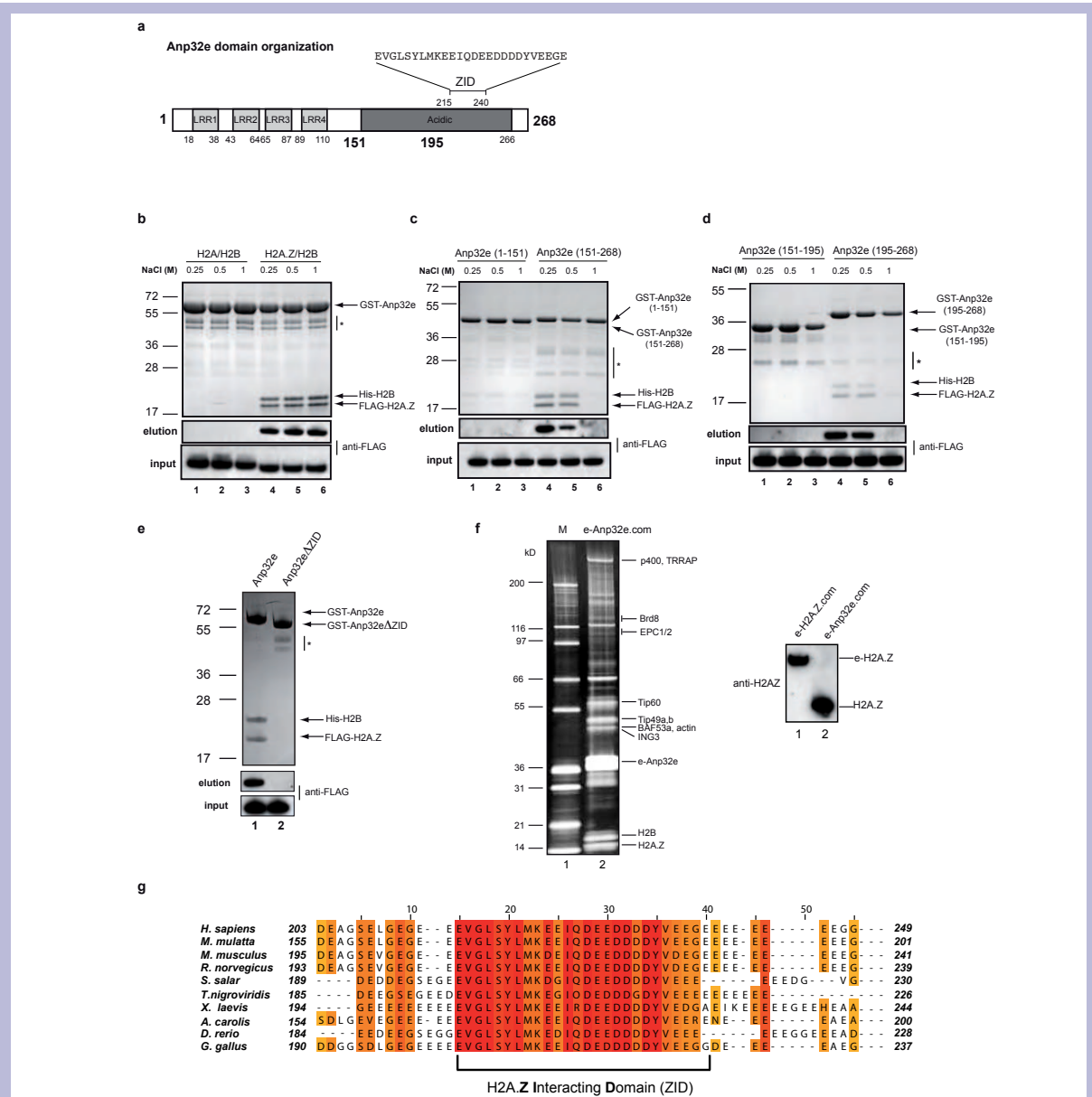
42 Hamiche, A. & Richard--Foy, H. Characterization of specific nucleosomal states by use of selective substitution reagents in model octamer and tetramer structures. *Methods* 19, 457--464, (1999).



**Figure 1: Immunopurification of e-H2A and e-H2A.Z pre-deposition complexes from soluble nuclear fractions.** (a) Stable expression of e-H2A and e-H2A.Z in HeLa cells. Cells expressing e-H2A or e-H2A.Z and control cells were stained with anti-HA (green) and DAPI (blue). (b) Silver staining of proteins associated with e-H2A. The pre-deposition complex of e-H2A (e-H2A.com) was purified by tandem immune-affinity and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry. Lane M, protein molecular mass marker. Lane Mock, mock purification from a non-tagged HeLa cell line. (c) Silver staining of proteins associated with e-H2A.Z. The pre-deposition complex of e-H2A.Z (e-H2A.Z.com) was purified by tandem immuno-affinity and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry. Lane M, molecular mass marker. (d) Western Blot analysis of Anp32e in the e-H2A.Z pre-deposition complex. e-H2A.com and e-H2A.Z.com were run on a 12% SDS PAGE and after transfer, the blot was revealed with an anti-Anp32e and an anti-HA (in order to detect e-H2A.Z or e-H2A).

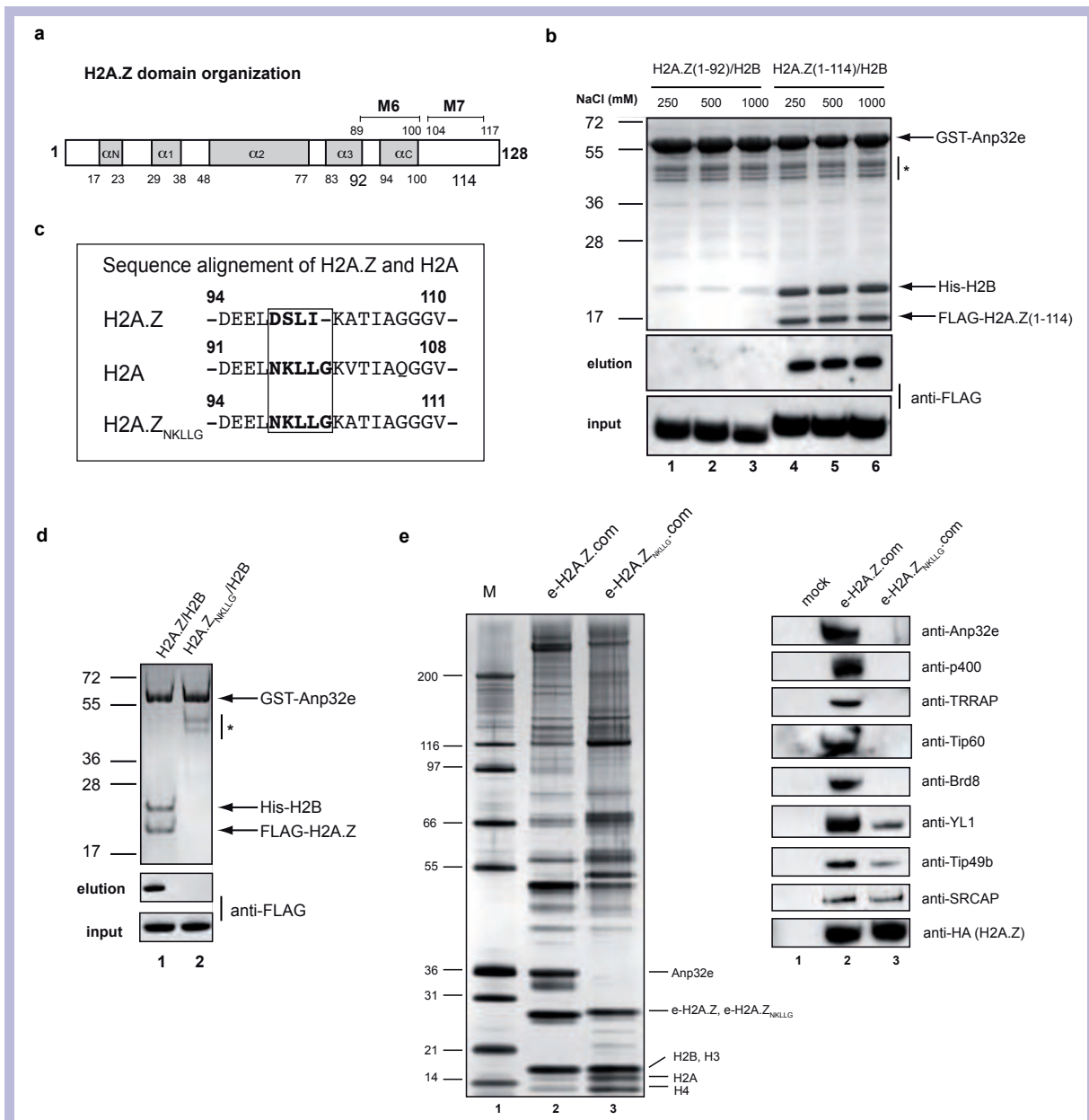


**Figure 2: H2A.Z, Anp32e and p400.com are stably associated in a H2A.Z subcomplex. (a)** Silver staining e-H2A.Z pre-deposition complex fractionated on a glycerol gradient (**top**). Fractions were pooled as indicated at the top of the gel (LMWC, MMWC and HMWC) and were analyzed by mass spectrometry **upper panel**; **lower panel**, immunoblotting of fractions containing e-H2A.Z nuclear subcomplexes with the indicated antibodies.

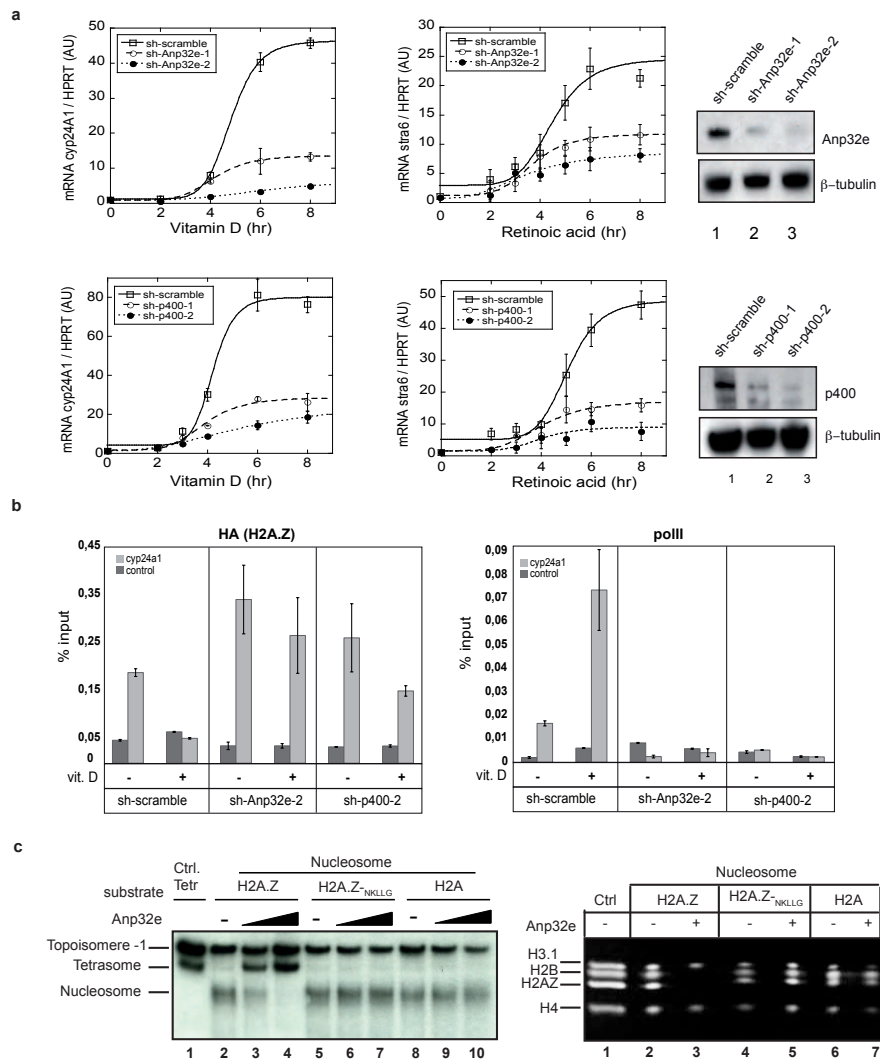


**Figure 3: Anp32e interacts specifically with H2A.Z via a novel ZID domain.** (a) Schematics of the Anp32e domain organization. Anp32e contains four leucine rich domains (LRR) in the N-terminal part and an acidic asparagine/glutamine rich domain (Asp/Glu) in the C-terminal part. (b) Anp32e associates with H2A.Z/H2B, but not with H2A/H2B dimers when expressed in bacteria. GST-Anp32e was coexpressed with either FLAG-H2A/His-H2B (lane 1-3) or with FLAG-H2A.Z/His-H2B (lane 4-6). Complexes were purified and washed with different concentration of NaCl. The purified material was separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie. Elution and input were immunoblotted with anti-FLAG antibody. (c, d) The acidic C terminal domain of Anp32e is required for the interaction with H2A.Z/H2B. The indicated Anp32e deletion mutants fused to GST were coexpressed with FLAG-H2A.Z/His-H2B and allowed to bind to Glutathione agarose beads. The attached proteins were next washed with different concentration of NaCl. Eluted proteins were run on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Elution and input were immunoblotted with anti-FLAG antibody. (e) ZID is essential for the Anp32e interaction with H2A.Z. GST-Anp32e and GST-Anp32eΔZID were coexpressed with FLAG-H2A.Z/His-H2B in bacteria. The GST-purified materials was run on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue and immunoblotted with anti-FLAG antibody. (f) Anp32e associates with H2A.Z H2B dimer in HeLa cells. Silver staining of proteins associated with e-Anp32e are presented. Left panel, the nuclear complex of e-Anp32e (e-Anp32e.com) was purified by tandem immunoaffinity from stable HeLa cell lines and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry; right panel, Western blotting with anti-H2A.Z antibody of the e-H2A.Z.com and e-Anp32e.com. The lower mobility of e-H2A.Z in the e-H2A.Z.com is due to the presence of the double HA and Flag tags. (g) The H2A.Z Interacting Domain (ZID) of Anp32e is highly conserved. Alignment of the Anp32e sequences from the indicated species is shown. The ZID sequence is indicated by brackets.





**Figure 4: H2A.Z associates with Anp32e and p400.com via a specific motif.** (a) Schematics of the structure of H2A.Z. The positions of the M6 and M7 cassettes are indicated. (b) The H2A.Z sequence encompassing AA 1-92 is not necessary for the H2A.Z interaction with Anp32e. GST-Anp32e was coexpressed with H2B and FLAG-H2A.Z deletion mutants in bacteria and purified by GSTchromatography. The attached to the glutathione beads complexes were washed with different concentration of NaCl. The purified materials were run on SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Elution and input were immunoblotted with anti-FLAG antibody. (c) Sequence alignment of H2A.Z (AA 94-110), H2A (AA 91-108) and the H2A.Z<sub>NKLLG</sub> mutant. (d) The H2A.Z DSLI motif is essential for the interaction with Anp32e. The indicated proteins were co-expressed in bacteria and purified by GST-chromatography. The purified samples were then run on a SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Elution and input were revealed by Western blotting using anti-FLAG antibody. (e) The H2A.Z DSLI motif is required for the *in vivo* binding to Anp32e. Stable HeLa cell lines expressing either the epitope tagged e-H2A.Z or the epitope tagged mutant e-H2A.Z<sub>NKLLG</sub> were used to purify the respective complexes by tandem immuno-affinity. The associated polypeptides of the e-H2A.Z<sub>NKLLG</sub>.com were identified by mass spectrometry (left panel) and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies (right panel). Lane Mock, mock purification from non-tagged HeLa cell line. Lane M, protein molecular mass marker.



**Figure 5: Both Anp32e and p400 are required for H2A.Z eviction from CYP24A1 and STRA6 promoters.** (a) Depletion of either Anp32e or p400 results in decrease of both CYP24A1 and STRA6 de-repression. Time-course of the vitamin D-mediated CYP24A1 (lower left and upper left panels) or retinoic acid-mediated STRA6 (lower middle and upper middle panels) expression measured by RT-PCR in control (treated with scramble sh) HeLa cell lines or HeLa cell depleted of either Anp32e (upper left and upper middle panels) or p400 (lower left and lower middle panel) using specific shRNA. Cells were treated with vitamin D or retinoic acid for the indicated times and the expression of CYP24A1 or STRA6 were measured by RT-PCR (means  $\pm$  s.d., n=3). Anp32e (upper right panel) and p400 (lower right panel) shRNA efficiency were determined by Western blot using anti-Anp32e, anti-p400 and anti- $\beta$ -tubulin antibodies. (b) Depletion of either Anp32e or p400 interferes with the eviction of H2A.Z from the CYP24A1 promoter after vitamin D treatment. The amount of H2A.Z (left panel) and PolII (right panel) on CYP24A1 promoter (after 4 hours vitamin D treatment) was measured by ChIP assays in either control HeLa stable cell lines expressing e-H2A.Z or in the same cell lines but shRNA depleted of either Anp32e or p400 (means  $\pm$  s.d., n=3). (c) Specific in vitro removal of the H2A.Z/H2B dimer by Anp32e; H2A.Z<sup>-</sup>, H2A.Z<sup>NKLLG</sup>- and conventional nucleosomes were reconstituted on negatively supercoiled human alpha-satellite DNA corresponding to topoisomer -1. The samples (1  $\mu$ M) were then incubated with two different amounts of Anp32e (5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, respectively) for 30 min at 37°C. The reaction products were analyzed on native 4.5% PAGE (left panel). Lane 1, topoisomer -1 DNA and H3-H4 tetrasome particle. The positions of the naked topoisomer -1 DNA, the tetrasome particle and the nucleosomes are indicated; right panel, 18% 2D-SDS-PAGE of the different nucleosomal particles. The bands corresponding to the indicated different particles (either control (-) or treated with 10  $\mu$ M Anp32e) were cut from the native gel and run on a second dimension SDS-PAGE Gel. Proteins were visualized by silver staining. The positions of the different histones are indicated. Note the absence of H2A.Z and H2B in the tetrasome particle generated upon incubation with Anp32e.

---

## SUPPLEMENTARY METHODS & DATAS

### Cell lines

H2A, H2A.Z and Anp32e proteins fused to N-terminal or C-terminal Flag- and HA- epitope tags (e-H2A/e-H2A.Z/e-ANP32E) were stably expressed in HeLa cells by retroviral transduction <sup>1,2</sup>.

### Tandem affinity purification

Full-length human cDNA clone of ANP32E (IMAGE 100002516) and H2A.Z (IMAGE IRATp970D10109D) were purchased from Source Bioscience. Human histones H2A was PCR amplified from HeLa cells genomic DNA by using Vent-DNA polymerase (New England Biolabs). The different full-length cDNAs were then subcloned into the XhoI-NotI sites of the pREV-HTF retroviral vector <sup>1</sup> using standard techniques. e-H2A, e-H2A.Z and e-Anp32e nuclear complexes and their respective mutants were purified by double immunoaffinity as previously described <sup>1,2</sup>. For glycerol density gradient, samples were loaded onto a 4,5 mL glycerol gradient (15%-35%) and spun 45,000 in a Beckman SW60 rotor for 16h. Fractions were collected from the bottom.

### Mass spectrometry

Identification of proteins was carried out using an ion-trap mass spectrometer (ThermoFinnigan LTQ-Orbitrap Velos) or by Taplin Biological Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, Boston, MA).

### Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed using standard procedures. Rat anti-HA antibody (Roche) was used at 1/200 dilution; the secondary antibody used is a goat antiRat IgG coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 1/400 dilution.

## Antibodies

Antibodies employed were as follows: monoclonal antibody Flag M2 (SIGMA); anti- HA 3F10 (Roche); anti-TIP49B (610918, 612482, BD Transduction); and polyclonal antibody anti-ANP32E (SAB2100124, SIGMA); anti-SRCAP (sc-133312, Santa Cruz Biotechnology); anti-p400 (HPA016704 SIGMA); anti-Ku86 (Santa Cruz Biotechnology) and polyclonal antibodies from ProteinTech Group anti-Tip60 (10824-1-AP); anti-YL1 (15143-1-AP); anti-Brd8 (10476-1-AP); anti-ZnF-Hit (16595-1-AP). Anti-pollI and anti-TRRAP were produced by the IGBMC facility. Anti-H2A.Z, a kind gift from Dr. Stefan Dimitrov (Institut Albert Bonniot, Grenoble France).

