



HAL
open science

Fonctions des extrémités flexibles de l'ADN du nucléosome CENP-A dans l'organisation de la chromatine centromérique

Yohan Roulland

► **To cite this version:**

Yohan Roulland. Fonctions des extrémités flexibles de l'ADN du nucléosome CENP-A dans l'organisation de la chromatine centromérique. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV087 . tel-01611128

HAL Id: tel-01611128

<https://theses.hal.science/tel-01611128>

Submitted on 5 Oct 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **CSV - Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Yohan ROULLAND

Thèse dirigée par **Stefan DIMITROV** et
codirigée par **Thierry GAUTIER**

préparée au sein de l'**Institut Albert Bonniot**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant...**

Fonctions des extrémités flexibles de l'ADN du nucléosome CENP-A dans l'organisation de la chromatine centromérique

Thèse soutenue publiquement le **1 Mars 2016**
devant le jury composé de :

Pr. Catherine GHEZZI

Professeur, Université Grenoble-Alpes (Grenoble), Présidente

Dr. Pascal BERNARD

Chargé de recherche, École Normale Supérieure (Lyon), Rapporteur

Dr. Patrick LOMONTE

Directeur de recherche, Institut NeuroMyoGène (Lyon), Rapporteur

Dr. Stefan DIMITROV

Directeur de recherche, Institut Albert Bonniot (Grenoble), Membre



Table des matières

Résumé	6
Abstract	7
Table des Abréviations	8
Liste des Figures	10
Première Partie - Introduction	13
Chapitre 1 - La chromatine, une structure dynamique	16
1.1 Le nucléosome.....	16
1.1.1 Les histones.....	16
1.1.2 La particule de cœur.....	18
1.1.3 Le chromatosome.....	19
1.2 Organisation supérieure de la chromatine.....	20
1.2.1 La fibre de 10 nm.....	20
1.2.2 La fibre de 30 nm.....	21
1.2.3 Repliement inter et intra chromosomique.....	22
1.2.4 Le chromosome mitotique.....	24
1.3 La chromatine - une structure dynamique.....	25
1.3.1 Modifications post-traductionnelles des histones.....	25
1.3.2 Le remodelage de la chromatine.....	28
1.4 Les variants d'histones.....	31
1.4.1 Histones conventionnelles.....	31
1.4.3 Définition d'un variant d'histone.....	32
1.4.4 Variants de H1.....	34
1.4.5 Variants de H2A.....	34
1.4.5 Variants de H2B.....	36
1.4.6 Variants de H3.....	36
Chapitre 2 - La mitose	40
2.1 Le cycle cellulaire.....	40
2.2 La mitose : déroulement et régulation.....	41
2.2.1 Déroulement de la mitose.....	41
2.2.2 Principales régulations de la mitose.....	42
2.3 Les structures mises en œuvre lors de la mitose.....	46
2.3.1 Le fuseau mitotique : microtubules.....	46
2.3.2 Les centrosomes.....	46
2.3.3 Le kinétochore.....	47
2.4 Mouvements des chromosomes.....	48
2.4.1 Accrochage au fuseau mitotique.....	48
2.4.2 Congression.....	49
2.4.3 Ségrégation.....	50

2.4	Contrôle de la ségrégation	51
2.5	La cytokinèse	54
Chapitre 3 - Le centromère		58
3.1	L'ADN centromérique	58
3.2	La chromatine centromérique	60
3.2.1	Organisation générale	61
3.2.2	Transcription de la chromatine centromérique	61
3.2.3	La chromatine péricentromérique	62
3.3	Le variant CENP-A : CENtromeric Protein-A	62
3.3.1	Le variant centromérique	62
3.3.2	Maintenance de CENP-A aux centromères	64
3.3.3	Assemblage du kinétochore	66
3.3.4	Structure du nucléosome CENP-A	69
Objectifs		73
Chapitre 4 - Matériels et méthodes		76
4.1	Construction des plasmides	76
4.1.1	Réactions de PCR	76
4.1.2	Construction du pBABE-GFP-hCENP-A	76
4.1.3	pBABE-GFP- α N _{H3} -hCENP-A	77
4.1.4	pCLMFG-HA-GFP-mCENP-A et pCLMFG-HA-GFP- α N _{H3} -mCENP-A	77
4.1.5	pQCXIH-RFP-hCENP-C et pQCXIH-RFP-mCENP-C	77
4.2	Construction des lignées cellulaires	78
4.2.1	Obtention des lignées HeLa	78
4.2.2	Obtention des lignées dérivées de MEF	79
4.2.3	Culture cellulaire	80
4.3	ARN interférence contre CENP-A dans les lignées HeLa	80
4.4	Induction de la délétion du CENP-A endogène dans les lignées MEF	80
4.5	Préparation d'extraits protéiques	81
4.5.1	Extraits de protéines totaux	81
4.5.2	Extraits de protéines nucléaires	81
4.6	Western Blot	81
4.7	Immunofluorescence	82
4.8	Calcul des défauts mitotiques et de cytokinèse	83
4.9	Microscopie et analyse d'image	83
Seconde Partie - Résultats		87
The flexible ends of CENP-A nucleosome are required for mitotic fidelity		89
	Introduction	90
	CENP-A nucleosomes exhibit highly dynamical DNA ends in solution	92
	CENP-A nucleosome is refractive to histone H1 binding	93

“Rigidifying” the DNA ends of the CENP-A nucleosome allows efficient binding of histone H1 <i>in vitro</i>	95
H1 is not associated with CENP-A chromatin <i>in vivo</i>	97
<i>In vivo</i> binding of H1 to the α N _{H3} -CENP-A nucleosome	99
The <i>in vivo</i> replacement of CENP-A with the α N _{H3} -CENP-A swap mutant leads to strong mitotic and cytokinetic defects	99
Replacement of CENP-A with the swapped α N _{H3} -CENP-A mutant at the centromeres leads to aberrant localization of CENP-C	103
Discussion.....	106
Materials and Methods	108
Supplemental Figures	113
Troisième Partie - Discussion et Perspective	119
Rôle de la flexibilité de l’ADN sortant des nucléosomes CENP-A.....	120
Organisation de la chromatine centromérique.....	122
Le paradoxe de la compaction	122
Exclusion de H1	122
Structure de la chromatine centromérique	124
Formation du CCAN.....	125
Maintenance de CENP-A aux centromères	129
Régulation par le CCAN	130
Contrôle temporelle de l’incorporation de CENP-A.....	130
Rôle des modifications post-traductionnelles	131
Rôle de la transcription de l’ADN centromérique	132
Stabilisation du nucléosome CENP-A	134
Perspectives	135
Implication de CENP-A dans les pathologies	135
L’exception à la règle CENP-A : les kinétoplastides	136
Conclusion	137
Bibliographie	139
Annexes	169
FACT assists BER by boosting the remodeling activity of RSC	170
Remerciements	199

Résumé

CENP-A est le variant d'histone qui remplace spécifiquement l'histone H3 au niveau des centromères et confère ses propriétés uniques à la chromatine centromérique. La cristallographie aux rayons X, ainsi que la digestion à la MNase des nucléosomes contenant CENP-A suggèrent une flexibilité de l'ADN entrant et sortant de ce nucléosome.

Néanmoins ces déductions restent aujourd'hui au stade hypothétique, en particulier, rien n'est connu sur le rôle éventuel de cette particularité dans la fonction du nucléosome CENP-A. L'utilisation de la cryo-électromicroscopie nous a permis de déterminer les caractéristiques de la dynamique de l'ADN sortant du nucléosome CENP-A.

Nos analyses biochimiques, protéomiques et de pseudo-génétiques révèlent que la flexibilité élevée de l'ADN du nucléosome CENP-A ne permet pas l'interaction avec l'histone de liaison H1. *In vitro*, remplacer les 2 tours de l'hélice α_N de CENP-A avec les 3 tours de l'hélice α_N de H3 permet de restaurer l'interaction de l'histone H1. *In vivo*, le remplacement des nucléosomes CENP-A par des nucléosomes contenant l'histone hybride $\alpha_{N_{H3}}$ -CENP-A permet également le recrutement de H1, mais cela conduit également à la délocalisation d'un certain nombre de protéines du kinétochore. Ce kinétochore ne permet pas une ségrégation correcte des chromosomes ce qui conduit à des phases de mitose et de cytokinèse défectueuses.

L'ensemble de ces données montre que la conservation au cours de l'évolution de la flexibilité de l'ADN dans le nucléosome CENP-A est essentielle pour l'accomplissement de la division cellulaire.

Mots clés

Chromatine, variant d'histone, CENP-A, structure du nucléosome.

Abstract

CENP-A is an histone variant, which replaces histone H3 at centromeres and confers unique properties to centromeric chromatin. The crystal structure and MNase digestion of CENP-A nucleosome suggests flexible nucleosomal DNA ends but their dynamics in solution remains elusive and their implication in centromere function is unknown.

Using electron cryo-microscopy we determined the dynamic solution properties of the CENP-A nucleosome. Our biochemical, proteomic and genetic data reveal that the high flexibility of the DNA ends impairs histone H1 binding to the CENP-A nucleosome. Substituting the 2-turn α N-helix of CENP-A with the 3-turn α N-helix of H3 results in particles able to bind histone H1. *In vivo* replacement of CENP-A nucleosomes with the same α N_{H3}-CENP-A hybrid nucleosomes leads to H1 recruitment, delocalization of kinetochore proteins and significant mitotic and cytokinesis defects.

Put together, our data reveal that the evolutionarily conserved flexible ends of the CENP-A nucleosomes are essential to ensure the fidelity of the mitotic pathway.

Key words

Chromatin, histone variant, CENP-A, nucleosome structure.

Table des Abréviations

3C	Chromosomal Conformation Capture
ACF1	ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor 1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALIX	ALG-2 Interacting protein X
ANP32E	Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member E
APC/C	Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome
ARN	Acide RiboNucléique
ASF-1	Alternative-Splicing Factor 1
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CAF-1	Chromatin Assembly Factor-1
CATD	CENP-A Targeting Domain
CCAN	Constitutive Centromere-Associated Network
CDE	Centromeric Determination Element
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CENP-A	CENtromeric Protein A
CENP-B	CENtromeric Protein B
CENP-C	CENtromeric Protein C
CEP55	CEntrosomal Protein of 55 kDa
CHD	Chromodomain-Helicase-DNA binding
CID	Centromere Identifier Protein
Cnp1	Centromere protein 1
CPC	Chromosomal Passengers Complex
CREST	Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia
Cse4	Chromosome segregation protein 4
CTs	Chromosomes Territories
DAXX	Death domain-associated protein 6
DCP	Depolymerisation Coupled Pulling
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FACT	FAcilitates Chromatin Transcription
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GFP	Green Fluorescente Protein
HAT	Histone AcetylTransferase
HDAC	Histone DéACetylase

HDM	Histone DéMethylases
HFD	Histone Fold Domain
HIRA	HIstone Regulator A
HJURP	Holliday JUncion Recognition Protein
HMT	Histones MethylTransferases
HOR	Higher Order Repeat
HP1	Heterochromatine Protein 1
INCENP	INner CENtromere Protein
ISWI	Imitation SWItch
kDa	kilo Dalton
KO	Knock Out
KNM	Réseau Knl1–Mis12–Ndc80
MCAK	Kinésine mitotic-Centromere-Associated Kinesin
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
NAP1	Nucleosome Assembly Protein 1
NASP	Nuclear Autoantigenic Sperm Protein
NCP	Nucleosome Core Particle
NIMA	Never In Mitosis A
NRK	NIMA-related kinases
NURD	NUcleosome Remodelling and Deacetylase
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCM	PeriCentriolar Material
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLK	Polo-like kinases
PTM	Post-Traductionnal Modification
RFP	Red Fluorescente Protein
RSF	Remodeling and Spacing Factor
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SANT domain	Domaine commun à Swi3, Ada2, N-Cor, and TFIIB
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate
siRNA	short interfering RNA
SLBP	Stem-Loop Binding Protein
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAD	Topologically Associating Domains
TSS	Transcription Start Site
γ -TURC	γ -TUBulin Ring Complex

Liste des Figures

Introduction

- Figure A1** | Le nucléosome
- Figure A2** | Les histones de coeur
- Figure A3** | Structure de la particule de coeur du nucléosome
- Figure A4** | Niveaux de compaction de la molécule de l'ADN par la chromatine
- Figure A5** | Les modifications post-traductionnelles des histones
- Figure A6** | Les remodeleurs de la chromatine
- Figure A7** | Les chaperonnes d'histones
- Figure A8** | Les histones canoniques et les histones variants
- Figure A9** | Ensemble des histones de la classe H3
- Figure A10** | Le cycle cellulaire
- Figure A11** | La mitose
- Figure A12** | Le kinétochore
- Figure A13** | Les différents types d'attachements des chromosomes au fuseau mitotique
- Figure A14** | Organisation de l'ADN des régions centromériques
- Figure A15** | Conservation inter espèces de la séquence du variant CENP-A
- Figure A16** | Déposition et maintenance de CENP-A aux centromères durant le cycle cellulaire
- Figure A17** | Fonctionnement du CCAN
- Figure A18** | Structure du nucléosome octamérique contenant le variant CENP-A
- Figure A19** | Différences dans la structure des nucléosomes CENP-A et H3

Matériel et Méthodes

- Table M1** | Liste des amorces
- Table M2** | Liste des lignées cellulaires humaines
- Table M3** | Liste des lignées cellulaires murines
- Table M4** | Liste des anticorps primaires

Résultats

- Figure R1** | Presence of CENP-A interferes with histone H1 binding to the nucleosome
- Figure R2** | Efficient in vitro and in vivo binding of histone H1 swapped $\alpha_{N_{H3}}$ helix mutant CENP-A nucleosome
- Figure R3** | Histone H1 binds in vivo to the $\alpha_{N_{H3}}$ -CENP-A swapped nucleosomes, but not to WT CENP-A particles
- Figure R4** | The replacement in HeLa cells of WT CENP-A with the swapped $\alpha_{N_{H3}}$ -CENP-A mutant at the centromere results in strong mitotic and cytokinetic defects

Figure R5 | The replacement in MEFs of WT CENP-A with the swapped α N_{H3}-CENP-A mutant at the centromere results in strong mitotic and cytokinetic defects

Figure R6 | The incorporation of swapped α N_{H3}-CENP-A mutant in the centromeres affects the localization pattern of CENP-C

Figure S1 | SDS gel of purified recombinant histones used for nucleosome reconstitution

Figure S2 | Galleries showing representative micrographs of conventional and CENP-A reconstituted centrally positioned nucleosomes

Figure S3 | Proteins identified in nucleosomal complexes of WT CENP-A and α NH3-CENP-A mutant by mass spectrometry

Figure S4 | Quantification of the percentage of centromeres showing CENP-T staining in HeLa cell lines

Discussion et Perspectives

Figure D1 | Schéma récapitulatif des résultats obtenus

Figure D2 | Modèles de l'organisation de la chromatine centromérique

Figure D3 | Modèle simplifié de l'organisation du kinétochore durant la mitose

Figure D4 | Structure du complexe CENP-B avec 21 pb d'ADN

Figure D5 | Control de l'incorporation de CENP-A

Figure D6 | Fonctions de la transcription des régions centromériques

*Through all the years of experimenting
and research, I never once made a discovery. I
start where the last man left off.*

Thomas EDISON

Première Partie

Introduction

Chapitre 1

La chromatine: Une structure dynamique

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'information génétique des cellules eucaryotes. Elle a été identifiée en 1881 par Walther Flemming qui la nomma ainsi en raison de son affinité pour les colorants. La chromatine a pour fonction primaire la compaction de l'ADN dans un faible volume afin de permettre à celui-ci de tenir dans l'espace restreint d'une cellule. De par sa structure et sa composition, la chromatine permet également la protection de l'ADN contre les dommages, le contrôle de l'expression des gènes et la réplication de l'ADN. Elle correspond donc à l'association entre l'ADN, les ARN et un certain nombre de protéines. Sa composition globale comprend un tiers d'ADN et deux tiers de protéines. La moitié de cette fraction protéique est composée de petites protéines très basiques appelées histones, l'autre moitié étant composée de protéines diverses appelées par opposition « protéines non-histones ».

1.1 Le nucléosome

Le nucléosome représente l'unité de répétition fondamentale de la chromatine. La particule de cœur du nucléosome ou *nucleosome core particle* (NCP) est constituée d'un fragment de 147 paires de bases d'ADN qui viennent s'enrouler autour d'un octamère d'histones (Luger et al., 1997) (Figure A1). Les particules de cœur sont ensuite connectées entre elles par de l'ADN non enroulé, nommé ADN de liaison et pouvant comporter jusqu'à 80 paires de bases. Au sens strict du terme, un nucléosome est défini comme l'addition d'une particule de cœur avec l'ADN de liaison, bien qu'il soit souvent utilisé pour désigner la particule de cœur. Enfin l'addition de l'octamère d'histones, d'une histone de liaison et de 166 paires de bases d'ADN de liaison forme le chromatosome (Figure A1).

1.1.1 Les histones

Les histones représentent environ la moitié de la composition protéique de la chromatine. Ce sont de petites protéines d'environ 15 kDa qui sont toutes très basiques. Il en existe cinq familles, H1, H2A, H2B, H3 et enfin H4. Les histones de la famille H1 sont dites histones de liaison et participent à la formation du chromatosome (Figure A1). Les quatre autres familles composent l'octamère d'histones au centre de la particule de cœur et sont donc dites histones de cœur.

Les quatre histones de cœur partagent une structure générale identique consistant en un domaine central, globulaire et structuré, auquel vient s'ajouter une queue carboxy-terminale ainsi

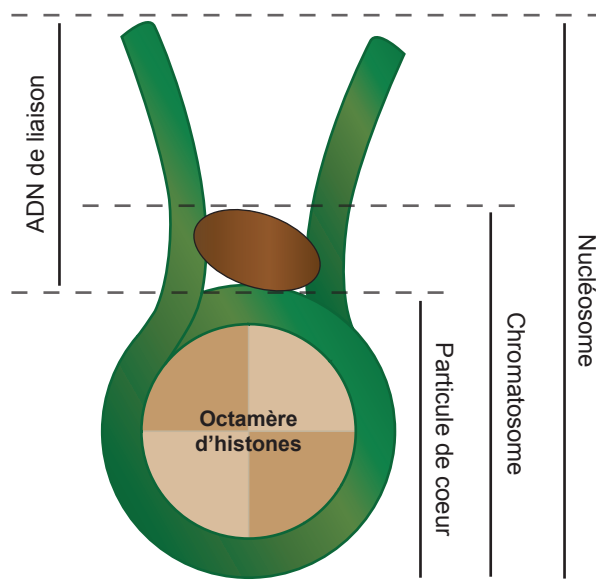


Figure A1 | Le nucléosome. Représentation schématique des différentes sous-parties du nucléosome. La particule de cœur est formée de l'octamère d'histones autour duquel viennent s'enrouler environ 150 paires de base. Le chromatosome est formé par l'association de la particule de cœur avec l'histone de liaison H1.

qu'une queue amino-terminale toutes deux non structurées (Figure A2a). De façon générale, la queue N-terminale est relativement longue alors que la queue C-terminale n'est souvent constituée que de quelques résidus. La caractéristique principale et essentielle du domaine globulaire est la présence de l'*histone fold domain* (HFD). Ce domaine est formé d'une longue hélice α centrale flanquée par deux hélices α plus petites auxquelles elle est reliée par deux courtes boucles (Figure A2b) (Arents et al., 1991). Le domaine HFD permet la dimérisation des protéines qui le contiennent, grâce à une interaction généralement requalifiée de « poignée de main » (Figure A2c) (Arents and Moudrianakis, 1993). Ce motif est, en plus des histones, retrouvé dans un très grand nombre de protéines et il définit la famille des protéines *histone-like*.

Les queues terminales des histones de cœur sont très divergentes entre les quatre familles, mais aussi au sein des variants qui composent une même famille (voir paragraphe 1.4).

Les histones de la famille H1 ne présentent pas de similarité avec les histones de cœur. Ils ont une structure à trois domaines : un domaine N-terminal d'environ 45 résidus, un domaine central globulaire très conservé d'environ 75 résidus ; et un domaine C-terminal d'une centaine de résidus (Happel and Doenecke, 2009). Les domaines N- et C-terminaux des différents sous-types d'histones H1 sont variables en taille et en séquence, mais possèdent tous une proportion importante de résidus basiques. Le domaine C-terminal n'est pas structuré en solution aqueuse, mais gagne une structure secondaire sitôt associé à l'ADN (Roque et al.,

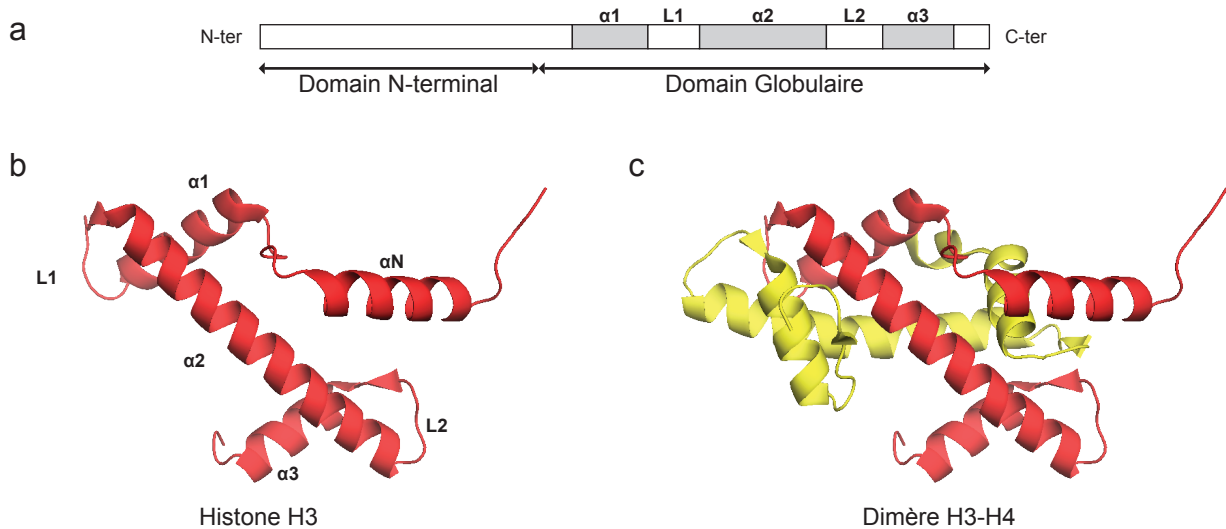


Figure A2 | Structure générale des histones de cœur. (a) Représentation schématique d'une histone de cœur. Les segments en gris indiquent les hélices α du domaine *histone fold*, ces hélices sont séparées par les boucles L1 et L2. (b) Structure du domaine *histone fold* de l'histone H3. (c) Les domaines *histone fold* interagissant selon le motif dit de la « poignée de main » ce qui permet la dimérisation des histones, ici H3-H4.

2005) . Il est également à noter que, bien que conservé, le domaine central globulaire n'est pas un domaine *histone-fold* (Arents and Moudrianakis, 1995) .

1.1.2 La particule de cœur

La particule de cœur est un sous-ensemble du nucléosome défini originellement par la protection de l'ADN contre la digestion par des nucléases. Elle se forme autour d'un cœur protéique composé de deux exemplaires de chacune des histones de cœur. Autour de ce cœur protéique s'enroulent 147 paires de bases d'ADN sur environ un tour trois quart (Figure A3).

Il est possible de former des dimères H2A-H2B et H3-H4 via l'interaction entre eux des domaines *histone-fold* des deux histones impliquées. L'octamère d'histones provient ensuite de l'assemblage de deux dimères H3-H4 et de deux dimères H2A-H2B. Les deux dimères H3-H4 s'associent via une interaction entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des deux histones H3, formant un tétramère (H3-H4)₂. Chaque dimère H2A-H2B s'associe ensuite séparément au tétramère via une interaction entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ appartenant respectivement aux histones H2A et H4 (Luger et al., 1997). Les interactions en poignée de main entre chaque paires d'histones provoquent la formation de ponts β entre les boucles L1 et L2. Ces ponts constituent une partie des sites de liaison à l'ADN. L'association entre l'octamère d'histones et le fragment d'ADN

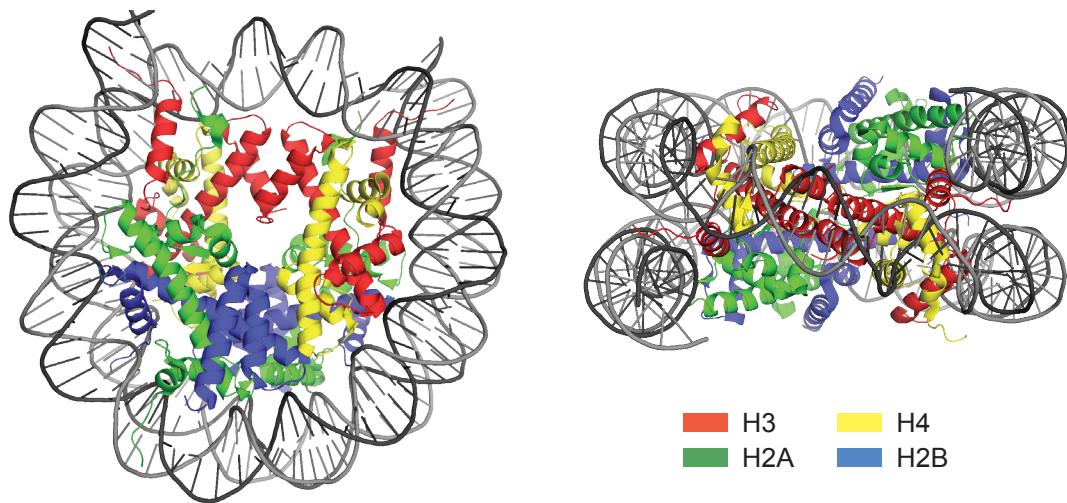


Figure A3 | Structure de la particule de cœur du nucléosome. Cette structure a été résolue par cristallographie aux rayons X (Luger et al, 1997). Représentée ici la structure PDB 3AFA de Tachiwana et al, 2011. Le tétramère (H2A-H2B)₂ s'associe avec deux dimères H3-H4 et forme l'octamère des histones de cœur, autour duquel viennent s'enrouler environ 150 paires de base d'ADN.

est principalement le fait de l'insertion des chaînes latérales des résidus arginine dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN (Harp et al., 2000).

1.1.3 Le chromosome

Le chromosome est formé via l'association d'une histone de liaison H1 à la particule de cœur (van Holde and Zlatanova, 1999). Dans ce cas, l'histone H1 lie l'ADN au niveau où celui-ci entre et sort de la particule de cœur (Syed et al., 2010). Elle induit le rapprochement des ADN de liaison entrant et sortant sur une trentaine de paires de bases, limitant fortement leurs mouvements et verrouillant ainsi le nucléosome dans une position fermée. Ce faisant, elle contribue à protéger environ 20 paires de bases supplémentaires en plus des quelques 147 associées à la particule de cœur. On considère donc que le chromosome contenant H1 comporte donc 166 paires de bases.

D'autres protéines que des histones sont susceptibles de lier les ADN de liaison. Il a été proposé de les désigner collectivement « protéines de liaison », et d'étendre la définition du chromosome pour inclure toute association d'une particule de cœur avec une protéine de liaison, qu'il s'agisse ou non d'une histone (Zlatanova et al., 2008). La présence d'une histone

ou d'une autre protéine de liaison, influe sur les propriétés du nucléosome, mais surtout sur la capacité de la fibre de chromatine à former des niveaux supérieurs d'organisation structurale.

1.2 Organisation supérieure de la chromatine

De part sa fonction même, compacter l'ADN, l'organisation structurale et spatiale est l'une, sinon la caractéristique majeure de la chromatine.

Dans ce contexte de la chromatine, un niveau d'organisation supérieur désigne tout assemblage de nucléosomes adoptant une conformation spatiale reproductible. Les concepts de structures primaires, secondaires et tertiaires peuvent être appliqués à la structure de la chromatine (Woodcock and Dimitrov, 2001). L'enchaînement des nucléosomes constituant la structure primaire, puis les interactions entre nucléosomes donnant lieu à des structures secondaires puis tertiaires. On peut ainsi définir la fibre de 10 nm, qui correspond à l'enchaînement des nucléosomes, la fibre de 30 nm qui correspond à l'organisation des nucléosomes entre eux, et enfin l'organisation générale de la chromatine en interphase, ou encore la spectaculaire condensation des chromosomes métaphasiques (Figure A4). Ce dernier étant le parfait exemple de la relation structure-fonction dont est capable la chromatine.

1.2.1 La fibre de 10 nm

Le premier niveau d'organisation de la chromatine est simplement caractérisé par l'enchaînement des nucléosomes le long de l'ADN. Cet enchaînement forme la fibre de chromatine de 10 nm nommée ainsi de part la taille apparente de la structure (Figure A4). De façon plus imagé il est commun de parler de « collier de perles », en raison de l'apparence de cette structure lorsqu'elle est observée en microscopie électronique. Les particules de cœur représentent les perles réparties de façon relativement uniforme sur la longueur du collier d'ADN. Dans la réalité, les particules de cœur sont séparées entre elles par un segment d'ADN de liaison dont la taille peut varier entre 20 et 80 paires de bases, selon l'espèce ou le tissu observé. La fibre de 10 nm est la première structure chromatinienne caractérisée *in vitro*, puisqu'elle est observée pour la première fois dans les années 1970, néanmoins il est peu probable qu'elle soit conservée telle quel *in vivo* (Hansen, 2002).