## Histones

Human histones were PCR amplified and cloned into a homemade bicistronic pET28b vector. H2B was cloned at the NdeI-BamHI sites of pET28b in frame with an N- terminal His tag, whereas Flag-tagged H2A was cloned at the EcoRI-NotI sites. Human H2A.Z and its mutants were cloned at the EcoRI-NotI sites in frame with an N-terminal Flag tag. Coding sequence of H2AZ was mutated by megaprimer PCR to produce H2A.Z-NKLLG mutant. Histones were co-expressed with the different GST- ANP32E constructs in BL21-CodonPlus-RIL (Stratagene) and purified as described previously described<sup>3</sup>. Non tagged human recombinant, wild-type or mutant, core Histones (H2A, H2A.Z, H2A.Z-NKLLG, H3 and H4) were individually expressed in BL21-CodonPlus-RIL (Stratagene), purified and reconstituted as octamers or tetramers as previously described<sup>4,6</sup>.

## Preparation of recombinant Anp32e

The full-length and deletions mutants of ANP32E were PCR amplified from pCMV- ANP32E (Source Bioscience) and subcloned into pGEX-5X.1 vector (GE Healthcare) for bacterial expression and pFastBac-His vector (Invitrogen) for baculovirus expression. GST and His fusion proteins were purified by standard methods.

## Purification of GST-fusion complexes expressed in bacteria.

GST-fusion Anp32e and its deletion mutants were coexpressed with H2A (or H2A.Z or H2A.Z-

NKLLG)/H2B in *Escherichia coli* strain BL21-CodonPlus-RIL-pLysS (Stratagene) at 37°C using multi-expression bicistronic vectors as previously described<sup>3</sup>. The soluble proteins were purified on glutathione Sepharose 4B beads (Amersham) or anti-Flag M2 beads (Sigma) using standard methods.

## shRNA design

ShRNA sequence against, Anp32e (sh-Anp32e-1 *CAGAATAGTAAAGGTTCTAT* and sh-Anp32e-2 *TATGGCTAATGTGGAAGCTAA*), p400 (sh-p400-1 *GCCAAACTTTACAGGAAGAAT* and sh-p400-2 *GCGGAAACTCATGGAGGAAAT*) and scramble shRNA (*CCTAAGGTTAAGGTTAAGTCG*) were cloned into pLKO.1(blast) vector (Addgene) for stable suppression of ANP32E and p400 mRNA.

## Retrotranscription and real-time quantitative PCR

Total RNAs were purified using standard methods and cDNA was synthesized by random priming. Real-time quantitative PCR was done in the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the Mastercycler Realplex apparatus (Eppendorf). *CYP24A1*, 5'-*CTGACTAGTCTCAACTCTGT*-3' and 5'-*AGCTCCCTGTGTTTGCTGCT*-3' for *STRA6*, and 5'-*TGACACTGGCAAACAATGCA*-3' and 5'-*GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT*-3' for *HPRT*. Results were normalized to *HPRT*.

## ChIP assay

15 cm dishes of subconfluent cells were treated or not with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a hormonally active form of vitamin D<sub>3</sub>, and chromatin immunoprecipitation experiments were next performed as previously described<sup>2</sup>. Immunoprecipitated DNA were quantified by real-time quantitative PCR by using the oligonucleotide pairs 5'-*AGCACACCCGGTGAAGTC*-3' and 5'-*TGGAAGGAGGATGGAGTCAG*-3' for *CYP24A1* and 5'-*CGAGTCCTTCTTCTCCAGTA*-3' and 5'-*GCTTGCAAAGGCTAAAGCCAA*-3' for the control region.

## Histone eviction assay

Assay of histone H2A.Z eviction in the presence of the histone chaperone Anp32e was performed

using a negatively supercoiled DNA topoisomer -1 prepared from the 360-bp human alpha-satellite DNA<sup>3</sup>. This fragment was purified from an EcoRI digest of the plasmid pBSK360, 32P end-labeled, and circularized in the presence of ethidium bromide<sup>5</sup>. Recombinant H2A.Z-, H2A.Z<sub>NKLLG</sub>- and conventional nucleosomes were reconstituted on negatively supercoiled human alpha-satellite DNA corresponding to topoisomer -1 using the salt jump method<sup>5</sup> and a histone to DNA ratio  $rw = 0.5$ . Nucleosome substrates (1  $\mu$ M) were then incubated with two different amounts of His-Anp32e (5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, respectively) for 30 min at 37°C in 20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.01% BSA. The reaction products were analyzed on 4.5% native polyacrylamide gel 1 x TG (0.025 M Tris, 0.192 M glycine), run at room temperature for 2h30 at 120V. Control tetrasomes were assembled on circular DNA according to the “salt jump” method as previously described<sup>5</sup>.

## REFERENCES

- 1 Ouararhni, K. et al. The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev* 20, 3324--3336 (2006).
- 2 Drane, 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* 24, 1253--1265, (2010).
- 3 Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S. & Hamiche, A. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1349-1354, (2010).
- 4 Luger, K., Rechsteiner, T. J. & Richmond, T. J. Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* 119, 1-16 (1999).
- 5 Hamiche, A. & Richard-Foy, H. Characterization of specific nucleosomal states by use of selective substitution reagents in model octamer and tetramer structures. *Methods* 19, 457-464, (1999).
- 6 Hamiche, A., Kang, J. G., Dennis, C., Xiao, H. & Wu, C. Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF.

e-H2A.com				e-H2A.Z.com			
Entry	Proteins	Peptides		Entry	Proteins	Peptides	
P78527-1	PRKDC	201	DNA repair	Q9Y4A5-1	TRRAP	229	p400/TIP60.com
P09874	PARP1	54		Q96L91-2	EP400	105	
P13010	XRCC5	49		Q9H0E9-3	BRD8	32	
P12956	XRCC6	41	Q9NV56	MRGBP	3		
Q08945	SSRP1	28	Q9H2F5-1	EPC1	23		
Q9Y5B9	SUPT16H	50	Q52LR7	EPC2	22		
Q9Y265-1	RUVBL1	4	Q92993-2	TIP60	18		
Q9Y230	RUVBL2	6	Q9NXR8-1	ING3	14		
P11387	TOP1	30	Q15014	MRGX	3		
P55209	NAP1L1	14	Q9UBU8	MRG15	3		
Q99733	NAP1L4	11	Q95619	GAS41	5	SRCAP.com	
Q13547	HDAC1	12	Q9NPF5	DMAP1	30		
P11021	HSPA5	11	Q9Y265-1	RUVBL1	23		
P11142-1	HSPA8	14	Q9Y230	RUVBL2	30		
P68431	H3	13	Q15906	YL1	9		
P62807	H2B	25	O96019-1	ACTL6A	16		
P0C0S8	H2A	30	O43257	ZNHIT1	4		
P62805	H4	15	Q6ZRS2-2	SRCAP	63		
			Q9GZN1	ACTR6	6		
			Q05BQ5-3	MBTD1	9		
			P11142-1	HSPA8	27	DNA repair	
			P78527-1	PRKDC	84		
			Q01831	XPC	8		
			P49916-2	LIG3	8		
			P52701-2	MSH6	2		
			P43246	MSH2	7		
			P18887	XRCC1	7		
			P13010	XRCC5	18		
			P12956	XRCC6	22		
			P54727	RAD23B	6		
			Q9BTT0	Anp32E	6	histone chaperone	
			P55209	NAP1L1	6		
			Q99733	NAP1L4	1		
			P68431	H3	4		
			P62807	H2B	26		
			P62805	H4	3		
			P0C0S5	H2A.Z	30		

**Supplementary Table 1 : Mass spectrometry analyses of e-H2A and e-H2A.Z complexes.**  
 Table summarizing polypeptides detected by mass spectrometry analysis of e-H2A and e-H2A.Z complexes, presented in Figure 1 and purified by double immunoaffinity.

gradient e-H2A.Z				
Entry	Proteins	HMWC	MMWC	LMWC
Q9Y4A5-1	TRRAP	163	56	7
Q96L91-2	p400	95	29	12
Q9H0E9-3	BRD8	21	6	2
Q92993-2	TIP60	7	0	0
Q9NPF5	DMAP1	24	16	0
Q9H2F5-1	EPC1	9	2	0
Q52LR7	EPC2	10	1	0
Q15014	MRGX	4	0	0
Q9NV56	MRGBP	3	0	0
Q9UBU8	MRG15	1	0	0
Q92993-2	TIP60	7	0	0
Q9NXR8-1	ING3	5	0	0
O95619	GAS41	12	0	0
Q9GZN1	ACTR6	9	0	0
Q15906	YL1	8	5	0
Q9Y265-1	RUVBL1	28	8	5
Q9Y230	RUVBL2	41	9	4
Q6ZRS2-2	SRCAP	68	15	0
P12956	XRCC5	0	35	0
P13010	XRCC6	1	32	0
O43257	ZNHIT1	2	0	0
P78527-1	DNA-PK	123	47	0
P78527-1	PARP1	0	28	0
Q08945	SSRP1	4	2	0
Q9Y5B9	SUPT16H	12	7	0
P55209	NAPL1	0	7	1
Q9BTT0	Anp32E	5	2	25
Q96P70	IPO9	16	29	3
P62807	H2B	5	8	12
P68431	H3	0	2	0
P62805	H4	0	3	0
P0C0S5	H2AZ	4	6	15

**Supplementary Table 2 : Mass spectrometry analyses of the different H2A.Z subcomplexes.**  
 Table summarizing polypeptides detected by mass spectrometry analysis of e-H2A.Z subcomplexes fractionated by glycerol gradient and presented in Figure 2.



**a**

Position	MH+	Sequence
86-92	851.0395	<a href="#">HLQLAIR</a>
24-32	945.1093	<a href="#">AGLQFPVGR</a>
93-102	1119.2138	<a href="#">GDEELDSLIIK</a>
103-116	1371.6254	<a href="#">ATIAGGGVIPHIHK</a>
86-102	1951.2301	<a href="#">HLQLAIRGDEELDSLIIK</a>

Protein coverage by amino acid count: 40/128 = **31.2%**

Protein coverage by mass: 4229/13509 = **31.3%**

**b**

e-Anp32e		
Entry	Proteins	
Q9Y4A5-1	TRRAP	25
Q96L91-2	EP400	20
Q9Y230	RUVBL2	17
Q9Y265-1	RUVBL1	10
O96019-1	ACTL6A	5
Q15014	MRGX	2
Q9UBU8	MRG15	3
Q9NV56	MRGBP	4
Q9H2F5-1	EPC1	6
Q52LR7	EPC2	7
Q92993-2	TIP60	2
Q9NXR8-1	ING3	5
O95619	GAS41	3
Q9NPF5	DMAP1	9
P13010	XRCC5	13
P12956	XRCC6	14
Q16531	DDB1	13
P52701-2	MSH6	16
P43246	MSH2	16
Q92878-3	RAD50	11
P11142-1	HSPA8	20
Q9BTT0	ANP32E	30
P62807	H2B	22
P0C0S5	H2A.Z	25

**Supplementary Table 3 : Mass spectrometry analysis of e-Anp32e complex and its associated H2A variant subtype.** a) Table summarizing specific H2A.Z peptides detected by mass spectrometry analysis of H2A variant subtype associated with e-Anp32e complex, presented in Figure 3f. b) Table summarizing polypeptides detected by mass spectrometry analysis of e-Anp32e complex, presented in Figure 3f and purified by double immunoaffinity.

<b>e-H2A.Z<sub>NKLLG</sub></b>			
<b>Entry</b>	<b>Proteins</b>	<b>Peptides</b>	
O95619	GAS41	2	SRCAP.com
Q9NPF5	DMAP1	27	
Q9Y265-1	RUVBL1	14	
Q9Y230	RUVBL2	25	
O96019-1	ACTL6A	10	
Q15906	YL1	3	
O43257	ZNHIT1	2	
Q6ZRS2-2	SRCAP	64	
Q9GZN1	ACTR6	3	FACT.com
Q9Y5B9	SUPT16H	13	
Q08945	SSRP1	11	DNA repair
P13010	XRCC5	24	
P12956	XRCC6	21	
P78527-1	PRKDC	70	
Q01831	XPC	11	
P52701-2	MSH6	3	
P43246	MSH2	4	histone chaperone
P11142-1	HSPA8	31	
P55209	NAP1L1	13	
Q99733	NAP1L4	5	
P68431	H3	15	
P62807	H2B	24	
P62805	H4	14	
P0C0S5	H2A.Z	27	

**Supplementary Table 4 : Mass spectrometry analyses of e-H2A.Z<sub>NKLLG</sub> complex.** Table summarizing polypeptides detected by mass spectrometry analysis of e-H2A.Z<sub>NKLLG</sub> complex, presented in Figure 4e and purified by double immunoaffinity.

# RÉSULTATS

## ARTICLE 2

---

### I. CONTEXTE ET QUESTION POSÉE.

Les résultats décrits plus haut ont mis en évidence la caractérisation d'une nouvelle chaperonne de la variante d'histone H2AZ. En collaboration avec le Dr. Christophe Romier de l'équipe de Pr. Jean Cavarelli nous avons obtenu une structure du complexe Anp32e-H2AZ-H2B a une résolution de 1.48 Å qui confirme clairement la fonction d'éviction de la chaperonne d'histone Anp32e. Cette structure présente les bases moléculaires de la reconnaissance de H2AZ par le domaine ZID d'Anp32e et donne une nouvelle fonction à l'hélice  $\alpha$ C de H2AZ.

### II. RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Nos résultats sont présentés dans la publication ci-après : « Structural basis for recognition of histone variant H2A.Z by human chaperone Anp32e ».

# STRUCTURAL BASIS FOR H2A.Z RECOGNITION AND NUCLEOSOMAL REMOVAL BY HUMAN CHAPERONE ANP32E

Marie-Laure Diebold<sup>1</sup>, Arnaud Obri<sup>2</sup>, Khalid Ouararhni<sup>2</sup>, Martin Marek<sup>1</sup>, Stefan Dimitrov<sup>3</sup>, Ali Hamiche<sup>2\*</sup> & Christophe Romier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie Intégrative and <sup>2</sup>Département de Génomique Fonctionnelle et Cancer, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UDS, CNRS, INSERM, 1 rue Laurent Fries, B.P. 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

<sup>3</sup>Université Joseph Fourier - Grenoble 1, INSERM, Institut Albert Bonniot, U823, Site Santé, B.P. 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

\*To whom correspondence should be addressed. Christophe Romier: Tel: +33-3-88-65-57-98; Fax: +33-3-88-65-32-00; E-mail: romier@igbmc.fr. Ali Hamiche: Tel: +33-3-88-65-32-50; Fax: +33-3-88-65-32-00; E-mail: hamiche@igbmc.fr.

## ABSTRACT

Histone variants are essential for shaping the chromatin landscape and regulating nuclear mechanisms<sup>1,2</sup>. H2A.Z, an essential histone variant<sup>3</sup>, is implicated in numerous cellular events<sup>4-7</sup> and plays an important role in transcriptional regulation<sup>8-15</sup>. However, the mechanism of H2A/H2A.Z exchange on chromatin remains elusive. In addition, the H2A.Z histone chaperones in higher eukaryotes are not known. We have identified human Anp32e protein as a H2A.Z chaperone responsible for H2A.Z specific removal from chromatin (see accompanying paper). H2A.Z removal is achieved via a small region of the Anp32e C-terminus, termed Anp32e-ZID (H2A.Z Interacting Domain). Here we present the structure at 1.48 Å resolution of the complex formed between Anp32e-ZID and the H2A.Z/H2B histone dimer. The N-terminus of the Anp32e-ZID specifically recognizes and interacts with the H2A.Z/H2B pair. This leads to an extension of the H2A.Z αC helix to the double of its canonical length, thus making the new conformation of the H2A.Z docking domain incompatible with nucleosome binding. The C-terminus of Anp32e-ZID, in turn, shields one H2A.Z/H2B DNA-interacting region from DNA binding. As a consequence, the H2A.Z/H2B interactions with both H3-H4 and nucleosomal DNA are strongly destabilized and H2A.Z/H2B is removed from the nucleosome. Our results provide structural determinants for human H2A.Z recognition by a specific chaperone, and illustrate a novel mechanism for H2A.Z removal from chromatin. The described findings explain how the epigenetic properties of histone variant chromatin could be acquired, modified, and propagated.

We report in the accompanying paper that Anp32e (Acidic nuclear phosphoprotein 32kDa e) is a vertebrate-specific member of the p400/Tip60 remodeling complex, one of the human homologs of the yeast SWR1 complex that catalyzes H2A.Z-H2A histone exchange<sup>16-21</sup>. Anp32e recognizes and evicts H2A.Z/H2B dimers from nucleosomes, both *in vitro* and from promoters upon transcriptional activation, via its Anp32e-ZID (H2A.Z Interacting Domain, encompassing AA 215-240; Fig. 1a and Supplementary Fig. 1 and 2; see accompanying paper).

The aim of this work is to understand the structural basis for H2A.Z recognition by Anp32e, and to explain how Anp32e is able to specifically remove H2A.Z from the nucleosome. To this end, we have used X-ray diffraction analyses combined with *in vitro* and *in vivo* biochemical approaches. Crystals of the Anp32e-ZID in complex with H2A.Z and H2B deleted from their NH<sub>2</sub>-unstructured tails (AA 18-127 and 30-125, respectively) were obtained. These crystals diffracted to 1.48 Å resolution. The structure of the complex was solved by molecular replacement, using one H2A.Z/H2B dimer from the H2A.Z nucleosome structure<sup>22</sup> as search model, followed by cycles of model building and refinement (Supplementary Table 1).

Our structure reveals that the Anp32e-ZID interacts with one tip of the H2A.Z/H2B dimer (Fig.1b). The Anp32e-ZID has no defined secondary structure elements, except for a small N-terminal  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ N). Strikingly, in the Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B structure, the H2A.Z  $\alpha$ C helix is extended twice compared to its canonical length within the nucleosome (compare Fig. 1 b with Fig. 1d; Fig 1c). This  $\alpha$ C helix has been shown to be the only absolutely essential region of H2A.Z for *Drosophila* development (cassette M6; Fig. 1e) 4. Note that the rest of the H2A.Z C-terminal tail (AA 108-127) is not seen in density.

Importantly, the H2A.Z  $\alpha$ C conformational change impedes the remaining part of the docking domain - that mediates the main nucleosomal interactions of H2A and H2A.Z with the H3/H4 pair<sup>22,23</sup> - to adopt the same conformation as the one observed in the nucleosome (Fig. 1c; Supplementary Fig. 3). Notably, the residues that participate in the extended part of H2A.Z  $\alpha$ C helix do not fold back anymore onto the H2A.Z  $\alpha$ 3 helix, and this position is now occupied by the Anp32e-ZID  $\alpha$ N helix (Fig.1b-d; Supplementary Fig. 3). This should in turn destabilize or completely abrogate the extensive interaction between the C-terminal part of the docking domain (cassette M7; Fig. 1e) and a H3/H4 pair within the nucleosome.

Anp32e-ZID binding appears to be the driving force for  $\alpha$ C H2A.Z conformational change. Consistent with this, upon H2A.Z binding the Anp32e-ZID  $\alpha$ N helix provides three residues (L218, L221, and M222) that form hydrophobic interactions with residues of helices  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ C of H2A.Z, as well as with helix  $\alpha$ 2 of H2B (Fig. 2 a-b). Importantly, residues belonging to the extended part of H2A.Z  $\alpha$ C, in particular T103 and I104, contribute to these interactions and stabilize this extended conformation. Notably, T103 hydroxyl forms a bidentate hydrogen bond with (i) the main chain amide of H2A.Z L99, that belongs to the canonical H2A.Z helix  $\alpha$ C, and (ii) the side chain of R72 from H2B  $\alpha$ 2 (Fig. 2a).