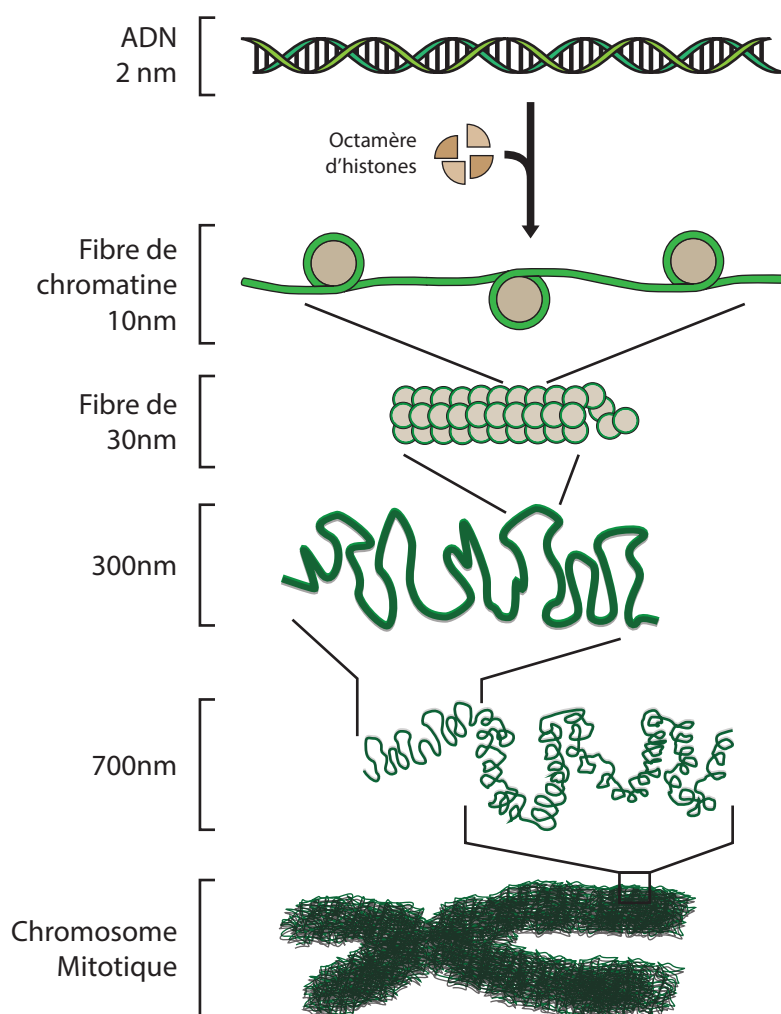


Figure A4 | Niveaux de compaction de la molécule de l'ADN par la chromatine. La double hélice d'ADN surenroulée autour des nucléosomes va former le nucléofilament ou fibre de chromatine de 10 nm. Le surenroulement de cette structure va former la fibre de 30 nm. Celle-ci est surenroulée durant l'interphase à différents niveaux. Le dernier niveau d'organisation correspond au chromosome mitotique : c'est le niveau de compaction le plus élevé (D'après Felsenfeld and Groudine, 2003).

1.2.2 La fibre de 30 nm

Le niveau suivant d'organisation théorique est représenté par la fibre de 30 nm (Figure A4). Celle-ci a également été mise en évidence *in vitro* dans des conditions physiologiques de salinité et de pH, et surtout en présence de l'histone de liaison H1. De nombreux modèles ont été débattus concernant l'organisation des nucléosomes entre eux dans cette fibre, et aujourd'hui encore, aucun d'entre eux ne parvient à faire l'unanimité.

Deux principaux modèles d'organisation coexistent aujourd'hui. Le premier modèle initialement décrit par Finch et Klug proposait une organisation dite en « solénoïde » (Finch and Klug, 1976). Dans ce modèle, la fibre de 10 nm s'enroule en une simple hélice, ainsi les nucléosomes consécutifs se retrouvent donc en position adjacente (Robinson and Rhodes, 2006). Le second modèle fut proposé suite aux observations de Woodcock (Woodcock et al., 1984). Ce modèle est dit « zig-zag » : les nucléosomes consécutifs se retrouvent de manière alternée de chaque côté de la fibre, formant une double hélice en zig-zag (Bednar et al., 1998).

Cependant les deux modèles possèdent le même inconvénient, ils sont tout deux majoritairement basés sur des observations *in vitro*. Certains travaux ont donc suggéré par la suite la coexistence de différentes structures *in vivo* (Grigoryev et al., 2009; Tremethick, 2007) Dans ce cas, la formation de l'une ou l'autre des structures serait déterminée par le contexte dans lequel la chromatine se trouve. Dans ce cadre le « contexte » comprenant les propriétés physico-chimique du nucléosome, mais et surtout, la présence de protéines auxiliaires (Hansen, 2002).

En effet, la structure du nucléosome, en particulier ses extensions amino-terminales, peuvent à elles seules permettre le repliement de la fibre de 10 nm en fibre de 30 nm. En particulier la queue N-terminale de H4 interagit avec une cavité acide formée en surface d'un autre nucléosome par l'histone H2A (Dorigo et al., 2003) et permet ainsi les interactions nucléosome-nucléosome. Dans ce cadre, la présence de l'histone de liaison n'est pas nécessaire à la formation de fibres de 30 nm (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005). L'histone H1 aurait alors un rôle de maintien de la structure, agissant comme un cadenas pour verrouiller le nucléosome.

1.2.3 Repliement inter et intra chromosomique

À l'heure actuelle, il est donc impossible de déterminer avec certitude la structure *in vivo* de la fibre de 30 nm, ni même si celle-ci existe réellement. Néanmoins l'apparition de nouvelles techniques a permis de regarder comment la chromatine s'organise à l'échelle du noyau entier, ou plus récemment à l'échelle de *loci* chromosomiques.

Initialement, la chromatine a été séparée en deux variétés : hétérochromatine et euchromatine. Cette distinction a été permise du fait que les deux formes étaient colorées de façon différente sur les chromosomes mitotiques : le marquage de l'euchromatine est peu intense, alors que le marquage de l'hétérochromatine est plus intense, suggérant une densité plus forte de la chromatine. L'euchromatine englobe ainsi les régions où la chromatine est peu compactée, généralement considérées comme favorisant la transcription des gènes. À l'opposé, il s'est

avéré que l'hétérochromatine était majoritairement constituée de régions satellites répétées (Lohe et al., 1993) considérées comme inactives au niveau de la transcription des gènes. Il existe de nombreuses formes d'hétérochromatine, par exemple les régions télomériques, mais également les centromères qui appartiennent à l'hétérochromatine constitutive, tandis que le corps de Barr est lui une région d'hétérochromatine facultative. Chacun de ces trois exemples possédant ensuite des caractéristiques distinctes qui leur sont propres.

Il existerait également une organisation globale de l'ADN dans le noyau des cellules interphasiques. Par exemple, on retrouve généralement l'hétérochromatine à la périphérie du noyau, proche des membranes nucléaires. Cette organisation peut toutefois être différente, dans les cellules murines, la coloration de l'ADN révèle des régions de forme circulaire plus denses réparties de façon équitable dans le noyau, le reste de celui-ci étant moins denses. Les régions plus denses correspondent à de l'hétérochromatine. Il existe donc également une organisation spatiale de la chromatine en interphase, cette organisation étant visiblement liée à un certain niveau de fonctionnalité.

Il s'avèrerait en effet que chaque chromosome soit régionalisé dans le noyau, formant des territoires chromosomiques (*Chromosomes Territories* ou CT) (Cremer et al., 2006). De nombreux modèles s'affrontent aujourd'hui pour savoir comment s'organise la fibre de chromatine au sein des CTs. Une évidence reste certaine : les CTs sont différents selon les types cellulaires ou les différents stades du développement, ceci démontrant le rôle majeur de l'organisation intranucléaire dans la régulation de l'expression des gènes à l'échelle globale. Par exemple l'inactivation du chromosome X dans les cellules embryonnaires nécessiterait une co-localisation de deux *X inactivation centers* (Xic) antérieure à l'inactivation elle-même (Xu et al., 2006). Cette co-localisation est nécessaire pour que la cellule puisse déterminer le nombre de Xic en présence et ainsi autoriser l'initiation de l'inactivation (Bacher et al., 2006).

Les observations des territoires chromosomiques étaient basées majoritairement sur des résultats de FISH ou de 3C (*Chromosomal Conformation Capture*). La résolution et la proportion du génome observable étaient donc limitée. L'apparition de l'Hi-C en 2009 (Lieberman-Aiden et al., 2009) a alors permis un début de réponse concernant l'organisation de la chromatine à des échelles plus restreintes. Une meilleure résolution (Dixon et al., 2012) ainsi que des données de 5C (Nora et al., 2012) ont ainsi mis en évidence que le génome était organisé en régions de « haute interaction » d'environ 1 Mb nommé *topologically associating domains* (TAD). L'idée étant que des régions interagissant facilement ensemble par leur proximité physique

pourraient avoir une régulation commune. Par exemple cela permet la régulation commune d'un ensemble de gènes spécifiques d'un type cellulaire particulier, alors que ces gènes sont répartis à différents endroits du génome.

On sait donc aujourd'hui que ces TAD existent et possèdent un rôle fonctionnel important dans la régulation de l'expression des gènes. Toutefois, les connaissances actuelles sur la façon dont la cellule régule la formation ou le maintien des TAD sont très limitées. Il est par contre certain que la compaction des chromosomes en mitose perturbe cette organisation qui doit être rétablie par la suite (Kadauke et al., 2013).

1.2.4 Le chromosome mitotique

En effet au début de la mitose, l'ensemble de la chromatine est réorganisée et adopte une conformation de compaction maximale (Figure A4). La chromatine apparaît alors sous la forme des chromosomes mitotiques. La représentation typique d'un chromosome mitotique est le «X» : les deux chromatides sœurs sont maintenues à proximité l'une de l'autre par des cohésines au niveau des centromères, au centre du X. Aux extrémités de chaque chromatide se trouvent les télomères qui permettent de protéger l'ADN. Sous cette forme l'ADN est ultra-condensé : les 246 millions de bases du chromosome n°1 humain peuvent alors être contenues dans un chromosome de seulement 2 μm de large pour 10 μm de long.

Pourtant, la structure de la chromatine au sein des chromosomes mitotiques est aujourd'hui largement controversée. Les premiers modèles proposés supposaient que les fibres de 30 nm formaient des boucles de 50 à 100 kb d'ADN de long et étaient fixées à un squelette de protéines non-histones (Marsden and Laemmli, 1979). Les modèles suivants se basent sur un repliement hiérarchique de la chromatine. La fibre de 30 nm s'enroulerait alors en fibres plus épaisses, qui elles-mêmes s'enrouleraient en fibres de niveau supérieur (Belmont et al., 1987).

Tout ces modèles et leurs différentes variations sont basés sur des repliements en niveaux supérieurs de la fibre de 30 nm. Or un nombre grandissant de travaux remettent en cause même la présence de ce niveau d'organisation de la chromatine dans le chromosome mitotique (Eltsov et al., 2008).

Avec ou sans fibre de 30 nm, l'organisation de la chromatine dans le chromosome mitotique dépendrait de l'arrangement des fibres par un squelette axial (Almagro et al., 2004 ; Kireeva et al., 2004) composé par les protéines de maintenance structurelle des chromosomes (SMC

pour *Structural Maintenance of Chromosome*). En particulier les condensines I et II sont spécifiquement régulées lors de la formation du chromosome mitotique (Ono et al., 2004).

La compaction et également la structure de la chromatine est également variable pendant les différentes phases de mitose. En début de prophase les chromosomes se condensent et les chromatides sœurs s'organisent autour d'une seule boucle linéaire, alors qu'en fin de prophase le niveau de compaction est légèrement diminué permettant la rotation de ces boucles dans un axe central nécessaire à une métaphase correcte (Liang et al., 2015).

La mitose, et donc la structure du chromosome mitotique, est associée à une absence presque totale de transcription. De façon curieuse cette absence de transcription ne provient pas directement du niveau de compaction de l'ADN sous la forme des chromosomes mitotiques. En effet cela n'entraîne pas une perte totale de l'accessibilité de l'ADN aux différents facteurs de transcription (Chen et al., 2005). Il semblerait que ce soit plutôt le fait que la structure de la chromatine soit relativement « figée » durant la mitose, en particulier la RNA polymérase ne peut plus glisser le long du brin d'ADN (Parsons et al., 1997).

1.3 La chromatine - une structure dynamique

La compaction de la chromatine sous la forme du chromosome mitotique permet de mettre en évidence que la chromatine n'est pas une structure figée dans le temps. Sa réorganisation totale ou partielle lui confère de nouvelles propriétés fonctionnelles permettant notamment la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN. Trois mécanismes principaux permettent ce dynamisme de la chromatine : le déplacement ou le retrait des nucléosomes par des complexes de remodelage, la modification post-traductionnelle (PTM pour *Post-Traductionnal Modification*) des histones et l'incorporation de variant d'histone au sein de la particule de cœur.

1.3.1 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont la cible d'un très grand nombre de modifications post-traductionnelles (Figure A5). Ce phénomène fut découvert dès les années 1960 (Allfrey et al., 1964, Pogo et al., 1966). Une majorité de ces modifications porte sur les extrémités amino-terminales des histones, facilement accessibles, mais le cœur du nucléosome peut également être affecté. Certaines de ces modifications sont associées spécifiquement à des processus comme la transcription, la

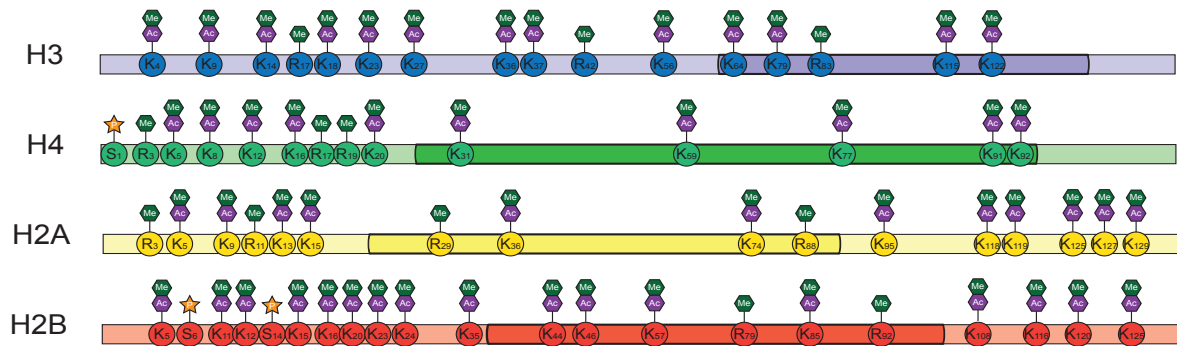


Figure A5 | Les modifications post-traductionnelles des histones. Schéma des principales modifications post-traductionnelles des histones H2A, H2B, H3 et H4. Sont uniquement représentées les acétylations, méthylations et phosphorylations. La plupart de ces modifications sont situées sur l'extrémité N-terminale des histones, mais le domaine globulaire ainsi que l'extrémité C-terminale possèdent également certaines de ces marques.

réparation de l'ADN ou la condensation de la chromatine. Néanmoins la plupart du temps, plusieurs modifications sont nécessaires pour observer un effet, certaines ayant aussi des effets opposés. Le code histone a alors été imaginé (Strahl and Allis, 2000). Il devait permettre de lier un ensemble de modifications à un signal émis par la chromatine, mais la rapidité dans le dynamisme de ces modifications rend leur interprétation difficile.

Dans la majorité des cas, l'objectif des PTMs est le recrutement de protéines spécifiques par le nucléosome ainsi modifié au niveau de la chromatine (Bannister and Kouzarides 2011). Toutefois certaines PTMs permettent une modification structurelle du nucléosome, en diminuant son affinité pour l'ADN (Tropberger and Scheinder, 2013) ou en facilitant son remodelage (Chatterjee et al., 2015).

Il existe aujourd'hui un minimum de 15 PTMs différentes identifiées. Il y a donc un nombre équivalent de familles d'enzymes permettant d'apposer ces marques ou de les retirer. Les plus étudiées sont les histones acétyltransferases (HAT) / déacétylases (HDAC) pour les acétylations, les histones méthyltransferases (HMT) / déméthylases (HDM) pour les méthylations. Ces deux marques, ainsi que la phosphorylation, l'ubiquitination sont également les PTMs les plus étudiées; les paragraphes suivants proposent une description non exhaustive de leurs implications (Figure A5).

L'acétylation des histones se fait sur le groupement amine des résidus lysines. Ce type de modification permet de neutraliser la charge du résidu. Les acétylations se font principalement sur l'extrémité N-terminale de H3 et H4. L'acétylation va alors changer l'interaction du couple H3-H4 avec l'ADN (Hong et al., 1993), ceci facilitant l'accès à l'ADN. C'est pour cette raison

que l'acétylation est associée avec une activation de la transcription et qu'à l'opposé, une hypoacétylation est souvent décrite dans la chromatine transcriptionnellement inactive (Katan-Khaykovich and Struhl 2002). De plus, l'analyse de mutants pour l'ensemble des lysines a révélé qu'aucun de ces résidus n'est spécifiquement nécessaire à la transcription, mettant en évidence l'influence de la charge générale de l'extrémité terminale plutôt que l'acétylation d'une lysine spécifique (Martin et al., 2004 ; Dion et al., 2005).

Les lysines peuvent également être mono, di ou tri méthylées. Contrairement aux acétylations, ces modifications ne montrent pas de consensus dans leur fonction et la position du résidu méthylé est extrêmement importante pour la fonction. Les méthylations des lysines H3K4, H3K36 et H3K79 sont associées à une transcription active (Hon et al., 2009) alors qu'à l'opposé la méthylation des lysines H3K9, H3K27 et H4K20 est reconnue pour être associée avec une répression de la transcription. En effet la présence de ces marques permet le recrutement de protéines nécessaires à la formation d'hétérochromatine. H3K9me2 ou H3K9me3 permet le recrutement de HP1 (Bannister et al., 2001 ; Canzio et al., 2011), alors que H3K27me est associée au recrutement des protéines Polycomb (Fishle et al., 2003).

De façon générale, la phosphorylation est une modification par laquelle un très grand nombre de signaux transiente dans les cellules. Au contraire, dans la chromatine, le rôle des phosphorylations peut sembler plus faible comparé aux autres modifications, principalement du fait du faible nombre des résidus pouvant subir cette modification. Le cas le plus étudié est sans doute la phosphorylation de H2A.X (un variant de H2A) qui est un prérequis aux mécanismes de réparation des cassures doubles brins de l'ADN (Paull et al., 2000).

Les phosphorylations sont également clés dans la régulation de la structure de la chromatine pendant la mitose. La phosphorylation de H3S10 et H3S28 est nécessaire dans la condensation des chromosomes en début de mitose (Hans and Dimitrov, 2001). En particulier la phosphorylation H3S10 permet le recrutement de Hst2p, une histone déacétylase, qui retire un groupement acétyl de la lysine 16 de H4. L'extrémité N-terminal de H4 peut alors interagir avec la même extrémité du nucléosome voisin et permet la condensation de la chromatine (Wilkins et al., 2014).

De façon générale, la présence ou l'absence de PTMs permet donc de réguler l'interaction des nucléosomes entre eux et avec des facteurs extérieurs (facteurs de transcription, protéines de réparation...), ou encore la force de l'association entre le nucléosome et l'ADN. Elles sont donc un élément clé dans le remodelage de la chromatine.

1.3.2 Le remodelage de la chromatine

Facteurs de remodelage

Le remodelage de la chromatine est possible grâce à l'action de complexes appelés facteurs de remodelage. La sous-unité catalytique de ces complexes est une ATPase, qui utilise l'énergie dégagée par l'hydrolyse d'ATP pour modifier les interactions entre l'ADN et les histones. Ces modifications permettent soit le déplacement du nucléosome le long de l'ADN, soit le retrait du nucléosome (Venkatesh and Workman, 2015). Le retrait du nucléosome peut être suivi de son remplacement par un autre nucléosome contenant un variant d'histone.

Il existe quatre familles de remodeleurs de la chromatine. Elles sont définies en fonction des propriétés portées par la sous-unité ATPasique (Figure A6).

La famille SWI/SNF (SWitch/Sucrose Non-Fermentable) est définie par la présence d'un domaine N-terminal SANT ainsi qu'au moins un bromo-domaine dans la partie C-terminale (Figure A6). Les premiers membres de cette famille ont été découverts initialement chez la levure (Cairns et al., 1994 ; Cote et al., 1994). Plus tard ils ont été impliqués dans l'ensemble des mécanismes nécessitant un remodelage : transcription, développement, réparation de l'ADN, réplication...

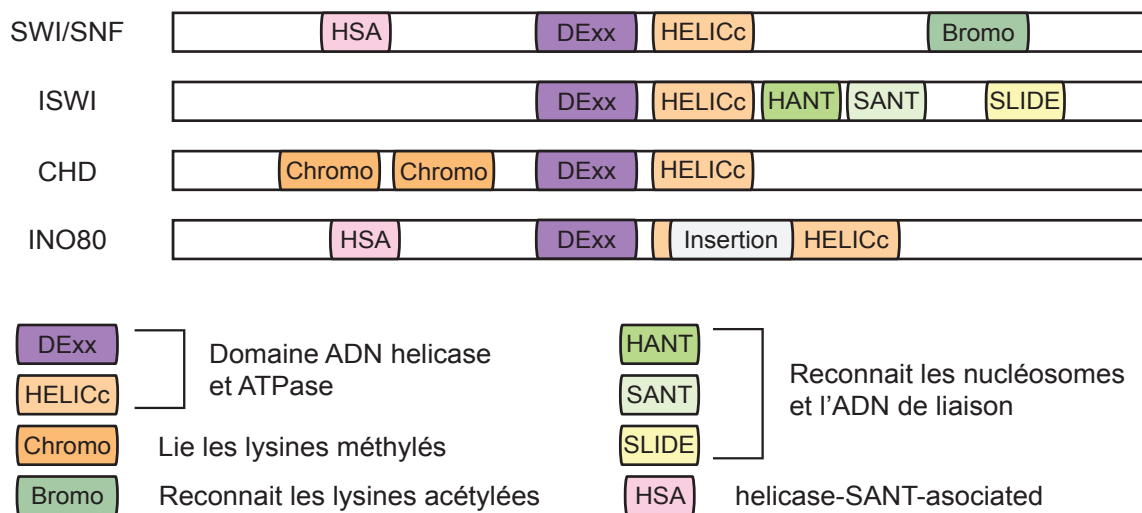


Figure A6 | Les remodeleurs de la chromatine. Organisation des familles de remodeleurs définies par leur domaine catalytique et par leurs domaines caractéristiques. Tous les facteurs de remodelage possèdent un unique site portant l'activité ATPasique nécessaire au remodelage. Leurs spécificités sont ensuite apportées par la présence des autres domaines. (Adapté de Langst et Manelyte, 2015).

Les membres de la famille INO80 (INOsitol requiring 80-SWi) possèdent la même organisation : leur domaine ATPasique est discontinu et possède un « spacer » au milieu de sa séquence (Figure A6). Ceci semble permettre l'interaction avec les protéines Rvb1 ou Rvb2 et ajoute une activité d'hélicase au complexe. Les membres de la famille INO80 sont également impliqués dans la régulation de la transcription. De façon plus spécifique, ils sont responsable de la régulation de l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine (Mizuguchi et al., 2004). Ils sont également impliqués dans les mécanismes de réparation en particulier ceux des cassures doubles brins (Morrison et al., 2004 ; van Attikum et al., 2004).

La famille CHD (Chromodomain-Helicase-DNA binding) est définie par la présence d'au moins un chromodomaine, le plus souvent en position N-terminale (Figure A6), ces domaines pouvant reconnaître de façon spécifique les histones méthylées. Les membres de la famille CHD sont donc principalement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (Murawska and Brehm, 2011), et possèdent notamment un rôle important pour le développement (Khattak et al., 2002). NURD (NUcleosome Remodelling and Deacetylase) est un membre particulier de cette famille, en effet en plus de son activité ATP-asiq, il possède de façon constante une sous-unité HDAC (*Histone deacetylase*) (Kehle et al., 1998) et permet donc une déacétylation des histones, ceci pouvant être associé avec une activité de répression de la transcription.

La famille ISWI (Imitation SWItch) est reconnaissable à la présence de deux domaines SANT dans la région C-terminale, mais se distingue de la famille SWI/SNF par l'absence de bromodomaine (Figure A6). Cette famille est également impliquée dans la régulation de la transcription, mais pour ce faire elle est capable de reconnaître les queues de l'histone H4 (Clapier and Cairns, 2009). Parmi les membres de cette famille, on peut citer ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) qui régule l'espacement entre les nucléosomes en conjugaison avec la chaperonne NAP1. ACF est également capable de déposer *de novo* des octamères d'histones sur l'ADN après la phase de réplication. Chez l'homme RSF (*Remodeling and Spacing Factor*) est un second complexe qui possède les mêmes fonctions que hACF, à l'heure actuelle ils n'ont pas de fonction différente identifiée. Ils sont donc considérés comme complémentaires.

Chaperonnes

En plus de l'utilisation des facteurs de remodelage, la manipulation des histones nécessite également la présence de chaperonnes. Les histones portent un grand nombre de charges positives. L'ADN étant lui chargé négativement, les histones peuvent donc facilement

interagir avec lui. Mais les charges positives des histones sont aussi potentiellement capables d'interactions indésirables avec tous les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires chargés. Afin de contourner ce problème, les histones ont besoin d'être escortées, c'est le rôle des chaperonnes d'histones (Hondele et Ladurner, 2011). Ce sont des protéines qui protègent la charge en interagissant avec les surfaces hydrophobes des histones, après leur synthèse jusqu'à l'assemblage des nucléosomes, mais également après éviction des nucléosomes par les facteurs de remodelage (Figure A7). Les histones libres sont donc fondamentalement inexistantes dans le contexte cellulaire.

Les chaperonnes peuvent être différenciées selon la fonction qu'elles occupent. Certaines telles que le complexe FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*), ou NAP1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*), sont capables de lier à la fois les dimères de H3-H4 ou H2A-H2B (Winkler et Luger, 2011), certaines ne peuvent lier qu'un seul dimère tel que CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor-1*) pour H3-H4. Enfin certaines chaperonnes ne sont utilisées que par les dimères contenant des variants d'histones. C'est le cas de HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) qui est impliquée dans la déposition du variant CENP-A (Foltz et al., 2009), ou HIRA (*Histone regulator A*) et DAXX pour le variant H3.3 (Loppin et al., 2005). De façon intéressante HJURP est la seule chaperonne capable de déposer CENP-A alors que le dimère H3.3-H4 peut également être déposé par les chaperonnes déposant le dimère canonique H3-H4 tel que ASF-1. Cette redondance s'explique par la façon dont les chaperonnes se lient aux histones. NAP1 interagit avec l'*histone fold* commune à l'ensemble des histones, elle n'est donc pas capable de différencier les dimères H2A-H2B des H3-H4. À l'inverse ASF-1 interagit avec le domaine de tétramérisation présent entre H3 et H4 (English et al., 2005 ; Antczak et al., 2006). Cette chaperonne ne peut donc pas lier H2A-H2B, mais reconnaît par contre le dimère H3.3-H4 qui possède ce même domaine, elle ne peut donc pas faire la différence avec ce variant (Green et al., 2005). Les chaperonnes qui sont capables de reconnaître spécifiquement un variant font la distinction en liant une chaîne présente seulement dans ce variant, c'est le cas pour la reconnaissance de CENP-A par HJURP qui nécessite le CATD (*CENP-A targeting domain*), un domaine présent uniquement dans CENP-A (Shuaib et al., 2010).

En plus de la spécificité pour un dimère, certaines chaperonnes ne sont impliquées que dans une seule fonction, NASP (*Nuclear Autoantigenic Sperm Protein*) permet principalement le stockage des histones dans le noyau après leur synthèse (Cook et al., 2011). Cette spécificité de fonction peut également être dans l'incorporation ou l'éviction du nucléosome. C'est par

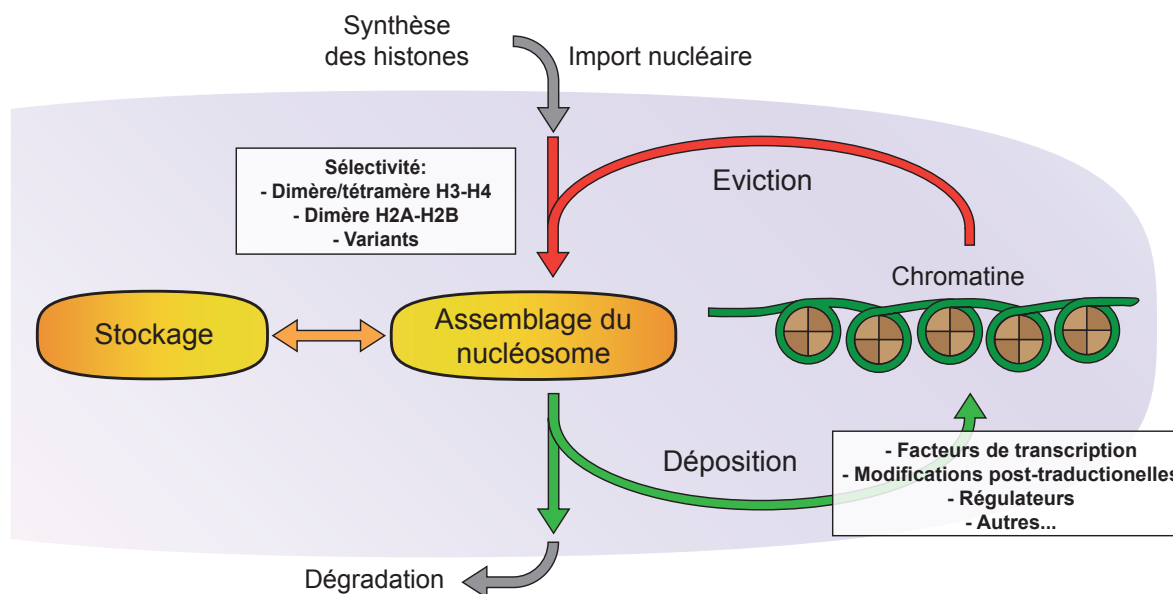


Figure A7 | Les chaperonnes d'histones. Schéma représentant les différentes fonctions des chaperonnes d'histones. Une chaperonne donnée peut posséder une sélectivité pour un dimère d'histones particulier. Pour un dimère donné, chaque fonction séparée peut être conduite par une même ou par différentes chaperonnes. Chacune de ses fonctions est également contrôlée par différents partenaires (PTMs, facteurs de remodelage...).

exemple le cas de ANP32E qui permet l'éviction de H2A.Z (Obri et al., 2014), mais pas son incorporation, pour laquelle aucune chaperonne n'est actuellement identifiée chez l'homme.

Les chaperonnes sont donc des éléments clés dans la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN ou la réplication. De plus, de facteurs passifs servant à transporter les histones, elles sont aujourd'hui considérées comme au cœur des modifications post-traductionnelles (Avvakumov et al., 2011). En effet les chaperonnes sont aussi bien nécessaires à l'établissement de ces marques qu'à leur propagation dans la chromatine.

1.4 Les variants d'histones

1.4.1 Histones conventionnelles

Il apparaît ainsi que les caractéristiques essentielles de la chromatine lui sont apportées par l'octamère d'histones et les modifications post-traductionnelles de ceux-ci.

Les histones majoritaires sont appelées histones conventionnelles ou canoniques. Par définition ils ont leur expression et leur incorporation qui est couplée à la réplication.

Les gènes codant les histones conventionnelles sont particuliers pour des gènes eucaryotes. Ces gènes sont présents en de multiples copies et sont organisés sous formes de clusters. Chez l'homme il existe 3 clusters codant pour ces gènes : HIST1 sur le chromosome 6 qui possède 55 gènes, HIST2 et HIST3 sur le chromosome 1 qui codent respectivement pour 6 et 3 gènes (Marzluff et al., 2002). Il existe également un gène nommé HIST4H4 qui se trouve hors cluster sur le chromosome 12 et qui code pour H4. Cette organisation est conservée chez la souris et probablement chez d'autres mammifères.