Surprisingly, both T103 and I104 are fully conserved in H2A (T101 and I102), indicating that this canonical histone could have the same extended  $\alpha$ C helix (Fig. 1e). However, a major difference between H2A and H2A.Z is the presence of an additional conserved glycine (G98) two residues before the conserved threonine-isoleucine motif (Fig. 1e). Beside its helix breaker propensity, this glycine would shift by one residue the position of T101 and I102 in an extended H2A  $\alpha$ C helix. This would prevent in turn the formation of a bidentate hydrogen bond by H2A T101, as observed for H2A.Z T103. Of note, H2A T101 would then be replaced at this position by V100 (Fig. 1e).

Thus, binding of Anp32e-ZID N-terminal helix to H2A.Z/H2B enables the specific recognition of this dimer over the H2A/H2B pair by creating and stabilizing a conformational change in H2A.Z that cannot be accommodated by H2A. Importantly, the other H2A histone variants  $\alpha$ C helices also have an additional residue before their conserved threonine-isoleucine motif, suggesting that Anp32e also discriminates H2A.Z from the other H2A variants (Supplementary Fig. 4).

The region of the Anp32e-ZID that follows helix  $\alpha$ N is conserved both in terms of high acidic residue content and length (Fig. 2b). It is however less well defined in density and does not interact extensively with the H2A.Z/H2B dimer, suggesting that its role is to form an acidic linker. In contrast, the C-terminal part of the Anp32e-ZID interacts strongly with the surface formed by H2A.Z loop L2 and the H2B  $\alpha$ 1-loop L1- $\alpha$ 2 region (Fig. 2c). Anp32e-ZID main chain and side chains of D232 and D234 form a hydrogen bond network with residues from H2A.Z

and H2B, whereas Y235 is involved in hydrophobic interactions with H2B residues (Fig. 2b-c). These interactions do not allow further discrimination of H2A.Z over H2A. Rather, they shield the H2A.Z loop L2/H2B loop L1 region, which is known to interact with DNA close to the entry/exit sites of the nucleosome<sup>22,23</sup>.

To investigate the importance of the Anp32e-ZID for the functional role of Anp32e, three mutants were designed in the context of the full-length protein, targeting both H2A.Z/H2B binding regions of the Anp32e-ZID: m1 (L218A/L221A/M222A), m2 (D232A/D234A/Y235A), and m12 (L218A/L221A/M222A/D232A/D234A/Y235A). Co-expression in *E. coli* of these mutants with the H2A.Z/H2B dimer showed that they have lost completely their ability to interact with the H2A.Z/H2B dimer (Fig. 3a).

We next expressed each one of these mutants in HeLa cells and purified the complexes they form. In contrast to the wild-type Anp32e, all three mutants were unable to bind the H2A.Z/H2B dimer, thus confirming our co-expression data in *E. coli* (Fig. 3b-c). In agreement with this, the Anp32e-m12 mutant loses its capacity to remove H2A.Z/H2B dimers from the nucleosome (Fig. 4a).

Taken together, our data show that Anp32e-ZID binding is involved in both H2A.Z specific recognition and destabilization of the H2A.Z/H2B binding to nucleosomes via  $\alpha$ C helix extension and DNA shielding. This destabilization is further enhanced by: (i) the Anp32e-ZID acidic linker clashing with residues from H3 LN loop, (ii) the positioning of the Anp32e-ZID N-terminus at the site occupied by the small  $\beta$ -sheet formed between the C-terminus of H4 and H2A.Z residues (which in the Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B complex form the end of the extended  $\alpha$ C helix), and (iii) the new position - resulting from the  $\alpha$ C extension - of the H2A.Z C-terminal tail at the center of the histone octamer, where it may not be easily accommodated (Fig. 4b-c).

The above described results suggest the following mechanism for the Anp32e mediated eviction of H2A.Z/H2B from the nucleosomes (Fig. 4b-c). Initially, Anp32e-ZID recognizes and interacts through its DNA shielding domain with the H2A.Z loop L2/H2B loop L1 region. This results in destabilization of H2A.Z/H2B binding to DNA at the entry/exit sites. This

---

destabilization is further increased by the Anp32e-ZID acidic linker, which tends to occupy the space of the LN region of H3 and the C-terminal part of the docking domain, thus altering the interaction of H3 with the H2A.Z

docking domain. As a result, the H2A.Z  $\alpha$ C helix becomes accessible to the Anp32e-ZID  $\alpha$ N. The positioning of this latter helix as well as H2A.Z  $\alpha$ C helix extension leads to large steric clashes and subsequent eviction of the H2A.Z/H2B dimer. This scenario implies initial accessibility of the H2A.Z loop L2/H2B loop L1 region to Anp32e, which could be achieved thanks to the nucleosome end breathing<sup>24</sup>. Note that, *in vivo*, H2A.Z nucleosome remodeling by p400 could greatly facilitate this mechanism and the H2A.Z/H2B eviction.

Chz1, a yeast H2A.Z histone chaperone, has also been reported to interact directly with the H2A.Z/H2B dimer and to assist SWR1 in H2A.Z/H2B deposition<sup>25</sup>. Chz1 is much less invasive than Anp32e and leaves, upon binding, the H2A.Z  $\alpha$ C helix and its following region in the same conformation as it is seen in the nucleosome (Supplementary Fig. 5)<sup>26</sup>. This apparently creates only some steric hindrance with DNA. This hindrance, in agreement with a deposition mechanism of H2A.Z/H2B by Chz1 following H2A/H2B removal, should most likely be easily accommodated since DNA at this position would be loosely bound due to the absence of a H2A/H2B pair (Supplementary Fig. 6). Intriguingly, H3 variant histone chaperones also show potentially similar DNA shielding propensities<sup>27-29</sup>.

The prevailing view in the literature is that histone variants are deposited and exchanged via deposition-exchange complexes<sup>1</sup>. Our data (this manuscript and the accompanying paper) refine this view, and suggest the existence of complexes specialized either in the removal or in the deposition of histone variants. In the case of human H2A.Z, we show that the cell exploits this mechanism for de-repression of hormone-dependent genes by p400/Tip60-dependent H2A.Z removal (see accompanying paper), whereas the role of the deposition complex could be played by SRCAP. Yet, H2A.Z removal/deposition complexes might be implicated, as H2A.Z itself, in a wide range of epigenetic regulations. For example, H2A.Z nucleosomes are maintained during mitosis, but they are shifted from the +1 position to the TSS of genes that need to be rapidly reactivated after mitosis<sup>30</sup>. The reactivation mechanism might require the removal of



---

the H2A.Z nucleosome from the TSS and thus, the p400/Tip60 complex.

## METHODS SUMMARY

The complexes used in this study were produced by co-expression of their subunits in *E. coli* using the pET-MCN multi-expression vector series. Purification was carried out by Talon affinity chromatography against His-tagged Anp32e constructs, thrombin cleavage of the His-tag, followed by either FLAG-tag affinity chromatography against FLAG-H2B constructs for analytical purifications, or gel filtration for large scale purifications. Crystals of the described complex were obtained by vapor diffusion by mixing equal amounts of complex at 10 mg/ml and reservoir containing 0.1 M Na Cacodylate pH 7.0, 0.2 M Na Formate and 24% to 30% PEG 3350. Prior to data collection, crystals were transferred to a solution of reservoir supplemented with 20% PEG 200 and quickly frozen in liquid nitrogen. Crystallographic data were collected on beamline PROXIMA1 at the SOLEIL synchrotron and processed with HKL2000. Structure determination was carried out by molecular replacement with MOLREP using as search model a H2A.Z/H2B dimer obtained from the H2A.Z nucleosome structure (PDB code 1F66). Model building and refinement were carried out with COOT, PHENIX and BUSTER. *In vivo* complexes purification and *in vitro* eviction experiments were carried out as described elsewhere (see accompanying paper).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Antony, Jean Cavarelli, and Dino Moras for critical reading of the manuscript. We thank Vincent Cura and Alastair Mc Ewen for help during data collection, and the IGBMC Structural Genomics Platform for setting up automated procedures. We thank members of SOLEIL for the use of their beamline facilities and for help during data collection. MLD was supported by a PhD grant from the French Research Ministry. This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Strasbourg (UDS), by the ANR Grant Varizome, and by La Ligue Nationale contre le Cancer, Equipe labellisée (S.D.).

---

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- 1 Luger, K., Dechassa, M.L., & Tremethick, D.J., New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (7), 436-447 (2012).
- 2 Tachiwana, H. et al., Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* 476 (7359), 232-235 (2011).
- 3 Faast, R. et al., Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development *Curr Biol* 11 (15), 1183-1187 (2001).
- 4 Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., & Tremethick, D.J., Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399 (6737), 694-697 (1999).
- 5 Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., & Tremethick, D.J., The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9 (3), 172-176 (2002).
- 6 Meneghini, M.D., Wu, M., & Madhani, H.D., Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112 (5), 725-736 (2003).
- 7 Rangasamy, D., Greaves, I., & Tremethick, D.J., RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* 11 (7), 650-655 (2004).
- 8 Guillemette, B. et al., Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3 (12), e384 (2005).
- 9 Raisner, R.M. et al., Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123 (2), 233-248 (2005).
- 10 Zhang, H., Roberts, D.N., & Cairns, B.R., Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123 (2), 219-231 (2005).
- 11 Li, B. et al., Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (51), 18385-18390 (2005).
- 12 Barski, A. et al., High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129 (4), 823-837 (2007).

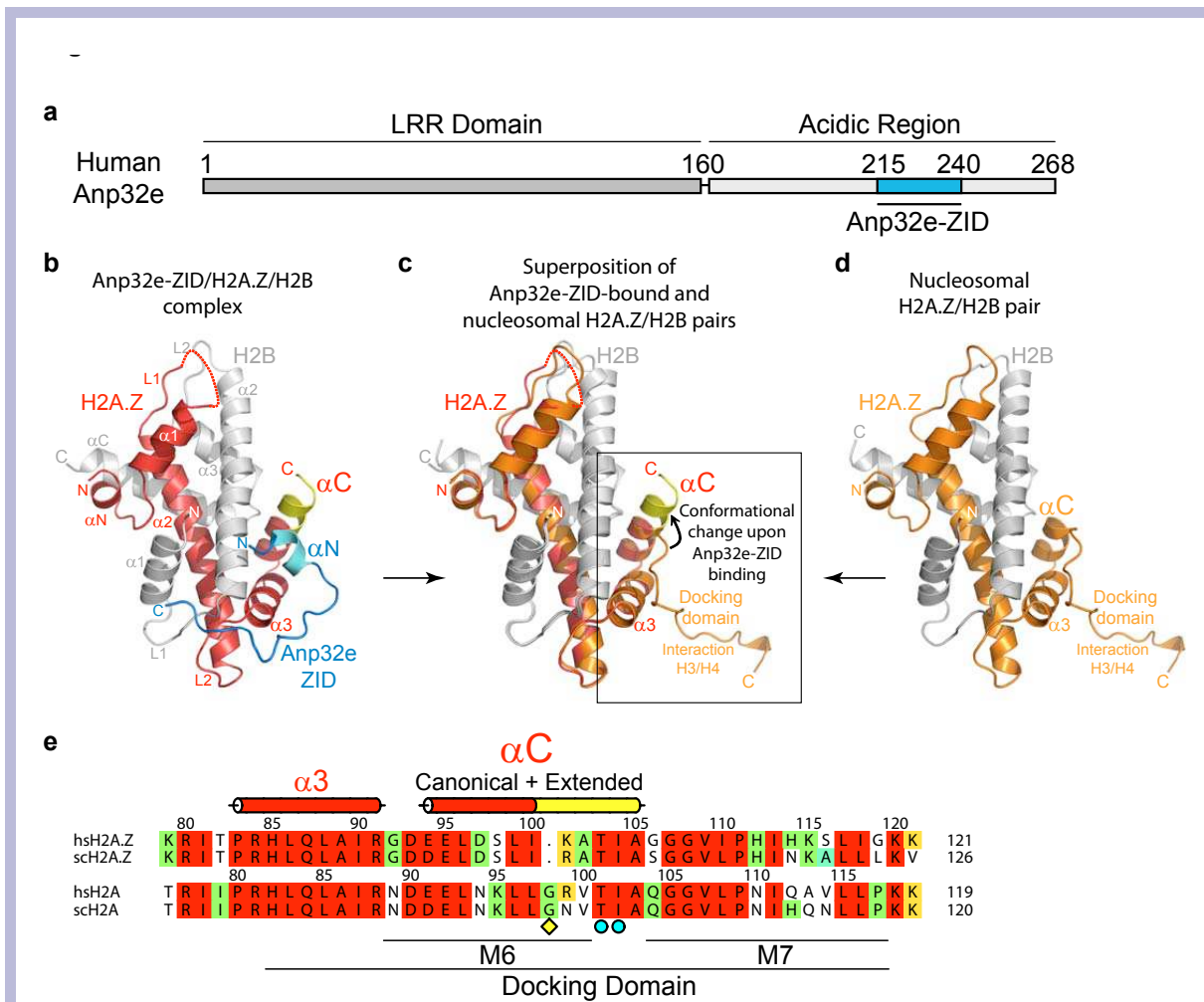
- 13 Mavrich, T.N. et al., Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453 (7193), 358-362 (2008).
- 14 Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., & Henikoff, S., Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456 (7218), 125-129 (2008).
- 15 Jin, C. et al., H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* 41 (8), 941-945 (2009).
- 16 Ikura, T. et al., Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102 (4), 463-473 (2000).
- 17 Krogan, N.J. et al., A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12 (6), 1565-1576 (2003).
- 18 Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., & Cote, J., Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 24 (5), 1884-1896 (2004).
- 19 Mizuguchi, G. et al., ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303 (5656), 343-348 (2004).
- 20 Kobor, M.S. et al., A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2 (5), E131 (2004).
- 21 Wong, M.M., Cox, L.K., & Chrivia, J.C., The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J Biol Chem* 282 (36), 26132-26139 (2007).
- 22 Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., & Luger, K., Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7 (12), 1121-1124 (2000).
- 23 Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., & Richmond, T.J., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389 (6648), 251-260 (1997).
- 24 Li, G., Levitus, M., Bustamante, C., & Widom, J., Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol* 12 (1), 46-53 (2005).
- 25 Luk, E. et al., Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell* 25 (3), 357-368 (2007).
- 26 Zhou, Z. et al., NMR structure of chaperone Chz1 complexed with histones H2A.Z-H2B. *Nat Struct Mol Biol* 15 (8), 868-869 (2008).
- 27 Cho, U.S. & Harrison, S.C., Recognition of the centromere-specific histone Cse4 by

the chaperone Scm3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (23), 9367-9371 (2011).

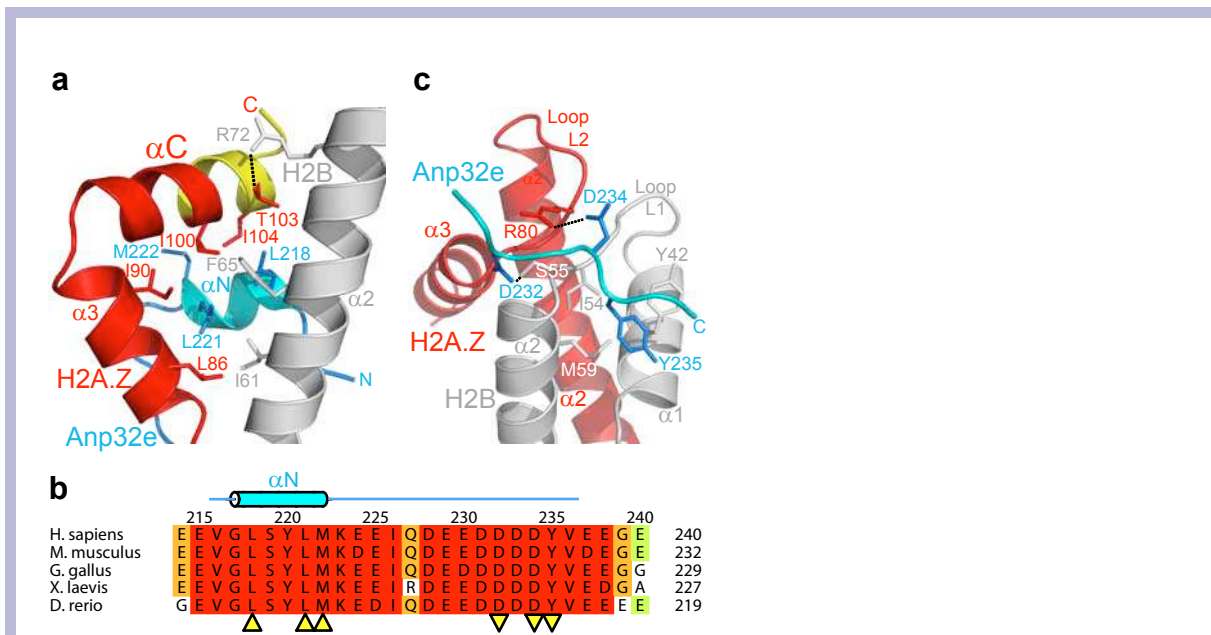
28 Hu, H. et al., Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP. *Genes Dev* 25 (9), 901-906 (2011).

29 Zhou, Z. et al., Structural basis for recognition of centromere histone variant CenH3 by the chaperone Scm3. *Nature* 472 (7342), 234-237 (2011).

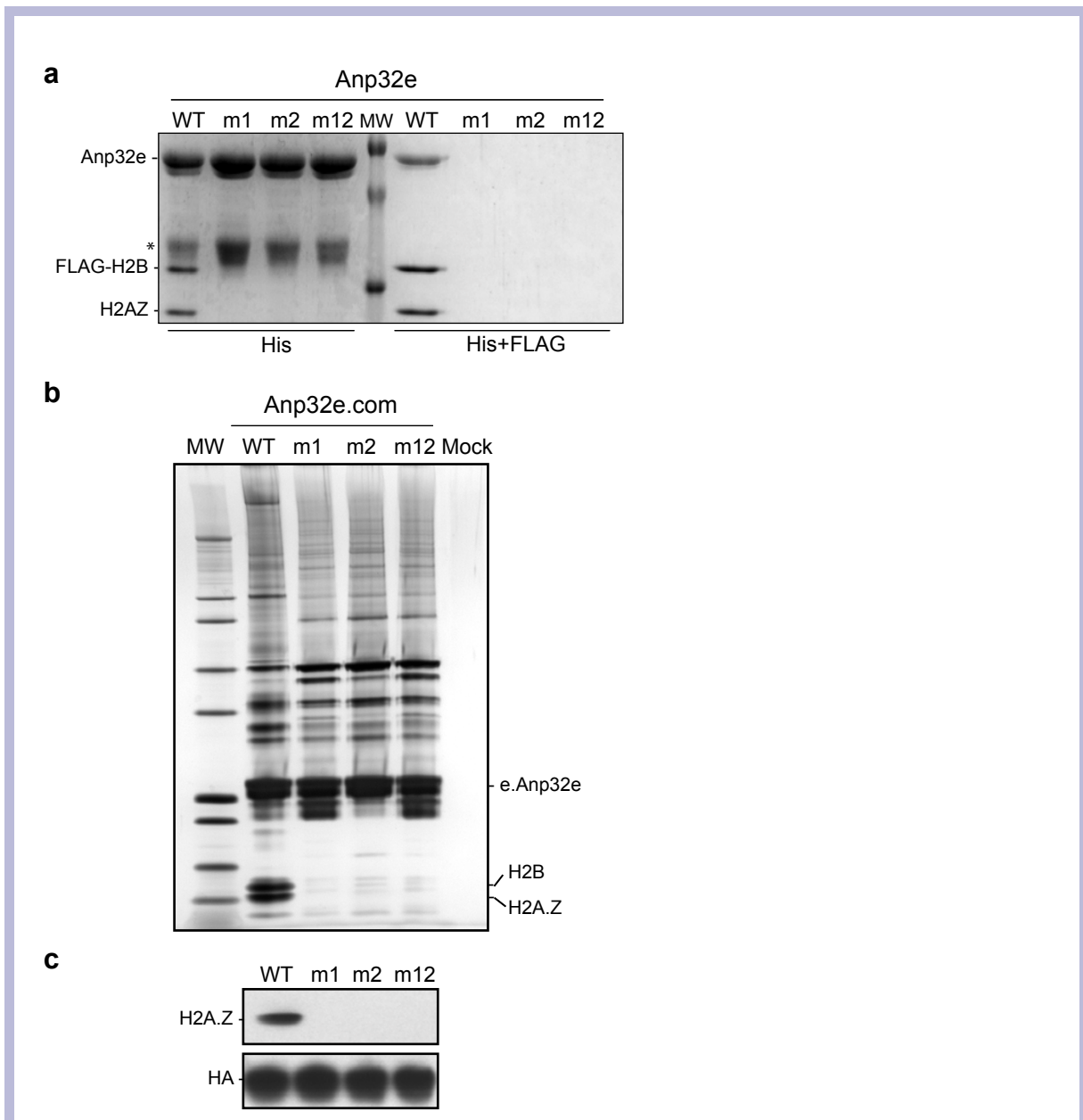
30 Kelly, T.K. et al., H2A.Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes. *Mol Cell* 39 (6), 901-911 (2010).



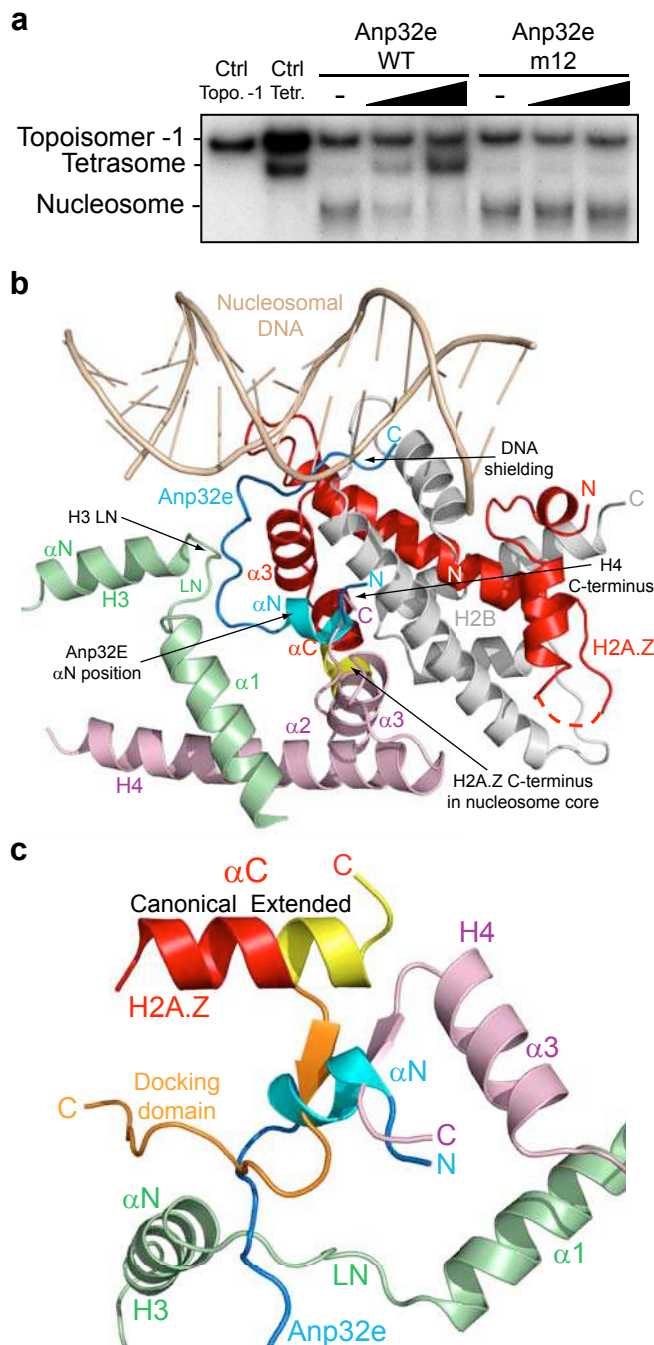
**Figure 1. Binding of human Anp32e to the H2A.Z/H2B dimer results in a two-fold extension of H2A.Z  $\alpha C$  helix.** **a**, Schematic presentation of the primary structure of Anp32e. The positions of the Leucine Rich Repeats (LRR) domain, the acidic C-terminal region and the Anp32e-ZID (blue) are indicated. **b**, Structure of the complex formed by the Anp32e-ZID (blue) in complex with the H2A.Z/H2B pair (colored red and gray, respectively). The part of H2A.Z  $\alpha C$  helix which is extended upon Anp32e binding is colored yellow. **c**, Superposition of the H2A.Z/H2B pairs from (i) the Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B complex (from panel a) and (ii) the H2A.Z nucleosome (from panel d). Anp32e binding induces a doubling of H2A.Z helix  $\alpha C$  (cassette M6) canonical length that, in turn, results in a strong conformational change of the C-terminal part of the H2A.Z docking domain (cassette M7) that normally interacts extensively in the nucleosome with a H3/H4 pair<sup>22,23</sup>. **d**, Structure of the H2A.Z/H2B dimer (colored orange and dark gray, respectively) from the H2A.Z nucleosome. **e**, Alignment of human and *S. cerevisiae* H2A and H2A.Z. The position of H2A.Z docking domain as well as cassettes M6 and M7, essential *in vivo*<sup>4</sup>, are indicated. Residues participating in the H2A.Z specific recognition and helix  $\alpha C$  extension are indicated with a yellow diamond and blue circles, respectively.



**Figure 2. Human Anp32e discriminates between H2A.Z and H2A through a single amino acid insertion in H2A.** **a**, Hydrophobic and hydrogen bond interactions made by residues from Anp32e-ZID (blue)  $\alpha$ N helix (L218, L221, and M222), H2A.Z (red)  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ C helices, and H2B (gray)  $\alpha$ 2 helix. These interactions enable stabilization of the extended conformation of H2A.Z  $\alpha$ C helix (yellow). The presence of an additional glycine in H2A M6 cassette prevents this full network of interactions to be formed. **b**, Sequence alignment of the Anp32e-ZID. Residues forming major contacts with the H2A.Z/H2B pair are indicated with yellow up- (as in panel a) and down- (as in panel c) triangles. **c**, Hydrophobic and hydrogen bond interactions made by residues from Anp32e-ZID (blue) C-terminus (D232, D234, and Y235), H2A.Z (red) loop L2, and H2B (gray)  $\alpha$ 1-loop L1- $\alpha$ 2 region.



**Figure 3. Mutations in full-length Anp32e abolish the interaction of Anp32e with the H2A.Z/H2B pair.** **a**, Coexpression of full-length Anp32e, either wild-type or mutant (m1, L218A/L221A/M222A; m2, D232A/D234A/Y235A; m12, L218A/L221A/M222A/D232A/D234A/Y235A), with the H2A.Z/H2B pair. Mutants cannot bind H2A.Z/H2B. ‘\*’ indicates proteolytic fragments of Anp32e. **b**, Purification from HeLa cells of Anp32e complexes, either wild-type or mutant. Mutant complexes do not incorporate H2A.Z/H2B. **c**, Western-blotting of the complexes with anti-H2A.Z and anti-HA antibodies. All mutant complexes are completely devoid of H2A.Z.



**Figure 4. Mutations in full-length Anp32e impede the removal of H2A.Z from the nucleosome.** *a*, Nucleosomal H2A.Z/H2B eviction experiments (also see accompanying paper). In contrast to wildtype Anp32e, the m12 mutant cannot evict H2A.Z/H2B from nucleosomes. *b*, Model of the Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B complex replacing a H2A.Z/H2B pair in the H2A.Z nucleosome. Arrows indicate zones of steric clashes, suggesting a mechanism for H2A.Z/H2B nucleosomal eviction by Anp32e. *c*, Closeup on steric clashes with H3, H4 and the canonical H2A.Z docking domain that would be caused by Anp32e-ZID N-terminus positioning. The nucleosomal docking domain, that forms a small  $\beta$ -sheet with H4 C-terminus, is shown in orange. The extended part of H2A.Z  $\alpha$ C helix is shown in yellow.



## SUPPLEMENTARY METHODS & DATAS

### Complexes preparation

The various constructs used were amplified by standard PCR procedures, and inserted using NdeI and BamHI restriction sites in the pET-MCN multi-expression vectors<sup>31</sup> pnEA-tH (Anp32e constructs), which codes for an N-terminal His-tag followed by a thrombin cleavage site, and pnCS (H2A.Z and H2B constructs), which codes for either no or an N-terminal FLAG-tag. For the H2A/H2B or H2A.Z/H2B pairs, further concatenation of the pnCS vectors was carried out to obtain a single vector co-expressing both partners, as already described<sup>31</sup>. Co-expression of all complex subunits was made by co-transforming *Escherichia coli* BL21[DE3] cells (Novagen) with pnEA-tH and pnCS vectors, as well as the pRare2 vector (Novagen). Cells were grown in 2xLB at 37°C to an absorbance of 0.3 at 600 nm and the temperature was then switched to 25°C. Growth was then carried on until cells reached an absorbance of 0.8-1.0 at 600 nm. Expression was induced by adding a final concentration of 1 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (Euromedex) and cells were further grown overnight at 25°C. Cells were collected by low speed centrifugation, resuspended in buffer A (10 mM Tris pH 8.0; 200 mM NaCl) and lysed by sonication. The soluble fraction recovered by high-speed centrifugation was mixed with Talon resin (Clontech). After 1 hour incubation, the supernatant was removed and the resin washed extensively with buffer A. The complex was then eluted from the resin by cleavage of the His-tag using bovine thrombin (MP Biomedicals) overnight at 4°C. For analytical purifications, a second step of affinity purification was carried out against the FLAG-tagged H2B subunit using the ANTI-FLAG M2 Affinity Gel purified immunoglobulin beads (Sigma). For the large scale cultures, the supernatant was recovered and applied onto a gel filtration column Hiload 16/60 Superdex 75 (Amersham Pharmacia) equilibrated with buffer A and 2 mM DTT (Euromedex). The purified proteins were concentrated on Microsep 10K Omega (Pall Filtron) to a final concentration of around 10 mg/ml as assayed with Bio-Rad protein assay (Bio-Rad). Wild-type and mutant full-length Anp32e were sensitive to non-specific proteolytic degradation that occurred during purification at the boundary between the LRR domain and the acidic region, explaining the degradation product observed in Fig. 3.

## Crystallization and data collection

Crystals of the complex formed by human Anp32e (residues 215-240), H2A.Z (residues 18-127), and H2B (residues 30-125) were obtained within a couple of days by vapor diffusion by mixing equal amounts of complex and reservoir solution containing 0.1 M Na Cacodylate pH 7.0, 0.2 M Na Formate and 24% to 30% PEG 3350 (all reagents from Fluka). Prior to data collection, crystals were transferred to a solution of reservoir supplemented with 20% PEG 200 and quickly frozen in liquid nitrogen. Crystallographic data at 1.48 Å resolution were collected at 110K on beamline PROXIMA1 at the SOLEIL synchrotron (Supplementary Table 1).

## Structure determination, model building and refinement

All data were processed and scaled with HKL2000<sup>32</sup>. Structure determination was carried out by molecular replacement with MOLREP<sup>33</sup> using as search model a H2A.Z/H2B dimer, without N-terminal tails, obtained from the H2A.Z nucleosome structure (PDB code 1F66). Model building and refinement were carried out with COOT, PHENIX and BUSTER<sup>34-36</sup>. The final model includes residues 215-237 of Anp32e, 18-107 of H2A.Z, 34-125 of H2B, and 212 waters, with R-factor and R-free of 16.8% and 19.5%, respectively, and good deviations from ideal geometry (Supplementary Table 1). Most of the residues of the three constructs are seen in density with the exception of a few N- and C-terminal residues, as well as residues forming loop L1 in H2A.Z. A major exception concerns H2A.Z C-terminal residues 108-127 which are not seen in density. The coordinates of the complex have been deposited within the PDB databank under the PDB code XXX. Figures have been made using ALINE<sup>37</sup> and PYMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

## In vivo complex purifications

All *in vivo* complexes were purified as described elsewhere (see accompanying paper).

## In vitro eviction experiments

All *in vitro* eviction experiments were carried out as described elsewhere (see accompanying paper).

---

## REFERENCES

- 31 Diebold, M.L., Fribourg, S., Koch, M., Metzger, T., & Romier, C., Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer. *J Struct Biol* 175 (2), 178-188 (2011).
- 32 Otwinowski, Z. & Minor, W., Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. in *Methods in Enzymology*, edited by Jr. Carter, C.W. & R.M. Sweet (Academic Press, New-York, 1997), Vol. 276, pp. 307-326.
- 33 Vagin, A. & Teplyakov, A., Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 1), 22-25 (2010).
- 34 Adams, P.D. et al., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 2), 213-221 (2010).
- 35 Blanc, E. et al., Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (Pt 12 Pt 1), 2210-2221 (2004).
- 36 Emsley, P. & Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (Pt 12 Pt 1), 2126-2132 (2004).
- 37 Bond, C.S. & Schuttelkopf, A.W., ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65 (Pt 5), 510-512 (2009).

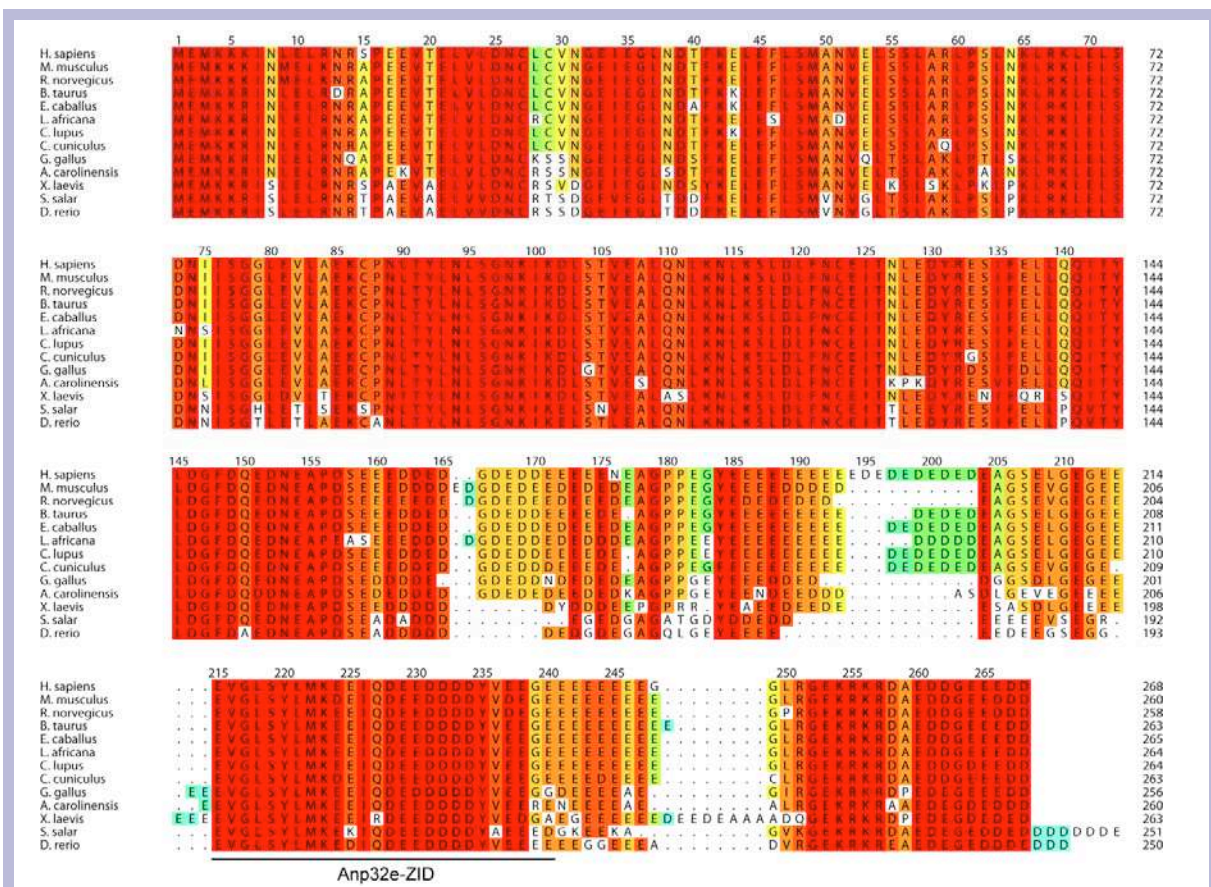
Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B native	
<b>Data collection</b>	
Space group	P2 <sub>1</sub>
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	31.82, 66.08, 45.29
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 95.76, 90.00
Resolution (Å)	99.0-1.48 (1.53-1.48)*
<i>R</i> <sub>sym</sub> or <i>R</i> <sub>merge</sub>	0.038 (0.192)
<i>I</i> / $\sigma I$	34.12 (5.36)
Completeness (%)	98.8 (97.8)
Redundancy	3.6 (3.4)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	37-1.48
No. reflections	30793
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.168/0.195
No. atoms	
Protein	1617
Water	212
<i>B</i> -factors	
Protein	21.92
Water	34.97
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.01
Bond angles (°)	1.00

\* Values in parentheses are for highest-resolution shell.

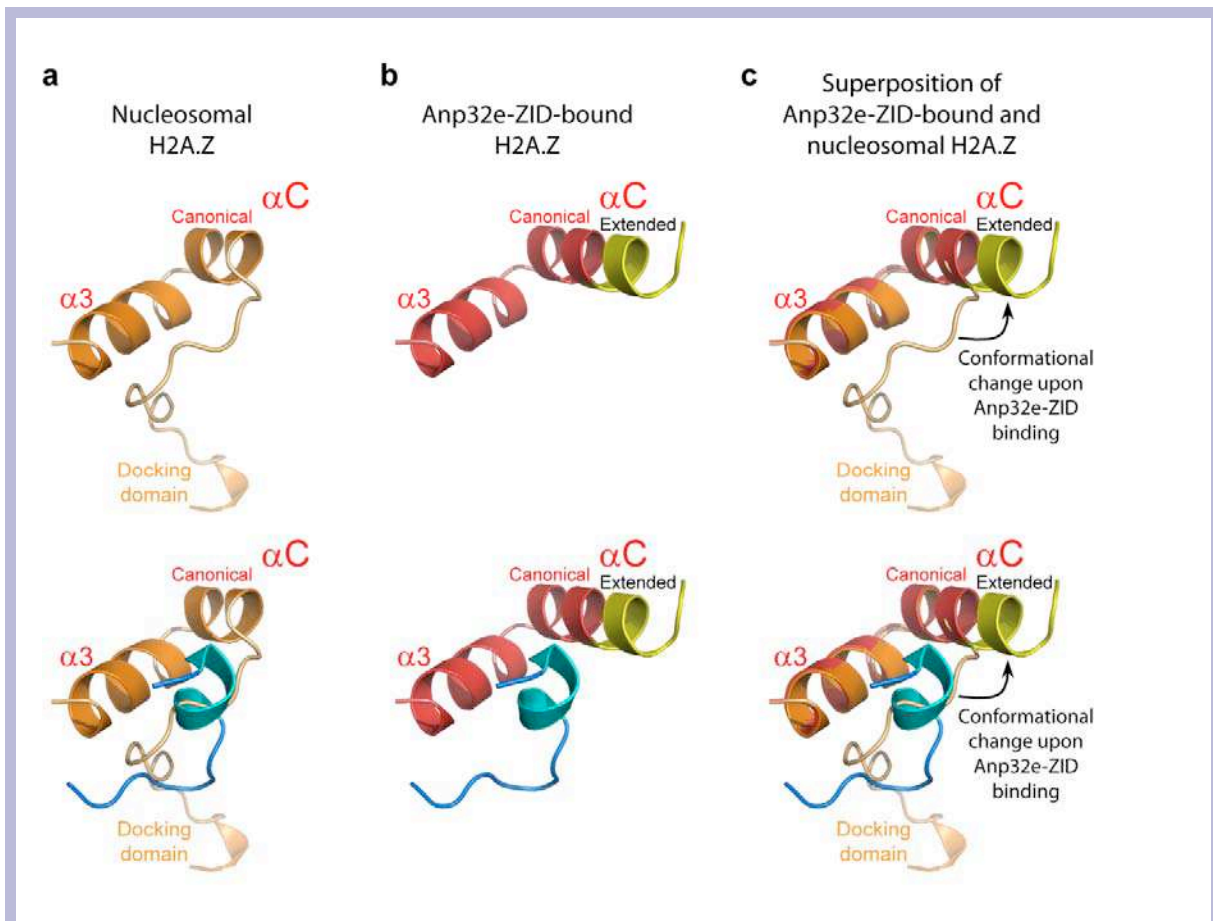
**Supplementary Table 1. Data collection and refinement statistics**



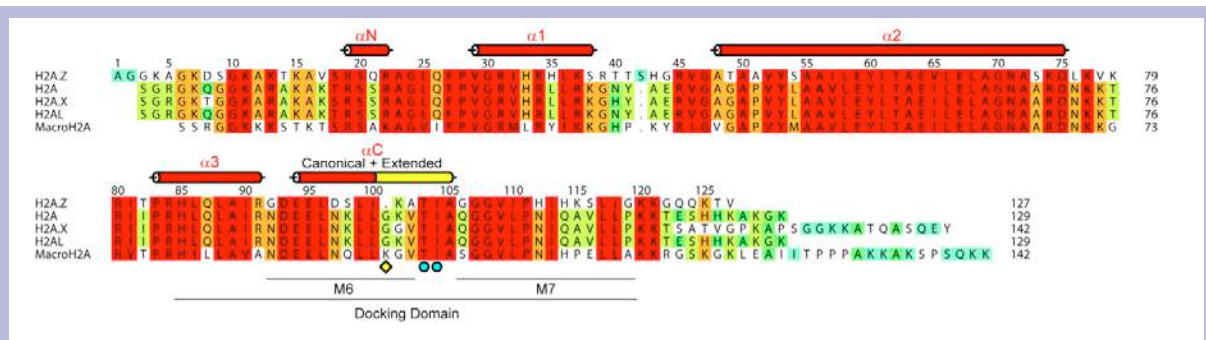
**Supplementary Figure 1. Anp32e ZID spans an Anp32e-specific region.** Multiple alignment of the human members of the ANP32 protein family. Anp32d, which is much shorter and ends around residue 130, has been omitted for clarity. The alignment clearly shows a specific insertion present in Anp32e. The An32e ZID (H2A.Z Interacting Domain), which interacts specifically with H2A.Z, spans most of this specific region. The Anp32e-ZID C-terminal region is also poorly conserved among the ANP32 family members. The numbering above the sequences corresponds to Anp32e. Sequence conservation is shown by shading from red (high) to green/blue (low).