Chacun de ces gènes possède des séquences nucléotidiques différentes y compris dans le promoteur et dans la séquence codante. Malgré cela les séquences protéiques sont extrêmement conservées, et si quelques différences existent, ces différences sont généralement conservées entre homme et souris. Il existe 26 gènes codant pour H4, si l'on combine les génomes de l'homme et de la souris. De façon encore plus spectaculaire ces 26 gènes codent exactement la même séquence d'acides aminés.

En plus de gènes particuliers, les histones canoniques possèdent également des ARNm particuliers. En effet les ARNm transcrits depuis ces gènes ne possèdent pas d'intron, et ils sont également les seuls ARNm eucaryotes qui ne possèdent pas de queue poly-adiénylée (Dominski et Marzluff, 1999). À la place, la terminaison est marquée par une structure tige-boucle dont la séquence est fortement conservée entre les espèces. Cette queue est reconnue par une protéine unique : SLBP (*stem-loop binding protein*) qui permet la régulation de la stabilité des ARNm. Cette différence majeure additionnée avec un ensemble de régulations spécifiques permet d'expliquer comment la cellule est capable de produire la forte quantité d'histones dont elle a besoin lors de la réplication.

1.4.3 Définition d'un variant d'histone

L'octamère d'histones porte les caractéristiques structurales essentielles de la chromatine. Pour modifier ces propriétés la cellule peut compter sur les modifications post-traductionnelles, mais également sur le remodelage des nucléosomes. Enfin pour modifier les propriétés et le dynamisme de la chromatine, la cellule peut compter sur une troisième possibilité : l'incorporation de variant d'histones.

En effet, il existe plusieurs sous-types distincts d'histones, les histones conventionnelles et les variants. Ces variants sont caractérisés par :

- une expression indépendante de la réplication

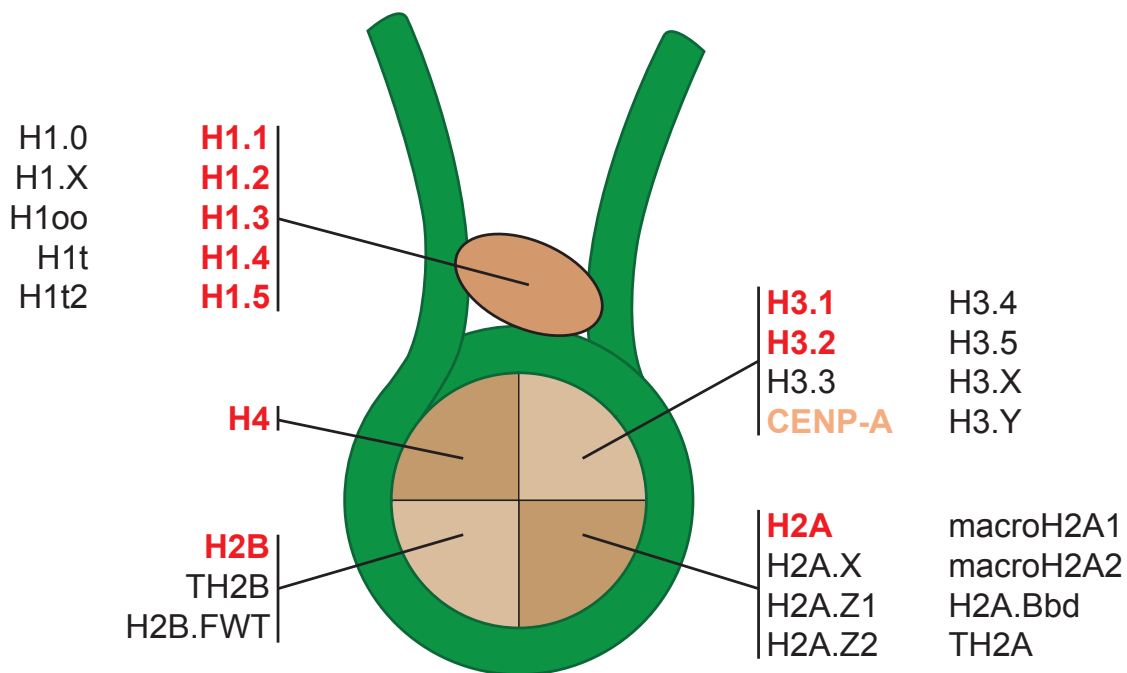


Figure A8 | Les histones canoniques et les histones variants. Représentation schématique des nombreuses histones existants chez l'homme. En rouge sont présentées les histones réplication dépendantes, en noir les histones non réplication dépendantes. Ces dernières possèdent généralement un rôle particulier de part leurs expressions tissus spécifiques (TH2B, H3.4...), dans la structuration de la chromatine (CENP-A), ou encore dans la régulation de la transcription (H3.3, H2A.Z...);

- une expression dépendante du tissu et/ou du stade de développement dans lequel se trouve la cellule.

Il existe des variants pour chacune des familles d'histones, H1, H2A, H2B et H3. L'exception étant à la famille H4 qui ne possède donc aucun variant (Figure A8).

À l'opposé des gènes codant pour les histones conventionnelles, les gènes codant pour les variants sont présents uniquement en une ou deux copies, et ils sont répartis dans l'ensemble du génome. De plus, ils possèdent tous au moins un intron et un signal de poly-adénylation. Il existe une seule exception : le gène codant pour H2A.X qui grâce un épissage alternatif peut aussi posséder la structure tige-boucle propre aux histones canoniques. Les histones codées par ces gènes ont tous la capacité de remplacer l'histone conventionnelle correspondante dans l'octamère du nucléosome. L'incorporation d'un variant confère alors au « nucléosome variant » des propriétés structurales et fonctionnelles distinctes de celles d'un nucléosome conventionnel. Les paragraphes suivants proposent de détailler les spécificités des principaux variants.

1.4.4 Variants de H1

La classe H1 est la famille qui possède le plus de variations entre les différentes protéines qui la compose y compris chez les histones réplication dépendantes (Figure A8). Chez l'homme il existe six histones H1 réplication dépendantes : H1.1 à H1.5 ainsi que H1t dont l'expression est testis spécifique. Il y a donc 5 variants : H1.0, H1t2 également testis spécifique, H1x et enfin deux protéines H1oo obtenu depuis le même gène par épissage alternatif (Izzo et al., 2008).

Toutefois la fonction spécifique de chaque variant individuellement reste très mal connue. Il semblerait plutôt que la présence de différents variants provienne principalement du polymorphisme des gènes obtenus après des événements de duplication. D'après cette hypothèse, le moment ainsi que le tissu dans lequel le variant est exprimé forment la spécificité du variant, plutôt que la séquence de la protéine. En effet la délétion de l'un des gènes codant pour H1 n'est pas létal mais entraîne une augmentation de l'expression des autres gènes. Cette compensation par les autres variants ne se fait pas au hasard, certaines formes sont privilégiées (Gabilovich et al., 2002). Enfin, parfois la structure de la chromatine est affectée (Alami et al., 2003) et l'expression de gènes peut-être modifiée (Fantz et al., 2001). Il existerait donc un rôle commun à l'ensemble de la famille H1 qui serait la compaction de la chromatine ; la quantité totale doit être maintenue, mais certains variants régulent préférentiellement certaines portions du génome. Par exemple le KO de H1t2 chez la souris entraîne une très légère réduction de la fertilité des mâles, mais globalement les souris sont normales et aucune fonction n'est totalement perdue (Tanaka et al., 2005).

1.4.5 Variants de H2A

La famille H2A comprend un nombre important de variants (Figure A8). Parmi ceux-ci, les plus étudiés sont H2A.Z et H2A.X qui sont retrouvés chez l'ensemble des eucaryotes, alors que H2A.Bbd et macroH2A sont spécifiques des vertébrés. Ils possèdent chacun des propriétés et donc des fonctions qui contrairement à la famille H1 sont bien définies.

MacroH2A est caractérisée par une très large extension C-terminale, le domaine « macro » qui donne son nom au variant : il est de très loin la plus grosse histone avec un poids moléculaire de 40 kDa contre seulement 15 kDa pour H2A. Malgré cela les nucléosomes incorporant macroH2A possèdent une structure similaire avec les nucléosomes canoniques (Chakravarthy et al., 2005). L'interaction macroH2A-H2B est par contre plus forte donnant donc un nucléosome

plus stable (Chakravarthy and Luger, 2006). Cette propriété, ainsi que son enrichissement dans le chromosome X inactif laissait supposer une fonction extrêmement spécifique (Costanzi and Pehrson, 1998). De nouvelles études ont montré qu'il était également présent au niveau de promoteurs de gènes inductibles dans certaines cellules souches (Buschbeck et al., 2009 ; Creppe et al., 2012). Il jouerait alors un rôle dans la régulation de la différenciation, empêchant justement la reprogrammation de celle-ci en cellules différenciées (Pasque et al., 2011 ; Gaspar-Maia et al., 2013 ; Barrero et al., 2013). Son rôle se situerait donc dans le maintien de la différenciation, en empêchant la transcription de gènes clés. Pour cela, il diminue la possibilité de remodelage (Angelov et al., 2003), ainsi que le niveau d'acétylation du nucléosome (Doyen et al., 2006b), ces deux événements étant nécessaires à la transcription.

A l'inverse de macroH2A, H2A.Bbd est exclue du chromosome X inactif, ce qui lui value originellement son nom, Bbd signifiant *Barr-Body Deficient*. Le nucléosome H2A.Bbd est associé à la chromatine transcriptionnellement active (Chadwick and Willard, 2001 ; Tolstorukov et al., 2012). Cette fonction provient du fait que le nucléosome contenant H2A.Bbd est plus relâché, la particule de cœur ne contenant que 120 paires de bases (Bao et al., 2004). Ceci forme un nucléosome moins stable, autorisant un accès plus facile à l'ADN et donc la transcription (Gautier et al., 2004).

Cette propriété est partagée avec H2A.Z qui forme également un nucléosome moins stable. H2A.Z est l'un des variants les plus conservés au cours de l'évolution : il y a plus de similarités de séquences entre certaines espèces que de similarités entre les différents H2A canoniques d'une même espèce. La différence de stabilité du nucléosome H2A.Z n'est pas liée à l'interaction avec l'ADN, cette fois-ci, elle s'explique par le fait que H2A.Z-H2B forme une interaction plus faible avec le tétramère H3-H4 (Thakar et al., 2009). H2A.Z est toutefois beaucoup plus exprimée que la plupart des autres variants, puisqu'il représente jusqu'à 10% de la quantité totale de H2A, une partie pouvant être incorporée durant la réplication. H2A.Z est donc trouvé de façon enrichie au niveau des TSS (*Transcription Start Site*) de gènes en cours de transcription. Cette présence serait nécessaire au recrutement de la machinerie de transcription (Nekrasov et al., 2012). À l'opposé H2A.Z est également trouvée enrichie dans certaines régions non transcrites, comme l'hétérochromatine péri-centromérique (Meneghini et al., 2003 ; Greaves et al., 2007).

Le dernier variant majeur de la famille H2A est H2A.X. Ce variant possède un rôle spécifique dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Lorsqu'une cassure survient, H2A.X

est phosphorylée au niveau de sa sérine 139. La forme phosphorylée, notée γ H2A.X, forme alors un *foci* de plusieurs mégabases autour des zones de cassures (Rogakou et al., 1998). La présence de cette phosphorylation est l'évènement déclencheur du recrutement de la machinerie de réparation. En plus de ce recrutement, γ H2A.X recrute également des facteurs de remodelage de la chromatine (van Attikum et al., 2007), toujours dans le but de faciliter l'accès à l'ADN au niveau de la cassure.

1.4.5 Variants de H2B

Les variants de la classe H2B sont peu nombreux (Figure A8). Il en existe deux qui sont tous deux exprimés dans les tissus testiculaires : TH2B et H2B.FWT.

TH2B remplace en grande majorité H2B dans les spermatocytes. Il a été identifié chez le rat (Meistrich et al., 1985). Il a été montré que l'incorporation de ce variant en combinaison avec TH2A forme un nucléosome particulièrement instable (Li et al., 2005). La formation de ce nucléosome permettrait ainsi la formation d'un état transitoire nécessaire aux remplacements des histones par des protamines (Montellier et al., 2013).

H2B.FWT est un variant très peu étudié. Il est très divergent et ne possède que 45% d'identité avec H2B. Il a été actuellement identifié seulement chez l'homme et les grands singes. Il semble être préférentiellement présent au niveau des télomères lors de la gaméto-genèse sans que l'on sache pourquoi (Boulard et al., 2006).

1.4.6 Variants de H3

La classe H3 comprend aujourd'hui un total de sept membres identifiés (Figure A8). Il existe deux histones conventionnelles H3.1 et H3.2 qui varient seulement entre eux d'un acide aminé (Hake and Allis, 2006), et quatre variants : H3.3, H3.4 (aussi appelé TH3, H3.1t ou encore H3.t), H3.5 et enfin CenH3 (Figure A9). Il existe également deux gènes chez l'homme et les grands singes codant pour deux variants supplémentaires nommés H3.X et H3.Y (Wiedemann et al., 2010), toutefois les preuves de leur expression semblent faibles aujourd'hui, ils ne seront donc pas discutés ici.

Le variant H3.4, diverge de H3.1 par quatre résidus et de H3.2 par cinq résidus (Figure A9). Il est un variant spécifique des tissus testiculaires. Chez l'homme, son expression est restreinte aux spermatocytes, où il représente potentiellement l'histone H3 majoritaire (Witt et al., 1996). Le nucléosome H3.4 est moins stable que le nucléosome conventionnel, avec notamment une

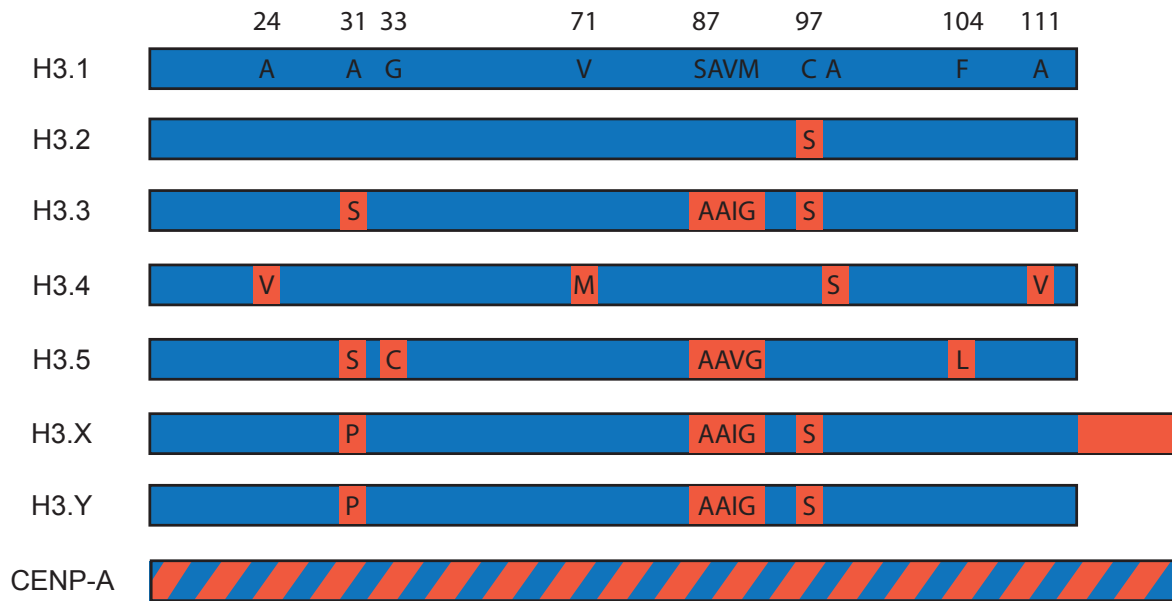


Figure A9 | Ensemble des histones de la classe H3. Il existe deux histones réplication dépendantes : H3.1 et H3. Ils ne diffèrent entre eux que par un seul résidu en position 97. Les variants de cette famille sont dit homéomorphes : c'est à dire qu'ils ne divergent entre eux que par un faible nombre de résidus. L'exception étant le variant CENP-A qui ne possède que 52% d'homologie dans son domaine globulaire, et dont l'extrémité N-terminale ne possède presque aucune similarité avec le reste de la classe H3.

plus faible interaction entre le tétramère H3.4-H4 et les dimères H2A-H2B (Tachiwana et al., 2010), il pourrait donc également participer à un état instable de chromatine permettant le remplacement par des protamines.

Le variant H3.3 est également très proche de H3.1 et H3.2, chez l'homme il ne varie respectivement que de 5 et 4 acides aminés (Figure A9). De façon générale, il est associé avec la chromatine transcriptionnellement active (Mito et al., 2005 ; Schwartz and Ahmad, 2005). L'incorporation de nucléosomes contenant H3.3 implique également la formation d'une chromatine plus ouverte en empêchant la formation des niveaux de repliement supérieur de la chromatine, toujours dans le but de favoriser la transcription (Chen et al., 2013). De plus, il est souvent co-localisé avec les nucléosomes contenant H2A.Z, en particulier au niveau des promoteurs de gènes transcrits (Jin et al., 2009). Il semblerait également que H3.3 soit également parfois associé avec des régions non actives, en particulier dans la chromatine péri-centromérique et également dans les régions télomériques. Dans ces régions il jouerait, tout comme H2A.Z, un rôle particulier dans le maintien de l'intégrité de la chromatine (Wong et al., 2009 ; Lewis et al., 2010).

H3.5 est un variant récemment découvert (Schenk et al., 2011). Il reprend les résidus modifiés chez H3.3 auxquels il ajoute deux nouvelles modifications (Figure A9). Il est spécifiquement

exprimé dans certains tissus testiculaires et tout comme H3.3 il est associé à une activation de la transcription (Schenk et al., 2011).

Le dernier membre de la classe H3 est CenH3. Cette notation désigne l'ensemble des homologues fonctionnels au variant CENP-A des mammifères ; Cse4 (*Chromosome segregation protein 4*) chez *Saccharomyces cerevisiae*, Cnp1 (*Centromere protein 1*) chez *Schizosaccharomyces pombe* ou encore CID (*Centromere Identifier Protein*) chez la drosophile. CENP-A est le variant de H3 qui est incorporé de façon spécifique au niveau de la chromatine centromérique. Son étude étant le cœur de ce travail de thèse, ses propriétés et fonctions seront détaillées dans le chapitre 3.

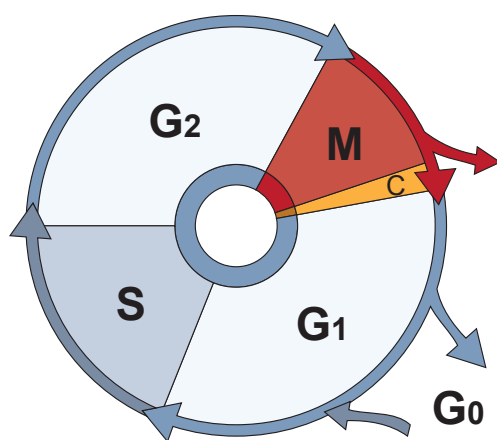
Chapitre 2

La mitose

La chromatine est ainsi une structure dynamique dont la principale fonction est la compaction de l'ADN. Elle joue également un rôle crucial dans la façon dont la cellule transcrit, répare et duplique son matériel génétique. Cette duplication permet la préparation d'un processus essentiel permettant la transmission de ce matériel à la génération suivante: la division des cellules lors de la mitose.

2.1 Le cycle cellulaire

Chez les Eucaryotes, la croissance et la division cellulaire se réalisent selon différentes étapes coordonnées dans le temps. C'est le cycle cellulaire (Figure A10). Durant ce cycle, deux grands événements sont importants : la réplication du matériel génétique et des organites, et la séparation de ce matériel entre les cellules filles. Le cycle se divise donc en deux phases distinctes : l'interphase et la mitose. L'interphase se caractérise par les événements suivants : durant la phase G1 la cellule se prépare à la phase qui va suivre, c'est la phase de croissance de la taille de la cellule. Lorsque la cellule est prête, elle entre alors en phase S pour « synthèse ». Au cours cette phase l'ADN et les différents organites sont dupliqués. À la fin de la phase S, la cellule entre ensuite en phase G2, qui se résume à un moment d'attente et de préparation avant la mitose. Différents points de contrôle sont alors à franchir, notamment pour éviter les erreurs de duplication. Si tout est prêt, alors la membrane nucléaire se dissocie. Cet événement marque la transition de l'interphase à la mitose ou phase M. La plupart des cellules sortent de ce cycle de division et entrent en quiescence. Cette phase est aussi appelée phase G0 (Figure A10). Cet



G0. Cellule quiescente, arrêt du cycle cellulaire

G1. Préparation de la cellule pour la division. À un certain point - le point de restriction - la cellule s'engage sur la voie menant à la division et entre en phase de synthèse

S. La phase de synthèse réplique le matériel génétique. Chaque chromosome consiste maintenant de chromatides

G2. La cellule change son métabolisme et se prépare à la mitose.

Mitose. La division du matériel génétique (mitose) suivie par la division du cytoplasme (cytokinèse).

Figure A10 | Les phases du cycle cellulaire.

état n'est pas figé, et elles peuvent à tout moment recommencer à cycler via une transition vers la phase G1.

2.2 La mitose : déroulement et régulation

2.2.1 Déroulement de la mitose

Le déroulement de la mitose est divisé en cinq phases (Figure A11). La première de ces 5 phases est la prophase, dans celle-ci la chromatine interphasique se condense jusqu'à former des chromosomes individualisés ; les deux centrosomes migrent chacun vers un pôle de la cellule et émettent des microtubules dans toutes les directions et enfin l'enveloppe nucléaire disparaît (Figure A11). Vient ensuite la prométaphase, les chromosomes sont désormais totalement condensés et ils migrent vers le centre de la cellule afin de s'aligner sur un plan équatorial représenté par la plaque métaphasique (Figure A11). Ce mouvement de congression est rendu possible par la formation du fuseau mitotique. Il s'agit d'un ensemble de microtubules reliant les centrosomes aux chromosomes au niveau de leur centromère. La phase suivante est la métaphase. Les chromosomes restent sur la plaque métaphasique et la cellule s'assure de la bonne orientation et de l'attachement correct de chaque chromosome au fuseau mitotique (Figure A11).

Une fois que ces conditions sont réunies, survient alors l'anaphase. Les deux chromatides sœurs constituant un chromosome se retrouvent séparées et chaque chromatide migre vers l'un des pôles de la cellule (Figure A11). Arrivé au terme de cette migration, la télophase commence : la cellule va reformer une enveloppe nucléaire autour des deux lots de chromatides préalablement séparées (Figure A11). Dans le même temps, les microtubules du fuseau mitotique se dissocient et la chromatine commence à se décondenser.

De manière concomitante à la télophase, se produit la cytokinèse, c'est la phase qui conduit à la division du cytoplasme (Figure A11). Cette phase comprend la formation d'un anneau contractile au niveau du milieu de la cellule. Celui-ci se resserre progressivement et conduit à la séparation presque totale des deux cellules-filles qui sont alors uniquement reliées par une petite structure très dense appelée le corps résiduel. La disparition du corps résiduel marque la sortie de mitose et donc la fin effective de la division cellulaire (Figure A11).

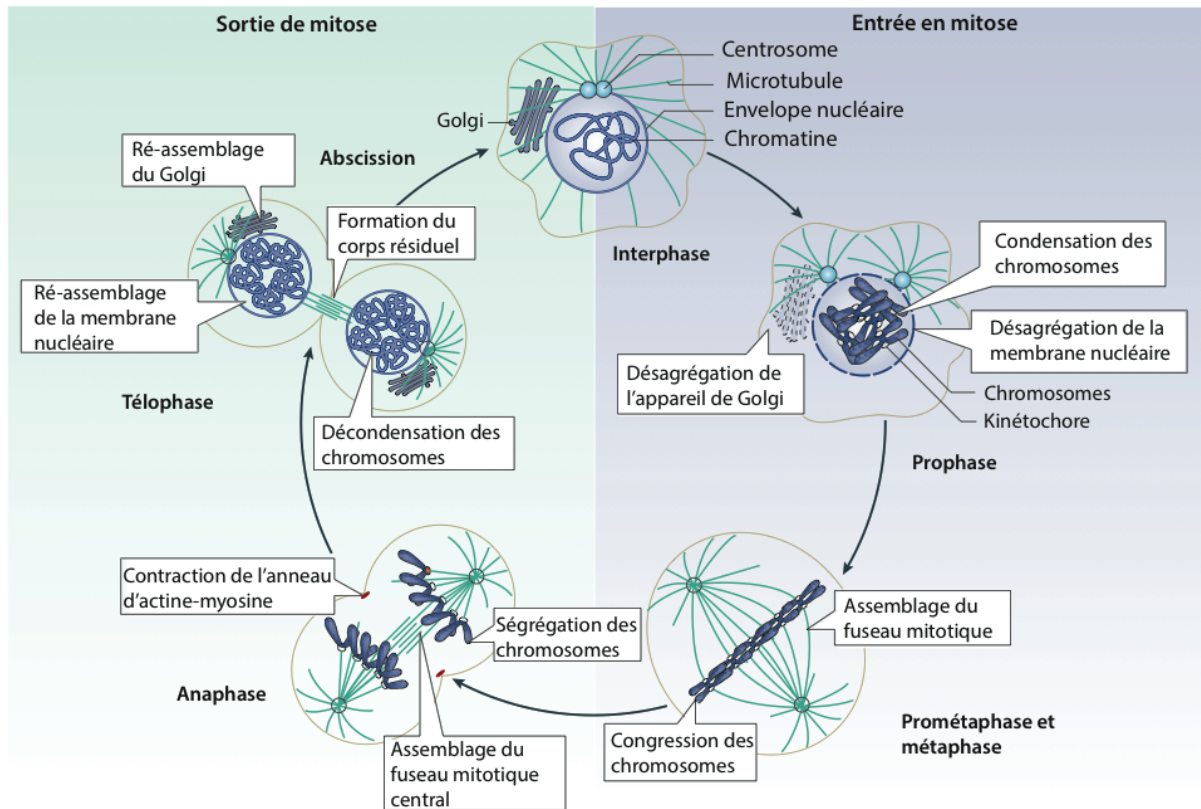


Figure A11 | Les différentes phases de la mitose. La mitose commence lors du désassemblage de la membrane nucléaire. La prophase se caractérise par la condensation de la chromatine sous la forme des chromosomes mitotiques. En prométaphase et métaphase, le fuseau mitotique se met en place à partir des deux centrosomes et permet la congression des chromosomes jusqu'à alignement sur la plaque équatoriale. En anaphase, les chromatides sœurs se séparent et ségrégent vers chacun des pôles opposés. L'anneau contractile d'actine/myosine et le fuseau mitotique central s'assemblent puis commencent à se contracter. En télaphase, la membrane nucléaire commence à se reformer, et durant l'abscession le cytoplasme des cellules se divise pour donner les deux cellules filles. (D'après Wurzenberger and Gerlich, 2011).

2.2.2 Principales régulations de la mitose

La mitose est un processus qui nécessite une régulation temporelle importante afin que son exécution se fasse correctement. En effet la mauvaise répartition de chromatides entrainerait une perte d'une part importante de l'information génétique pour les cellules filles. L'ensemble des processus mitotiques est donc contrôlé de façon stricte. La régulation de la synthèse et de la dégradation permet de contrôler la disponibilité des différents effecteurs protéiques nécessaires à la mitose, mais la coordination de leurs actions est faite en grande majorité via des cycles de phosphorylation/déphosphorylation de leurs résidus, agissant ainsi comme des interrupteurs. De nombreuses kinases sont donc impliquées dans la régulation de la mitose.

Les kinases cycline dépendantes (CDK).

Les kinases de la famille CDK sont parmi les régulateurs majeurs de la progression dans le cycle cellulaire. Elles ont été originellement découvertes chez la levure, au cours d'un criblage de gènes impliqués dans la régulation de la division cellulaire (pour revue voir Malumbres, 2011). Les CDK sont des sérine/thréonine kinases, leur association avec les cyclines permet leur activation.

L'une des kinases les plus importantes lors de de cette famille lors de la mitose est CDK1. Elle est exprimée à partir de la phase G2, mais est maintenue inactive par la phosphorylation de ses résidus thréonine 14 et tyrosine 15. La déphosphorylation de ces deux résidus par Cdc25 précède l'association avec la cycline B, permet d'activer la kinase et signale l'entrée de la cellule en mitose.

Les cibles du couple cycline B/CDK1 sont nombreuses. Elles incluent en particulier les lamines, conduisant à leur dépolymérisation et entraînent donc la disparition de l'enveloppe nucléaire dès le début de la mitose. Parmi les autres cibles, on peut citer les kinésines qui vont jouer un rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique ou encore les condensines et cohésines qui sont nécessaires à la condensation de la chromatine interphasique en chromosome mitotique.

Dans un second temps c'est l'inactivation du même complexe cycline B/CDK1 qui devient essentielle, sans cette étape d'inactivation la cellule ne peut sortir de mitose. En effet lors de la transition métaphase/anaphase, la dégradation de la cycline B par l'*anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C) conduit à la désactivation de CDK1. Cette inactivation permet l'entrée de la cellule en cytokinèse (Musacchio and Salmon, 2007) et donc la sortie effective de la mitose.

Les kinases polo-like (PLK).

La famille des PLK (*Polo-like kinases*) regroupe les homologues de la protéine Polo. Cette protéine a été identifiée chez la drosophile, son absence provoquant des défauts dans la maturation du fuseau mitotique. Cette famille se caractérise par la présence d'un *polo-box domain* en N-terminal. Ce domaine étant notamment responsable de la localisation de la kinase.

Chez les mammifères, cette famille comprend quatre membres, PLK1 à 4, PLK1 étant celle impliquée lors de la mitose (Weerdt and Medema, 2006). Elle est exprimée à partir de la phase G2, et est alors répartie dans toute la cellule. Elle se localise ensuite au niveau des centrosomes

en prophase et participe à la formation des kinétochores à partir de la prophase jusqu'à la métaphase. Tout comme CDK1, elle est ensuite dégradée par l'APC/C lors de la transition métaphase/anaphase, à l'exception d'une fraction qui subsiste sur le fuseau central et se retrouve localisée dans le corps résiduel en fin de mitose.

L'action de PLK1 consiste à favoriser l'entrée en mitose, à la fois par une activation directe du complexe cycline B/CDK1 et par la phosphorylation de Cdc25c, qui promeut en réponse sa localisation nucléaire (Roshak et al., 2000). Au niveau des centrosomes, elle favorise le recrutement des complexes *γ-tubulin ring complex* (γ -TURC) par la phosphorylation de Asp (Petronczki et al., 2008). Ceci permet de former *de novo* les microtubules nécessaires au déplacement des chromosomes. Sur les kinétochores, elle contribue au recrutement du complexe NDC80 (Wong et al., 2007). Finalement, elle participe à la transition métaphase/anaphase, soit en phosphorylant certaines des sous-unités de l'APC/C (Golan et al., 2002), soit en déclenchant la dégradation de Emi1 qui est normalement l'un des inhibiteurs de l'APC/C.

La famille NRK.

La kinase NIMA pour *Never In Mitosis A* a été identifiée chez *Aspergillus nidulans*. Les mutants pour cette kinase restaient en phase G2 et n'étaient jamais capables d'entrer en mitose. Les kinases NRK (*NIMA-related kinases*) forment une grande famille de kinases qui possèdent toutes une séquence catalytique homologue avec NIMA, mais toutes ne sont pas impliquées dans la régulation de la mitose.

Chez l'homme, la kinase la plus étudiée de cette famille est Nek2. Elle est essentiellement impliquée dans la maturation et la séparation des centrosomes. En phosphorylant C-Nap1, elle favorise la disparition d'une structure maintenant les centrosomes ensemble après leur duplication (Bahe et al., 2005). Elle rompt également l'interaction entre la protéine Root-letin et la β -caténine, cet événement étant également nécessaire à la séparation des centrosomes ainsi qu'à leur migration correcte vers les pôles de la cellule (Bahmanyar et al., 2008).

Un autre substrat de NIMA est l'histone H3 dont elle est capable de phosphoryler la sérine 10 (De Souza et al, 2000). Cette marque épigénétique est fortement liée à la condensation des chromosomes (Krien et al, 1998).

Les kinases Aurora.

La famille des kinases Aurora comprend trois membres chez les mammifères : Aurora A, B et C. Elles sont toutes les trois impliquées dans la formation du fuseau mitotique, toutefois Aurora C est exprimée uniquement dans les tissus testiculaires et les gamètes subissant une méiose. Il est donc considéré que Aurora C possède une fonction spécialisée dans la division méiotique plutôt que dans la mitose, néanmoins lorsqu'elle est artificiellement surexprimée dans d'autres types cellulaires, elle peut adopter la localisation et le comportement d'Aurora A durant l'interphase, et d'Aurora B durant la mitose (Giet et al., 2005 ; Salaun et al., 2008).

Aurora A est également contributaire de l'étape d'entrée en mitose, mais également de la maturation des centrosomes. Elle possède normalement une localisation cytoplasmique en phase G1 ou elle forme un complexe avec Bora. Le complexe Bora/Aurora A est alors relocalisé au niveau des centrosomes, et phosphoryle PLK1 qui lui-même agit sur le recrutement de la cycline B/Cdk1 et déclenche l'entrée en mitose (Macûrek et al., 2008 Seki et al., 2008). De façon PLK1 dépendante, Bora est alors à son tour phosphorylée ce qui entraîne sa dégradation (Chan et al., 2008). Aurora A peut alors interagir avec un autre de ces cofacteurs; TPX2 ce qui maintient sa localisation au niveau des centrosomes. Elle va alors recruter plusieurs éléments nécessaires à la maturation des centrosomes (Hannak et al., 2001). Elle va également permettre la mobilisation de protéines associées aux microtubules (Dutertre et al., 2002).

Aurora B est l'un des membres du complexe CPC pour *chromosomal passengers complex*. Ce complexe tient son nom de la localisation transitoire de ses membres au niveau du centromère. INCENP, un autre membre du CPC, auto-active Aurora B et est aussi responsable de sa localisation. En prophase, Aurora B est localisée au niveau des bras chromosomiques où elle participe à la régulation de la compaction de la chromatine via les condensines (Giet et al., 2005). En prométaphase et métaphase, elle est relocalisée au niveau des centromères, et elle est le contrôleur essentiel de l'attachement des microtubules aux kinétochores, elle permet principalement de déstabiliser les attachements incorrectes (Tanaka et al., 2002); lorsque tous les attachements sont corrects, elle va alors activer le point de contrôle du fuseau mitotique et autoriser le passage en anaphase. Elle reste ensuite localisée sur le fuseau central jusqu'en télophase et permet le désassemblage de celui-ci (Buvelot et al., 2003). Elle fait donc également partie du corps résiduel durant la cytokinèse et participe à la formation de l'anneau contractile (Minoshima et al., 2003).

2.3 Les structures mises en œuvre lors de la mitose

2.3.1 Le fuseau mitotique : microtubules

Le fuseau mitotique est composé de microtubules. Un microtubule possède une structure cylindrique d'environ 24 nm de diamètre formée par l'association de treize protofilaments. Chaque protofilament est lui-même composé d'hétérodimères d' α et β -tubuline (Nogales, 2001). Cette structure est polarisée : l'agencement des dimères de tubuline se fait de façon spécifique, toujours dans le même sens, si bien que les deux extrémités d'un protofilament sont différentes. On différencie donc une extrémité n'exposant que des molécules d' α -tubuline, qualifiée de positive (+), et une extrémité n'exposant que des molécules de β -tubuline, inversement qualifiée de négative (-).

Le fonctionnement des microtubules est possible uniquement parce qu'ils sont extrêmement dynamiques. Pour faire varier leur longueur, il faut ajouter ou retirer des dimères de tubuline aux extrémités (Desai and Mitchison, 1997). À une extrémité donnée, le ratio de polymérisation/dépolymérisation détermine si le microtubule est en phase de croissance ou de rétraction. De plus, chacune des deux extrémités peut avoir des propriétés dynamiques distinctes, ce qui laisse au microtubule la possibilité de croître ou de se rétracter dans un sens particulier.

Ainsi à l'état d'équilibre parfait, possible uniquement *in vitro* ; lorsque l'une des extrémités grandit aussi vite que la seconde décroît, on observe un phénomène de « tapis roulant » (*treadmilling*) : les dimères de tubuline ajoutés à l'extrémité croissante sont progressivement décalés, jusqu'à devenir l'extrémité décroissante où ils se dissocient du microtubule, et ceci malgré le fait que la longueur du microtubule reste constante (Margolis and Wilson, 1998).

2.3.2 Les centrosomes

Le centrosome est le centre organisateur des microtubules dans la cellule. Il se retrouve dupliqué lors de la phase S et les deux centrosomes résultants définiront les deux pôles opposés du fuseau mitotique lors de la mitose suivante (Urbani and Stearns, 1999). Chaque centrosome est lui-même constitué de deux centrioles associés avec des protéines amorphes nommées PCM pour *pericentriolar material*. Le PCM contient en particulier un complexe de γ -tubuline, γ -TURC, qui sert à la nucléation de la tubuline pour la formation de microtubules (Zheng et al., 1995). Au cours de la mitose la formation de microtubules augmente de façon importante au niveau des centrosomes par le recrutement de plus grandes quantités de γ -TURC via la kinase PLK1

(Khodjakov and Rieder, 1999 ; Piehl et al., 2004). Cela permet une augmentation rapide du nombre des microtubules émis à partir du centrosome créant aussi le fuseau mitotique. Toutefois, le centrosome n'est pas strictement indispensable dans ce processus, et un fuseau mitotique fonctionnel peut se former en absence de centrosome (Mahoney et al., 2006). Le centrosome a également un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire.

2.3.3 Le kinétochore

Le kinétochore est un complexe protéique qui s'assemble au niveau des centromères lors de la mitose. Son but est de fournir l'interface entre l'ADN contenu dans la chromatine centromérique et les microtubules du fuseau mitotique (Figure A12a).

Les premières observations du kinétochore sont faites au microscope électronique dans les années 60. Elles révèlent que le kinétochore est une structure en trois couches assemblées sur la surface de la région centromérique (Figure A12b) (Jokelainen, 1967). Cette structure est visible sur chaque chromatide sœur à partir de la prophase et ceci jusqu'à la fin de la mitose (Brenner et al. 1981). Les trois couches sont : le kinétochore interne, très étroitement associé à la chromatine ; le kinétochore externe, qui est l'interface directe avec les microtubules ; et enfin le kinétochore central, une région peu dense aux électrons qui sépare le kinétochore interne du kinétochore externe. Enfin, non observable en microscopie électronique, ce trouve un réseau de fibres à la surface du kinétochore externe.

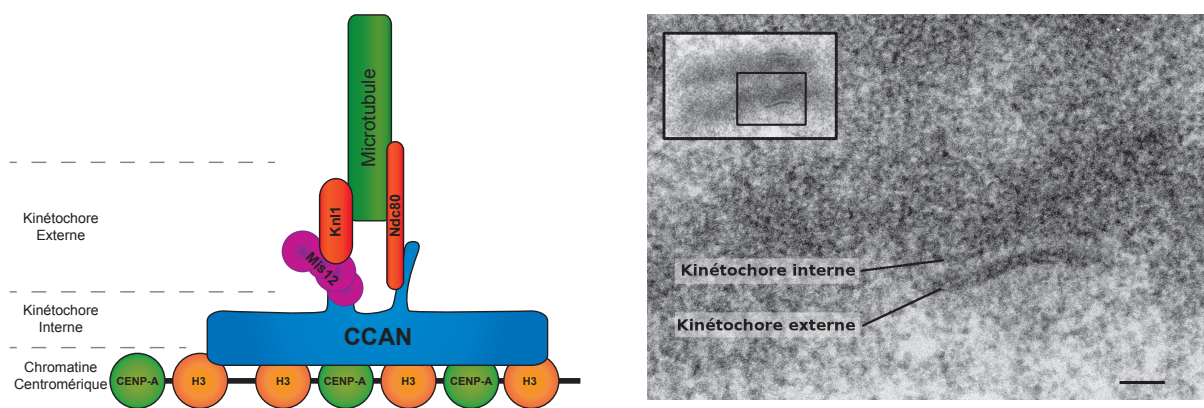


Figure A12 | Le kinétochore fonctionnel. (a) Schéma fonctionnel du kinétochore : le CCAN s'assemble sur la chromatine centromérique, il permet ensuite de lier les différents membres du réseau KNM. Ces derniers permettent l'attachement aux microtubules (Adapté de Gascoigne et al, 2012). (b) Micrographie électronique d'un chromosome de souris (en encart) et vue agrandie de la région du kinétochore. Échelle : 100 nm. (Cliché original de Hans Riz).

Le kinétochore le plus simple est décrit chez la levure *Sacharromyces cerevisiae*, il ne permet que de lier un seul microtubule. Malgré cela, il est constitué d'une soixantaine de protéines (McAinsh et al., 2003; Westermann et al., 2007) qui se répartissent en cinq complexes majeurs : CBF3, Ndc80, Mtw1, Spc105 et Dam1.

Trois d'entre eux, Ndc80, Mtw1 (Mis12 chez l'homme) et Spc105 (Knl1 chez l'homme) sont conservées chez les eucaryotes supérieurs et forment le réseau KNM (Knl1–Mis12–Ndc80) qui est permet l'attachement des microtubules (Musacchio and Salmon 2007; Welburn and Cheeseman 2008). Chez l'homme le kinétochore possède à ce jour une centaine de protéines impliquées (Earnshaw, 2015). Chez l'homme le kinétochore serait alors capable de fixer entre 15 et 20 microtubules. Ce nombre plus important d'attachements est permis par une répétition pour chaque microtubule du module de base présent chez la levure (Joglekar et al. 2008).

Le kinétochore interne peut être confondu d'un point de vue fonctionnel avec un large complexe appelé le CCAN pour *Constitutive Centromere-Associated Network*. Comme son nom l'indique, il est associé de façon permanente à la chromatine centromérique : son fonctionnement sera donc présenté en même temps que celle-ci dans le chapitre 3. Le CCAN possède un rôle simple : il permet le recrutement du kinétochore externe, en particulier du réseau KMN (Figure A12).

Ce réseau est constitué de trois complexes conservés Ndc80, Mis12 et Knl1 (Cheeseman et al., 2006). Dans ce réseau, Knl1 ainsi le complexe Ndc80 composé de 4 sous-unités (Ndc80, Nuf2, Spc24 et Spc25) interagit directement avec le microtubule. L'affinité d'interaction est faible mais elle augmente de façon drastique lorsqu'ils sont associés entre eux, mais surtout avec le complexe Mis12. Le complexe Mis12 comprend Mis12, Nsl1, Nnf1 et Dsn1, son rôle est donc essentiellement dans la stabilisation et le renforcement de l'interaction (Cheeseman et al., 2004; Obuse et al. 2004). Chaque microtubule se retrouve lié au kinétochore par plusieurs complexes KMN (Joglekar et al. 2006)

2.4 Mouvements des chromosomes

2.4.1 Accrochage au fuseau mitotique

Chaque mouvement des chromosomes pendant la mitose nécessite leur accrochage aux microtubules provenant du fuseau mitotique. Les microtubules accrochés à un kinétochore forment une fibre polarisée par l'orientation des microtubules ; ils sont orientés avec leurs

extrémités (+) attachées aux kinétochores et leurs extrémités (-) ancrées au niveau du centrosome.

L'attachement des microtubules se fait durant la prométaphase. Le modèle dit de « recherche et capture » (McIntosh et al., 2002) propose que les microtubules émis à partir des centrosomes explorent dans toutes les directions jusqu'à finalement entrer en contact avec un kinétochore. Ensuite, les microtubules ayant réussi à établir ce contact sont stabilisés alors que ceux qui n'ont lié aucun chromosome sont dépolymérisés. Ce modèle est cohérent avec l'augmentation de la nucléation des microtubules au niveau des centrosomes, conséquence de l'action d'Aurora A en début de mitose (Khodjakov and Rieder, 1999 ; Brittle and Ohkura, 2005).

Ce modèle possède toutefois une limitation importante. En effet, il a été observé qu'il était possible de former un fuseau mitotique fonctionnel en l'absence de centrosome (Mahoney et al., 2006). Il existe donc un second modèle, dit d'auto-assemblage. Celui-ci propose que des microtubules se forment directement à proximité de la chromatine, de façon non dépendante des centrosomes. Il semblerait en effet que les kinétochores soient également capable de polymériser directement des microtubules. Ces microtubules sont ensuite capables d'être intégrés aux centrosomes (Maiato et al., 2004).

Les deux modèles ne sont donc pas exclusifs et ils pourraient très bien se compléter. De façon générale une fibre de microtubules reliée à un kinétochore est alors appelé K-fiber (pour *kinetochores fiber*).

2.4.2 Congression

Durant la prométaphase, une fois attachés au fuseau mitotique, les chromosomes doivent s'aligner sur la plaque métaphasique. Ce premier déplacement des chromosomes s'appelle la congression.

Le mouvement général se fait en direction de la plaque métaphasique, mais des mouvements oscillatoires en direction de l'un et l'autre des pôles sont aussi observés.

Cela provient du mécanisme de traction des chromosomes. À ce stade, chaque chromosome possède deux kinétochores, avec chacun une fibre K reliée. Il y a donc un kinétochore qui doit être éloigné du centrosome auquel il est relié, il est noté AP pour *away from the pole*, tandis que le second doit rapprocher le chromosome du centrosome auquel il est lié, il est noté P pour *poleward*. (Cassimeris et al., 1987 ; Centonze et Borisy, 1991).

C'est néanmoins essentiellement la fibre qui raccourcit qui est responsable du déplacement, en effet la fibre s'allongeant est incapable seule de pousser le chromosome (Khodjakov and Rieder, 1996), ce qui correspond à la compression plus forte du kinétochore P par rapport au kinétochore AP. On peut donc considérer qu'il possède simplement un attachement passif des microtubules, alors que le kinétochore P est responsable de la génération de la force (Dumont et al., 2012). C'est donc la dépolymérisation de la fibre la plus courte qui permet la traction. Ce mécanisme est appelé *depolymerization-coupled pulling* ou DCP.

Un autre mécanisme contribuant à la congression est le déplacement latéral (*chromosome sliding*) d'un chromosome le long d'une fibre K déjà formée. Ce cas se présente par exemple si les deux kinétochores sont reliés à la même fibre K ou si le chromosome est relié à un seul centrosome. Ce mouvement est possible grâce à l'action de moteurs moléculaires associés aux microtubules qui possèdent une activité motrice dirigée vers l'extrémité (+). C'est le cas de la kinésine CENP-E (Kapoor et al., 2006). Il permet donc la congression d'un chromosome non encore bi-orienté. Il favorise alors sa bi-orientation en rapprochant le chromosome de la plaque métaphasique et donc des faisceaux de microtubules provenant du centrosome opposé.

2.4.3 Ségrégation

La ségrégation des chromatides vers les deux pôles de la cellule au cours de l'anaphase nécessite deux mouvements distincts définissant donc deux sous-phases, l'anaphase A et l'anaphase B. Au cours de l'anaphase A, les chromatides migrent en direction du pôle qui leur fait face. Au cours de l'anaphase B, les pôles eux-mêmes migrent dans des directions opposées. La contribution des anaphases A et B à la ségrégation totale des chromatides est variable selon les espèces et les types cellulaires, et de plus, les deux phases peuvent parfaitement se chevaucher temporellement au cours de la même division.

Anaphase A

Le mouvement des chromatides en direction des pôles au cours de l'anaphase A est le fait de principalement deux mécanismes : la dépolymérisation des microtubules et l'activité de protéines motrices au niveau du kinétochore.

Comme lors de la congression, la dépolymérisation des microtubules par leur extrémité positive (+) entraîne le raccourcissement des fibres K tractant les chromatides en direction du pôle (Gorbsky et al., 1987 ; Gorbsky et al., 1988). Le même effet peut également être obtenu par une

dépolymérisation à l'extrémité (-) présente au niveau du centrosome. En réalité, les deux sont combinées.

Plusieurs protéines motrices sont aussi impliquées dans le mouvement des chromatides. La dynéine est présente aux kinétochores durant l'anaphase et elle possède une activité motrice dirigée vers l'extrémité (-) (Pfarr et al., 1990 ; Steuer et al., 1990). Son rôle pourrait être de livrer des protéines favorisant la dépolymérisation aux pôles plutôt que d'agir directement sur la traction de la chromatide (Gaetz and Kapoor, 2004). Parmi les protéines transportées on trouverait les membres de la famille kinésine-13 (Ganem and Compton, 2004).

Anaphase B

L'anaphase B nécessite la séparation initiale des chromatides sœurs en début anaphase. La place laissée disponible sur la plaque équatoriale, permet la formation d'une autre structure à base de microtubules appelée fuseau central. Les microtubules qui composent cette structure proviennent également des deux pôles. Des moteurs moléculaires peuvent alors être recrutés au niveau du fuseau central et font « glisser » les microtubules antiparallèles. La force ainsi générée éloigne alors chaque moitié du fuseau l'une de l'autre et contribue aux mouvements des centrosomes (Brust-Mascher and Scholey, 2002 ; Brust-Mascher et al., 2004 ; Zhu et al., 2005).

Les microtubules astraux qui relient les centrosomes au cortex cellulaire, contribuent également à la migration des centrosomes vers les pôles opposés (Rosenblatt, 2005).

2.4 Contrôle de la ségrégation

Le point de contrôle du fuseau mitotique ou *spindle assembly checkpoint* (SAC) possède une fonction essentielle: il doit empêcher la cellule d'entrer en anaphase avant que tous les chromosomes ne soient correctement attachés au fuseau mitotique.

L'attachement correct est l'attachement dit amphitélisque (Figure A13) dans lequel le kinétochore de chaque chromatide est lié à des fibres K venant du centrosome qui lui fait face. Les autres types d'attachements possibles sont : l'attachement monotélisque, où un seul des deux kinétochores est lié au fuseau (Figure A13); l'attachement syntélisque, où les deux kinétochores sont liés à des fibres K en provenance du même centrosome (Figure A13) ; et l'attachement

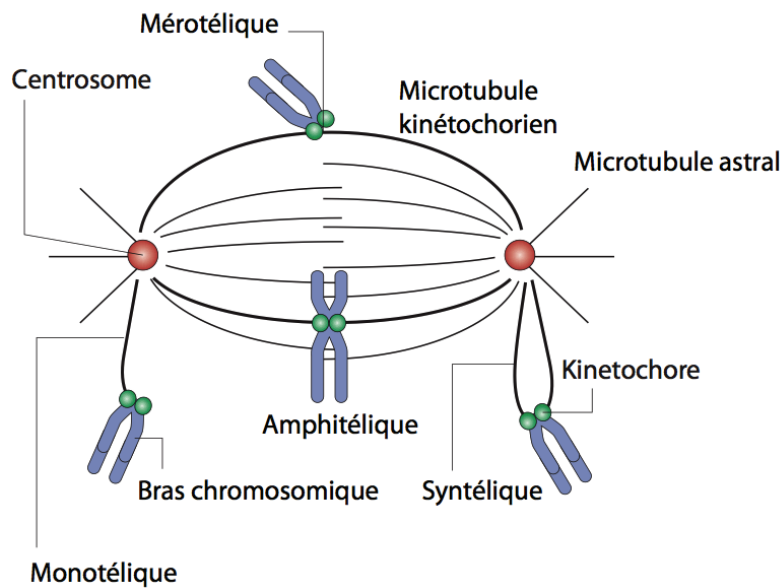


Figure A13 | Les différents types d'attachements des chromosomes au fuseau mitotique. L'attachement amphitélique : chaque kinétochore est lié à un pôle opposé de la cellule : cela permet une ségrégation équilibrée des chromosomes. Attachement mérotélique : un des kinétochores du même chromosome lie les microtubules des deux centrosomes. Attachement monotélique : un des deux kinétochores lie les microtubules issus du même pôle. Attachement syntélique : les deux kinétochores d'un même chromosome lient les microtubules provenant d'un même centrosome (D'après Keen and Taylor, 2004).

mérotélique, où l'un des kinétochores est lié à des fibres K en provenance des deux centrosomes (Figure A13). En présence de chromosomes non attachés ou attachés de manière incorrecte, le SAC retarde la transition métaphase/anaphase jusqu'à la résolution du problème d'attachement. L'attachement amphitélique est l'attachement correct, il est le seul qui permette la ségrégation correcte des chromatides durant l'anaphase.

Activation du SAC

L'effecteur majeur de la transition métaphase/anaphase est le complexe APC/C-Cdc20. Il possède une activité E3-ubiquitine ligase dirigée notamment contre la sécurine, un inhibiteur de la séparase. La dégradation de la sécurine supprime l'inhibition de la séparase, qui peut alors détruire la protéine Smc3. Smc3 fait partie du complexe des cohésines (Haering and Nasmyth, 2003). La destruction de Smc3 permet la séparation des chromatides sœurs et l'entrée en anaphase. La seconde cible principale de l'APC/C-Cdc20 est la cycline B1, dont la dégradation entraîne l'arrêt de l'activité du complexe cycline B1/Cdk1. Cet événement favorise la sortie de la mitose.

Le SAC est activé par la présence de kinétochores non-attachés au fuseau mitotique. Il suffit qu'un seul kinétochore soit détecté par la cellule comme non-attaché pour activer le point de contrôle et retarder la transition vers l'anaphase (Rieder et al., 1994). Chez les métazoaires, le SAC est systématiquement et normalement activé « par défaut » dès le début de la mitose, ceci avant même le début de la capture des kinétochores par les microtubules du fuseau (Musacchio and Salmon, 2007). Il se trouve par la suite désactivé à partir du moment où tous les kinétochores sont convenablement attachés.

L'activation du SAC se traduit par la formation du complexe *mitotic checkpoint complex* (MCC). Il est composé des protéines Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20. Ce complexe induit en particulier l'inhibition du complexe APC/C, le mécanisme exact de cette inhibition reste aujourd'hui inconnu. On sait cependant que la séquestration de Cdc20 empêche la formation du complexe APC/C-Cdc20 actif, et que l'interaction directe avec l'APC/C provoque une conformation fermée de celui-ci (Herzog et al., 2009). On sait également que la présence du MCC entraîne une dégradation précoce de Cdc20 (Pan and Chen, 2004 ; Nilsson et al., 2008 ; Ge et al., 2009).

En l'absence d'attachement aux microtubules, le kinétochore est supposé agir comme un site catalytique favorisant la formation du MCC (Howell et al., 2004 ; Shah et al., 2004) en permettant notamment le recrutement de Mad2. Son changement de conformation intervenant lors de l'attachement permet son association avec Cdc20 (Musacchio and Salmon, 2007). Une fois le kinétochore attaché, les composants du point de contrôle sont donc évacués par des protéines motrices, mettant fin à la production de MCC et autorisant ainsi la levée de l'inhibition sur l'APC/C.

Détection des attachements incorrects

L'absence de microtubules sur un kinétochore permet de détecter les attachements incomplets (monotéliques), mais ne permet pas de détecter les attachements incorrects (syntéliques et mérotéliques) (Figure A13). Un autre signal que l'absence de microtubules est donc nécessaire pour permettre la correction de ces attachements imparfaits. Le modèle actuel repose sur la détection de la tension entre les deux kinétochores d'un même chromosome (Kelly and Funabiki, 2009). L'absence de tension semble suffisante pour conduire la kinase Aurora B à déstabiliser les interactions entre kinétochore et microtubules. Aurora B peut agir notamment en phosphorylant directement les membres du réseau KMN, réduisant leur affinité pour les microtubules (Welburn et al., 2010) ; elle phosphoryle également la kinésine *mitotic-centromere-associated kinesin* (MCAK), stimulant son activité de dépolymérisation des microtubules (Andrews et al., 2004).

Combinées entre elles, les actions d'Aurora B provoquent la rupture de l'attachement. Il n'y a donc pas d'activation direct du SAC, mais elle permet de faire passer d'un état signalant l'absence de tension à un signal d'absence d'attachement. C'est cette absence d'attachement qui induit à nouveau le SAC.

Une fois que tous les chromosomes sont attachés correctement, la cellule peut donc séparer les chromatides soeurs et effectuer leur ségrégation lors de l'anaphase.

2.5 La cytokinèse

La cytokinèse consiste en la séparation physique du cytoplasme de la cellule mère vers deux cellules filles distinctes. Elle est en partie concomitante avec la mitose puisque le début effectif de la cytokinèse se situe en anaphase. À ce moment, le sillon de division commence à se mettre en position de façon perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique. Une vingtaine de protéines ont aujourd'hui été identifiées comme impliquées dans les mécanismes moléculaires de la cytokinèse des cellules eucaryotes animales (Fededa et Gerlich 2012). La cytokinèse consiste à un certain nombre d'évènements localisés à différents points dans la cellule;

Le fuseau central est composé majoritairement par un réseau de microtubules, mais il comporte également des protéines régulatrices de la cytokinèse. L'ensemble se positionne au niveau du futur site de clivage entre les cellules filles: ces microtubules polymérisent en effet entre les deux lots de chromosomes encore en cours de ségrégation.

L'anneau contractile est formé par un réseau de filaments d'actine et est rendu fonctionnel grâce à l'activité motrice des myosines associées : la myosine se déplace sur l'actine, ce qui permet la réduction de la taille de l'anneau contractile. La position de l'anneau contractile est déterminée par le fuseau mitotique même s'il est attaché à la membrane plasmique des cellules. Son activité est régulée, ce qui permet la synchronisation entre la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. (Glotzer, 2005 ; Fededa et Gerlich, 2012). Parmi ces régulations, la plus importante est faite par une guanosine triphosphate : RhoA. Cette voie de signalisation permet l'assemblage de l'anneau contractile, RhoA induisant la nucléation de l'actine et active la myosine (Yüce et al., 2005 ; D'Avino et Glover, 2009). La réduction progressive de la taille de l'anneau contractile forme le sillon de division. Ceci entraîne progressivement la formation effective de deux nouvelles cellules mais qui reste pour le moment encore liés entre-elles.

Lors de la télophase ce qui reste du sillon de division devient le corps résiduel. Celui-ci tire son nom de la composition : il contient les protéines résiduelles du sillon de division. Le corps résiduel sert de base au recrutement des effecteurs de l'abscission. C'est la dernière étape de la cytokinèse: la séparation effective des cellules. Les mécanismes impliqués dans l'abscission font appel à l'endocytose. Les composants de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) responsables du tri des endosomes sont nécessaires. Ils s'assemblent dans les membranes endosomales et leur permettent de s'invaginer, et donc de former une vésicule. En particulier deux protéines du complexe ESCRT sont impliquées dans l'abscission : ALIX et TSG101 ; elles sont en effet capables d'interagir avec le corps résiduel via la protéine CEP55 présente dans celui-ci. Le recrutement des endosomes aurait alors pour rôle le remodelage de la membrane plasmique et pourrait ainsi promouvoir l'abscission (Barr and Gruneberg, 2007).

C'est seulement à l'issue de tous ces processus complexes et hautement régulés que la cellule peut terminer sa division et ainsi générer les deux nouvelles entités cellulaires.

La mitose est donc le processus cellulaire qui possède la lourde tâche de la répartition équitable du matériel génétique entre les deux cellules filles. L'ensemble des mécanismes mis en oeuvre est donc crucial. Pour remplir cet objectif, il est nécessaire de créer une interface entre l'ADN et le reste des machineries mitotiques. Cette interface est matérialisée par une région de chromatine dédiée à cette fonction: le centromère.

Chapitre 3

Le centromère

Le centromère est une structure du chromosome extrêmement spécialisée. Le centromère possède une seule fonction : il permet l'assemblage du kinétochore nécessaire à la fixation des chromosomes aux microtubules. La présence du centromère permet la répartition égale du matériel génétique entre les deux cellules filles. On distingue deux types de centromères, qui eux-mêmes définissent deux types de chromosomes : les chromosomes holocentriques, dont le centromère est réparti sur l'ensemble de la longueur du chromosome et les chromosomes monocentriques, dont le centromère se concentre en un seul site. Les chromosomes monocentriques apparaissent alors généralement avec une constriction sur le chromosome mitotique.

3.1 L'ADN centromérique

Les centromères les plus simples sont décrits chez la levure *S. cerevisiae*. Ils sont monocentriques et leur formation dépend d'une petite séquence d'ADN de 125 paires de base composée de trois éléments fonctionnels conservés (CDEI, CDE II et CDEIII). En raison de cette spécificité, ces centromères sont désignés sous le nom de « centromères en point » (Figure A14a).

Chez l'ensemble des autres eucaryotes possédant des centromères monocentriques, ils sont de plus grande taille et désignés par le terme générique de « centromère régional ». Il existe des centromères régionaux simples, comme chez *S. pombe*, où ils sont constitués d'une séquence centrale de 4 à 5 kb intercalée au milieu de régions d'hétérochromatine (Pluta et al., 1995) (Figure A14a). La plupart sont néanmoins qualifiés de « centromères complexes » en raison de l'organisation de l'ADN qui les compose qui se base majoritairement sur des séquences répétées.

Chez *D. melanogaster*, les centromères sont composés de larges répétitions d'ADN satellite de séquences connues : AATAT et AAGAG (Sun et al., 1997). Ces répétitions s'enchaînent sur 400 kb à plusieurs mégabases selon les chromosomes (Figure A14a).