**Supplementary Figure 2. Anp32e-ZID is highly conserved. Multiple alignment of Anp32e from various organisms.** Sequences were retrieved by PSI-Blast search using human Anp32e as search sequence. Only vertebrate sequences could be identified, indicating that Anp32e is a vertebrate specific H2A.Z histone chaperone. The Anp32e-ZID is strongly conserved in all these organisms and is flanked by acidic regions of lower conservation. The numbering above the sequences corresponds to human Anp32e. Sequence conservation is shown by shading from red (high) to green/blue (low).

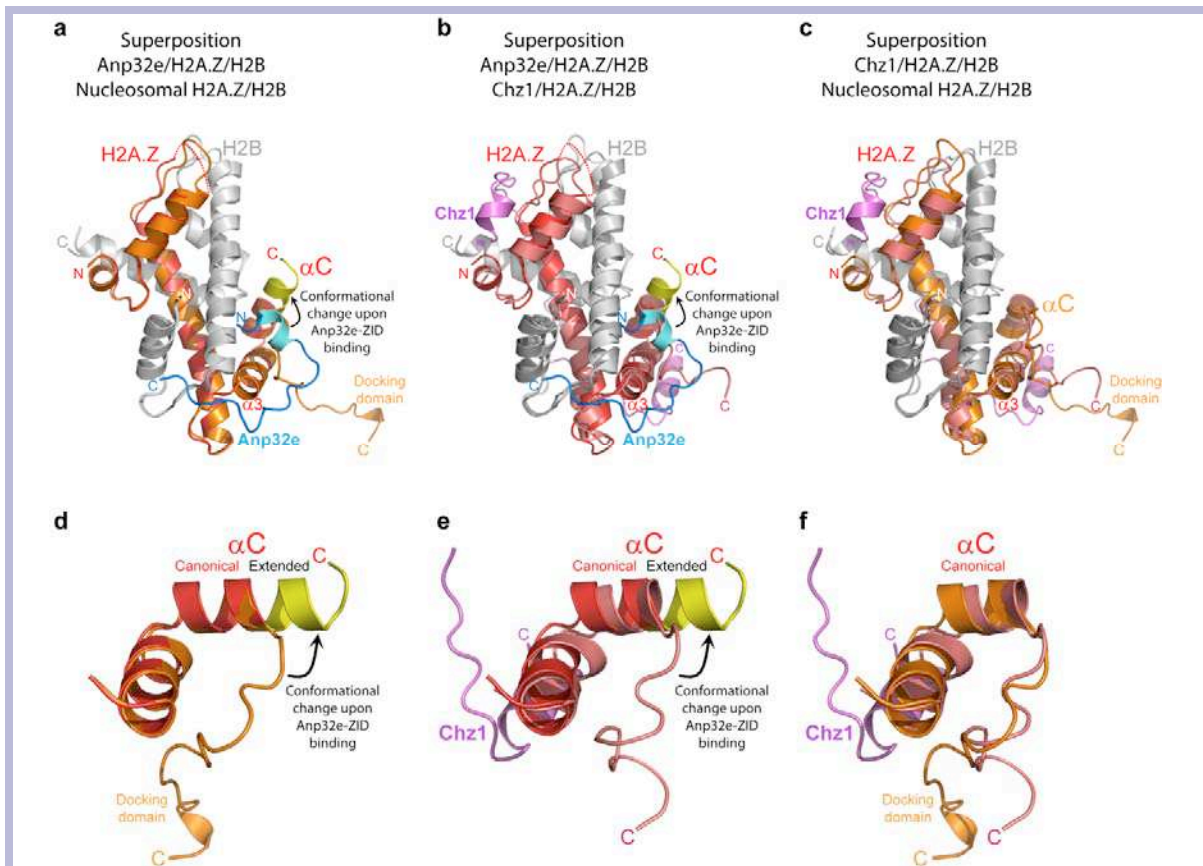


**Supplementary Figure 3. H2A.Z  $\alpha$ C helix undergoes a large conformational change upon Anp32e-ZID binding.** The conformation of the  $\alpha$ 3- $\alpha$ C region of H2A.Z is shown in the H2A.Z nucleosome (panel a), the Anp32e/H2A.Z/H2B complex (panel b), and as a superposition of views from panels a and b (panel c). The upper views show only H2A.Z  $\alpha$ 3- $\alpha$ C region, clearly highlighting the conformational change occurring upon Anp32e-ZID binding: the extension of H2A.Z  $\alpha$ C helix (extension is shown in yellow). The lower views are the same as the upper views, but the Anp32e-ZID  $\alpha$ N helix and the following residues are shown in addition, clearly showing that Anp32e-ZID occupies a position previously occupied by the H2A.Z C-terminal part of the docking domain (cassette M7). Thus Anp32e-ZID can strongly destabilize the canonical conformation of this docking domain that makes intensive interactions with the H3/H4 pair in a nucleosomal context.

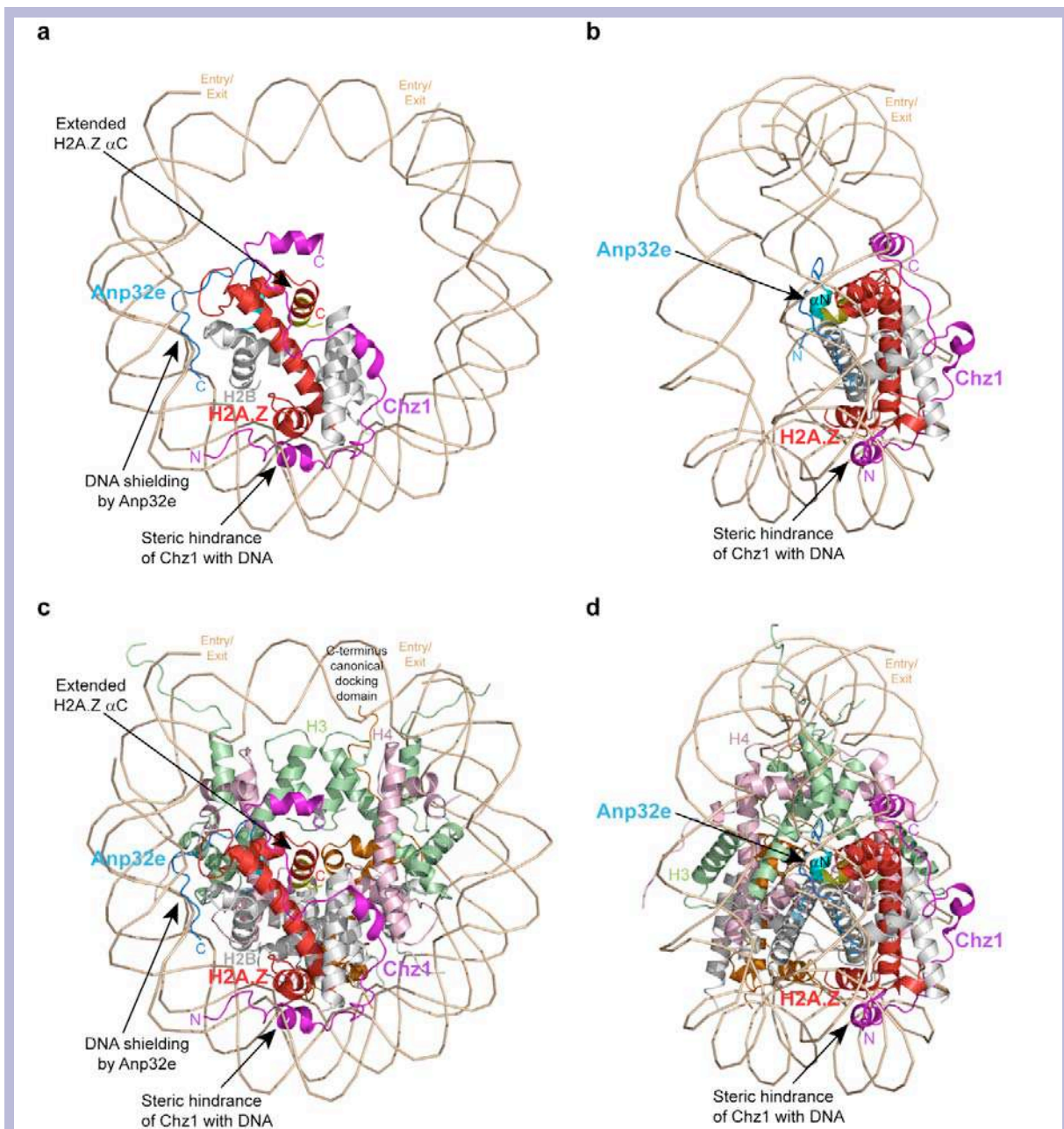


**Supplementary Figure 4. Other human H2A histone variants have an additional residue in their M6 cassette compared to H2A.Z.** Multiple alignment of human canonical and variant H2A histones. All these histones have an additional residue in their M6 cassette compared to H2A.Z (labeled with a yellow diamond). This should enable Anp32e to discriminate H2A.Z from all other H2A histones. For clarity, the C-terminal sequence of MacroH2A is not shown. Of note, the histone variant H2A.Bbd, which has a completely divergent sequence at the level of the docking domain, is not shown. Consequently, this analysis cannot apply to H2A.Bbd. The numbering above the sequences corresponds to human H2A.Z. Sequence conservation is shown by shading from red (high) to green/blue (low).





**Supplementary Figure 5. Yeast Chz1 does not induce large conformational changes upon H2A.Z/H2B binding.** Pairwise superposition of the nucleosomal H2A.Z pair, the human Anp32e-ZID H2A.Z/H2B complex, and the yeast Chz1/H2A.Z(Htz1)/H2B complex. Complexes superposed are indicated above the structures. *a,b,c*, View of the full length proteins. *d,e,f*, Close-up view of the H2A.Z  $\alpha 3$ - $\alpha C$  region. The position of the C-terminal part of Chz1 is shown in panels *b, c, e* and *f*, showing that it does not interact extensively with H2A.Z  $\alpha C$  helix. In strong contrast to human Anp32e (blue), yeast Chz1 (purple) does not induce large conformational changes in H2A.Z and H2B upon binding (compare panels *b,e* and *c,f*). Notably, the H2A.Z docking domain conformation is similar to the one observed in the nucleosome (panels *c* and *f*). This indicates that this conformation of the docking domain is preferred in solution since Chz1 does not interact with the C-terminal end of the  $\alpha C$  helix and the M7 cassette. This is in agreement with its proposed deposition mechanism, where a “preformed” H2A.Z/H2B pair could be brought to the nucleosome by Chz1. In contrast, Anp32e creates large conformational changes which are in agreement with its H2A.Z/H2B nucleosomal removal activity.



**Supplementary Figure 6. Anp32e and Chz1 approach the nucleosome differently.** Superposition of the human Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B and the yeast Chz1/H2A.Z/H2B complexes onto a H2A.Z/H2B pair from the H2A.Z nucleosome. The nucleosomal H2A.Z/H2B pair that served for superposition was replaced by the H2A.Z/H2B pair (colored red) of the Anp32e-ZID/H2A.Z/H2B complex, whereas the second nucleosomal pair was not replaced (colored orange in panels c and d). Anp32e (blue) and Chz1 (purple) are shown after superposition. Panels a and b only show the superposed complexes and the nucleosomal DNA. Panels c and d provide the same information in the context of the full histone octamer. Structures in the panels b and d were generated from the structures in panels a and c upon a 70° rotation. The same coloring is used as in Figure 4b. Anp32e and Chz1 are diametrically opposed, the former being at the center of the nucleosome, whereas the latter is at the surface of the nucleosome. This is in agreement with the removal and deposition roles of Anp32e and Chz1, respectively. Yet, Chz1 creates steric hindrance with its N-terminal part. Such a steric hindrance could most likely be accommodated if the H2A/H2B pair to be replaced has already been removed and the DNA at the position of the steric hindrance is loosely or not bound anymore to the histone octamer. Alternatively, or in addition, remodeling by the Swr1 complex should facilitate this accommodation and H2A.Z/H2B deposition.



**DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES**

---

# DISCUSSION & PERSPECTIVES

---

Mon travail de thèse se place dans une démarche contributive à la compréhension des processus moléculaires impliqués dans la dynamique de la variante d'histone H2AZ. Pour assurer le contrôle de l'information génétique, la cellule eucaryote a développé différents moyens de régulation de l'expression des gènes. Un de ces mécanismes utilise les variantes d'histones, des isoformes non alléliques des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4, qui sont présentes chez tous les organismes eucaryotes.

Lors de ma thèse, je me suis focalisé sur H2AZ, une variante d'histone de la famille H2A. Alors que l'histone H2AZ est très conservée au cours de l'évolution de la levure à l'homme avec environ 90 % d'identité, celle-ci ne possède que 60 % d'identité avec l'histone H2A (Zlatanova and Thakar, 2008). Ces changements créent une structure unique de la chromatine aux endroits où H2AZ est déposée. En effet, H2AZ contient au niveau de sa partie C-terminale un domaine d'ancrage alternatif et un « patch » acide beaucoup plus grand que celui de H2A (Zlatanova and Thakar, 2008). H2AZ joue un rôle dans de multiples processus biologiques comme la transcription (Santisteban et al., 2000a), le développement (Faast et al., 2001), la réparation de l'ADN (Kalocsay et al., 2009), la ségrégation des chromosomes (Rangasamy et al., 2003) et la progression dans le cycle cellulaire (Dhillon et al., 2005).

## I. ANP32E, UNE CHAPERONNE D'HISTONE SPÉCIALISÉE DANS L'ÉVICTION DE H2AZ.

Les chaperonnes d'histones sont nécessaires pour fournir les histones sur le lieu de leur déposition et participent ainsi à leur déposition ou à leur éviction de la chromatine. Le mécanisme d'incorporation de H2AZ dans la chromatine est assez bien décrit. En effet, il est aujourd'hui admis que la majorité de l'incorporation de H2AZ dans la chromatine est assurée par le complexe protéique SWR1 (chez la levure) ou SRCAP (chez les vertébrés), qui a la capacité d'échanger au sein d'un nucléosome un dimère H2A-H2B par un dimère H2AZ-H2B (Morrison and Shen, 2009). À l'inverse, le processus par lequel un dimère de H2AZ-H2B est évincé d'un

nucléosome reste inconnu. Dans le but d'éclaircir ce processus, nous avons entrepris, via une approche protéomique, d'identifier les protéines spécifiquement associées à H2AZ chez l'homme. Nous avons ainsi montré que la protéine Anp32e lie spécifiquement la variante d'histone H2AZ et que Anp32e est capable d'enlever un dimère H2AZ-H2B d'un nucléosome. Ces caractéristiques biochimiques la définissent clairement comme une chaperonne de la variante d'histone H2AZ.

Anp32e appartient à la famille des protéines Anp32. Ces protéines partagent deux domaines conservés : le domaine LRR situé à l'extrémité N-terminale, et une queue acide à l'extrémité C-terminale (Matilla and Radrizzani, 2005). Alors que Anp32e a été initialement identifiée comme impliquée dans le développement cérébral et la synaptogénèse en modulant l'activité de la protéine phosphatase 2A (Costanzo et al., 2006), Anp32b, a été caractérisée comme une chaperonne d'histone du dimère H3-H4 (Tochio et al., 2010).

## II. LA PROTÉINE ANP32E ET LE COMPLEXE P400/TIP60 SONT ASSOCIÉS À L'ENLÈVEMENT DE H2AZ DE LA CHROMATINE.

La caractérisation du complexe H2AZ humain nous a permis de confirmer, en accord avec la littérature, que H2AZ interagit avec le complexe SRCAP et le complexe p400/TIP60 (Choi et al., 2009). Des études récentes, chez les vertébrés et chez la drosophile, ont montré que ces deux complexes sont homologues au complexe SWR1 chez la levure au niveau de l'activité d'échange de H2A-H2B par H2AZ-H2B au sein d'un nucléosome (Kusch et al., 2004; Ruhl et al., 2006; Gévry et al., 2007; Wong et al., 2007).

Chez les eucaryotes supérieurs, la protéine à activité ATPase p400 est retrouvée associée avec la protéine à activité acétyltransférase TIP60, créant ainsi un complexe hybride contenant les complexes de levure SWR1 et NuA4. Notre étude démontre que Anp32e fait partie du complexe p400/TIP60 et qu'ils agissent ensemble pour enlever H2AZ-H2B de la chromatine. Cependant, nous ne savons pas comment Anp32e est incorporée dans le complexe p400/TIP60, ni quelle est la fonction exacte des différentes sous-unités du complexe dans le mécanisme d'éviction de H2AZ-H2B. Deux hypothèses sont possibles :

- Dans un premier cas, Anp32e est recrutée en même temps que p400/TIP60 au niveau d'un nucléosome contenant H2AZ pour réaliser l'éviction du dimère H2AZ-H2B. Dans ce contexte, Anp32e et p400/TIP60 agissent de façon coordonnée, Anp32e apportant la spécificité et p400/Tip60 fournissant l'énergie nécessaire à la réaction.

- Dans un deuxième cas, le complexe p400/TIP60 est déjà présent sur la chromatine et le recrutement d'Anp32e entraîne l'éviction de H2AZ-H2B.

### III. LES COMPLEXES SRCAP ET P400/TIP60 ONT DEUX RÔLES ANTAGONISTES SUR LA DYNAMIQUE DE H2AZ.

L'incorporation de H2AZ au sein de la chromatine est assurée par le complexe protéique SWR1 (chez la levure) ou SRCAP (chez les vertébrés), au sein de ce processus, plusieurs protéines ont été décrites pour interagir physiquement avec H2AZ-H2B *in vivo*.

Nap1, une chaperonne de H2A, peut fixer un dimère H2AZ-H2B libre pour l'importer du cytoplasme vers le noyau et l'incorporer au complexe de déposition SWR1 (Mizuguchi et al., 2004; Luk et al., 2007; Straube et al., 2010). Mais Nap1 ne présentant pas d'interaction spécifique avec l'histone H2AZ, elle agit probablement plus dans l'import des histones de l'ensemble de la famille H2A vers le noyau.