Chez *Mus musculus*, une séquence spécifique appelée *minor satellite DNA* compose la quasi totalité de l'ADN centromérique (Figure A14a). Cette séquence de 120 pb est conservée entre tous les chromosomes (Kuznetsova et al., 2006).

Chez l'homme, les séquences centromériques sont toutes composées de séquences alpha-satellites. Globalement un consensus s'établit autour d'une séquence monomérique de 171 pb,

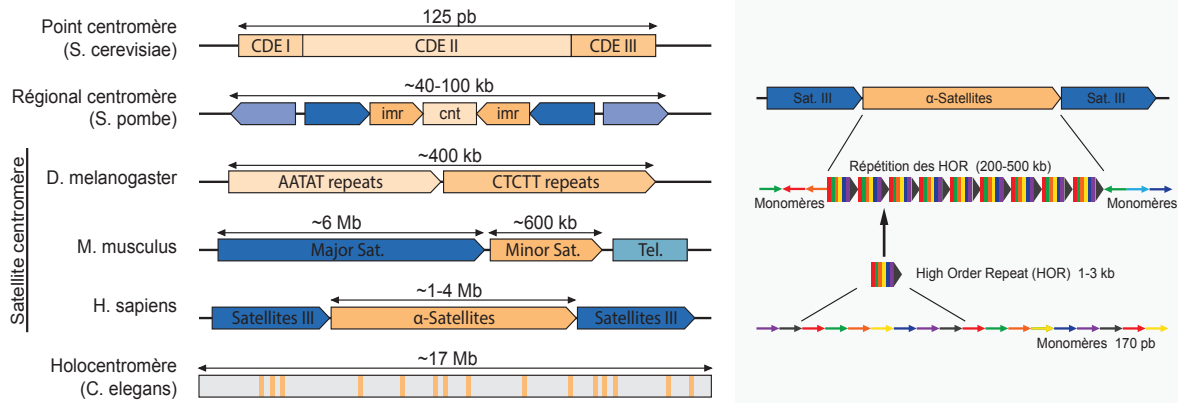


Figure A14 | Organisation de l'ADN des régions centromériques. (a) Représentation schématique de l'ADN centromérique (en orange) et péri-centromérique (en bleu) chez différents eucaryotes. CDE, Centromere DNA element ; cnt, central core ; imr, innermost repeats. *S. Serevisiae* possède un « centromère en point » : le centromère est défini par une séquence unique. Les « centromères régionaux » sont plus grands et le plus souvent basés sur des séquences répétées. Les holocentromères sont des centromères où la région centromérique est morcelée sur l'ensemble du chromosome. (b) Détail de l'organisation des répétitions de séquences des centromères humains.

toutefois il existe des sous-familles de cette séquence selon les chromosomes. Ces monomères s'assemblent en tandem, organisés de façon *head to tail* (Figure A14b). Cette première répétition des monomères donne ensuite naissance à une nouvelle unité de répétition supérieure (*higher order repeat* ou HOR). Les HORs sont également répétées jusqu'à composer l'ensemble du *locus* (Figure A14b). Celui-ci possède une taille comprise entre 250 et 5000 kb (Aldrup-MacDonald and Sullivan, 2014). Les séquences des HORs varient entre-elles, mais elles sont très conservées au sein du même chromosome et sont organisées en sous-classes.

Chez certaines espèces, en particulier de plantes, en plus des ADN satellites, les centromères comportent un nombre important d'un autre type de séquences répétées : les rétrotransposons, comme par exemple chez le riz (Cheng et al., 2002) ou le maïs (Wolfgruber et al., 2009). Ces centromères ont alors une composition mixte entre ADN satellite et rétrotransposons. Il existe également des espèces où seuls des rétrotransposons composent les centromères, comme chez le blé (Li et al., 2013).

La présence de séquences répétées, satellites ou non semblait donc être un prérequis à la formation de centromères, mais ce n'est pas toujours le cas. Chez le cheval, la majorité des centromères se composent également de quatre sous-types d'ADN satellites organisés de façon variable. Toutefois le centromère du chromosome 11 ne comporte aucune répétition (Piras et al., 2010 ; Alkan et al., 2011). L'exemple le plus frappant se trouve chez la pomme de terre où la

moitié des 12 chromosomes (les chromosomes 4, 6, 10, 11 et 12) n'ont aucune séquence répétée dans leurs centromères (Gong et al., 2012).

Le cas des holocentromères est également intéressant. Il s'agit de centromères non pas portés sur un *locus* donné, mais répartis sur de nombreux *loci* tout au long du chromosome. Dans la majorité des cas, il semblerait que ces positions soient également composées de séquences répétées. Comme pour les chromosomes monocentromériques, il peut s'agir d'ADN satellite ou de rétrotransposons (Neumann et al., 2012, Marques et al., 2015), mais il existe aussi des exemples de région non répétées (Heckmann et al., 2013). L'association entre centromères et séquences répétées semble donc être favorisée sans pour autant constituer une obligation.

Il existe une autre exception à la règle : les néocentromères. Ces centromères fonctionnels émergent sur un nouveau *locus* qui n'était auparavant pas associé avec l'assemblage d'un kinétochore. Ainsi chez l'homme, la majorité des néocentromères mis en évidence dans certaines pathologies ne se forment pas sur des séquences répétées (Marshall et al., 2008). Au cours de l'évolution, il est également possible d'observer le repositionnement de certains centromères. Une fois repositionné, le nouveau centromère est transmis à la descendance (Rocchi et al., 2012). La formation d'un nouveau centromère entraînant de façon systématique la perte du centromère initial : il doit y avoir un unique centromère par chromosome. Dans ce cas le nouveau centromère va au fil de l'évolution gagner des séquences répétées, tandis qu'à l'opposé le centromère ancestral va perdre les régions satellites qui lui étaient associées (Ventura et al., 2007).

L'ensemble de ces données semblent donc montrer que les centromères sont capables de se former sur n'importe quelle séquence d'ADN. Toutefois la présence de séquences répétées favorise la stabilisation du centromère sur un *locus* bien défini, c'est pour cela que ce type de séquences est favorisé.

3.2 La chromatine centromérique

En l'absence d'une séquence d'ADN universelle, c'est la présence spécifique d'un variant de l'histone H3, nommé CenH3, qui a été identifiée comme déterminante dans la définition du centromère. On peut donc parler de détermination épigénétique du centromère. En effet des homologues de cette protéine (CENP-A chez les mammifères, CID chez *D. melanogaster*, Cse4

chez *S. cerevisiae*) ont été identifiés dans l'ensemble des centromères actifs étudiés aujourd'hui (Black et Bassett, 2008 ; Malik et Henikoff, 2009).

3.2.1 Organisation générale

Ainsi par définition, la chromatine contenant le nucléosome CENP-A est donc la chromatine centromérique. Mais CENP-A n'est pas présent dans l'ensemble des nucléosomes. Il existe en effet une alternance entre les nucléosomes conventionnels et les nucléosomes CENP-A. Chez l'homme, cette alternance s'effectue sur les régions d'environ 15 à 40 kb selon les chromosomes (Blower et al., 2002). Toutefois, l'ADN étant le plus souvent formé de séquences répétées, leur positionnement les uns par rapport aux autres par les méthodes de ChIP-seq n'a pour le moment pas pu être effectuée. De plus il semblerait également que les nucléosomes contenant H3 soient enrichis en variants H2A.Z (Greaves et al., 2007). Il est par contre connu qu'un certain nombre de marques épigénétiques caractérisent ces nucléosomes H3. En particulier les marques H3K4me2 (Sullivan et al., 2004 ; Bergmann et al., 2011).

Le positionnement entre eux de ces différents types de nucléosomes ne serait pas dû au hasard. L'un des modèles de cette organisation propose que l'ensemble des nucléosomes CENP-A devant fixer les microtubules se retrouvent orientés sur la face externe des chromatides (Sullivan et al., 2010 ; Ribeiro et al., 2010). De ce fait, les nucléosomes contenant H3K4me2/H2A.Z se retrouvent positionnés de force sur la face interne, au niveau de la jonction entre les deux chromatides sœurs (Greaves et al., 2007)

Enfin, de façon générale, chez la plupart des eucaryotes supérieurs, on note la présence de plusieurs mégabases d'ADN de chaque côté de la chromatine centromérique, le plus souvent également constituées de séquences répétées. Cette chromatine péricentrosomique appartient à l'hétérochromatine. Cette hétérochromatine n'est toutefois pas toujours présentes sur l'ensemble des chromosomes pour une même espèce.

3.2.2 Transcription de la chromatine centromérique

Pendant longtemps la chromatine centromérique a été assimilée à l'hétérochromatine, et de ce fait considérée comme une région réfractaire à la transcription. Ce dogme était conforté par le fait qu'il n'y avait pas ou peu de gènes dans ces séquences. La question de leur transcription n'a donc pas été étudiée plus précisément. Il a toutefois été montré que lorsque des gènes codants sont présents, ils peuvent être transcrits (Yan et al., 2006 ; Saffery et al., 2003). Toutefois ces

gènes se trouvent alors généralement dans les régions contenant les nucléosomes H3 plutôt que CENP-A.

En plus des gènes codants, un nombre grandissant de transcrits correspondants aux séquences centromériques est aujourd'hui mis en évidence. C'est le cas chez la levure (Choi et al., 2012), chez la souris (Ferri et al., 2009), mais aussi chez l'homme (Wong et al., 2007). Il semblerait qu'ils participent aux mécanismes de déposition de CENP-A au niveau de la chromatine centromérique (Quénet and Dalal, 2014), mais également qu'ils exercent un rôle dans la régulation de l'activité de Aurora B et INCENP durant la mitose (Ideue et al., 2014). Même si leurs rôles et mécanismes d'action restent aujourd'hui plus qu'énigmatiques, il est certain qu'ils sont nécessaires à la fois à l'organisation fonctionnelle des kinétochores, qu'à la ségrégation correcte des chromosomes (Rošić et al., 2014)

3.2.3 La chromatine péri-centromérique

En plus de la chromatine centromérique contenant le nucléosome CENP-A, les eucaryotes supérieurs possèdent de chaque côté de celle-ci une hétérochromatine aux propriétés particulières, elle est donc qualifiée d'hétérochromatine péri-centromérique (Figure A14a).

En effet, cette région particulière présente un grand nombre des caractéristiques de l'hétérochromatine : la présence de HP1 (heterochromatine protein 1), ainsi que la marque H3K9me3 (Sullivan and Karpen, 2004). Cette hétérochromatine est nécessaire à la formation et la fonction de centromères fonctionnels. Sa fonction clé se situe néanmoins dans la cohésion entre les chromatides sœurs avant leur séparation lors de l'initiation de l'anaphase.

3.3 Le variant CENP-A : CENTromeric Protein-A

3.3.1 Le variant centromérique

La protéine CENP-A est un variant de l'histone H3. Comme toutes les autres histones, CENP-A est composée de deux domaines distincts : un domaine globulaire et une extrémité N-terminale non structurée.

Les variants de la famille H3 sont tous très proches des histones conventionnelles, ne variant que par quelques acides aminés de la séquence de H3.1 ou H3.2 (Figure A9). Ce n'est pas le cas

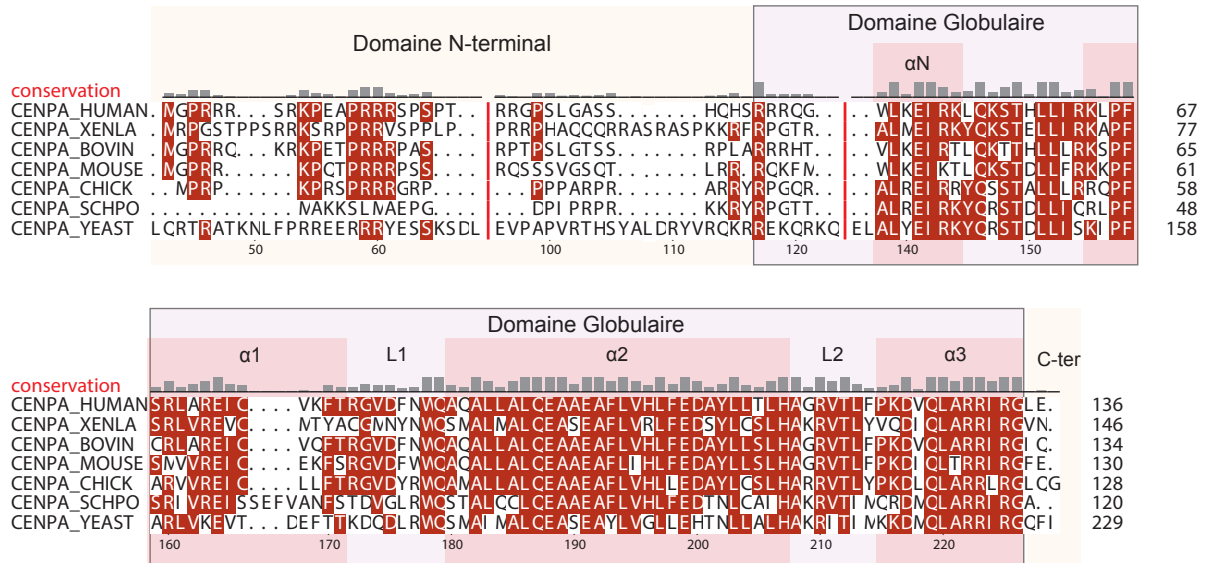


Figure A15 | Conservation inter espèces de la séquence du variant CENP-A. CENP-A (de son homologue fonctionnel) possède peu de similarité avec H3.1, cet alignement montre la conservation de sa séquence chez un certain nombre d'eucaryotes. Les résidus conservés apparaissent en rouge. Le domaine globulaire est très conservé y compris entre des espèces éloignées, tandis que les domaines N- et C- terminaux sont moins conservés.

de CENP-A qui possède un domaine globulaire présentant seulement 62% d'identité avec H3.1, tandis que son domaine N-terminal est totalement différent. Le domaine globulaire est donc différent de H3.1, mais de façon générale il est très conservé entre les espèces, même éloignées (Figure A15). Par contre si son domaine globulaire est extrêmement conservé l'extrémité N-terminale de CENP-A peut diverger grandement entre les espèces (Figure A15).

La conservation inter-espèce du domaine globulaire est en corrélation avec le fait que c'est lui qui semble conférer à CENP-A la majorité de ses propriétés. C'est par exemple lui qui permet la localisation spécifique de CENP-A au niveau des centromères (Sullivan et al., 1994). Cette fonction a par la suite été réduite à un sous domaine plus petit nommé CATD (*CENP-A Targeting Domain*) qui se compose d'une partie de l'hélice $\alpha 1$, de l'hélice $\alpha 2$ et de la boucle L1 qui relie les deux hélices entre elles (Black et al., 2004).

Malgré sa faible conservation inter-espèce, l'extrémité N-terminale possède également quelques propriétés intéressantes. La phosphorylation de la sérine 7 est par exemple indispensable à la stabilisation de l'interaction CENP-C/CENP-A durant la mitose (Goutte-Gattat et al., 2013).

3.3.2 Maintenance de CENP-A aux centromères

La quantité de CENP-A présente au niveau des centromères doit être maintenue constante pour que ses fonctions soient conservées. En effet, chaque phase de réplication entraîne une division par deux de la quantité de nucléosome CENP-A par rapport à la quantité d'ADN centromérique présent dans une cellule. CENP-A doit donc être redéposée à chaque cycle de division (Figure A16).

Préparation de la chromatine

Avant que CENP-A ne soit déposée, la chromatine subit une étape de préparation. Cette phase de préparation se fait chez l'homme en fin de télophase et elle nécessite hMis18, un complexe comprenant hMis18 α , hMis18 β et M18BP1 (aussi appelé HsKNL-2) (Fujita et al., 2007). Chez la levure, Mis18 et Mis16 (chez l'homme RbAp46/48) sont également recrutés au niveau de la chromatine centromérique. Leur cinétique et mode de recrutement restent très largement incompris, mais leur rôle consiste à préparer la chromatine centromérique pour son remodelage. Une étape clé dans cette préparation semble être le maintien de la chromatine dans un état déacétylé. En particulier au niveau de H3K9 (Ohzeki et al., 2012) et H3K4 (Bergmann et al., 2011), où la présence d'acétylations empêche le chargement de CENP-A.

Incorporation de CENP-A aux centromères

La déposition de CENP-A aux centromères se fait dans une fenêtre de temps court. Chez les mammifères, elle se situe uniquement entre la fin de la télophase et le début de la phase G1 (Jansen 2007) (Figure A16). Dans ce processus, une partie du CCAN joue un rôle majeur, en particulier CENP-H/CENP-I (Okada et al., 2006 ; Hori et al., 2013).

La plupart des variants peuvent être reconnus par un certain nombre de chaperonnes, ce n'est pas le cas pour CENP-A où seule HJURP est capable de la reconnaître. Cette spécificité provient de la présence du domaine CATD. C'est en effet ce domaine qu'HJURP est capable de reconnaître de façon spécifique (Shuaib et al., 2010). Cette chaperonne est ensuite capable de stabiliser le dimère CENP-A-H4 (Dunleavy et al., 2009 ; Foltz et al., 2009). La déposition de CENP-A via HJURP requière la présence d'une di-méthylation au niveau de H3K4 indispensable au dépôt de CENP-A (Bergmann et al., 2011). En plus de HJURP, les condensines forment une autre classe de protéines qui sont nécessaires à la déposition de CENP-A. Elles imposent une certaine structure à la chromatine (Samoshkin et al., 2009), leur fonction est de stabiliser le nucléosome CENP-A pour empêcher son éviction (Bernad et al., 2011). Cette fonction pourrait

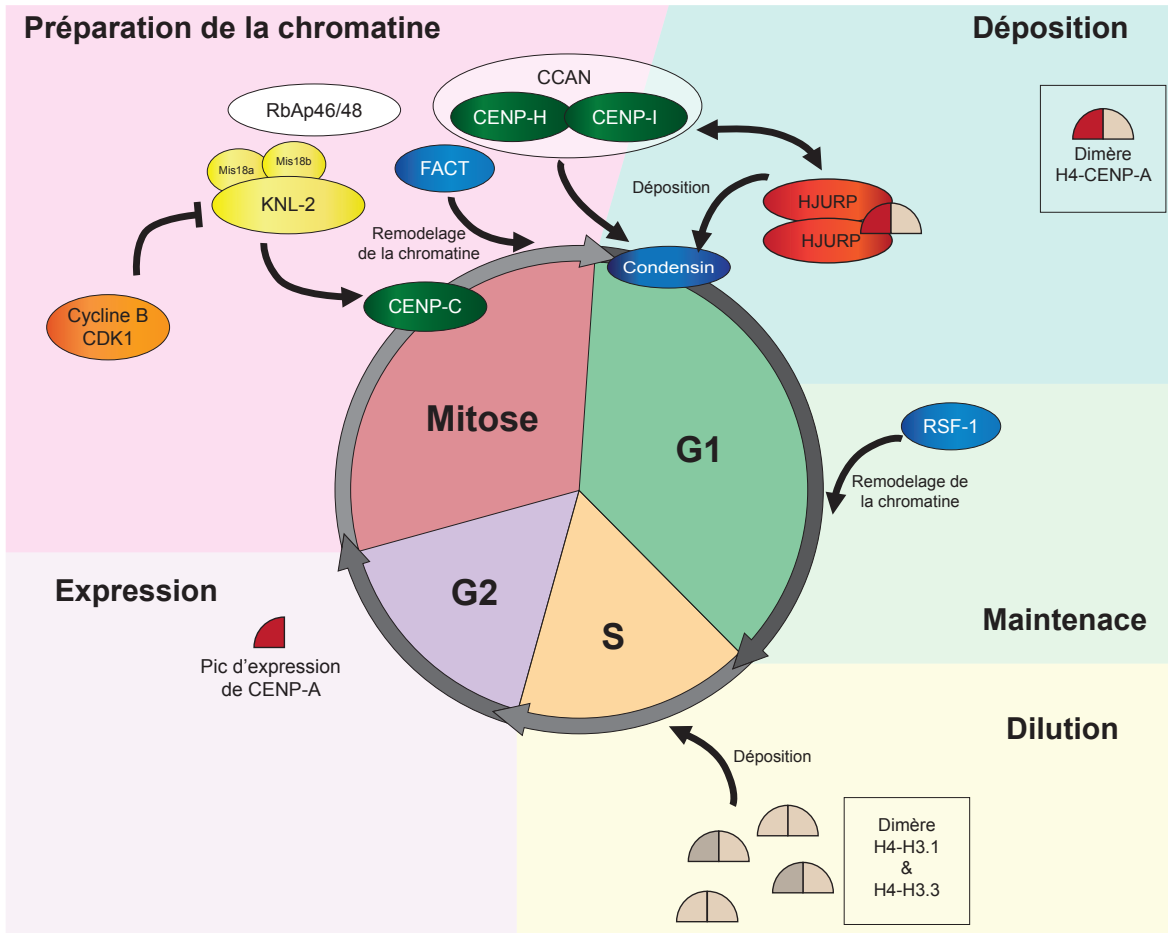


Figure 16 | Modèle de la déposition et de la maintenance de CENP-A au niveau des centromères durant le cycle cellulaire. En fin de mitose/début de G1, la chromatine centromérique est préparée pour l'incorporation de CENP-A par le complexe Mis18/KNL-2. Ceci permet le recrutement de la chaperonne HJURP qui a préalablement pris en charge le dimère H4-CENP-A. En fin de G1, la présence de CENP-A au centromère doit être activement maintenue par le remodelage. Durant la phase S, les nucléosomes CENP-A se retrouvent dilués sur chacun des brins d'ADN. Les positions laissées vacantes sont occupées par des nucléosomes contenant H3.1 mais également H3.3. C'est à la fin de la phase G2 que des nouveaux histones CENP-A sont synthétisées. La cellule entre en mitose. (Adapté de Müller et Almouzni, 2012)

être synergique avec la présence de And-1, une ADN hélicase principalement impliquée dans la transcription, mais dont l'homologue McI1 chez la levure, est nécessaire à la formation des centromères (Mamnun et al., 2006). À part l'importance du rôle clé de sa chaperonne HJURP, les prérequis pour l'incorporation de CENP-A sont donc encore peu clairs.

Rétention de CENP-A

Une fois déposé le nucléosome CENP-A doit être maintenu dans la chromatine centromérique (Figure A16). Pour cela un facteur de remodelage particulier est nécessaire, il s'agit de RSF. Il interagit spécifiquement avec CENP-A durant la phase G1 et est capable de son remodelage *in vitro* (Perpelescu et al., 2009). Le second facteur clé est le complexe ICEN (*Interphase*

Centromere Complex). Il est principalement impliqué dans la cytokinèse, mais est également présent au cours de la phase G1 et est nécessaire pour maintenir CENP-A au niveau des centromères (Lagana et al., 2012).

Devenir de CENP-A lors de la réplication

Durant la phase de réplication, la quantité d'ADN de la cellule est doublée et les histones canoniques « réplication dépendantes » sont incorporées. C'est également le cas des homologues de CENP-A chez les levures où l'incorporation de Cse4 ou Cnp1 n'a pas lieu en début de G1 mais est aussi couplée avec la réplication (Takayama et al., 2008).

Chez les mammifères, la réplication entraîne une dilution des nucléosomes CENP-A, ils se retrouvent répartis sur les deux molécules filles d'ADN, cette répartition se fait probablement de façon équitable (Jansen et al., 2007) (Figure A16), mais tout comme la répartition des différentes marques épigénétiques, son fonctionnement est inconnu. Il semblerait que les positions laissées libres puissent être occupées soit par H3.1 soit par H3.3 (Dunleavy et al., 2011). Cette observation est pour le moment à nuancer, en effet l'utilisation de H3.3 à la place de CENP-A n'est actuellement liée à aucune fonction, et H3.1 peut également occuper ces mêmes positions.

Ce qui par contre est certain, est que la phase G2 qui suit la synthèse, est concomitante avec le pic d'expression de CENP-A (Foltz et al., 2009). CENP-A est donc exprimée avant la mitose, prise en charge par HJURP, mais seulement incorporée après que celle-ci soit complétée (Figure A16). La cellule entre donc en mitose avec uniquement 50% de la quantité maximale de CENP-A que la chromatine peut théoriquement incorporer.

3.3.3 Assemblage du kinétochore

L'incorporation de CENP-A dans la chromatine centromérique permet l'assemblage du kinétochore. L'interface directe entre kinétochore et chromatine est assurée par un ensemble de protéines présentes au niveau du centromère, il s'agit du CCAN (Figure A12). Le CCAN est un groupe de 16 protéines qui sont donc localisées de façon constante au niveau du centromère, quelque soit la phase du cycle cellulaire (Cheeseman et Desai, 2008). Chez les vertébrés, elles appartiennent toutes à la famille des *CENTromeric Proteins* (CENP), dont la nomenclature comporte une lettre en fonction de l'ordre de leur découverte. Ces 16 protéines sont donc CENP-C, CENP-H, CENP-I, CENP-K, CENP-L, CENP-M, CENP-N, CENP-O, CENP-P,

CENP-Q, CENP-R, CENPS, CENP-T, CENP-U, CENP-W et enfin CENP-X. Toutefois un nombre important membres des CENP ne font pas parti du CCAN. C'est bien sur le cas de CENP-A qui est présent dans la chromatine centromérique, mais aussi de CENP-B dont la fonction reste très largement méconnue. C'est également le cas de CENP-E qui est une kinésine que l'on retrouve sur les microtubules. À l'intérieur du CCAN, on peut regrouper ces protéines selon cinq sous-complexes différents (Hinshaw et Harrison, 2013). Le complexe CENP-L/CENP-N, le complexe CENP-H/CENP-I/CENP-K/CENP-M (noté par la suite CENP-HIKM), le complexe CENP-O/CENP-P/CENP-Q/CENP-U/CENP-R (noté CENP-OPQUR), le complexe CENP-T/CENP-W/CENP-X/CENP-S (noté CENP-TWXS) et enfin CENP-C qui fonctionne seul (Figure A17).

Au vu du nombre important de partenaires présents et de leur taille, comprendre les interactions internes au CCAN est déjà un défi à part entière, mais comprendre les interactions dans le contexte de la chromatine centromérique d'une part et avec le reste du kinétochore d'autre part

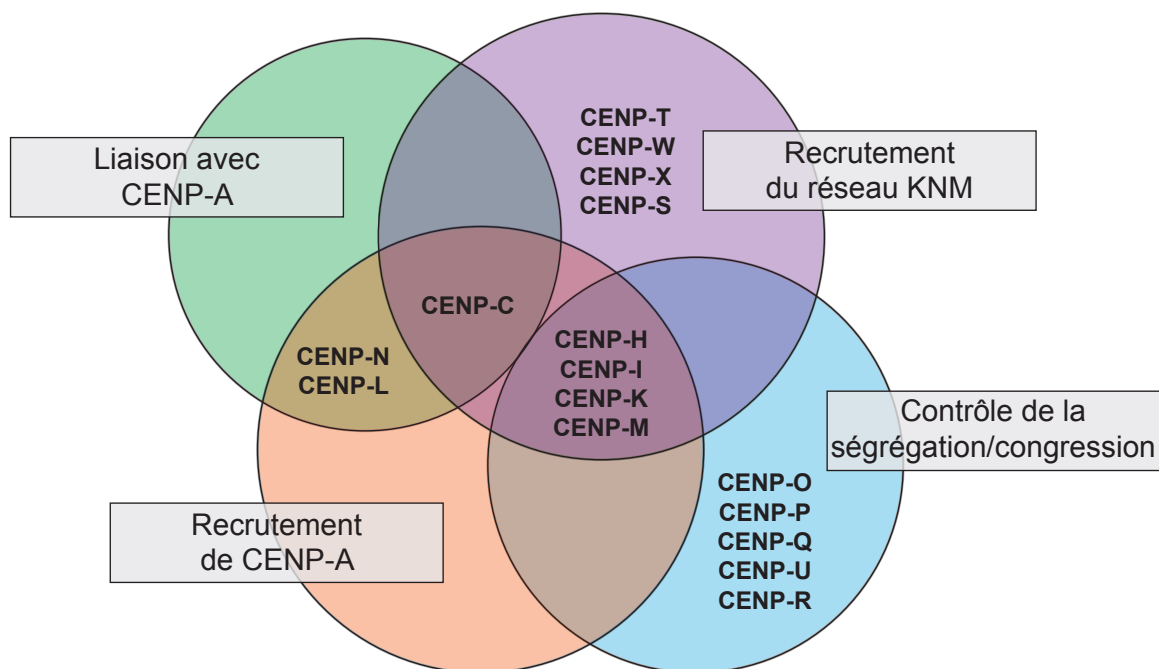


Figure A17 | Fonctions actuellement attribuées aux différents membres du CCAN. Les 16 membres du CCAN peuvent être groupés en sous complexes : CENP-C seul, CENP-TWXS, CENP-N/CENP-L, CENP-HIKM et CENP-OPQUR. Chacun de ces sous complexes possède plusieurs fonctions. Plusieurs complexes sont impliqués pour chacune des fonctions données : la présence de tous les membres est nécessaire pour un fonctionnement optimal (Adapté de McKinley et Cheeseman 2015).

reste aujourd'hui un challenge. De nombreuses avancées ont néanmoins été réalisées ces cinq dernières années (Figure A17) :

Ainsi, CENP-C est le cœur du CCAN, il est capable de reconnaître spécifiquement le nucléosome CENP-A (Carroll et al., 2010), l'ADN centromérique, et est également en contact direct avec le réseau KMN (Screpanti et al., 2011). Il est nécessaire au recrutement de l'ensemble des autres membres du complexe, et également à la maintenance des centromères. Il est en effet requis pour la déposition de CENP-A via HJURP (Falk et al., 2015 ; Tachiwana et al., 2015). CENP-C est donc considéré comme la pierre angulaire des fonctions du CCAN : il est capable de tout faire.

Le seul autre membre dont il a été montré qu'il possède une interaction directe avec le nucléosome CENP-A est CENP-N (Carroll et al., 2009), qui est également nécessaire au recrutement de CENP-A (Carroll et al., 2010). Il est associé avec CENP-L et possède un rôle dans la structuration du CCAN (McKinley et al., 2015).

Le complexe CENP-TWXS est particulièrement intrigant : il est capable d'interactions directes avec l'ADN (Hori et al., 2008). Il se compose de protéines contenant des domaines *histone fold* ; de plus les dimères CENP-T-W et CENP-S-X sont capables de s'associer pour former un tétramère qui adopte une conformation jumelle à celle du tétramère (H3-H4)₂ (Nishino et al., 2012). Il est également capable de former un octamère (CENP-TWSX)₂ qui peut s'incorporer dans l'ADN et induire des torsions de celui-ci (Takeuchi et al., 2014). Toutes ces propriétés comparables à celle d'un nucléosome suggèrent sa possible incorporation directe dans la chromatine, bien que sa fonction exacte reste à élucider.