Par ailleurs, Chz1 a été montrée comme une chaperonne spécifique de l'histone H2AZ de levure. Elle est probablement responsable de l'incorporation de H2AZ dans le complexe SWR1 et dans sa déposition sur la chromatine (Luk et al., 2007). Aussi, au début de ce travail, nous nous sommes focalisés sur la protéine HIRIP3, l'homologue humain de Chz1 (De Koning et al., 2007; Luk et al., 2007), mais nous n'avons jamais pu détecter cette protéine comme partenaire de l'histone H2AZ *in vivo*. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que HIRIP3 lie avec la même affinité l'histone canonique H2A et la variante d'histone H2AZ (A.O et A.H, travaux non publiés). L'ensemble de ces données suggère qu'il n'y a pas eu de conservation de la fonction de Chz1 de la levure à l'homme.

Enfin, le complexe FACT, composé des protéines SSRP1 et Sp16, a été impliqué dans l'incorporation et l'enlèvement de H2A-H2B de la chromatine. Il a été proposé que FACT assure également cette fonction pour H2AZ chez la levure. En effet, en l'absence de Nap1 et Chz1, FACT est capable d'escorter H2AZ au complexe SWR1 (Luk et al., 2007; Mahapatra et al., 2011). Mais, bien que SSRP1 et Spt16 aient été clairement identifiées comme partenaires de l'histone H2A, nous n'avons jamais pu visualiser le complexe FACT au sein du complexe H2AZ.

Notre étude n'a pas encore permis de mettre en évidence une chaperonne d'histone impliquée dans la déposition spécifique de H2AZ-H2B au sein de la chromatine chez l'homme. Selon les données actuelles, il paraît très probable que cette protéine soit une sous-unité du complexe SRCAP. Plusieurs candidats sont possibles et nos travaux en cours permettront

certainement d'identifier cette chaperonne. Les candidats potentiels seront exprimés dans le système baculovirus et testés pour leur capacité à directement interagir avec H2AZ puis pour leur capacité à déposer le dimère H2AZ-H2B sur un tétrasome (H3-H4)<sub>2</sub> assemblé *in vitro*.

#### IV. H2AZ ET SON RÔLE POSITIF ET NÉGATIF SUR LA TRANSCRIPTION.

Plusieurs expériences d'immunoprécipitations de chromatine sur l'ensemble du génome ont permis de dresser une cartographie de la localisation de H2AZ. Chez la levure, H2AZ est distribuée sur les promoteurs cibles de l'ARN polymérase II. H2AZ se situe au niveau des gènes actifs et inactifs, et plus particulièrement sur les nucléosomes -1 et +1 par rapport au site d'initiation de la transcription (Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005). La même distribution a été observée chez les eucaryotes supérieurs, mais seulement sur les gènes actifs (Schones et al., 2008; Whittle et al., 2008; Hardy et al., 2009; Jin et al., 2009; Rando and Chang, 2009). Actuellement, il est proposé que la déposition de H2AZ sur les promoteurs définit une chromatine dite transcriptionnellement permissive, la dépression de la transcription nécessitant une éviction des nucléosomes contenant H2AZ (Zhang et al., 2005).

Nos données *in vivo* montrent que la délétion de Anp32e empêche la dépression des gènes régulés par la vitamine D ou l'acide rétinoïque (cyp24a1 et stra6 respectivement). De plus, nos résultats d'immunoprécipitations de chromatine mettent en évidence une accumulation de H2AZ et une absence de recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur de cyp24a1 lorsque Anp32e est invalidée dans la cellule. Ces résultats sont en accord avec un rôle positif et négatif de H2AZ sur la transcription. Cependant, il reste encore à décrire le mécanisme par lequel la transcription est inhibée lorsque H2AZ est présent sur le promoteur. Pour cela, il serait intéressant de caractériser les protéines associées à H2AZ sur la chromatine.

#### V. UN NOUVEAU RÔLE POUR L'HÉLICE $\alpha$ C DE H2AZ

Une des différences majeures entre H2AZ et H2A réside dans le « patch » acide étendu qui est formé par l'hélice  $\alpha$ C de H2AZ. Des études génétiques chez la levure ont montré l'importance de cette région dans la déposition de cette variante d'histone. La conformation de cette région permet de créer une interface inédite par rapport à H2A, ce qui facilite le recrutement de facteurs spécifiques (Jensen et al., 2011; Wang et al., 2011). La délétion de cette hélice entraîne un défaut de développement chez la drosophile (Clarkson et al., 1999).

Notre étude biochimique a permis d'identifier le domaine ZID comme essentiel à

la reconnaissance de H2AZ par Anp32e. Ce domaine distingue spécifiquement la région comprenant l'hélice  $\alpha$ C de H2AZ. La résolution de la structure de Anp32e en interaction avec le dimère H2AZ-H2B à 1.48 Å nous a permis de décortiquer le mode d'interaction de Anp32e avec H2AZ et de proposer un modèle pour l'éviction du dimère H2AZ-H2B du nucléosome. Dans ce modèle, la chaperonne Anp32e reconnaît et interagit avec les boucles L2 de H2AZ et L1 de H2B entraînant une déstabilisation de l'interaction entre le dimère H2AZ-H2B et l'ADN. Le domaine ZID de Anp32e s'intercale entre le domaine d'ancrage de H2AZ et H3 ce qui rend l'hélice  $\alpha$ C accessible. L'interaction avec l'hélice  $\alpha$ N de ZID entraîne un changement de conformation de l'hélice  $\alpha$ C conduisant à plusieurs gênes stériques et empêchant toute interaction avec H3-H4. Tous ces changements conformationnels vont aboutir à la dissociation du dimère H2AZ-H2B du nucléosome.

Il est intéressant de comparer le mode d'interaction de Anp32e avec H2AZ à celui de Chz1, qui est une chaperonne de déposition de H2AZ chez la levure. La structure de Chz1 en interaction avec le dimère H2AZ-H2B ne montre pas de changement de conformation de l'hélice  $\alpha$ C mais seulement une modulation des interactions avec l'ADN (Zhou et al., 2008). On constate une très nette différence au niveau du mode d'interaction de ces deux chaperonnes avec H2AZ, ce qui est compatible avec des fonctions opposées.

## VI. ANP32E ET LES AUTRES FONCTIONS DE H2AZ.

Mon travail de thèse s'est principalement focalisé sur le rôle de H2AZ et de Anp32e dans la régulation de l'expression génique. Mais H2AZ est aussi impliquée dans d'autres processus.

### VI.1. La réparation de l'ADN.

Un rôle de H2AZ dans la réparation de l'ADN a été proposé très récemment chez la levure (Kalocsay et al., 2009). Ce nouveau concept s'ajoute à de nombreux travaux sur H2AX, une autre variante de H2A, qui ont mis en avant son rôle de senseur dans la réparation (Rossetto et al., 2010). Il a été démontré que H2AZ était déposé très rapidement sur le lieu d'une cassure double brin. Il y a là une grande différence avec H2AX qui est localisée aux alentours de la cassure pour recruter la machinerie de réparation de l'ADN (Rossetto et al., 2010). Il serait intéressant de vérifier si l'on retrouve H2AZ sur les sites de cassure double brin d'ADN chez les eucaryotes supérieurs. Nos données sont en accord avec cette hypothèse, puisque le fractionnement du complexe H2AZ sur un gradient de glycérol révèle un complexe contenant exclusivement H2AZ, Anp32e et plusieurs protéines de la réparation (DNA-PK, XRCC5, XRCC6, XRCC1, RAD23, XPC



et LIG3). Ces observations suggèrent que Anp32e, par sa fonction de chaperonne de H2AZ puissent être impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN.

## VI.2. L'intégrité du génome.

La maintenance de la stabilité et de l'intégrité du génome est essentielle pour la survie de la cellule. L'instabilité génomique est une marque de nombreux cancers chez l'homme (Negrini et al., 2010). L'expression et la localisation de H2AZ doivent être strictement contrôlées, car une surexpression de cette dernière corrèle avec une prolifération cellulaire anarchique (Rangasamy et al., 2004; Hua et al., 2008). Une étude récente chez la levure a montré que le complexe INO80 est capable d'enlever H2AZ de la chromatine (Papamichos-Chronakis et al., 2011). INO80 aurait pour fonction d'enlever le dimère H2AZ-H2B lorsqu'il est déposé à un mauvais endroit. En effet, des souches déficientes pour Swr1 ou Ino80 présentent une hypersensibilité à certaines drogues et une mauvaise localisation de H2AZ sur le génome (Morillo-Huesca et al., 2010; Papamichos-Chronakis et al., 2011). Ces données montrent l'importance de SWR1 et INO80 dans le contrôle de la localisation de H2AZ. Il serait pertinent de vérifier si un mécanisme similaire est présent chez les eucaryotes supérieurs. Notre approche protéomique n'a pas permis de lier le complexe INO80 à H2AZ chez les eucaryotes supérieurs. Dès lors, on peut se demander si les complexes SRCAP et de p400/TIP60 sont impliqués dans la maintenance de l'intégrité du génome en contrôlant la localisation génomique de H2AZ.

## VI.3. Le cancer du sein.

Les oestrogènes sont des hormones de la famille des stéroïdes connues pour jouer un rôle critique dans l'initiation et la progression du cancer du sein (Deroo and Korach, 2006). L'action des oestrogènes est assurée par les récepteurs aux oestrogènes ER- $\alpha$  et ER- $\beta$  qui ciblent au niveau de l'ADN les éléments de réponse ERE. Une étude récente a montré qu'une surexpression du gène TFF1, régulé par les oestrogènes, est associée au cancer du sein (Prest et al., 2002). Les auteurs ont montré que dans les cellules cancéreuses, l'expression de TFF1 est due à une localisation aberrante de H2AZ au niveau des éléments ERE du promoteur de TFF1. Cette mauvaise localisation de H2AZ entraîne un recrutement de FoxA1 en réponse aux oestrogènes qui induit l'activation transcriptionnelle. Ces données montrent qu'une surexpression de H2AZ peut être à l'origine de l'expression aberrante de certaines protéines et par conséquent dans la genèse du cancer de sein (Hua et al., 2008).

Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence que dans le cancer du sein, la dérégulation

---

de six gènes prédit l'apparition de métastase au niveau des poumons (Landemaine et al., 2008). De manière très intéressante, Anp32e fait partie de ce groupe de gènes et il a été montré que son expression était multipliée par 6 dans les cancers agressifs. Cette étude montre combien la machinerie de déposition et d'éviction de H2AZ peut avoir un rôle clé dans les mécanismes de cancérogenèse. H2AZ et Anp32e pourraient être ainsi des marqueurs oncogéniques voir des cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein.

## VII. CONCLUSION.

L'ensemble des données présentées dans cette thèse illustre le rôle essentiel des variantes d'histones dans des processus biologiques aussi variés que la régulation transcriptionnelle, la réparation des dommages de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire ou le maintien de l'intégrité du génome. L'identification des facteurs protéiques spécifiquement associés à H2AZ est une étape nécessaire à la compréhension de la dynamique spatio-temporelle de cette variante de H2A. Depuis quelques années des études génétiques associées à des approches biochimiques ont ainsi permis de décrire les bases moléculaires qui décrivent la déposition ou l'éviction de H2AZ de la chromatine. Pour autant, la description des mécanismes régissant la dynamique de l'ensemble des variantes d'histones dans le temps et dans l'espace reste élémentaire. Nous commençons seulement à comprendre le rôle fondamental des variantes d'histones dans la régulation génique, ce qui laisse à présager que les études futures dans ce domaine seraient fascinantes.



**LISTES**

---

# LISTES DES ABRÉVIATIONS

---

Å	Ångström
aa	acide aminé
ACF	ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Anp32	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asf1	Anti-silencing function protein 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BAF	BRG1-associated factors
BAP	Brahma-associated proteins
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog
CAC	Chromatin assembly complex
CAF-1	Chromatin assembly factor 1
CATD	CENP-A targeting Domain
CDC45	Cell division control protein 45
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CEMOVIS	Cryomicroscopie électronique en couche vitrifiée
CenpA	Centromere protein A
CHD	Chromodomain
ChIP	Chromatin Immunopurification
CHRAC	Chromatin-accessibility complex
CRC	Complexe de remodelage de la chromatine

---

Cryo-EM	Cryomicroscopie electronique
DAXX	Death domain-associated protein
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
ERE	Estrogen responsive element
FACT	Facilitates chromatin transcription complex
GNAT	Guanine nucleotide binding protein
HAT	Histone acetyltransferase
HAT1	Histone acetyltransferase 1
Hat1	Histone acetyltransferase 1
HDAC	Histone deacetylase
HFD	Histone fold domain
HJURP	Holliday junction recognition protein
HKMT	Histone lysine methyltransferase
HMT	Histone methyltransferase
HP1	Heterochromatin protein 1
IMP4	importin 4
INO80	Inositol requiring 80
loc	ISWI one complex
IpL1	Increase-in-ploidy protein 1
ISWI	Imitation switch
JMJD	Jumonji domain containing 6
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LRR	Leucine Rich Repeat
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1
LTR	Long terminal repeat
MBD	Methyl-CpG binding domain
MBD1	Methyl binding domain 1
MCM	Minichromosome maintenance complex
MECP2	Methyl CpG binding protein 2
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAP1	Nucleosome assembly protein 1
NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1

---

NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4
NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein
nm	nanomètre
NoRC	nucleolar remodeling complex
NPM	Nucleoplasmin/nucleophosmin
P53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
PARG	Poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
pb	paire de base
PBAF	Polybromo-associated BAF
PBAP	Polybromo-associated BAP
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PHD	plant homeodomain
PHF	PHD finger protein
PRC1L	Polycomb repressive complex 1-like
PRMT	Protein arginine methyltransferase
PRMT	Protein arginine methyltransferase
RbAp	Rb-associated protein
RBAP46	Retinoblastoma-binding protein p46
RING	Really interesting new gene
RING	Really Interesting New Gene
RNF	Ring finger protein
RSC	Remodels the structure of chromatin
RSF	Remodeling and spacing factor
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
Sir2	Sirtuin 2
SLBP	Stem-loop binding protein
SRCAP	SNF2-related CREB-activator protein
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
SV40	Simian virus 40
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable
TIFF	Trefoil family factor
Tip5	Transcription termination factor I-interacting protein 5

---

Tip60	Tat-interactive protein 60
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains
UV	Ultraviolet
WCRF	WSTF-related chromatin-remodeling factor
WICH	WSTF-ISWI chromatin remodeling complex
WSTF	Williams syndrome transcription factor
ZID	H2AZ Interacting Domain

---

# LISTE DES FIGURES

---

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

**Figure 2** : Structure des histones.

**Figure 3** : Structure d'ordre supérieur de la chromatine.

**Figure 4** : Les différents modèles de structure de la fibre de 30 nm.

**Figure 5** : L'hétérochromatine et l'euchromatine.

**Figure 6** : Les modifications covalentes des histones.

**Figure 7** : L'acétylation des lysines des histones.

**Figure 8** : La méthylation des lysines et des arginines des histones.

**Figure 9** : Les sites de modifications des méthyltransférases.

**Figure 10** : Déimination des résidus arginines des histones.

**Figure 11** : Relation entre les modifications covalentes des histones.

**Figure 12** : Mode d'action des complexes de remodelages de la chromatine.

**Figure 13** : Les familles de complexes de remodelages de la chromatine.

**Figure 14** : Structure des principales variantes d'histones.

**Figure 15** : Alignement des séquences en acides aminés de H2A et H2AZ.

**Figure 16** : Comparaison des nucléosomes contenant H2A ou H2AZ.

**Figure 17** : Le désassemblage de la chromatine durant la réplication.

**Figure 18** : Ségrégation des histones lors de l'assemblage de la chromatine pendant la réplication.

**Figure 19** : Modèle de réplication couplé à l'assemblage de la chromatine.



---

# LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1:** Les principales enzymes HAT.

**Tableau 2:** Les principales enzymes HDAC.

**Tableau 3:** Composition des CRC de la famille SWI/SNF.

**Tableau 4:** Composition des CRC de la famille ISWI.

**Tableau 5:** Composition des CRC de la famille Mi-2/NuRD.

**Tableau 6:** Composition des CRC de la famille INO80.



# **BIBLIOGRAPHIE**

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

Abbott, D.W. (2001). Characterization of the Stability and Folding of H2A.Z Chromatin Particles. IMPLICATIONS FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry* 276, 41945–41949.

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6270–6279.

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

Ai, X., and Parthun, M.R. (2004). The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell* 14, 195–205.

Aihara, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Suzuki, M., Takahashi, E., Monden, M., and Nakamura, Y. (1998). Cloning and mapping of SMARCA5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of *Drosophila* ISWI. *Cytogenet. Cell Genet.* 81, 191–193.

Alabert, C., and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 153–167.

Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Côté, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *Embo J* 18, 5108–5119.

Allfrey, V.G., FAULKNER, R., and MIRSKY, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 51, 786–794.

Allis, C.D. (2007). *Epigenetics* (CSHL Press).

Allis, C.D., and Wiggins, J.C. (1984). Proteolytic processing of micronuclear H3 and histone phosphorylation during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.* 153, 287–298.

---

Allis, C.D., Bowen, J.K., Abraham, G.N., Glover, C.V., and Gorovsky, M.A. (1980). Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei. *Cell* 20, 55–64.

Alvarez, F., Muñoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G., and Loyola, A. (2011). Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry* 286, 17714–17721.

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

Annunziato, A.T. (2012). Assembling chromatin: The long and winding road. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 196–210.

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

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, 269–275.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801–806.

Bao, Y., and Shen, X. (2007). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat. Res.* 618, 18–29.

Barak, O., Lazzaro, M.A., Lane, W.S., Speicher, D.W., Picketts, D.J., and Shiekhattar, R. (2003). Isolation of human NURF: a regulator of *Engrailed* gene expression. *Embo J* 22, 6089–6100.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143, 470–484.

Bassett, A., Cooper, S., Wu, C., and Travers, A. (2009). The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 159–165.

Becker, P.B., and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev.*

Biochem. 71, 247–273.

Becker, P.B., Tsukiyama, T., and Wu, C. (1994). Chromatin assembly extracts from *Drosophila* embryos. *Methods Cell Biol.* 44, 207–223.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1–13.

Benson, L.J. (2005). Modifications of H3 and H4 during Chromatin Replication, Nucleosome Assembly, and Histone Exchange. *Journal of Biological Chemistry* 281, 9287–9296.

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

Bernstein, B.E., Tong, J.K., and Schreiber, S.L. (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 97, 13708–13713.

Bestor, T.H. (1992). Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *Embo J* 11, 2611–2617.

Birchler, J.A., Bhadra, M.P., and Bhadra, U. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 211–216.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6–21.

Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213.

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

Black, B.E., Jansen, L.E.T., Maddox, P.S., Foltz, D.R., Desai, A.B., Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2007). Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain. *Mol. Cell* 25, 309–322.

Bochar, D.A., Savard, J., Wang, W., Lafleur, D.W., Moore, P., Côté, J., and Shiekhattar, R. (2000). A family of chromatin remodeling factors related to Williams syndrome transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 97, 1038–1043.

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, 1991–2006.

Bonner, W.M. (1975). Protein migration into nuclei. II. Frog oocyte nuclei accumulate a class of microinjected oocyte nuclear proteins and exclude a class of microinjected oocyte cytoplasmic proteins. *J. Cell Biol.* 64, 431–437.

Bozhenok, L., Wade, P.A., and Varga-Weisz, P. (2002). WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *Embo J* 21, 2231–2241.

Brasacchio, D., Okabe, J., Tikellis, C., Balcerczyk, A., George, P., Baker, E.K., Calkin, A.C., Brownlee, M., Cooper, M.E., and El-Osta, A. (2009). Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes* 58, 1229–1236.

Breeden, L., and Nasmyth, K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators. *Cell* 48, 389–397.

Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G., et al. (2000). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* 6, 1287–1295.

Buschbeck, M., Uribealago, 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.

Cai, Y. (2003). Identification of New Subunits of the Multiprotein Mammalian TRRAP/TIP60-containing Histone Acetyltransferase Complex. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42733–42736.

Cai, Y., Jin, J., Gottschalk, A.J., Yao, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2006). Purification and assay of the human INO80 and SRCAP chromatin remodeling complexes. *Methods* 40, 312–317.

Cairns, B.R., Kim, Y.J., Sayre, M.H., Laurent, B.C., and Kornberg, R.D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 91, 1950–1954.

Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D., and Winston, F. (1999). Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell* 4, 715–723.