Le complexe CENP-HIKM posséderait une fonction similaire, mais non redondante à celle de CENP-C ; il connecte ensemble les différents modules du CCAN (Figure A17). CENP-I/H est en effet nécessaire au recrutement de CENP-A via FACT, sans posséder toutefois d'interaction directe avec le nucléosome (Okada et al., 2006 ; Okada et al., 2009). Il fait également office de coordinateur entre les autres blocs du CCAN : CENP-M est une pseudo GTPase, qui permet le maintien du complexe CENP-HIKM (Basilico et al., 2014). CENP-HIKM permet ensuite la stabilisation d'une part de CENP-TWXS, mais aussi de CENP-OPQUR (Foltz et al., 2006 ; Okada et al., 2006). Il est également nécessaire à la liaison avec le réseau KNM.

CENP-OPQUR est impliqué dans la liaison avec le réseau KNM, mais semble en plus être chargé du rôle de régulateur de la congression/ségrégation lors la mitose (Hori et al., 2008), son fonctionnement est toutefois peu clair, d'autant plus que la déplétion de CENP-O ou CENP-Q

entraîne des effets relativement faibles sur la ségrégation des chromosomes (Hori et al., 2008 ; Kagawa et al., 2014).

De façon générale, beaucoup des connaissances sur le CCAN restent donc à acquérir. La plupart proviennent d'études sur la levure, dont le CCAN, qui bien que très conservé chez l'homme, n'en présente pas moins des différences importantes. De nouvelles études chez d'autres eucaryotes sont donc nécessaires. Une chose est toutefois certaine, la formation du CCAN est dépendante du nucléosome CENP-A, et en particulier de ses propriétés structurales particulières.

3.3.4 Structure du nucléosome CENP-A

Avant de détailler la structure du nucléosome CENP-A, il est important de noter qu'il existe un débat sur la composition même de ce nucléosome. Ses différentes compositions, et les structures associées sont résumées par Black et Cleveland, 2011. Les hypothèses prédominantes sont soit celle d'un nucléosome tétramérique composé de deux dimères H4-CENP-A (Williams et al., 2009), soit un nucléosome tétramérique constitué des quatre histones H2A, H2B, CENP-A et H4 (Furuyama and Henikoff, 2009), soit enfin un nucléosome à cœur octamérique, similaire à un nucléosome conventionnel dans lequel les deux histones H3 seraient remplacées par deux CENP-A (Sekulic et al., 2010).

De nombreux travaux ont été réalisés afin de tenter d'apporter une réponse définitive à cette question cruciale (Bui et al., 2012, Shivaraju et al., 2012, Miell et al., 2013 ; Hasson et al., 2013, Padeganeh et al., 2013). L'ensemble de ces études semblent accrédi-ter l'hypothèse du nucléosome octamérique contenant deux histones CENP-A, les autres formes décrites auparavant pourraient s'expliquer par la relative instabilité du nucléosome CENP-A et sa relation particulière avec l'ADN.

En effet, l'une des caractéristiques les plus notables du nucléosome CENP-A est son interaction avec l'ADN. La résolution de la structure du nucléosome octamérique CENP-A par Tachiwana et ses collègues en 2011 (Figure A18), va également dans cette direction, puisque la taille du brin d'ADN visible dans le cristal est autour de 120 pb contre 150 pb pour le nucléosome conventionnel (Tachiwana et al., 2011 ; Tachiwana et al., 2012).

À ces observations sont à ajouter celles faites par Hasson en 2013. Dans leurs travaux, ils décrivent un nucléosome CENP-A protégeant moins d'ADN de la digestion par la nucléase micrococcale qu'un nucléosome conventionnel. Le fragment d'ADN protégé mesurerait entre

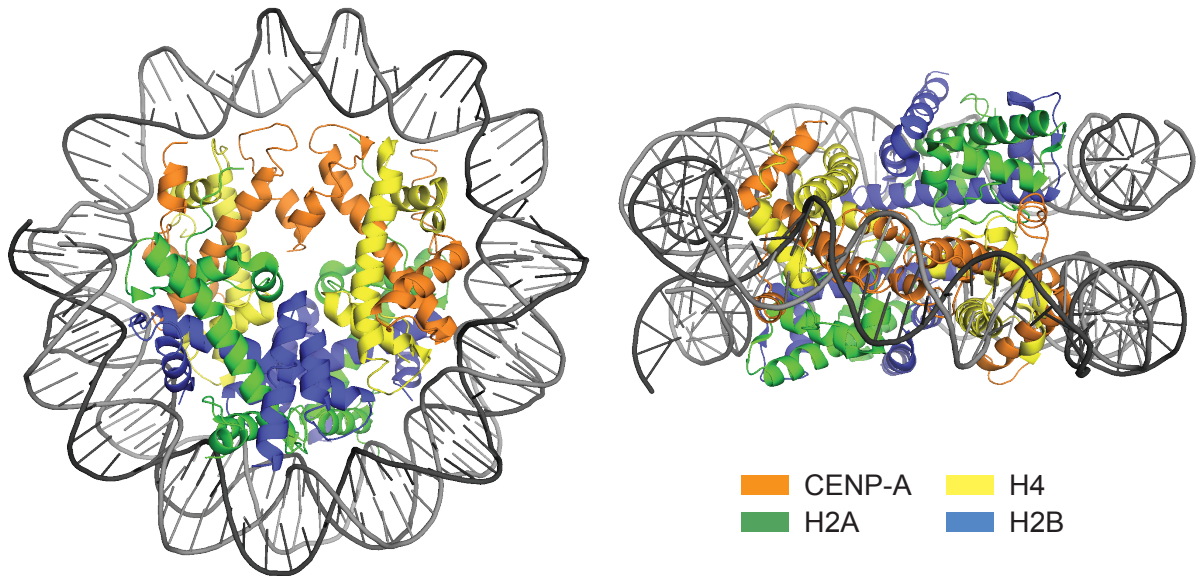


Figure A18 | Structure du nucléosome octamérique contenant le variant CENP-A. Cette structure a été résolue par cristallographie aux rayons X par Tachiwana et al., 2011 (PDB 3AEN). La différence majeure à l'échelle de la particule de cœur est la présence de seulement 120 pb d'ADN dans le cristal contre 147 pb pour un nucléosome canonique. Cette observation suggère une différence dans l'interaction entre le nucléosome CENP-A et l'ADN.

120 et 140 pb seulement contre 150 pour le nucléosome H3 (Hasson et al., 2013). Toutes ces données supposent donc l'existence d'un nucléosome contenant deux CENP-A et qui possède une interaction plus faible avec l'ADN.

Cette propriété particulière du nucléosome CENP-A semble lui être conférée par la présence de l'hélice α N (Figure A19a), en contact directe avec l'ADN entrant et sortant du nucléosome (Tachiwana et al., 2011) (Figure A19b). Cette hélice, commune et spécifique à l'ensemble de la famille H3, n'est pas présente chez les autres histones. Toutefois les hélices α N de CENP-A et H3 sont légèrement différentes : celle portée par H3 est plus longue que celle présente dans CENP-A, et les aminoacides formant la chaîne ne sont pas identiques. Cette hélice variée pourrait être la cause d'interactions plus faibles avec l'ADN entrant dans le nucléosome, expliquant une partie des différences décrites précédemment (Figure A19b). Il est également intéressant de noter que cette variation dans la longueur et la composition de l'hélice α N de CENP-A est très largement conservée entre les espèces renforçant la probabilité de son importance pour les fonctions structurales de CENP-A (Figure A15).

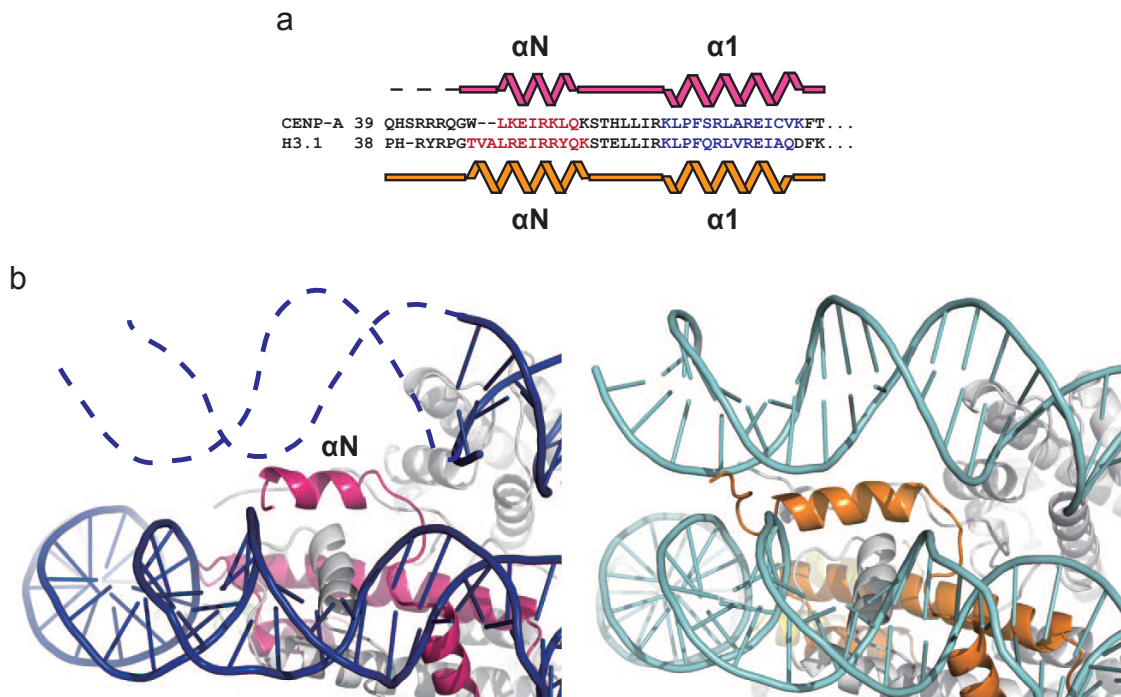


Figure A19 | Différences dans la structure des nucléosomes CENP-A et H3. (a) La structure secondaire entre l'histone CENP-A et H3.1 varie notamment au niveau de l'hélice αN spécifique à la famille H3. Celle-ci est légèrement plus courte chez CENP-A. (b) Zoom sur la structure de l'hélice αN de CENP-A (gauche) et H3.1 (droite) dans leurs nucléosomes respectifs. Les lignes pointillées montrent l'absence d'ADN dans structure obtenue la diffraction aux rayons X. (Adapté de Tachiwana et al, 2011).

Objectifs

À l'heure actuelle, les données présentes dans la littérature tendent à décrire le nucléosome CENP-A avec une structure différente de celle du nucléosome canonique. Cette différence de structure serait ainsi responsable de sa fonction particulière. L'un des éléments clés de la spécificité du nucléosome CENP-A pourrait se situer au niveau de son interaction avec l'ADN. Depuis la publication de la structure du nucléosome CENP-A, de très nombreuses études se sont focalisées sur l'interaction entre le nucléosome CENP-A et les constituants du CCAN. Le nombre et la qualité des résultats publiés pointe le fait que la structure du nucléosome CENP-A est cruciale pour son fonctionnement et que ses fonctions dans la division cellulaire sont dépendantes de ses spécificités. Toutefois aucune de ces études ne s'est focalisée aujourd'hui sur la question de la flexibilité de l'ADN entrant et sortant du nucléosome CENP-A. Dunleavy et collaborateurs effleurent la question et résument la problématique de la façon suivante: « *This partial unwinding of DNA at the CENP-A nucleosome entry-exit site is likely to be an important feature of CENP-A nucleosome identity and function* » (Dunleavy 2013).

C'est dans ce cadre de réflexion que s'inscrivent les travaux de thèse présentés dans ce mémoire. L'objectif global du travail étant la dissection de la relation entre la structure et les fonctions du nucléosome CENP-A. Nous nous sommes concentrés en particulier sur la détermination du rôle du dépliement partiel de l'ADN entrant et sortant du nucléosome CENP-A qui semble bien plus important que celui observé lorsqu'il est complexé au nucléosome canonique.

Avec cette problématique en tête, nous avons cherché à répondre à plusieurs questions fondamentales :

L'ADN sortant du nucléosome CENP-A est-il réellement plus flexible ?

Cette flexibilité de l'ADN du nucléosome CENP-A est-elle nécessaire à la mitose ?

A-t-elle un rôle dans la formation du kinétochore ?

Influence-t-elle le fonctionnement de la chromatine centromérique ?

Le travail présenté ici tente donc de répondre à ces questions.

*La science nous incite donc à abandonner
la recherche de la vérité absolue, et à y substituer
ce qu'on peut appeler la vérité «technique».*

Bertrand Russel

Chapitre 4

Matériels & Méthodes

4.1 Construction des plasmides

4.1.1 Réactions de PCR

Les réactions d'amplification par *PCR (Polychain Reaction)* sont réalisées dans un volume de 50 µl contenant 100ng d'ADN matrice, 1x de *Expand High Fidelity PCR Buffer*, 0,4 mM de dNTP, 500 nM de chacune des amorces sens et antisens (toutes les amorces utilisées sont listées dans le tableau M1) et 1U de *Expand High Fidelity Taq DNA Polymerase* (Roche). Le programme de PCR type comprend une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C ; trente cycles comportant chacun une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 55°C, une étape d'élongation de 1 minute à 72°C; et une étape finale de terminaison de 5 minutes à 72 °C.

Les produits de PCR sont purifiés sur gel d'agarose 1% à l'aide du kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) et clonés dans le vecteur intermédiaire pGEM-T Easy (Promega) avant d'être sous-clonés dans le vecteur final approprié.

4.1.2 Construction du pBABE-GFP-hCENP-A

La construction de ce vecteur a été réalisée par Damien Goutte-Gattat et est décrite dans (Goutte-Gattat et al. 2013) De façon brève : La séquence codante de la green fluorescent protein (GFP)

Nom	Séquence (5' vers 3')
GFP-F	ggatccatggtgagcaagggcgagg
GFP-R	tggacgagctgtacaaggaattc
hCENPA-F	gaattcggcccgcgccgtcgagccgtaaaccggaagcg
hCENPA-R	ctggaagaaggtctgggctaagtcgac
HGmCPA-F	cagaattcatgtaccatacagatgtccagattacgcttaccatacagatgtccagattacgctgtgagcaaggg
HGmCPA-R	gtgcccgcctagcccagaccttctccagaccgcagaccgc

Table M1 | Séquences des amorces de PCR utilisées pour la construction des différents vecteurs décrits dans le manuscrit.

est amplifiée à partir d'un plasmide pEGFP-C1 (Clontech) avec le couple d'amorces GFP-F et GFP-R. Le produit de PCR est cloné dans les sites BamHI/EcoRI du vecteur pBABE-puro (Addgene #1764) donnant le vecteur pBABE-GFP. La séquence codante de CENP-A est amplifiée à partir d'un plasmide exprimant un ARN messenger insensible aux ARN interférents dirigés contre l'ARN messenger CENP-A endogène (Tanaka et al. 2004) . Le fragment amplifié avec les amorces hCENPA-F et hCENPA-R est cloné dans les sites EcoRI/SalI du vecteur pBABE- GFP, produisant le vecteur final pBABE-GFP-hCENP-A.

4.1.3 pBABE-GFP- α N_{H3}-hCENP-A

La séquence codant pour le gène chimère α N_{H3}-CENP-A a été synthétisée par la société Eurofins et est insérée par restriction EcoRI/SalI dans le vecteur pBABE-GFP décrit en 4.1.2.

4.1.4 pCLMFG-HA-GFP-mCENP-A et pCLMFG-HA-GFP- α N_{H3}-mCENP-A

Les séquences codant pour les gènes de souris mCENP-A et α N_{H3}-mCENP-A ont été synthétisées par la société Eurofins. Le fragment mCENP-A est amplifié et cloné par restriction HindIII/BamHI dans le vecteur pEGFP-C2 (Clontech).

Le fragments GFP-CENP-A sont à nouveau amplifiés par PCR à l'aide des amorces HGmCPA-F et HGmCPA-R, les fragments HA-GFP-CENP-A obtenus sont clonés à l'aide du kit Gibson Assembly (NEB) dans le vecteur pCLMFG précédemment modifié au sein du laboratoire à partir du vecteur Addgene #12341. Le fragment α N_{H3}-mCENP-A est ensuite inséré à la place de mCENP-A dans le vecteur pCLMFG-HA-GFP précédemment obtenu. L'insertion est faite à l'aide des sites de restrictions XhoI/NotI.

4.1.5 pQCXIH-RFP-hCENP-C et pQCXIH-RFP-mCENP-C

Le vecteur codant pour mRFP-C2-CENP-C est obtenu du laboratoire du Dr Ian Cheeseman. La séquence RFP-hCENP-C de ce vecteur est amplifiée et clonée dans un vecteur pQCXIH (Clontech) à l'aide des sites de restrictions AgeI/PacI. La séquence mCENP-C a été synthétisée par la société Eurofins et insérée à la place de hCENP-C dans le vecteur pQCXIH-RFP précédemment obtenu. L'insertion se fait à l'aide des sites de restrictions XhoI/PacI.

4.2 Construction des lignées cellulaires

4.2.1 Obtention des lignées HeLa

L'ensemble des lignées cellulaires humaines utilisées dans cette étude sont listées dans la figure M2. Ces lignées de cellules HeLa (ATCC CCL-2) exprimant stablement les constructions GFP-CENP-A et leurs dérivés sont générées par infection rétrovirale avec le virus de la leucémie murine de Moloney (*Moloney murine leukemia virus, MMLV*) produit par des cellules d'empaquetage Phoenix amphotropes (Swift et al., 2001).

Les cellules phoenix-ampho sont transfectées en boîtes de 10 cm par 6 µg d'ADN et 10 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, l'ADN et l'agent transfectant sont dilués séparément dans 250 µL de milieu sans sérum (OptiMEM, Invitrogen) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Puis les deux solutions sont mélangées et incubées à nouveau pendant 20 minutes à température ambiante. Enfin les 500 µL de la solution sont ajoutés, dans les boîtes de culture. Les cellules sont ensuite incubées pendant 12 heures à 37°C après quoi le milieu de transfection est remplacé par du milieu frais.

Deux jours après la transfection des cellules Phoenix, leur milieu est collecté et remplacé par 10 ml de milieu frais. Le surnageant viral est centrifugé 5 minutes à 1200 rpm, puis filtré sur un filtre 0,45 µm. Pour chaque boîte de cellules cibles, 5 ml de surnageant viral sont mélangés avec 5 ml de milieu frais et 8 µg/ml de polybrène (Sigma Aldrich). Le milieu de culture des cellules cibles est alors remplacé par cette solution contenant les particules virales, et les cellules sont remises en culture. L'infection est répétée 24 heures après la première. Puis, 24 h après la

Nom	GFP	RFP
HeLa	-	-
HeLa	GFP-CENP-A	-
HeLa	GFP- α N _{H3} -CENP-A	-
HeLa	-	RFP-CENP-C
HeLa	GFP-CENP-A	RFP-CENP-C
HeLa	GFP- α N _{H3} -CENP-A	RFP-CENP-C

Table M2 | Liste des lignées cellulaires dérivées de cellules humaines utilisées. Les colonnes GFP et RFP réfèrent à la fusion exprimée par ces lignées.

Type	Génotype CENP-A	Immortalisation	Cre Recombinase	GFP	RFP
MEF	Wt/Wt	SV40	-	-	-
MEF	Wt/Wt	SV40	CreERT2	-	-
MEF	Wt/Wt	SV40	CreERT2	HA-GFP-mCENPA	-
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	-	-	-
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	-	-
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	HA-GFP-mCENPA	-
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	HA-GFP- α N _{H3} -mCENPA	-
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	-	RFP-mCENP-C
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	HA-GFP-mCENPA	RFP-mCENP-C
MEF	cKO/KI L2/L2	SV40	CreERT2	HA-GFP- α N _{H3} -mCENPA	RFP-mCENP-C

Table M3 | Listes des lignées cellulaires de souris utilisées. La colonne Cre Recombinase réfère à la Cre exprimée par la lignée, les colonnes GFP et RFP réfèrent aux différentes fusions exprimées par la lignée. La colonne génotype réfère au gène CENP-A endogène de la lignée : Wt pour les allèles sauvages et cKI/KO L2 pour les allèles modifiés avec le tag HA-Flag et flanqué de site LoxP.

dernière transfection, les cellules cibles sont divisées dans deux nouvelles boîtes et la sélection des cellules infectées est réalisée en présence de 3 μ g/ml de puromycine (Sigma-Aldrich).

Les lignées exprimant RFP-hCENP-C sont obtenues après une seconde série d'infection respectant le même protocole. La sélection des cellules infectées se fait en présence de 200 μ g/ml d'hygromycine (Sigma-Aldrich).

4.2.2 Obtention des lignées dérivées de MEF

La lignée de souris CENP-A conditionnal knock-out/knock-in (cKO/KI) a été générée en utilisant les approches standards de génétique. Dans cette lignée, le gène CENP-A a été modifié par un gène codant pour la fusion de CENP-A avec un marquage HA-FLAG-HA afin de coder pour la protéine HA-FLAG-CENP-A. En plus de l'insertion du marquage, l'exon 1 du gène est également modifié par l'ajout d'une séquence loxP de chaque côté. L'ajout de CRE-recombinase permet donc l'excision de l'exon 1, ce qui conduit à la perte d'expression de la protéine.

L'ensemble des lignées cellulaires murines utilisées dans cette étude sont listées dans la figure M3. Des fibroblastes embryonnaires de ces souris (MEF pour mouse embryonic fibroblasts) ont été isolés au jour 14 du développement de l'embryon. Ces cellules sont immortalisées par

infection à l'aide du vecteur pBABE-largeTcDNA (Addgene #1780). Les cellules immortalisées sont sélectionnées par l'ajout de néomycine dans le milieu durant 15 jours. Une nouvelle infection est ensuite réalisée à l'aide des vecteurs MCSV CreERT2 (Addgene #22776) et des vecteurs exprimant les fusions HA-GFP-mCENP-A. Les cellules sont sélectionnées par addition de 2 µg/mL de puromycine. Une nouvelle série d'infection à l'aide du vecteur pQCXIH-RFP-mCENP-C permet la création des lignées exprimant les deux fusions. La sélection de ces cellules est réalisée par addition de 200 µg/mL d'hygromycine dans le milieu de culture.

4.2.3 Culture cellulaire

L'ensemble des lignées est cultivé à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Gibco) contenant en plus 10 % de sérum de veau fœtal, 1% glutamine, 1% pénicilline et streptomycine (Gibco).

4.3 ARN interférence contre CENP-A dans les lignées HeLa

Dans les lignées dérivées des cellules HeLa, l'expression de la protéine CENP-A endogène est abolie en transfectant les cellules avec des siRNA dirigés contre son ARN messager (Dharmacon). En parallèle, des cellules contrôles sont traitées de la même façon à l'aide de siRNA contrôles (Dharmacon). Les transfections sont réalisées dans des plaques 6 puits avec 20 nM de siRNA dans 100 µl d'OptiMEM d'une part et 12 µl de Oligofectamine (Invitrogen) dans 100 µl d'OptiMEM d'autre part ; les mélanges sont incubés 5 minutes à température ambiante avant d'être mélangés entre eux. Après une nouvelle incubation à température ambiante de 20 minutes le mélange final est ajouté aux cellules. Le lendemain, le milieu de transfection est remplacé par du milieu frais. 72 h après transfection les cellules sont fixées ou collectées pour les expériences.

4.4 Induction de la délétion du gène CENP-A endogène dans les lignées MEF

La délétion du gène CENP-A endogène est induite par l'addition de 10 µM (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) au milieu de culture durant 24 h. Chaque 48 h durant 10 jours

les cellules sont décollées, une portion est replacée en culture en présence d'hydroxytamoxifen, le reste des cellules est collecté dans le but de réaliser les expériences.

4.5 Préparation d'extraits protéiques

4.5.1 Extraits de protéines totaux

Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm et 4°C entre chaque lavage. Le culot est ensuite suspendu dans 100 μ L de tampon de lyse RIPA (Tris-HCl pH7.4 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, SDS 0,1% et NaF 50 mM). Les cellules sont alors incubées 30 minutes sur glace à 4°C avant sonication. La quantité de protéines des extraits finaux est alors dosée par la méthode μ BCA réalisée à l'aide du kit *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher).

4.5.2 Extraits de protéines nucléaires

Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X et centrifugées à 1500 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Elles sont ensuite suspendues dans 4 mL de tampon de lyse complété avec des inhibiteurs de protéases (Roche) (NaCl 150 mM, Tris 150 mM, KCl 60 mM, sucrose 340 mM, EDTA 2 mM, EGTA 0,5 mM, DTT 1 mM, spermine 0,2 mM, spermidine 0,65 mM, PMSF 0,5 mM et NP40 0,4 %), incubées 5 minutes à 4°C sur glace, puis centrifugées à 1500 rpm et 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot repris dans 3 mL de tampon de lavage (tampon de lyse sans EDTA, EGTA, ni NP40) et centrifugé une nouvelle fois à 1500 rpm et 4°C durant 5 minutes. Le surnageant est à nouveau jeté, le culot est constitué des noyaux.

Les noyaux sont alors lysés de la façon décrite précédemment pour les extraits totaux.

4.6 Western Blot

Les extraits protéiques sont dénaturés avant utilisation par addition de tampon de Laemmli (Tris pH 6.8 100 mM, SDS 2 %, glycérol 10 %, B-mercaptoéthanol 1 %, bleu de bromophénol) et par incubation à 100°C pendant 10 minutes. Après centrifugation, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS), puis transférées

sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF) 0,2 μm préalablement activée 30 secondes dans de l'isopropanol 100 %.

Après transfert, la membrane est saturée par une solution de PBS 1X, lait 5 %, Tween 0,1 % ou de PBS 1X, BSA 5 %, Tween 0,2% pendant 30 minutes. Elle est ensuite incubée successivement avec les solutions d'anticorps primaires durant une nuit à 4°C et les solutions d'anticorps secondaires pendant une heure à température ambiante. Des lavages sont réalisés entre chaque solutions d'anticorps et avant la révélation dans un tampon PBS (PBS 1X, Tween 0,02 % ou PBS 1X, NaCl 0,4 M, Triton X-100 0,1%).

Les anticorps utilisés sont listés dans le tableau M4. Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de PBS 1X, SVF 10 %, Tween 0,2 % ou PBS 1X, BSA 3 % et Tween 0,2 %. Les anticorps secondaires dans une solution de PBS 1X, lait 1 % et Tween 0,02 %. La membrane est révélée à l'aide du système Luminata (Millipore).

4.7 Immunofluorescence

Pour les analyses par immunofluorescence, les cellules sont cultivées sur des lamelles dans des plaques 24 puits. Elles sont fixées avec une solution de PBS 1X, PFA 2 % pendant 20 minutes

Nom	Fournisseur	Référence	Dilution en WB	Dilution en IF
CENP-A	Epitomics	1745.1	1/1000	-
CENP-B	Abcam	ab25734	-	1/1000
CENP-C	Gift from I. Cheeseman		-	1/2000
CENP-C	Abcam	ab193666	-	1/2000
CENP-T	Gift from I. Cheeseman		-	1/2500
CREST	Immunovision	HCT-0100	-	1/2000
H3	Millipore	05-928 (clone A3S)	1/10000	-
H4	Abcam	ab10158	1/5000	-
HA	Abcam	ab9110	1/1000	-
INCENP	Abcam	ab36463	-	1/500
Lamin B	Santa Cruz	6217	-	1/300
Tubuline	Santa Cruz	2148S	1/1000	-

Table M4 | Liste des anticorps primaires utilisés en western blot ou en immunofluorescence.

à 37°C et rincées au PBS 1X. Elles sont perméabilisées par 0,2 % de Triton X-100 pendant 10 minutes, puis saturées par du PBS 1X, BSA 2 % ou PBS 1X, NGS 1 % pendant 30 minutes. Après saturation, les lamelles sont incubées successivement avec la solution d'anticorps primaires pendant 1 heure à 37°C, puis avec la solution d'anticorps secondaires pendant 1 heure à 37°C ; trois lavages au PBS 1X sont réalisés après chaque incubation. L'ADN est coloré par addition de 0,5 mg/ml de Hoechst 33443 dans le premier lavage suivant le dernier anticorps.

La liste des anticorps utilisés est disponible dans le tableau M4. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans une solution de PBS 1X, BSA 3 %, Tween 0,05 %, ou PBS 1X, NGS 1 %, Tween 0,05 %.

4.8 Calcul des défauts mitotiques et de cytokinèse

Deux types de défauts sont facilement observables durant la mitose ; les chromosomes non alignés sur la plaque métaphasique durant la métaphase, et la présence de chromosomes qui ne ségrégent pas vers l'un des pôles durant l'anaphase. Le nombre de cellules présentant ces phénotypes est quantifié sur des cellules fixés dont l'ADN est coloré au Hoechst.

Les défauts de cytokinèse sont quantifiés par rapport au nombre de cellules présentant des micronoyaux durant l'interphase, montrant un échec de la sortie correcte de la mitose.

Pour les cellules HeLa, les défauts sont comptés 72 heures après transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre CENP-A, ou un siRNA control (voir 4.3). Les données présentées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes dans chacune desquelles au moins 300 cellules sont comptées.

Pour les cellules MEF, ces défauts sont calculés soit avant l'induction de la délétion du gène CENP-A (voir 4.4) soit 8 jours après l'induction. Les données présentées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes dans chacune desquelles au moins 200 cellules sont comptées.

4.9 Microscopie et analyse d'image

L'ensemble de la microscopie a été effectuée sur cellules fixées à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager Z1 équipé d'un objectif x63 Plan-Apochromat. La GFP, la RFP, la cyanine-2, la

cyanine-3 et le Hoechst 33342 ont été utilisés comme fluorochromes : les filtres adéquats sont utilisés pour la prise d'image. Les images sont acquises en Z-stacks à l'aide d'une caméra Zeiss AxioCam pilotée par le logiciel Zeiss Axiovision 4.8.10.

Tous les traitements d'image ont été réalisés en utilisant le logiciel FiJi (ImageJ2-RC14). La quantification du signal de CENP-C aux centromères requiert une déconvolution des images de façon à obtenir les projections bidimensionnelles des d'intensités maximales de fluorescence. Les projections sont sauvegardées comme des images TIFF 8-bit. Ensuite, chaque noyau individuel est déterminé en utilisant la coloration au Hoechst, puis pour chaque noyau la colocalisation du signal de CENP-C (ou de CENP-T) avec la GFP-CENP-A ou avec le CREST est calculée en utilisant le plugin *Jacop 2.1.1 plugin* (Bolte et Cordelières, 2006). Les cellules dont au moins de 30 centromères sont détectés dans le noyau sont éliminés des analyses. Les données présentées représentent la moyenne de colocalisation d'au moins 150 cellules réparties équitablement entre 5 expériences indépendantes.

*La science c'est ce que l'on connaît ; la
philosophie c'est ce que l'on ne connaît pas.*

Bertrand Russel

Deuxième Partie

Résultats

La partie résultats de ce manuscrit est présentée sous la forme d'un article envoyé aux éditeurs pour publication. Afin de faciliter sa lecture, le numéro des figures renvoie directement aux figures présentes dans celui-ci. La bibliographie renvoie quand à elle à celle située en quatrième partie du manuscrit.

Les résultats présentés dans cette partie concernent les implications de la structure du nucléosome CENP-A dans son interaction avec l'ADN.

Un second aspect du projet visait initialement à répéter les travaux de Zeitlin* qui en 2009 décrivent le recrutement de CENP-A au niveau de sites de cassures de l'ADN. Il s'agit de la seule fonction externe au centromère aujourd'hui supposée pour CENP-A. Malheureusement nous n'avons pas pu reproduire ces résultats.

Toutefois cette partie du projet a permis des avancées dans la compréhension du rôle du complexe FACT dans le mécanisme de réparation des dommages de base de l'ADN (Base Excision Repair ou BER). Un article est en préparation à ce sujet, il est présenté dans la partie annexes de ce manuscrit.

*Zeitlin, S. G., Baker, N. M., Chapados, B. R., Soutoglou, E., Wang, J. Y. J., Berns, M. W., & Cleveland, D. W. (2009). Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15762–15767. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908233106>

The flexible ends of CENP-A nucleosome are required for mitotic fidelity

Yohan Roulland¹, Khalid Ouararhni², Mladen Naidenov³, Lorrie Ramos¹, Muhammad Shuaib², Sajad Hussain Syed^{1,3}, Imtiaz Nizar Lone^{1,3}, Ramachandan Boopathi^{1,3}, Emeline Fontaine¹, Gabor Papai⁴, Hioraki Tachiwana⁵, Thierry Gautier¹, Dimitrios Skoufias⁶, Kiran Padmanabhan¹, Jan Bednar¹, Hitoshi Kurumizaka⁵, Patrick Schultz⁴, Dimitar Angelov^{3#}, Ali Hamiche^{2#} & Stefan Dimitrov^{1#}

¹Université de Grenoble Alpes/INSERM U823, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Department of Functional Genomic and Cancer, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) /Université de Strasbourg/CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France.

³Université de Lyon/CNRS/INRA UMR 5239, LBMC, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France

⁴Department of Integrated Structural Biology, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) /Université de Strasbourg/CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France.

⁵Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Advanced Science & Engineering, Waseda University, Shinjuku, Tokyo 162-8480, Japan.

#, corresponding authors

Abstract

CENP-A is a histone variant, which replaces histone H3 at centromeres and confers unique properties to centromeric chromatin. The crystal structure of CENP-A nucleosome suggests flexible nucleosomal DNA ends but their dynamics in solution remains elusive and their implication in centromere function is unknown. Here, by using electron cryo-microscopy we determined the dynamic solution properties of the CENP-A nucleosome. Our biochemical, proteomic and genetic data reveal that the high flexibility of the DNA ends impairs histone H1 binding to the CENP-A nucleosome. Substituting the 2-turn α N-helix of CENP-A with the 3-turn α N-helix of H3 results in particles able to bind histone H1. *In vivo* replacement of CENP-A nucleosomes with H3-CENP-A hybrid nucleosomes leads to H1 recruitment, delocalization of kinetochore proteins and significant mitotic and cytokinesis defects. Our data reveal that the evolutionarily conserved flexible ends of the CENP-A nucleosomes are essential to ensure the fidelity of the mitotic pathway.

Introduction

Chromatin is composed of repetitive structures of the basic unit - a nucleosome, which consists of histone octamer composed of core histones (two of each H2A, H2B, H3 and H4) around which 167 bp of DNA are wrapped to form two superhelices (Luger et al., 1997; Van Holde et al., 1980). Individual nucleosomes interspersed with linker DNA, form the 10 nm chromatin filament (Thoma et al., 1979; Van Holde et al., 1980). A fifth histone, termed 'linker histone', interacts with this linker DNA and assists in the assembly, condensation and stability of the 30 nm chromatin fiber (Makarov et al., 1983; Thoma et al., 1979).

In addition to the conventional core histones, each cell expresses histone variants. Histone variants are non-allelic isoforms of conventional histones and all histones, except H4, have variants (Van Holde et al., 1980). Incorporation of these variants confers novel structural and functional properties to chromatin (reviewed in (Boulard et al., 2007)).

The histone CENP-A is a textbook example of a histone variant that upon incorporation changes the properties of a nucleosome (Goutte-Gattat et al., 2013; Henikoff et al., 2014; Kingston et al., 2011; Mizuguchi et al., 2007; Tachiwana et al., 2011; Xiao et al., 2011). CENP-A belongs to the H3 family of histones (Earnshaw and Migeon, 1985; Palmer et al., 1987) and is exclusively localized to centromeres and defines the specific centromere structure and function (Buscaino et al., 2010; Henikoff and Dalal, 2005).

CENP-A epigenetically marks the centromeres, where it is required for the assembly of active kinetochores. The Constitutive Centromere Associated Network (CCAN), a complex consisting of 16 proteins (termed generally as CENPs), recognizes and directly interacts with centromeric chromatin (Perpelescu and Fukagawa, 2011). Importantly, two of the CCAN members, CENP-C and CENP-T, assemble a platform to direct kinetochore formation (Perpelescu and Fukagawa, 2011).

CENP-A depletion results in numerous mitotic and cytokinetic defects and subsequent aneuploidy (Goutte-Gattat et al., 2013; Regnier et al., 2005). CENP-A loss leads to altered composition and organization of the kinetochore, including the delocalization of the inner kinetochore proteins CENP-C, CENP-I and CENP-H as well as the outer kinetochore components HEC1, Mad2 and CENP-E (Goutte-Gattat et al., 2013; Regnier et al., 2005).

The crystal structure of the CENP-A nucleosome particle was recently solved (Tachiwana et al., 2011). In contrast to the conventional nucleosome structure, only 121 bp of DNA are resolved in the crystal structure of the CENP-A nucleosome, suggesting that 13 bp of DNA at each nucleosomal end display marked flexibility. In agreement with

this suggestion, CENP-A nucleosomal ends exhibited higher accessibility to nucleases (Hasson et al., 2013; Kingston et al., 2011). Whether the CENP-A driven nucleosomal end DNA flexibility has any physiological consequences is totally unknown.

To determine the dynamics of nucleosomal DNA ends in solution, both conventional and CENP-A nucleosomes were analyzed by using Electron Cryo-Microscopy (E-CM) combined with 3D reconstruction. E-CM data clearly show that the CENP-A nucleosomal ends, as suggested by the crystal structure, exhibit a high degree of flexibility. The α N helix of H3 and the preceding loop, which is in contact with DNA, plays a role in stabilizing the conventional nucleosomal DNA ends. This specific rigid orientation of the exit and entry angle of the nucleosomal DNA ends in turn regulates the binding of histone H1 to conventional nucleosomes (Syed et al., 2010). Thus, highly dynamic CENP-A nucleosomal ends would likely preclude the binding of H1, which might in turn be important for centromere function and kinetochore assembly (Figure 1 **a,b**). Since the fixed entry/exit angle and rigidity of DNA ends of a conventional nucleosome is governed by the interaction of the α N helix of H3, we created a hybrid CENP-A nucleosome, wherein the α N helix of CENP-A was replaced with that of H3 which is one helical turn longer. We then studied the properties of these hybrid nucleosomes *in vitro* and *in vivo* and compared them with those of wildtype (WT) CENP-A nucleosomes. Our biochemical and cell biological analyses reveal that the flexible DNA ends of CENP-A nucleosome are essential not just for structural integrity of the centromere but also to ensure fidelity of the mitotic process.

Results

CENP-A nucleosomes exhibit highly dynamical DNA ends in solution

We used Electron Cryo-Microscopy (E-CM) to analyze the dynamics of CENP-A nucleosome in solution. We purified recombinant human core histone octamers containing conventional H3 or CENP-A (**Supplemental Figure S1**), and reconstituted centrally positioned nucleosomes on 197 base pairs (bp) 601 DNA in order to have

25 bp free DNA ends. The reconstituted particles were studied in frozen hydrated conditions (**Supplemental Figure S2**). Frames showing well-separated nucleosomes were selected and 29,711 and 24,286 molecular images were extracted for conventional and CENP-A nucleosomes, respectively. These images were used for building *ab initio* a three-dimensional (3-D) model of the particles (**Figure 1c**). The final E-CM map is in full agreement with the crystal structure of the nucleosome core particle (NCP) (Luger et al., 1997). To analyze the conformational variability of the particle population, a 3-D classification scheme based on maximum likelihood optimization was used to separate different structural variants (Scheres, 2010). While the nucleosome core showed little variation, we observed distinct configurations of the DNA ends for both conventional and CENP-A particles (**Fig.1c**). In particular, the CENP-A particles showed open conformations with much higher entry/exit angles (higher DNA end orientation fluctuations) compared to the conventional ones. We conclude that in solution the CENP-A nucleosomal ends exhibited, as suggested by the X-ray diffraction studies, very high degree of flexibility.

CENP-A nucleosome is refractive to histone H1 binding

The binding of histone H1 to the nucleosome is regulated by the entry/exit angle of the nucleosomal DNA ends and is favored by rigid DNA (Bednar et al., 1998; Syed et al., 2010). The flexibility of the ends within the CENP-A nucleosome might therefore interfere with the binding of histone H1. To analyze the ability of histone H1 to interact *in vitro* with the CENP-A nucleosome we have used a combination of two techniques, namely EMSA and hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) footprinting. EMSA allows the visualization of H1 binding to the nucleosome, but does not differentiate between specific and non-specific association, while $\bullet\text{OH}$ footprinting detects the specific H1 binding at one base pair resolution (Menoni et al., 2012; Syed et al., 2010).

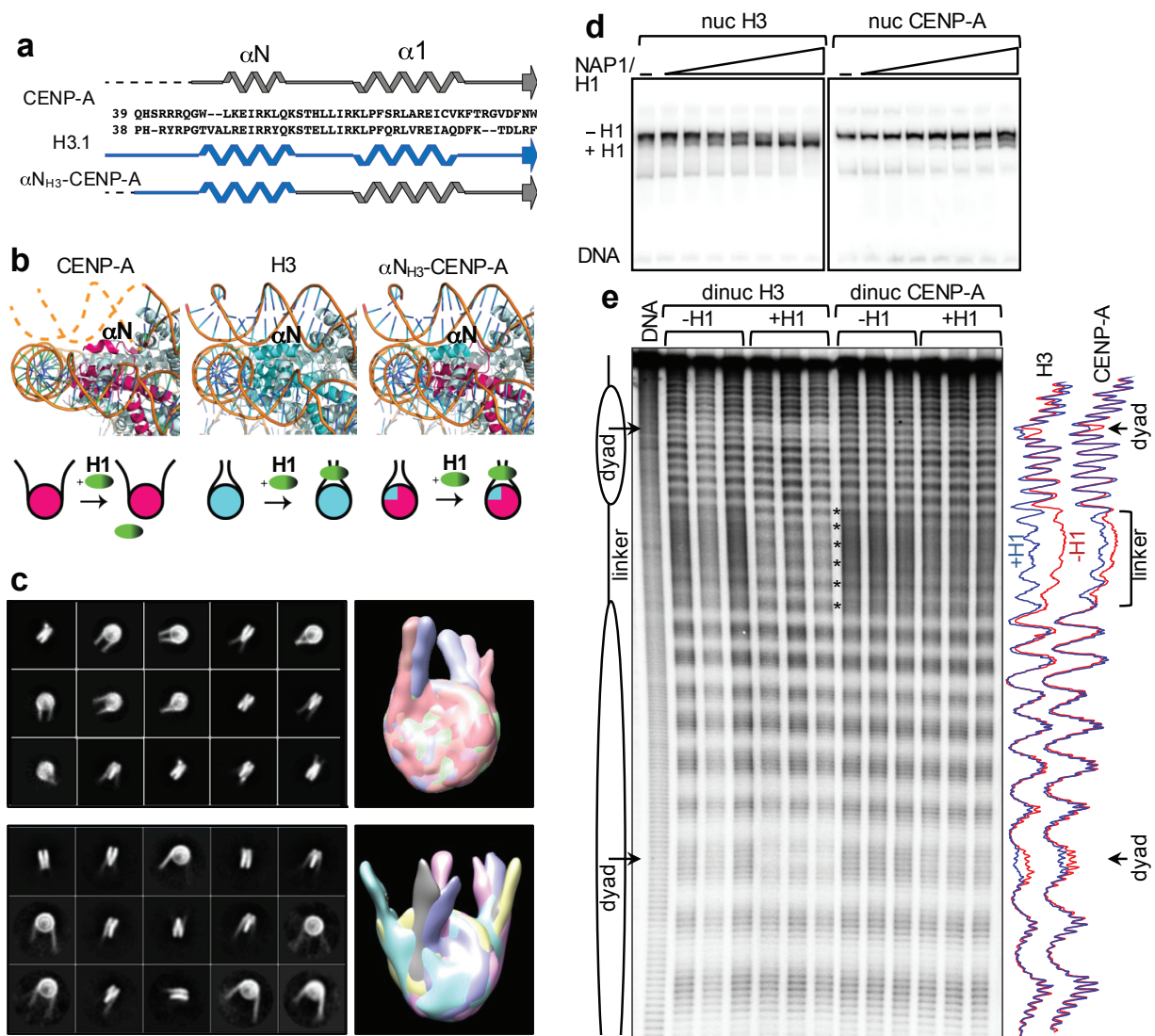


Figure 1. The presence of CENP-A interferes with histone H1 binding to the nucleosome.

(a) Schematics of the secondary structure of the N-terminal regions of CENP-A, H3 and α N_{H3}-CENP-A in the nucleosome. The sequences of human CENP-A, H3 and α N_{H3}-CENP-A are aligned with the secondary structural elements. (b) Close up views of the α N helices and the DNA edge regions of CENP-A (left panel) and H3 (middle panel) nucleosomes; right panel, predicted organization of the α N helices and the DNA edge regions of α N_{H3}-CENP-A nucleosome; bottom panel, schematics of the expected interaction of H1 with the respective nucleosomes, depicted in the upper panels. (c) Electron cryo-microscopy and image analysis of conventional and CENP-A nucleosomes reconstituted on 601 DNA; gallery of class averages after image alignment and clustering for conventional (upper panel) and CENP-A (lower panel) nucleosomes without H1; right, surface representation of the main distinct conformations of conventional (upper panel) and CENP-A (lower panel) nucleosomes. (d) EMSA of binding of histone H1 to conventional H3 (nucH3, left) and to CENP-A (nuc CENP-A, right) mononucleosomes. The particles were incubated with increasing amount of NAP-1-histone H1 complex. (e) Hydroxyl radical footprinting of conventional H3 and CENP-A di-nucleosomes. The di-nucleosomes were assembled with H1 and H1 binding was analyzed by \bullet OH footprinting. Left, schematics of the di-nucleosome, the nucleosome dyad is indicated with arrow; right, scans of the \bullet OH digestion pattern of H3 and CENP-A di-nucleosomes, assembled (+H1, blue) or not (-H1, red) with H1.

A physiologically relevant linker histone chaperone (NAP-1) was used to deposit histone H1 on centrally positioned conventional or CENP-A nucleosomes (Syed et al., 2010). The particle solutions were incubated with increasing amounts of NAP-1/H1 complex and run on native PAGE (**Figure 1d**). As seen, at the NAP-1/H1 concentration when a complete shift for the H3-nucleosome was found, only a very weak shifted band reflecting the H1-CENP-A-nucleosomal complex was detected. These data showed that the presence of CENP-A interferes with the binding of histone H1 to the nucleosome.

This conclusion was further confirmed by the •OH footprinting experiments (**Figure 1e**). In agreement with our earlier data (Syed et al., 2010), the binding of histone H1 to conventional H3 di-nucleosomes results in: (i) clear protection of the nucleosomal dyad due to the strong interaction of the globular domain of H1 with the dyad, and (ii) generation of 10 bp repeat of the linker DNA (**Figure 1e**, see the footprinting gel and the scans), which reflects the H1-induced formation of the stem structure (H1 interacts with both linkers and brings them in close vicinity and thus, induces the assembly of the stem (Hamiche et al., 1996; Menoni et al., 2012; Syed et al., 2010)). However, only very faint protection and 10 bp repeats were observed in CENP-A-dinucleosomes incubated with the NAP1/H1 complex (**Figure 1e**, see the footprinting gel and the scans). These data revealed weak interaction of histone H1 with the CENP-A particles. Taken together, our *in vitro* experiments demonstrate that the CENP-A nucleosomal templates are poor substrates for H1 binding.

“Rigidifying” the DNA ends of the CENP-A nucleosome allows efficient binding of histone H1 *in vitro*

The flexibility of the DNA ends of CENP-A nucleosome highlights a distinct feature of CENP-A amino-terminal region within the nucleosome (Tachiwana et al., 2011). The α N helix of CENP-A is one helical turn shorter than that of conventional H3 nucleosome

and the preceding region, in contrast to that of H3, is completely disordered ((Tachiwana et al., 2011), see also **Figure 1a**). However, both the length of α N helix and the loop segment preceding the α N helix (this loop interacts directly with the DNA ends in H3 nucleosome (Luger et al., 1997)) are required for maintaining the DNA orientation at the entrance and exit of H3 nucleosomes. Thus the “defects” in the organization of these regions in CENP-A might be responsible for the inherent flexibility of the DNA ends of the CENP-A nucleosome (Tachiwana et al., 2011) and the inability of histone H1 to bind to it both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, we hypothesized that swapping the CENP-A α N helix and the segment preceding it with those of conventional H3 would rigidify the ends of nucleosomal CENP-A DNA and would allow H1 binding (see Schematics,

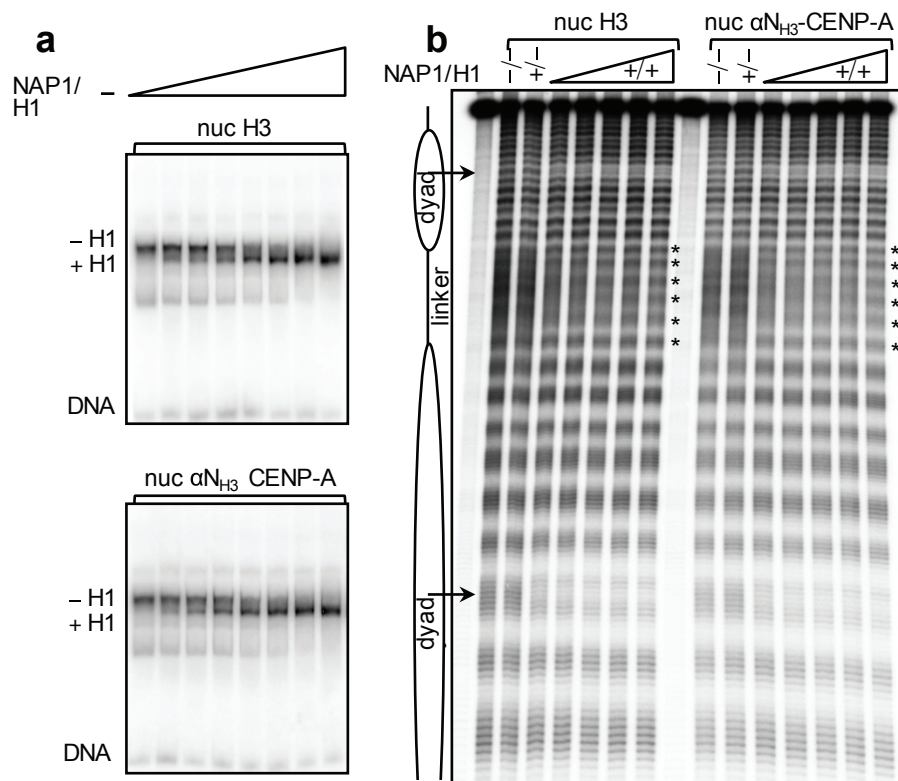


Figure 2. Efficient *in vitro* and *in vivo* binding of histone H1 swapped α N_{H3} helix mutant CENP-A (α NH₃-CENP-A) nucleosome. (a) EMSA of histone H1 binding to H3 and α N_{H3}-CENP-A nucleosomes. Conventional H3 (upper panel) or swapped α N_{H3}-CENP-A nucleosomes (lower panel) were incubated with increasing amount of NAP-1-histone H1 complex and analyzed by PAGE. The positions of the non-bound and H1-bound nucleosomes are indicated. (b) Hydroxyl radical (\bullet OH) footprinting of H3 and α N_{H3}-CENP-A di-nucleosomes. The di-nucleosomes were assembled with increasing amount of NAP-1-histone H1 complex and H1 binding was analyzed by \bullet OH footprinting. Left, schematics of the di-nucleosome, the nucleosome dyad is indicated with arrow.

Figure 1a,b). To test this we generated a hybrid H3-CENP-A mutant ($\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A) containing the αN helix and the preceding loop region of H3. Next, we expressed this construct in bacteria and after purification we used it for reconstitution of $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A nucleosomes (see **Figure 2a, b and Supplemental Figure S1**). The deposition of H1 was performed by using the NAP-1/H1 complex as detailed in **Figure 1**. Then the ability of histone H1 to bind to these mutant nucleosomes was studied again with EMSA and $\bullet\text{OH}$ footprinting as described for WT CENP-A (**Figure 1**). The EMSA experiment clearly shows that histone H1 binds to both H3 and $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A particles with the same efficiency (**Figure 2a**, compare upper and lower panels). $\bullet\text{OH}$ footprinting revealed identical localization of histone H1 on both control H3 and $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A nucleosomes as evidenced by a clear protection at the nucleosomal dyad and the generation of the typical $\bullet\text{OH}$ cleavage 10 bp-repeat of the linker DNA (**Figure 2b**). Therefore, the hybrid $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A nucleosomes, in contrast to WT CENP-A nucleosomes, exhibit a structure very similar to that of a conventional nucleosome and are able to bind H1 with higher specificity and affinity. As H1 binding requires a rigid end-DNA entry/exit angle, these data provide strong evidence that hybrid H3-CENP-A particles indeed have a compact conformation.

H1 is not associated with CENP-A chromatin *in vivo*.

To determine whether H1 binding to CENP-A nucleosomes was also negatively affected *in vivo* as our *in vitro* experiments demonstrated, we used a proteomic approach coupled to mass spectrometry using cell culture models. We generated stable HeLa cell lines expressing double HA and FLAG tagged CENP-A (e-CENP-A) (Goutte-Gattat et al., 2013; Shuaib et al., 2010). Stable HeLa cell lines expressing double-tagged conventional histone H3.1 (e-H3.1) or the histone variant H3.3 (e-H3.3) were used as positive controls. We isolated the nucleosomal e-CENP-A as well as both e-H3.1 and e-H3.3 nucleosomal complexes by double immunoaffinity purification (Goutte-Gattat et al., 2013). The composition of the complexes was analyzed by mass spectrometry,

SDS PAGE and Western blotting (**Figure 3**). The e-CENP-A complex, in agreement with the available data (Foltz et al., 2006; Goutte-Gattat et al., 2013), contained several proteins from the Constitutive Centromere Associated Network (CCAN) as well as other proteins (**Figure 3 and Supplemental Figure S3**). Importantly, no histone H1 was found associated within the complex as shown by electrophoretic analysis, Western blotting and mass spectrometry (**Figure 3b-d**), although e-H3.1 and e-H3.3

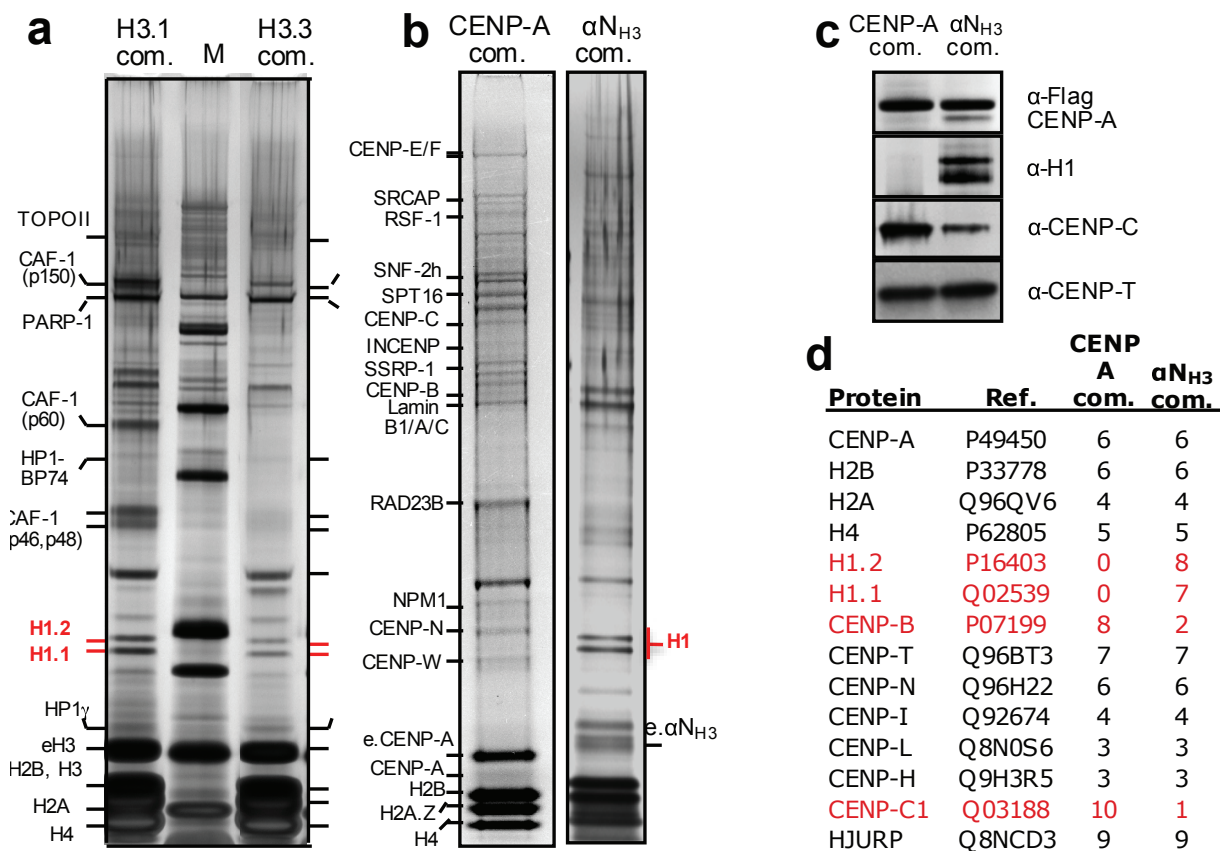


Figure 3. Histone H1 binds in vivo to the α N_{H3}-CENP-A swapped nucleosomes, but not to WT CENP-A particles. (a) Silver staining of proteins associated with either e-H3.1 or e-H3.3 nucleosomes. The nucleosomal e-H3.1 and e-H3.3 complexes were purified by tandem immunoaffinity from stable HeLa cells expressing either e-H3.1 or e-H3.3 and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry. Lane M corresponds to a protein molecular mass marker. The H1 histones (both H1.1 and H1.2 isoforms) are indicated in red. (b) Silver staining of proteins associated with either the e-CENP-A (left) or the e- α N_{H3}-CENP-A (right) nucleosomal complexes isolated from stable HeLa expressing either e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A, respectively. Note that the e-CENP-A complex, in contrast to e- α N_{H3}-CENP-A and both e-H3.1 and e-H3.3 complexes, is not associated with histone H1. (c) Western blot detection of the indicated proteins associated with either the WT e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A mutant nucleosomes. (d) Mass spectrometry analysis of selected proteins associated with either the WT e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A mutant nucleosomes. Proteins together with the number of identified peptides are indicated. The H1 histones (both H1.1 and H1.2 isoforms) and CENP-C and CENP-B are indicated in red.

nucleosomal complexes contained both isoforms H1.1 and H1.2 of histone H1 (**Figure 3a**). Therefore, histone H1 does not associate *in vivo* with CENP-A chromatin. These *in vivo* data fully agree with the poor non-specific *in vitro* binding of H1 to reconstituted CENP-A nucleosomes (**Figure 1**).

***In vivo* binding of H1 to the α_{H3} -CENP-A nucleosome**

Does artificially rigidifying CENP-A nucleosomal ends allow H1 binding *in vivo*? To analyze this, we generated stable HeLa cell lines expressing double HA and FLAG epitope tagged α_{H3} -CENP-A. The α_{H3} -CENP-A nucleosomal complex was purified as above and compared to the WT CENP-A nucleosomal complex. Its members were characterized by SDS PAGE, Western blot and mass spectrometry (**Figure 3b-d**). Unlike the CENP-A nucleosomal complex, all methods identified histone H1 present in the α_{H3} -CENP-A nucleosomal complex. The characteristic histone H1 doublet was present in the electrophoretic pattern of the α_{H3} -CENP-A complex, but not in that of WT CENP-A one (**Figure 3b**). The anti-H1 antibody revealed a clear doublet corresponding to H1 (**Figure 3c**) and 15 H1 peptides (in total) were found by mass spectrometry in the α_{H3} -CENP-A nucleosomal complex (**Figure 3d**). Taken as a whole, our data reveal that the swapping the α_{N} helix and the preceding region of CENP-A with those of H3, allows the generation of a particle with rigid orientation of the entry/exit DNA ends, which then allows efficient and specific association with histone H1 both *in vitro* and *in vivo*.

The *in vivo* replacement of CENP-A with the α_{H3} -CENP-A swap mutant leads to strong mitotic and cytokinetic defects

The replacement of CENP-A with the hybrid α_{H3} -CENP-A allows H1 binding which would in turn lead to the formation of condensed chromatin fibers similar to those established with canonical H3. Could this compact structure of the α_{H3} -CENP-A chromatin then affect the function of centromeres? To test this hypothesis, endogenous CENP-A was knocked down by using specific siRNAs in HeLa cell lines and we analyzed

the effect of expressing a siRNA resistant GFP- α N_{H3}-CENP-A hybrid transcript as compared to a siRNA resistant GFP-CENP-A transcript (see schematics in **Figure 4a**). This was followed by quantitative analysis of mitotic progression in all cell lines.