Campos, E.I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W.-H.W., Seepany, H., Gao, Z.,

---

Day, L.A., Greenblatt, J.F., et al. (2010). The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1343–1351.

Carrozza, M.J., Utlely, R.T., Workman, J.L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19, 321–329.

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. *J. Cell Biol.* 152, 375–384.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318, 444–447.

Chen, Y., Baker, R.E., Keith, K.C., Harris, K., Stoler, S., and Fitzgerald-Hayes, M. (2000). The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7037–7048.

Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.-H., Dai, S., et al. (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* 125, 691–702.

Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263–271.

Chiba, H., Muramatsu, M., Nomoto, A., and Kato, H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 22, 1815–1820.

Choi, J., Heo, K., and An, W. (2009). Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res.* 37, 5993–6007.

Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18475–18480.

Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., et al. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353–360.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes.

---

Annu. Rev. Biochem. 78, 273–304.

Clarkson, M., and Saint, R. (1999). A His2AvDGFP fusion gene complements a lethal His2AvD mutant allele and provides an *in vivo* marker for *Drosophila* chromosome behavior. *DNA Cell Biol.* 18, 457–462.

Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D.J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694–697.

Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol. Cell* 25, 297–308.

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

Collins, R.E., Tachibana, M., Tamaru, H., Smith, K.M., Jia, D., Zhang, X., Selker, E.U., Shinkai, Y., and Cheng, X. (2005). *In vitro* and *in vivo* analyses of a Phe/Tyr switch controlling product specificity of histone lysine methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 280, 5563–5570.

Contreras, A., Hale, T.K., Stenoien, D.L., Rosen, J.M., Mancini, M.A., and Herrera, R.E. The Dynamic Mobility of Histone H1 Is Regulated by Cyclin/CDK Phosphorylation.

Cook, A.J.L., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I., and Almouzni, G. (2011). A Specific Function for the Histone Chaperone NASP to Fine-Tune a Reservoir of Soluble H3-H4 in the Histone Supply Chain. *Mol. Cell* 44, 918–927.

Corona, D.F., Eberharter, A., Budde, A., Deuring, R., Ferrari, S., Varga-Weisz, P., Wilm, M., Tamkun, J., and Becker, P.B. (2000). Two histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC). *Embo J* 19, 3049–3059.

Corona, D.F., Längst, G., Clapier, C.R., Bonte, E.J., Ferrari, S., Tamkun, J.W., and Becker, P.B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell* 3, 239–245.

Costanzo, R.V., Vilá-Ortíz, G.J., Perandones, C., Carminatti, H., Matilla, A., and Radrizzani, M. (2006). Anp32e/Cpd1 regulates protein phosphatase 2A activity at synapses during synaptogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 23, 309–324.

Côté, J., Quinn, J., Workman, J., and Peterson, C. (1994). Stimulation of GAL4 derivative



---

binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53–60.

Crémisi, C., Chestier, A., and Yaniv, M. (1977). Preferential association of newly synthesized histones with replicating SV40 DNA. *Cell* 12, 947–951.

Croken, M.M., Nardelli, S.C., and Kim, K. (2012). Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in Parasitology* 28, 202–213.

Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., et al. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545–553.

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.

Das, C., Lucia, M.S., Hansen, K.C., and Tyler, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459, 113–117.

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., Longthorne, R.F., and Gurdon, J.B. (1978). Intracellular migration of nuclear proteins in *Xenopus* oocytes. *Nature* 272, 254–256.

Dekker, J. (2008). Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J. Biol. Chem.* 283, 34532–34540.

Delmas, V., Stokes, D.G., and Perry, R.P. (1993). A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain.

Denslow, S.A., and Wade, P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26, 5433–5438.

Deroo, B.J., and Korach, K.S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 116, 561–570.

Dhillon, N., and Kamakaka, R.T. (2000). A Histone Variant, Htz1p, and a Sir1p-like Protein, Esc2p, Mediate Silencing at HMR. *Mol. Cell* 6, 769–780.

Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S.J., Aparicio, O.M., and Kamakaka, R.T. (2005). H2A.Z Functions To Regulate Progression through the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* 26, 489–501.

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.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136, 435–446.

Dong, A., Liu, Z., Zhu, Y., Yu, F., Li, Z., Cao, K., and Shen, W.-H. (2005). Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants. *Plant Physiol.* 138, 1446–1456.

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

Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P., and Cote, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* 16, 979–990.

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol. Cell Biol.* 24, 1884–1896.

Drané, P., Ouarrhni, 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.

Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2008). Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 135, 284–294.

Dunleavy, E., Pidoux, A., Monet, M., and Bonilla, C. (2007). A NASP (N1/N2)-Related Protein, Sim3, Binds CENP-A and Is Required for Its Deposition at Fission Yeast Centromeres. *Mol. Cell*.

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.

Earnshaw, W.C., Honda, B.M., Laskey, R.A., and Thomas, J.O. (1980). Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin. *Cell* 21, 373–383.

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

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

Eberharter, A., Ferrari, S., Längst, G., Straub, T., Imhof, A., Varga-Weisz, P., Wilm, M., and Becker, P.B. (2001). Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *Embo J* 20, 3781–3788.

Eirín-López, J.M., Ishibashi, T., and Ausió, J. (2008). H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *Faseb J.* 22, 316–326.

El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E., and Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.* 205, 2409–2417.

Elfring, L.K., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S.J., Waldrip, W.R., Daubresse, G., DePace, A., et al. (1998). Genetic analysis of brahma: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148, 251–265.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19732–19737.

English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E.A., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* 127, 495–508.

English, C.M., Maluf, N.K., Tripet, B., Churchill, M.E.A., and Tyler, J.K. (2005). ASF1 binds to a heterodimer of histones H3 and H4: a two-step mechanism for the assembly of the H3-H4 heterotetramer on DNA. *Biochemistry* 44, 13673–13682.

Enomoto, S., McCune-Zierath, P.D., Gerami-Nejad, M., Sanders, M.A., and Berman, J. (1997). RLF2, a subunit of yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function in vivo. *Genes & Development* 11, 358–370.

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

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

Fazio, T.G., Huff, J.T., and Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 134, 162–174.

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

Finn, R.M., Browne, K., Hodgson, K.C., and Ausiό, J. (2008). sNASP, a histone H1-specific eukaryotic chaperone dimer that facilitates chromatin assembly. *Biophys. J.* 95, 1314–1325.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425, 475–479.

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.

Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., and Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.* 8, 458–469.

Frehlick, L.J., Eirín-Lόpez, J.M., and Ausiό, J. (2006). New insights into the nucleophosmin/nucleoplasm family of nuclear chaperones. *Bioessays* 29, 49–59.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* 106, 297–307.

Fujii-Nakata, T., ISHIMI, Y., Okuda, A., and Kikuchi, A. (1992). Functional analysis of nucleosome assembly protein, NAP-1. The negatively charged COOH-terminal region is not necessary for the intrinsic assembly activity. *J. Biol. Chem.* 267, 20980–20986.

G T Wondrak, D.C.-L.E.L.J.M.K.J. (2000). Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochemical Journal* 351, 769.

Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson,

R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* 8, 358–366.

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

Ge, Q., Nilasena, D.S., O'Brien, C.A., Frank, M.B., and Targoff, I.N. (1995). Molecular analysis of a major antigenic region of the 240-kD protein of Mi-2 autoantigen. *J. Clin. Invest.* 96, 1730–1737.

Gelbart, M.E., Rechsteiner, T., Richmond, T.J., and Tsukiyama, T. (2001). Interactions of Isw2 chromatin remodeling complex with nucleosomal arrays: analyses using recombinant yeast histones and immobilized templates. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2098–2106.

Gévry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes & Development* 21, 1869–1881.

Giannasca, P.J., Horowitz, R.A., and Woodcock, C.L. (1993). Transitions between in situ and isolated chromatin. *J. Cell. Sci.* 105 ( Pt 2), 551–561.

Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95–105.

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.

González-Romero, R., Méndez, J., Ausió, J., and Eirín-López, J.M. (2008). Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* 413, 1–7.

Govin, J., Caron, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2005). Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem. Sci.* 30, 357–359.

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

Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., and Schlick, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc. Natl. Acad.*

---

Sci. U.S.a. 106, 13317–13322.

Groth, A. (2009). Replicating chromatin: a tale of histones. *Biochem. Cell Biol.* 87, 51–63.

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.

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

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

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

Hamiche, A., and Shuaib, M. (2012). Chaperoning the histone H3 family. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 230–237.

Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D.A., and Wu, C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* 97, 833–842.

Happel, A.M., Swanson, M.S., and Winston, F. (1991). The SNF2, SNF5 and SNF6 genes are required for Ty transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 128, 69–77.

Hardy, S., Jacques, P.-E., Gévry, N., Forest, A., Fortin, M.-E., Laflamme, L., Gaudreau, L., and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet.* 5, e1000687.

Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., and Bunick, G.J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 1513–1534.

Hartman, H.B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T., and Lazar, M.A. (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep.* 6, 445–451.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 789–829.

Hendzel, M.J., Lever, M.A., Th'ng, J.P.H., and Sun, X. (2000). Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature* 408, 873–876.

Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.

Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 97, 716–721.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.

Hiroshi Kimura, P.R.C. (2001). Kinetics of Core Histones in Living Human Cells: Little Exchange of H3 and H4 and Some Rapid Exchange of H2b. *J. Cell Biol.* 153, 1341.

Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes & Development* 6, 2288–2298.

Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 5528–5540.

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 97, 1148–1153.

Hua, S., Kallen, C.B., Dhar, R., Baquero, M.T., Mason, C.E., Russell, B.A., Shah, P.K., Liu, J., Khramtsov, A., Tretiakova, M.S., et al. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol. Syst. Biol.* 4, 188.

Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B. (1995). Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochemical and Molecular Medicine* 56, 76–83.

Iida, T., and Araki, H. (2004). Noncompetitive counteractions of DNA polymerase epsilon and ISW2/ $\gamma$ CHRAC for epigenetic inheritance of telomere position effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 217–227.

Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463–473.

Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., Jackson, D., Clee, C., Plumb, R., Rogers, J., et al. (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* 6, e22.

ISHIMI, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugasawa, K., Yokota, S., Hanaoka, F., and YAMADA, M. (1984). Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 142, 431–439.

ISHIMI, Y., KOJIMA, M., YAMADA, M.-A., and HANAOKA, F. (1987). Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *European Journal of Biochemistry* 162, 19–24.

ISHIMI, Y., Yasuda, H., Hirosumi, J., Hanaoka, F., and YAMADA, M. (1983). A protein which facilitates assembly of nucleosome-like structures in vitro in mammalian cells. *J. Biochem.* 94, 735–744.

Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3112–3124.

Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90, 145–155.

Ito, T., Levenstein, M.E., Fyodorov, D.V., Kutach, A.K., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1999). ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly.

Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res.* 28, 3811–3816.

Jackson, V. (1987). Deposition of newly synthesized histones: new histones H2A and H2B do not deposit in the same nucleosome with new histones H3 and H4. *Biochemistry* 26, 2315–2325.

Jackson, V. (1988). Deposition of newly synthesized histones: hybrid nucleosomes are not tandemly arranged on daughter DNA strands. *Biochemistry* 27, 2109–2120.



Jackson, V. (1990). In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry* 29, 719–731.

Jackson, V., and Chalkley, R. A reevaluation of new histone deposition on replicating chromatin.

Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Mol. Cell* 37, 736–743.

Jensen, K., Santisteban, M.S., Urekar, C., and Smith, M.M. (2011). Histone H2A.Z acid patch residues required for deposition and function. *Mol. Genet. Genomics* 285, 287–296.

Jeppesen, P., Mitchell, A., Turner, B., and Perry, P. (1992). Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma* 101, 322–332.

Jiang, T., Zhou, X., Taghizadeh, K., Dong, M., and Dedon, P.C. (2007). N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 60–65.

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.

Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutiérrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A., et al. (2005). A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J. Biol. Chem.* 280, 41207–41212.

Jing-mei Hsu, J.H.P.B.M.B.C.L. (2003). The Yeast RSC Chromatin-Remodeling Complex Is Required for Kinetochore Function in Chromosome Segregation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3202.

Johnson, A., and O’Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 283–315.

Jones, R.S., and Gelbart, W.M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6357–6366.

Kadam, S., and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377–389.

---

Kalocsay, M., Hiller, N.J., and Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break. *Mol. Cell* 33, 335–343.

Kamakaka, R.T., Bulger, M., Kaufman, P.D., Stillman, B., and Kadonaga, J.T. (1996). Postreplicative chromatin assembly by *Drosophila* and human chromatin assembly factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 810–817.

Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1997). Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes & Development* 11, 345–357.

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.

Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M., and Müller, J. (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* 282, 1897–1900.

Khavari, P.A., Peterson, C.L., Tamkun, J.W., Mendel, D.B., and Crabtree, G.R. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* 366, 170–174.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259–272.

Kim, J., Guermah, M., McGinty, R.K., Lee, J.-S., Tang, Z., Milne, T.A., Shilatifard, A., Muir, T.W., and Roeder, R.G. (2009). RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 137, 459–471.

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.

Kleinschmidt, J.A., Fortkamp, E., Krohne, G., Zentgraf, H., and Franke, W.W. (1985). Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 1166–1176.

Kleinschmidt, J.A., Seiter, A., and Zentgraf, H. (1990). Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from

nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Embo J* 9, 1309–1318.

Klose, R.J., and Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 307–318.

Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Müller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & Development* 20, 1110–1122.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biol.* 2, e131.

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.

Krogan, N.J., Keogh, M.-C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., et al. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell* 12, 1565–1576.

Kuo, M.H., Baur, vom, E., Struhl, K., and Allis, C.D. (2000). Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol. Cell* 6, 1309–1320.

Kurumizaka, H., and Wolffe, A.P. (1997). Sin mutations of histone H3: influence on nucleosome core structure and function. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6953–6969.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084–2087.

la Cruz, de, X., Lois, S., Sánchez-Molina, S., and Martínez-Balbás, M.A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27, 164–175.

Lamond, A.I., and Earnshaw, W.C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547–553.

---

Landemaine, T., Jackson, A., Bellahcene, A., Rucci, N., Sin, S., Abad, B.M., Sierra, A., Boudinet, A., Guinebretiere, J.M., Ricevuto, E., et al. (2008). A Six-Gene Signature Predicting Breast Cancer Lung Metastasis. *Cancer Res.* 68, 6092–6099.

Larsen, D.H., Poinignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M.R., Hari, F.J., Rendtlew Danielsen, J.M., Menard, P., Sand, J.C., Stucki, M., et al. (2010). The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J. Cell Biol.* 190, 731–740.

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.

Laskey, R.A., Mills, A.D., and Morris, N.R. (1977). Assembly of SV40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs. *Cell* 10, 237–243.

Lazzaro, M.A., and Picketts, D.J. (2001). Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for *Snf2h* and *Snf2l*. *J. Neurochem.* 77, 1145–1156.

Längst, G., Bonte, E.J., Corona, D.F.V., and Becker, P.B. (1999). Nucleosome Movement by CHRAC and ISWI without Disruption or trans-Displacement of the Histone Octamer. *Cell* 97, 843–852.

Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1029–1042.

Leach, T.J. (2000). Histone H2A.Z Is Widely but Nonrandomly Distributed in Chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23267–23272.

Lee, D.Y., Teyssier, C., Strahl, B.D., and Stallcup, M.R. (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* 26, 147–170.

Lee, J.-S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. (2007). Histone Crosstalk between H2B Monoubiquitination and H3 Methylation Mediated by COMPASS. *Cell* 131, 1084–1096.

Lee, S., Lee, J., Lee, S.-K., and Lee, J.W. (2008). Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Mol. Endocrinol.* 22, 1312–1319.

Lemon, B., Inouye, C., King, D.S., and Tjian, R. (2001). Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* 414, 924–928.

---

LeRoy, G. (1998). Requirement of RSF and FACT for Transcription of Chromatin Templates in Vitro. *Science* 282, 1900–1904.

LeRoy, G., Loyola, A., Lane, W.S., and Reinberg, D. (2000). Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J. Biol. Chem.* 275, 14787–14790.

Levchenko, V., Jackson, B., and Jackson, V. (2005). Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. *Biochemistry* 44, 5357–5372.

Lew, D.J., Burke, D.J., and Dutta, A. (2008). The immortal strand hypothesis: how could it work? *Cell* 133, 21–23.

Li, B. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 18385–18390.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.

Liebich, H.M., Gesele, E., Wirth, C., Wöl, J., Jobst, K., and Lakatos, A. (1993). Non-enzymatic glycation of histones. *Biological Mass Spectrometry* 22, 121–123.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 293, 2453–2455.

Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P.O., and Zhao, K. (2001). Regulation of CSF1 Promoter by the SWI/SNF-like BAF Complex. *Cell* 106, 309–318.

Liu, X., Li, B., and GorovskyMA (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4305–4311.

Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R., and Berger, S.L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293, 1142–1146.

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., 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.

Loyola, A., Huang, J.-Y., LeRoy, G., Hu, S., Wang, Y.-H., Donnelly, R.J., Lane, W.S., Lee, S.-C., and Reinberg, D. (2003). Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF.

Loyola, A., LeRoy, G., Wang, Y.H., and Reinberg, D. (2001). Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes & Development* 15, 2837–2851.

Luger, K., and Richmond, T.J. (1998). DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 33–40.

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 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

Luk, E., Ranjan, A., FitzGerald, P.C., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D., and Wu, C. (2010). Stepwise Histone Replacement by SWR1 Requires Dual Activation with Histone H2A.Z and Canonical Nucleosome. *Cell* 143, 725–736.

Luk, E., Vu, N.-D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.-H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., et al. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol. Cell* 25, 357–368.

Lusser, A., and Urwin, D. (2005). Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nature Structural & Molecular ...*

Ma, X.J., Wu, J., Althelm, B.A., Schultz, M.C., and Grunstein, M. (1998). Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6693–6698.

Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 291–297.

Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27, 271–276.

Mahapatra, S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A., and Bhargava, P. (2011). Yeast H2A.Z, FACT

---

complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 4023–4034.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10, 882–891.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2009). Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* 138, 1067–1082.

Martin, D.G.E., Baetz, K., Shi, X., Walter, K.L., MacDonald, V.E., Wlodarski, M.J., Gozani, O., Hieter, P., and Howe, L. (2006). The Yng1p plant homeodomain finger is a methyl-histone binding module that recognizes lysine 4-methylated histone H3. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7871–7879.

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.

Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., and Verreault, A. (2005). A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* 436, 294–298.

Matilla, A., and Radrizzani, M. (2005). The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum* 4, 7–18.

Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.-J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.-S., Gourraud, P.-A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C., and Trouche, D. (2009). The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* 28, 1506–1517.

McDaniel, I.E., Lee, J.M., Berger, M.S., Hanagami, C.K., and Armstrong, J.A. (2008). Investigations of CHD1 Function in Transcription and Development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 178, 583–587.

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.

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.

Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725–736.

Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R., and Brockdorff, N. (1999). Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J. Cell Biol.* 147, 1399–1408.

Méchal, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 728–738.

Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., and Brown, D.T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877–881.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343–348.

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. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1206–1218.

Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, A.J., Heck, A.J.R., and Verrijzer, C.P. (2004). Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3077–3088.

Montero, L.M., Filipski, J., Gil, P., Capel, J., Martínez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (1992). The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants. *Nucleic Acids Res.* 20, 3207–3210.

Morgan, R. (2006). Engrailed: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Letters* 580, 2531–2533.

Morillo-Huesca, M., Clemente-Ruiz, M., Andújar, E., and Prado, F. (2010). The SWR1 histone replacement complex causes genetic instability and genome-wide transcription misregulation in the absence of H2A.Z. *PLoS ONE* 5, e12143.

Morrison, A.J., and Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 373–384.

Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119, 767–775.

Mosammamarast, N., and Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and



---

molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 155–179.

Mosammaparast, N., Del Rosario, B.C., and Pemberton, L.F. (2005). Modulation of histone deposition by the karyopherin kap114. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1764–1778.

Mosammaparast, N., Ewart, C.S., and Pemberton, L.F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J* 21, 6527–6538.

Mosher, R.A., and Melnyk, C.W. (2010). siRNAs and DNA methylation: seedy epigenetics. *Trends Plant Sci.* 15, 204–210.

Muchardt, C., and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Embo J* 12, 4279–4290.

Munro, S., Khaire, N., Inche, A., Carr, S., and La Thangue, N.B. (2010). Lysine methylation regulates the pRb tumour suppressor protein. *Oncogene* 29, 2357–2367.

Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* 4, 529–540.

Nagaki, K., Neumann, P., Zhang, D., Ouyang, S., Buell, C.R., Cheng, Z., and Jiang, J. (2005). Structure, divergence, and distribution of the CRR centromeric retrotransposon family in rice. *Mol. Biol. Evol.* 22, 845–855.

Nakayama, J., Klar, A.J., and Grewal, S.I. (2000). A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell* 101, 307–317.

Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 220–228.

Neigeborn, L., and Carlson, M. (1984). Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108, 845–858.

Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 407–422.

Nie, Z., Xue, Y., Yang, D., Zhou, S., Deroo, B.J., Archer, T.K., and Wang, W. A Specificity and

---

Targeting Subunit of a Human SWI/SNF Family-Related Chromatin-Remodeling Complex.

Noyer-Weidner, M., and Trautner, T.A. (1993). Methylation of DNA in prokaryotes. *Exs* 64, 39–108.

O’Rand, M.G., Richardson, R.T., Zimmerman, L.J., and Widgren, E.E. (1992). Sequence and localization of human NASP: conservation of a *Xenopus* histone-binding protein. *Dev. Biol.* 154, 37–44.

Okabe, I., Bailey, L.C., Attree, O., Srinivasan, S., Perkel, J.M., Laurent, B.C., Carlson, M., Nelson, D.L., and Nussbaum, R.L. (1992). Cloning of human and bovine homologs of SNF2/SWI2: a global activator of transcription in yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 4649–4655.

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.

Oki, M., Aihara, H., and Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell. Biochem.* 41, 319–336.

Okuwaki, M., Kato, K., Shimahara, H., Tate, S.-I., and Nagata, K. (2005). Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein I. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10639–10651.

Osakabe, A., Tachiwana, H., Matsunaga, T., Shiga, T., Nozawa, R.-S., Obuse, C., and Kurumizaka, H. (2010). Nucleosome formation activity of human somatic nuclear autoantigenic sperm protein (sNASP). *Journal of Biological Chemistry* 285, 11913–11921.

Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes & Development* 20, 3324–3336.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300.

Palmer, D.K., O’Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3734–3738.

Paolo Piatti, A.Z.A.L. (2011). ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factors and Their Roles in Affecting Nucleosome Fiber Composition. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 6544.

---

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., and Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200–213.

Papoulas, O., Beek, S.J., Moseley, S.L., McCallum, C.M., Sarte, M., Shearn, A., and Tamkun, J.W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125, 3955–3966.

Park, Y.-J., and Luger, K. (2006). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1248–1253.

Park, Y.-J., Chodaparambil, J.V., Bao, Y., McBryant, S.J., and Luger, K. (2005). Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.* 280, 1817–1825.

Park, Y.-J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 24274–24282.

Parthun, M.R. (2007). Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* 26, 5319–5328.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895.

Pehrson, J.R., Costanzi, C., and Dharia, C. (1997). Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J. Cell. Biochem.* 65, 107–113.

Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H., and Yoda, K. (2009). Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J. Cell Biol.* 185, 397–407.

Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O’Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* 12, 1577–1589.

Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Difilippantonio, M.J., Wilson, P.C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D.R., et al. (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414, 660–665.

Peterson, C.L. (1998). Subunits of the Yeast SWI/SNF Complex Are Members of the Actin-related Protein (ARP) Family. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23641–23644.

Peterson, C.L., Dingwall, A., and Scott, M.P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement.

Piña, B., and Suau, P. (1987). Changes in histones H2A and H3 variant composition in differentiating and mature rat brain cortical neurons. *Dev. Biol.* 123, 51–58.

Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., and Jackson, S.P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *Embo J* 29, 3130–3139.

Poot, R.A., Dellaire, G., Hülsmann, B.B., Grimaldi, M.A., Corona, D.F., Becker, P.B., Bickmore, W.A., and Varga-Weisz, P.D. (2000). HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *Embo J* 19, 3377–3387.

Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 28, 1057–1068.

Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., and Sendra, R. (2004). Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 16033–16043.

Prest, S.J., May, F.E.B., and Westley, B.R. (2002). The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *Faseb J.* 16, 592–594.

Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell. Sci.* 116, 3677–3685.

Prior, C.P., Cantor, C.R., Johnson, E.M., and Allfrey, V.G. (1980). Incorporation of exogenous pyrene-labeled histone into *Physarum* chromatin: a system for studying changes in nucleosomes assembled in vivo. *Cell* 20, 597–608.

Quivy, J.-P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *Embo J* 23, 3516–3526.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233–248.

Rando, O.J., and Chang, H.Y. (2009). Genome-wide views of chromatin structure. *Annu.*

---

Rev. Biochem. 78, 245–271.

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.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.

Reinberg, D. (2004). Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Current Opinion in Genetics & ....*

Ren, Q., and Gorovsky, M.A. (2001). Histone H2A.Z acetylation modulates an essential charge patch. *Mol. Cell* 7, 1329–1335.

Ren, Q., and Gorovsky, M.A. (2003). The nonessential H2A N-terminal tail can function as an essential charge patch on the H2A.Z variant N-terminal tail. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2778–2789.

Reyes, J.C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C., and Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J* 17, 6979–6991.

Richardson, R.T., Alekseev, O.M., Grossman, G., Widgren, E.E., Thresher, R., Wagner, E.J., Sullivan, K.D., Marzluff, W.F., and O'Rand, M.G. (2006). Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), a linker histone chaperone that is required for cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 281, 21526–21534.

Richardson, R.T., Batova, I.N., Widgren, E.E., Zheng, L.X., Whitfield, M., Marzluff, W.F., and O'Rand, M.G. (2000). Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J. Biol. Chem.* 275, 30378–30386.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532–537.

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.

Robinson, P.J.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the “30 nm” chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 336–343.

Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., and Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6506–6511.

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.

Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Cote, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin. Cancer Res.* 16, 4543–4552.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671–5677.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Suka, N., Turner, B.M., and Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 392, 831–835.

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.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000a). Histone H2A.Z Regulates Transcription and Is Partially Redundant with Nucleosome Remodeling Complexes. *Cell* 103, 411–422.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000b). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411–422.

Santos-Rosa, H., Kirmizis, A., Nelson, C., Bartke, T., Saksouk, N., Cote, J., and Kouzarides, T. (2009). Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 16, 17–22.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.

Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell* 15, 595–605.

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.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.-Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887–898.

Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., and Halazonetis, T.D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 151, 1381–1390.

Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 22, 415–422.

Sealy, L., Cotten, M., and Chalkley, R. (1986). Xenopus nucleoplasmin: egg vs. oocyte. *Biochemistry* 25, 3064–3072.

Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 690–699.

Seelig, H.P., Moosbrugger, I., Ehrfeld, H., Fink, T., Renz, M., and Genth, E. (1995). The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation. *Arthritis Rheum.* 38, 1389–1399.

Selker, E.U., Tountas, N.A., Cross, S.H., Margolin, B.S., Murphy, J.G., Bird, A.P., and Freitag, M. (2003). The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* 422, 893–897.

Senshu, T., Fukuda, M., and Ohashi, M. (1978). Preferential association of newly synthesized H3 and H4 histones with newly replicated DNA. *J. Biochem.* 84, 985–988.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541–544.

Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., and Wu, C. (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell* 12, 147–155.

Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Peña, P., Lan, F., Kaadige, M.R., et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active

---

gene repression. *Nature* 442, 96–99.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.

Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575–585.

Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13225–13230.

Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 1349–1354.

Sims, R.J. (2005). Human but Not Yeast CHD1 Binds Directly and Selectively to Histone H3 Methylated at Lysine 4 via Its Tandem Chromodomains. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41789–41792.

Sims, R.J., 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. *Mol. Cell* 28, 665–676.

Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M., and Gottschling, D.E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 613–632.

Sivolob, A., and Prunell, A. (2003). Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. *J. Mol. Biol.* 331, 1025–1040.

Sklenar, A.R., and Parthun, M.R. (2004). Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity. *BMC Biochem.* 5, 11.

Smeenk, G., Wiegant, W.W., Vrolijk, H., Solari, A.P., Pastink, A., and van Attikum, H. (2010). The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J. Cell Biol.* 190, 741–749.

Smith, B.C., and Denu, J.M. (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine



---

modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 45–57.

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.

Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T., and Allis, C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1237–1241.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780–7791.

Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J. Cell. Sci.* 114, 2891–2893.

Stargell, L.A., Bowen, J., Dadd, C.A., Dedon, P.C., Davis, M., Cook, R.G., Allis, C.D., and Gorovsky, M.A. (1993). Temporal and spatial association of histone H2A variant hv1 with transcriptionally competent chromatin during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*. *Genes & Development* 7, 2641–2651.

Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., and Harte, P.J. (1995). The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* 52, 209–223.

Steger, D.J., Lefterova, M.I., Ying, L., Stonestrom, A.J., Schupp, M., Zhuo, D., Vakoc, A.L., Kim, J.-E., Chen, J., Lazar, M.A., et al. (2008). DOT1L/KMT4 Recruitment and H3K79 Methylation Are Ubiquitously Coupled with Gene Transcription in Mammalian Cells.

Stern, M., Jensen, R., and Herskowitz, I. (1984). Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J. Mol. Biol.* 178, 853–868.

Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., et al. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136, 420–434.

Stiff, T., O’Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390–2396.

Stillman, B. (1986). Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro. *Cell* 45, 555–565.

Stockdale, C., Flaus, A., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2006). Analysis of nucleosome repositioning by yeast ISWI and Chd1 chromatin remodeling complexes. *J. Biol. Chem.* 281, 16279–16288.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.

Straube, K., Blackwell, J.S., and Pemberton, L.F. (2010). Nap1 and Chz1 have separate Htz1 nuclear import and assembly functions. *Traffic* 11, 185–197.

Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Längst, G., and Grummt, I. (2001). NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J* 20, 4892–4900.

Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D.R., Collins, R.E., Sharma, D., Peng, J., Cheng, X., and Vertino, P.M. (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol. Cell* 30, 336–347.

Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O., and Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3364–3369.

Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J., and Grunstein, M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. pp. 473–479.

Sullivan, B.A. (2002). Centromere round-up at the heterochromatin corral. *Trends Biotechnol.* 20, 89–92.

Sullivan, K.F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J. Cell Biol.* 127, 581–592.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstone, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.* 11, 1376–1382.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z

. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1121–1124.

---

Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–476.

Svotelis, A., Gévry, N., and Gaudreau, L. (2009). Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem. Cell Biol.* 87, 179–188.

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.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J.-I., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34, 75–79.

Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., and Kennison, J.A. (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561–572.

Tan, B.C.-M., Chien, C.-T., Hirose, S., and Lee, S.-C. (2006). Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication. *Embo J* 25, 3975–3985.

Taverna, S.D., Coyne, R.S., and Allis, C.D. (2002). Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* 110, 701–711.

Taverna, S.D., Ilin, S., Rogers, R.S., Tanny, J.C., Lavender, H., Li, H., Baker, L., Boyle, J., Blair, L.P., Chait, B.T., et al. (2006). Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol. Cell* 24, 785–796.

Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427.

Thomson, A.M., Gillespie, P.J., and Blow, J.J. (2010). Replication factory activation can be decoupled from the replication timing program by modulating Cdk levels. *J. Cell Biol.* 188, 209–221.

Tjeertes, J.V., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *Embo J* 28, 1878–1889.

Tochio, N., Umehara, T., Munemasa, Y., Suzuki, T., Sato, S., Tsuda, K., Koshihara, S., Kigawa, T.,

---

Nagai, R., and Yokoyama, S. (2010). Solution structure of histone chaperone ANP32B: interaction with core histones H3-H4 through its acidic concave domain. *J. Mol. Biol.* 401, 97–114.

Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2012). Histone Variant H2A.Bbd Is Associated with Active Transcription and mRNA Processing in Human Cells. *Mol. Cell.*

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.

Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R., and Johnson, A.D. (2000). The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J* 19, 2323–2331.

Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.

Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2004). Reconstitution of glucocorticoid receptor-dependent transcription in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3347–3358.

Tsukada, Y.-I., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816.

Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 422–429.

Tsukiyama, T., and Wu, C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1011–1020.

Tsukiyama, T., Becker, P.B., and Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367, 525–532.

Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C. (1995). ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1021–1026.

Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C.C., Shiloach, J., and Wu, C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 13, 686–697.

Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379–383.

Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836–845.

Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402, 555–560.

Tyler, J.K., Bulger, M., Kamakaka, R.T., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). The p53 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6149–6159.

Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6574–6584.

van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S.M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *Embo J* 26, 4113–4125.

van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777–788.

Varga-Weisz, P.D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P.B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388, 598–602.

Vary, J.C., Gangaraju, V.K., Qin, J., Landel, C.C., Kooperberg, C., Bartholomew, B., and Tsukiyama, T. (2003). Yeast Isw1p forms two separable complexes in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 80–91.

Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., et al. (2010). Quantitative Interaction Proteomics and Genome-wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers. *Cell* 142, 967–980.

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.

Wade, P.A., Gogonne, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., and Wolffe, A.P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat.*

Genet. 23, 62–66.

Walter, P.P., Owen-Hughes, T.A., Côté, J., and Workman, J.L. (1995). Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6178–6187.

Wang, A.Y., Aristizabal, M.J., Ryan, C., Krogan, N.J., and Kobor, M.S. (2011). Key functional regions in the histone variant H2A.Z C-terminal docking domain. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3871–3884.

Wang, H., Walsh, S.T.R., and Parthun, M.R. (2008). Expanded binding specificity of the human histone chaperone NASP. *Nucleic Acids Res.* 36, 5763–5772.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.

Wang, W. (2003). The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 274, 143–169.

Wang, W., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P.A., Biggar, S.R., Muchardt, C., Kalpana, G.V., Goff, S.P., Yaniv, M., et al. (1996). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* 15, 5370–5382.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.-H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., et al. (2004b). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science* 306, 279–283.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–47762.

Weber, C.M., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2010). H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1500–1507.

Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., and Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 37, 853–862.

Wechsler, M.A., Kladde, M.P., Alfieri, J.A., and Peterson, C.L. (1997). Effects of Sin- versions of histone H4 on yeast chromatin structure and function. *Embo J* 16, 2086–2095.

Whittle, C.M., McClinic, K.N., Ercan, S., Zhang, X., Green, R.D., Kelly, W.G., and Lieb, J.D. (2008). The genomic distribution and function of histone variant HTZ-1 during *C. elegans* embryogenesis. *PLoS Genet.* 4, e1000187.

Wong, L.H., Ren, H., Williams, E., McGhie, J., Ahn, S., Sim, M., Tam, A., Earle, E., Anderson, M.A., Mann, J., et al. (2009). Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res.* 19, 404–414.

Wong, M.M., Cox, L.K., and Chrivia, J.C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J. Biol. Chem.* 282, 26132–26139.

Woodage, T., and Basrai, M. (1997). Characterization of the CHD family of proteins.

Woodcock, C.L. (1994). Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J. Cell Biol.* 125, 11–19.

Woodcock, C.L., Frado, L.L., and Rattner, J.B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* 99, 42–52.

Worcel, A., Han, S., and Wong, M.L. (1978). Assembly of newly replicated chromatin. *Cell* 15, 969–977.

Wu, J., Suka, N., Carlson, M., and Grunstein, M. (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell* 7, 117–126.

Wu, W.-H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.-H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064–1071.

Wu, W.-H., Wu, C.-H., Ladurner, A., Mizuguchi, G., Wei, D., Xiao, H., Luk, E., Ranjan, A., and Wu, C. (2009). N terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. *J. Biol. Chem.* 284, 6200–6207.

Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., et al. (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57–62.

Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* 421, 652–656.

Xiao, H., Sandaltzopoulos, R., Wang, H.M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K.M., Fu, D., and Wu, C. (2001). Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol. Cell* 8, 531–543.

Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* 121, 375–385.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Côté, J., and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* 2, 851–861.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310–5318.

Ye, J., Ai, X., Eugeni, E.E., Zhang, L., Carpenter, L.R., Jelinek, M.A., Freitas, M.A., and Parthun, M.R. (2005). Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol. Cell* 18, 123–130.

Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G., and Lazar, M.A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J* 22, 3403–3410.

Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters* 513, 124–128.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219–231.

Zhang, K., and Tang, H. (2003). Analysis of core histones by liquid chromatography–mass spectrometry and peptide mapping. *Journal of Chromatography B* 783, 173–179.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* 15, 2343–2360.

Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development* 13, 1924–1935.

Zhou, Z., Feng, H., Hansen, D.F., Kato, H., Luk, E., Freedberg, D.I., Kay, L.E., Wu, C., and Bai, Y. (2008). NMR structure of chaperone Chz1 complexed with histones H2A.Z-H2B. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 868–869.

Zhou, H., Madden, B.J., Muddiman, D.C., and Zhang, Z. (2006). Chromatin assembly factor



1 interacts with histone H3 methylated at lysine 79 in the processes of epigenetic silencing and DNA repair. *Biochemistry* 45, 2852–2861.

Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D., and Tremethick, D.J. (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1070–1076.

Zhou, Y., Santoro, R., and Grummt, I. (2002). The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *Embo J* 21, 4632–4640.

Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A., and Muyldermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395, 402–405.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16, 166–179.

Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.-M., Jackson, V., and van Holde, K. (2009). The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* 17, 160–171.

# ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA VARIANTE D'HISTONE H2AZ.

**ARNAUD OBRI**

## RÉSUMÉ

La variante d'histone H2AZ joue un rôle important dans l'activation de la transcription, la prolifération cellulaire, le développement et la différenciation. H2AZ orne les promoteurs de la majorité des gènes, mais les mécanismes de bases de cette localisation sont inconnus. La compréhension de l'assemblage et du désassemblage du nucléosome passe par la caractérisation de la dynamique du nucléosome et des chaperonnes d'histones. L'objectif de ma thèse était d'identifier des chaperonnes spécifiques impliqués dans la dynamique de H2AZ en utilisant une approche de protéomique. Pour élucider les mécanismes de déposition/éviction de H2AZ, nous avons purifié le complexe prénucléosomale de H2AZ et caractérisé toutes les protéines associées. Nos travaux montrent que Anp32e fait partie du complexe p400/TIP60 qui est présumé être responsable de l'échange de H2AZ sur la chromatine. Anp32e présente une spécificité pour le dimère H2AZ-H2B, car il n'interagit pas avec le dimère H2A-H2B. L'interaction est accomplie via une petite région dans le domaine d'ancrage sur H2AZ et au niveau d'un nouveau domaine ZID sur Anp32e. Finalement, nous avons montré que la suppression de Anp32e par siRNA entraîne : un défaut dans la d'activation des gènes inductibles sous contrôle hormonal et l'accumulation de H2AZ sur les promoteurs de ces gènes. Dans l'ensemble, ces résultats identifient Anp32e comme une nouvelle chaperonne de la variante d'histone H2AZ impliquée dans l'éviction de H2AZ chez les mammifères et dissèque son mécanisme d'action.

**MOTS CLÉS :** variante d'histone, H2AZ, chaperonne d'histone, Anp32e, transcription.

## SUMMARY

The histone variant H2AZ has emerged as a key regulator of chromatin function and plays an essential role in transcriptional activation, cell proliferation, development, and differentiation. H2AZ marks nucleosomes flanking the promoters of most genes, but the mechanistic basis for this localization is unknown. A mechanistic understanding of nucleosome assembly/disassembly requires a detailed knowledge of nucleosome thermodynamics and histone chaperones. The aim of my thesis was to identify specific chaperones involved in H2AZ dynamic by using biochemical and proteomic strategies. To elucidate the mechanism of H2AZ deposition/eviction, we have purified the prenuclosomal H2AZ complex and characterized in details the interacting protein partners. We found that Anp32e is a member of the presumed H2A.Z histone-exchange complex p400/TIP60. Bacterially expressed Anp32e binds specifically to the H2AZ/H2B dimers but not to the H2A/H2B dimers. Anp32e interacts with a short region of the docking domain of H2A.Z. The binding occurred through a novel Anp32e motif, termed ZID. Finally, we show that down regulation of Anp32e interferes with both the de-repression of hormone dependent genes and H2A.Z removal from their promoter. Our data identified Anp32e as a novel mammalian H2AZ chaperone invoved in H2AZ eviction and dissected its mode of action.

**KEY WORDS :** histone variant, H2AZ, histone chaperone, Anp32e, transcription.