Treatment with siRNA results in very strong ablation of endogenous CENP-A: more than 85-90% of endogenous CENP-A was depleted in each of the cell lines used and, as expected, the expression of the siRNA-resistant GFP-fusions was not affected (**Figure 4b**). Both GFP-fusions were found localized to the centromeres (**Figure 4c**). In agreement with the reported data (Goutte-Gattat et al., 2013; Regnier et al., 2005), the absence of CENP-A in naïve HeLa cells has deleterious effects on both mitosis and cytokinesis (**Figure 4c**). CENP-A depleted cells exhibited numerous mitotic and cytokinetic defects including chromosome misalignment, lagging chromosomes, chromosome bridges and multiple nuclei in interphase (**Figure 4c-e**). The presence of stably expressed GFP-CENP-A completely rescued the mitotic and cytokinetic defects in HeLa cells lines treated with siRNA (**Figure 4c-e**). No rescue was, however, observed in CENP-A depleted HeLa cell lines stably expressing the GFP- α N_{H3}-CENP-A fusion (**Figure 4c-e**).

HeLa cells are polyploid and exhibit some mitotic defects even under normal growth conditions and while our data clearly illustrate that cells harboring hybrid CENP-A nucleosomes are in a poor condition, we cannot rule out some off-target effects. To conclusively eliminate any possible undesirable effects, we established conditional homozygous knock-out/knock-in (cKO/KI) mouse lines, where the endogenous CENP-A was replaced with HA-FLAG-tagged CENP-A version (**Figure 5a**). These mice did not show any visible phenotype and were fertile. We derived MEF cells from 14.5 days mouse embryos and immortalized them. The immortalized MEFs were transfected with constructs expressing a tamoxifen inducible Cre-ERT2 recombinase along with either GFP-CENP-A or GFP- α N_{H3}-CENP-A mutants and stable lines were established. Tamoxifen induced Cre-ERT2 expression led to excision of both

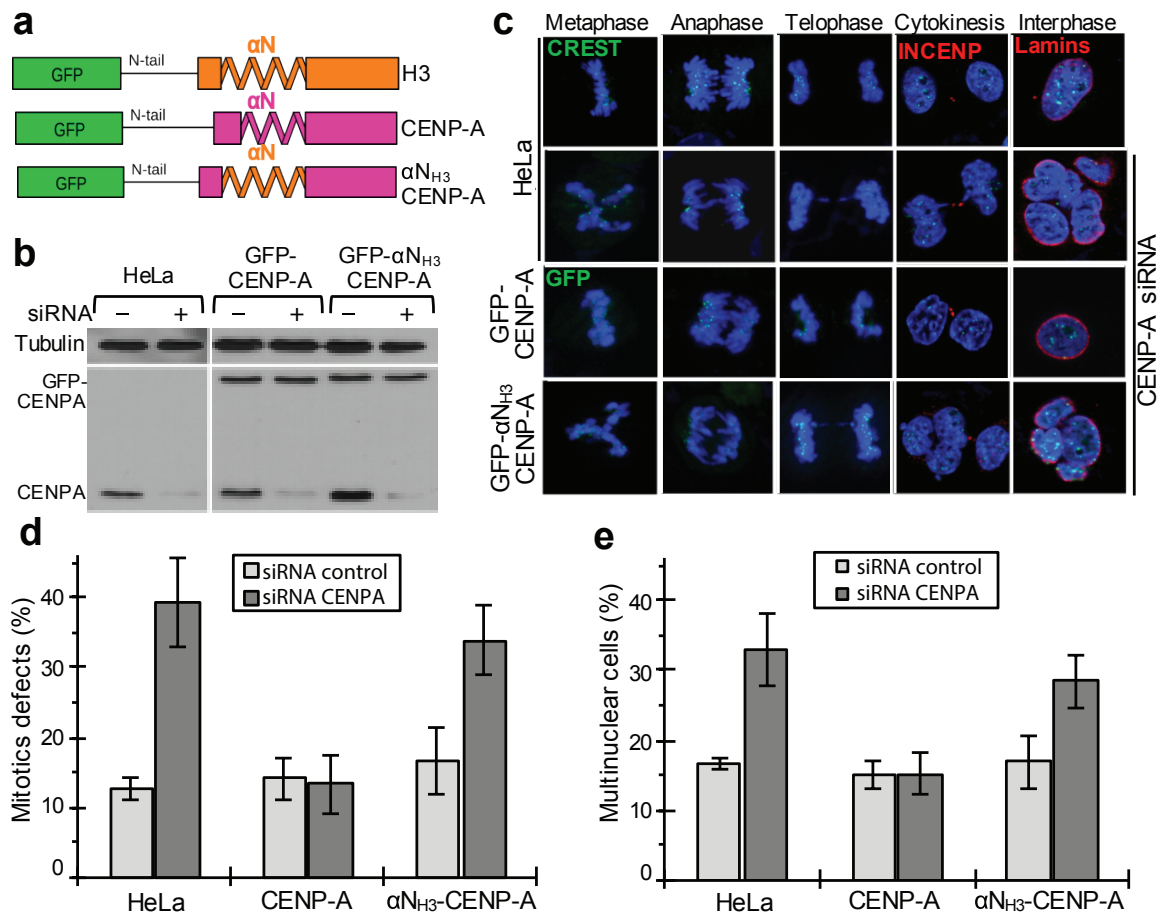


Figure 4. The replacement in HeLa cells of WT CENP-A with the swapped αN_{H3} -CENP-A mutant at the centromere results in strong mitotic and cytokinetic defects. (a) Schematics for the silencing resistant GFP-fusions used for the *in vivo* replacement of WT CENP-A with the swapped αN_{H3} -CENP-A mutant. (b) Western blot detection of the GFP-CENP-A fusions and endogenous CENP-A using anti-CENP-A antibody in cells treated with control siRNA (-) or CENP-A siRNA (+). Nuclear proteins were extracted 72 h post-transfection. The cell lines as well as the positions of the GFP-CENP-A fusions and endogenous CENP-A are indicated. (c) Cell cycle visualization, after endogenous CENP-A depletion by siRNA treatment, of naïve HeLa cells (second row) or HeLa cells stably expressing siRNA-resistant full-length GFP-CENP-A (third row) or the swapped αN_{H3} -CENP-A mutant (fourth row). On the first row are shown naïve HeLa cells treated with scramble siRNA. The centromeres in naïve cells were stained by CREST antibody; GFP fluorescence was used to visualize CENP-A in GFP fusion-expressing cells. An antibody against inner centromere protein (INCENP) and anti-lamina antibody were used to detect the midbody during cytokinesis and the nuclear envelope in interphase cells (shown in red). Blue, DNA; (d, e) quantification of the mitotic (d) and cytokinetic (e) defects at 72 h post-transfection with siRNA against CENP-A in the indicated cell lines. For each experiment at least 300 cells were counted. Data are means and SEM from 3 different experiments.

CENP-A alleles and subsequent depletion of CENP-A protein. Western blot analysis showed that 8 days after tamoxifen treatment, the endogenous protein was completely depleted (Figure 5b-d) and a strong increase of both mitotic and cytokinesis defects

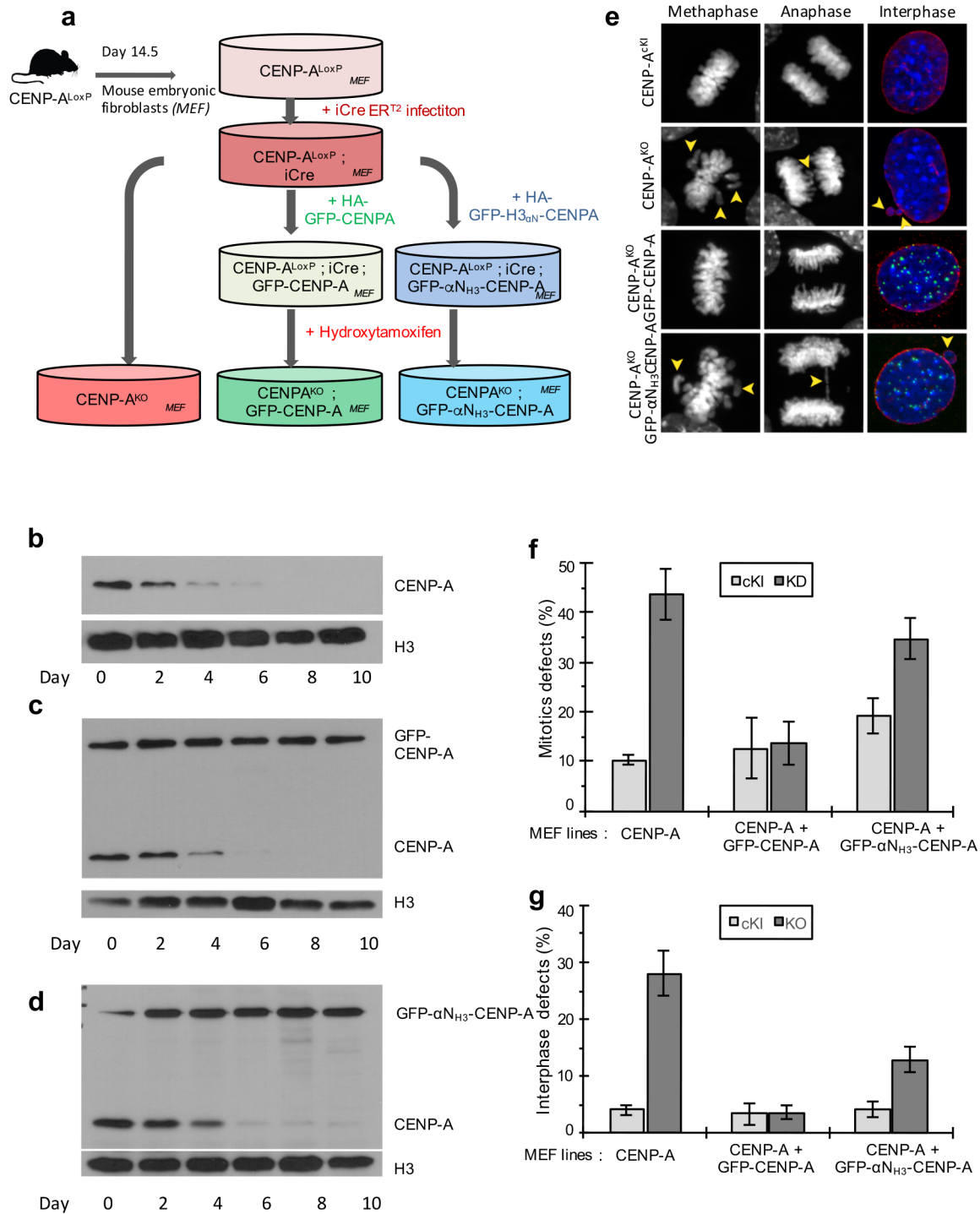


Figure 5. The replacement in MEFs of WT CENP-A with the swapped α N_{H3}-CENP-A mutant at the centromere results in strong mitotic and cytokinetic defects. (a) Schematics of the establishment of stable MEF cell lines expressing the indicated GFP-CENP-A fusions. (b-d) Western blot detection of the HA-GFP-CENP-A fusions and endogenous HA-CENP-A in control CENP-A (Flox/Flox) MEFs (b) and stable CENP-A (Flox/Flox) MEFs expressing either HA-GFP-CENP-A (c) or HA-GFP- α N_{H3}-CENP-A (d) at different days after tamoxifen treatment. All cells have stably inserted Cre-ERT2. H3 is used for visualization of the equal loading. (e) Cell cycle visualization of the effects of CENP-A depletion (8 days after the treatment with tamoxifen) in the indicated MEF lines. The first row shows the control CENP-A (Flox/Flox) MEFs, which do not have inserted Cre-ERT2. (f,g) Quantification of the mitotic (f) and cytokinetic (g) defects in the indicated cell lines upon depletion of CENP-A after 8 days treatment with tamoxifen. For each experiment at least 200 cells were counted. Data are means and SEM from 3 different experiments.

were observed in the control CENP-A depleted MEFs (**Figure 5e-g**). The expression of GFP-CENP-A was sufficient to completely rescue the phenotype (**Figure 5e-g**). The expression of GFP- α N_{H3}-CENP-A however, was unable to rescue both the mitotic and cytokinesis defects (**Figure 5e-g**). In the absence of endogenous CENP-A the stable MEFs expressing GFP- α N_{H3}-CENP-A exhibited close to two-fold more mitotic defects compared to those expressing GFP-CENP-A (**Figure 5f**). Of note, GFP- α N_{H3}-CENP-A is likely to act as a dominant negative since its stable expression (in the presence of endogenous CENP-A) is associated with two-fold increase of mitotic defects compared to those of control MEFs (**Figure 5f**). Taken as a whole, the data in both HeLa cells and in MEFs reveal that the replacement of CENP-A with α N_{H3}-CENP-A nucleosomes at the centromeres impairs both mitosis and cytokinesis in these cells.

Replacement of CENP-A with the swapped α N_{H3}- CENP-A mutant at the centromeres leads to aberrant localization of CENP-C

The deleterious effect of α N_{H3}-CENP-A hybrid nucleosomes on centromere function might reflect reduced amount or absence of some proteins from the CCAN complex, crucial for the assembly of active kinetochores. Comparative mass spectrometry analysis on the composition of α N_{H3}-CENP-A and the WT CENP-A nucleosomal complexes reveals that this is the case (**Figure 3d and Supplemental Figure S3**). In agreement with earlier observations (Goutte-Gattat et al., 2013), the WT CENP-A nucleosomal complex comprised a large number of CCAN proteins (CENP-B, CENP-T, CENP-N, CENP-I, CENP-L, CENP-C, CENP-H), the CENP-A chaperone HJURP, the chromatin remodeler RSF-1, as well as many other proteins (**Figure 3d and Supplemental Figure S3**). These proteins are also members of the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex (**Figure 3d and Supplemental Figure S3**). However, the number of identified peptides originating from several of the identified proteins and in particular for both CENP-C and CENP-B dramatically decreased in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex compared to the WT CENP-A complex (from 10 to 1 for CENP-C and from 8 to 2 for CENP-B,

respectively) (**Figure 3d** and **Supplemental Figure S3**), suggesting a strong loss of these two proteins in the $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A nucleosomal complex. Western blot analysis further confirmed that the amount of CENP-C is much lower in the $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A nucleosomal complex (**Figure 3c**). In contrast, the levels of CENP-T, another essential CCAN platform protein, are not affected in both types of nucleosomes, as shown by Western blot and mass spectrometry (**Figure 3c,d**).

Indeed immunofluorescence analysis of the localization of CENP-C in stable HeLa cells expressing $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A and depleted of endogenous CENP-A support our biochemical data (**Figure 6**). Depletion of CENP-A in naïve HeLa cells results in dramatic delocalization of CENP-C, but not of CENP-T from the centromeres (**Figure 6a,b** and **Supplemental Figure S4**). In the siRNA treated stable HeLa cells expressing GFP-CENP-A this phenotype was completely rescued, i.e. a CENP-C centromere specific localization was indistinguishable from that observed in naïve cells (**Figure 6 a,b**). However, no rescue was observed in the siRNA treated stable HeLa cells expressing GFP- $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A since almost complete delocalization of CENP-C was observed (**Figure 6 a,b**). We have further confirmed these results by using stable HeLa cells expressing GFP-CENP-A or both GFP- $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ - CENP-A and RFP-CENP-C fusions. As expected, the absence of endogenous CENP-A in the control cells resulted in the delocalization of RFP-CENP-C and this phenotype was completely reversed by the presence of GFP-CENP-A (**Figure 6c**). However, only very faint RFP stained centromeres were observed in endogenous CENP-A depleted cells, stably expressing GFP- $\alpha\text{N}_{\text{H3}}$ -CENP-A (**Figure 6c**). Identical results were observed in modified MEFs depleted of CENP-A, which expressed mouse RFP-CENP-C (**Figure 6d**). Therefore, the flexible CENP-A nucleosomal ends and the absence of H1 from centromeric chromatin are required for both proper CENP-C localization and function at the centromeres.

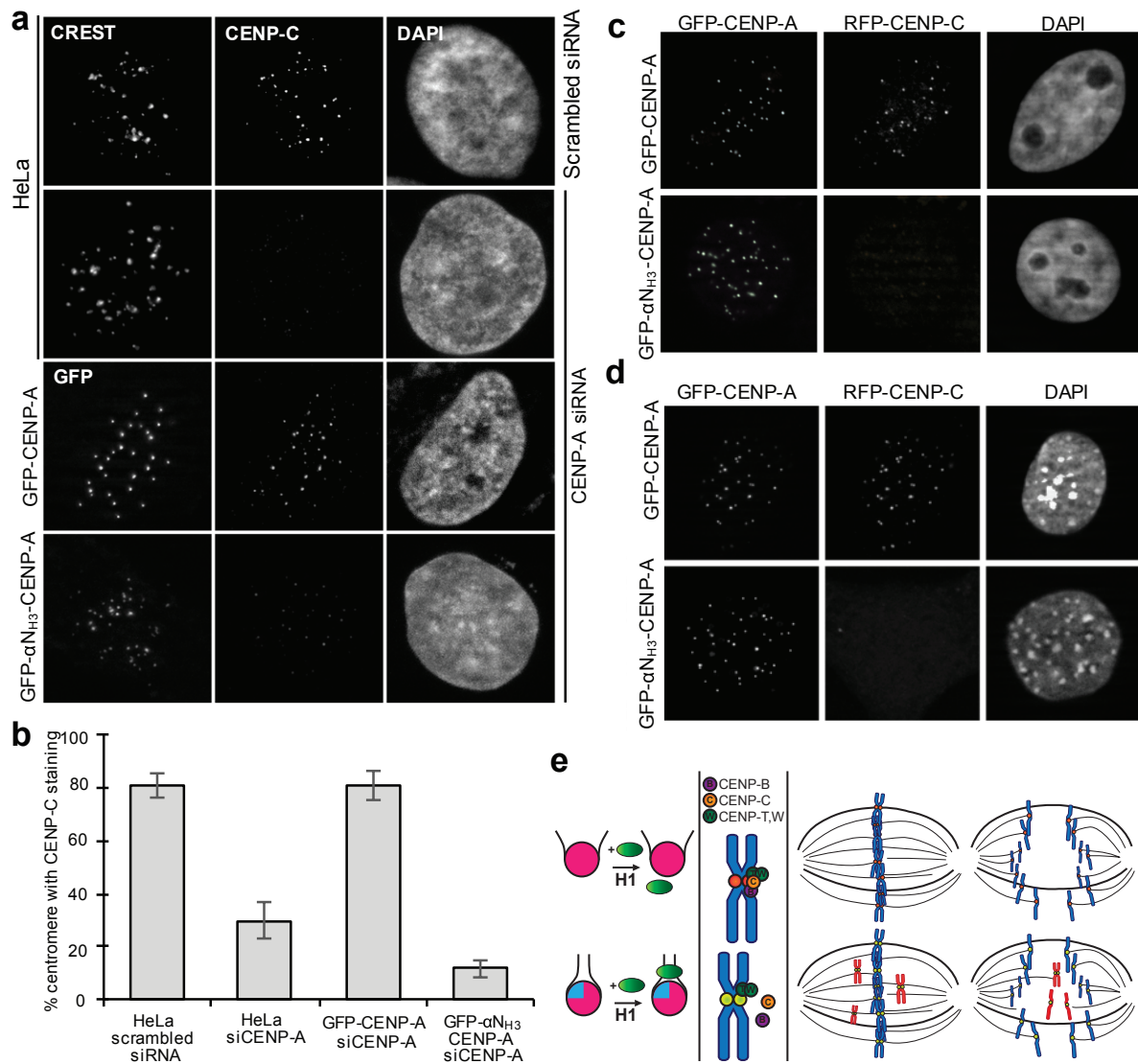


Figure 6. The incorporation of swapped α N_{H3}-CENP-A mutant in the centromeres affects the localization pattern of CENP-C. (a) Immunofluorescent localization of CENP-C in CENP-A depleted HeLa cells stably expressing the indicated siRNA-resistant GFP-CENP-A fusions (rows 3,4). Rows 1 and 2 show the CENP-C localization in naïve HeLa cells treated with scrambled or CENP-A siRNA respectively. Centromeres in naïve cells were stained with a CREST antibody. (b) Quantification of the CENP-C delocalization data presented in (a). In each experiment 150 cells were used. Data are means from 5 different experiments and errors bars are the SEM. (c) Same as (a), but for the localization of the fusion RFP-CENP-C. The experiments were carried out in stable HeLa cells expressing both RFP-CENP-C and the respective siRNA-resistant GFP-CENP-A fusions. (d) Localization of RFP-CENP-C in endogenous CENP-A-depleted MEF cells stably expressing either the GFP-CENP-A (first row) or GFP- α N_{H3}-CENP-A (second row) fusions. (e) Schematics describing the role of the flexible nucleosomal ends of the CENP-A nucleosome in the organization of CENP-A centromeric chromatin and the assembly of active kinetochores. Rigidifying the ends of the CENP-A nucleosome compromises kinetochore assembly and mitosis.

Discussion

Recent X-ray diffraction studies revealed that within the crystal, the DNA ends of the CENP-A nucleosome are not firmly wrapped around the histone octamer. In this work, by using high resolution E-CM we confirmed the results of the X-ray diffraction studies and showed that in solution the CENP-A nucleosomal ends are indeed highly flexible. We hypothesized that maintaining DNA ends in a flexible state is central to the function of CENP-A in not only the structural context of a nucleosome but also in the control of the biological output of CENP-A centromeric chromatin. Our results reveal that the higher flexibility of the DNA ends prevents the *in vitro* binding of the linker histone H1 to the CENP-A nucleosome. In agreement with this, no binding of H1 was observed to the CENP-A nucleosome *in vivo*. This observation may be linked to the fact that a stable interaction with the nucleosome requires that H1 interact not only with the DNA on the dyad axis but also with both linker DNAs. A more open conformation resulting in highly divergent entry and exit linker DNA ends may prevent H1 from binding simultaneously both linkers and thus weaken the interaction. Indeed, we found that hybrid H3-CENP-A nucleosome with rigid orientation of the DNA linkers was able to bind *in vitro* histone H1 with higher specificity and the same efficiency as conventional H3 nucleosome. In agreement with this, the *in vivo* replacement of the CENP-A nucleosome with rigid hybrid H3-CENP-A nucleosome allowed the binding of H1.

We have further investigated the biological outcomes of the distinct CENP-A nucleosome structure by various *in vitro* and *in vivo* approaches. Our data clearly reveal that the highly flexible DNA ends of the CENP-A nucleosome are required for the assembly of the CCAN complex. In both HeLa and MEF cells, where the CENP-A nucleosomes were fully replaced with rigid end H3-CENP-A hybrid nucleosomes, several kinetochore proteins, including CENP-C and CENP-B, were delocalized. As a result, the kinetochore assembly was highly perturbed and the chromosome segregation was strongly affected (schematically depicted in **Figure 6e**). Our data thus revealed that the flexible ends of CENP-A nucleosomes are required to ensure the fidelity of

the mitotic pathway in higher eukaryotes (schematically depicted in **Figure 6e**). The lower affinity of H1 for the CENP-A nucleosome appeared to be important for this event, since artificially induced H1 binding to centromeres, containing only rigid end hybrid H3-CENP-A nucleosomes, altered both the association of several kinetochore proteins (Supplemental Figure S3) with centromeric chromatin and the organization of the structure of the kinetochores. We attribute this to the assembly of the rigid and compact conventional-like chromatin fiber containing H1 and the subsequent inability of kinetochore to get access and bind to it.

Of note, the non-conventional flexible structure of the CENP-A nucleosome is likely to be preserved in all eukaryotes, including yeast (Kingston et al., 2011). All this indicates that the open structure of the CENP-A nucleosome in yeast is, as in the case of higher eukaryotes, required for mitosis. Yeast do not express, however, conventional H1 able to condense chromatin. The inability of histone H1 to bind to CENP-A nucleosomes thus allows higher eukaryotes to assemble centromeres with distinct low compact chromatin structure, which would then be important for recognition of centromeric chromatin by the kinetochore protein complexes. Therefore, evolution has preserved an open structure of CENP-A nucleosomes for chromosome segregation and mitotic fidelity.

Interestingly, CENP-A is retained quantitatively, presumably under the form of nucleosomes, in mature spermatozoa in mouse, human and bull as well as in *Drosophila* (Hammoud et al., 2009; Palmer et al., 1990; Raychaudhuri et al., 2012). The CENP-A nucleosome as a whole is therefore likely to be inherited, thus clearly establishing the epigenetic character of the CENP-A nucleosomal structure. The flexibility of DNA ends on CENP-A nucleosome could thus be needed to establish critical protein networks important for male genome function post-fertilization.

Materials and Methods

Plasmids and recombinant protein purification

Human silencing-resistant CENP-A and α N_{H3}-CENP-A mutants were constructed using the CENP-A coding sequence (Tanaka et al., 2004). For α N_{H3}-CENP-A construct, coding sequence of amino acids 39 to 54 from CENP-A have been replaced by coding sequence for H3.1 amino acids 38 to 53. Final CENPAs constructs were fused at the N-term with GFP and cloned into pBABE-puro vector (Addgene #1764).

Mouse α N_{H3}-CENP-A was obtained by replacing mouse CENP-A coding sequence of amino acids 34 to 49 by mouse coding sequence of H3.1 amino acids 34 to 51. Both mouse wild type CENPA and mouse α N_{H3}-CENP-A were fused at the N-term with HA-GFP and then cloned into retroviral pCL-MFG vector.

Human CENP-C and mouse CENP-C sequence were fused in N-ter with RFP and then cloned into pQCXIH vector (Clontech).

Construction of GFP-H3.1 and GFP-H3.3 were described elsewhere (Drane et al., 2010). Core human recombinant histones and histone H1 were expressed in bacteria and purified as described in (Angelov et al., 2004) and in (Syed et al., 2010), respectively. Recombinant bacterially expressed NAP-1 was purified according to the procedure described in (Syed et al., 2010).

Nucleosome reconstitution, EMSA and OH footprinting

Centrally positioned conventional or either wild-type CENP-A or α N_{H3}-CENP-A mono-nucleosomes and di-nucleosomes were reconstituted as described previously (Menoni et al., 2007) using 255 bp 601 DNA fragment and 2 x 197 bp 601 DNA (Syed et al., 2010). The deposition of H1 was carried out by using NAP-1/H1 complexes as described in (Syed et al., 2010). Electro-mobility shift assay (EMSA) and OH footprinting were performed according to well-established protocols (Syed et al., 2010).

Cell culture

HeLa cell lines stably expressing the various GFP-CENP-A fusions were established by retroviral infection with Moloney murine leukemia viruses (MMLV) produced by amphotropic Phoenix packaging cells (Swift et al., 2001). HeLa cell lines stably expressing either GFP-H3.1 or GFP-H3.3 were described in (Drane et al., 2010). The cells were maintained in standard DMEM media containing 10% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin, and 1% glutamine at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For generation of stable HeLa cell lines expressing Flag-HA epitope-tagged either wild-type CENP-A or aN_{H3}-CENP-A swapped mutant, the cells were transfected with calcium phosphate.

Tandem affinity purification

The chromatin extracts were prepared from stable HeLa cell lines expressing CENP-A, aN_{H3}-CENP-A, H3.1 or H3.3 proteins fused to FLAG and HA epitope tags. The protein complexes were purified from asynchronous or mitotic cells by double immunoaffinity purification procedure with anti-Flag M2 antibody-conjugated agarose (Sigma), followed by anti-HA purification (Drane et al., 2010). Interacting partners of purified complexes (CENP-A.com, aN_{H3}-CENP-A.com, H3.1.com, H3.3.com) were identified by an iron-trap mass spectrometer (Goutte-Gattat et al., 2013).

CENP-A KI-cKO mouse line

The CENP-A conditional knock-out/knock-in (cKO/KI) mouse line was established by using standard mouse genetic approaches. In this line the CENP-A gene replaced by a double tagged FLAG-HA-CENP-A fusion. The targeting vector of the cKO/KI FLAG-HA tagged CENP-A^{flox/flox} mice flanked exon 1 of the murine CENP-A gene with LoxP recombination sites. The exon 1 excision leads to the loss of expression of the protein (see Figure 4).

MEF conditional CENP-A knockout

Day 14 mouse embryonic fibroblasts were isolated and cultured from CENP-A cKO/KI mice. P2 cells were immortalized using pBABE-largeT virus with a Neomycin selection cassette. Two weeks after selection, cells were expanded in culture and infected with MSCV CreERT2 puro (Addgene #22776) and vectors expressing CENP-A constructs. CENP-A knock-out is induced by adding 10 μ M (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) to cell culture media during 24h. Every 48h during 10 days, cells are trypsinized and a small portion of the cells is put back into culture. The rest of the cells is collected in order to perform experiments.

RNA interference

Endogenous CENP-A expression was silenced by transient transfection with CENP-A siRNAs (Dharmacon). Transfections were carried out in 6 wells plates with 100 nM of siRNA mixed with 4 μ l of Oligofectamin (Invitrogen), following the provider's instructions. The following day, the transfection medium was replaced by fresh medium and cells were allowed to grow. 72h after transfection, cells were fixed on coverslip for IF or collected for WB.

Immunofluorescence and microscopy image acquisition

Cells were fixed in formalin solution (Sigma-Aldrich) at room temperature. After permeabilization, primary antibodies were incubated in blocking buffer for 1 h at room temperature using the following antibodies: CENP-C 1/2000^e (gift from I. Cheeseman), CREST 1/2000^e (ImmunoVision), Lamin B 1/300^e (Santa Cruz). All microscopy was performed on fixed cells with a Zeiss Axio Imager Z1 microscope with a Plan-Apochromat x63 objective. GFP, cyanine-2, cyanine-3 and Hoechst 33342 were used as fluorochromes. Z-stacks images were acquired with a Zeiss AxioCam camera piloted

with the Zeiss Axiovision 4.8.10 software. All image treatment was performed using Fiji (ImageJ2-rc14). For quantification of CENP-C signal at centromeres, un-deconvoluted two-dimensional maximum intensity projections were saved as 8-bit TIFF images. Each individual nucleus was determined using Hoechst staining, then colocalization of CENP-C signal with GFP-CENP-A or CREST signal was calculated using JACoP 2.1.1 plugin (Bolte and Cordelieres, 2006).

Electron cryo-microscopy image acquisition

Specimen preparation. The reconstituted nucleosomes were prepared in a low ionic strength buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) and diluted in the same buffer to a concentration of 150 mg/ml of DNA. Three microliters of the specimen were deposited on a holey carbon film (C-flat 2-2-2), rendered hydrophilic by a 20 sec glow discharge in air, and flash frozen in liquid ethane using an automated plunger (Vitrobot, FEI) with controlled blotting time (1 sec.), blotting force (5), humidity (97%) and temperature (4°C). The particles were imaged using a cryo-transmission electron microscope (Polara, FEI) equipped with a field emission gun operating at 100 kV. Images were recorded under low-dose condition (total dose of 20 e-/Å²) on a 4096 x4096 CCD camera (Eagle FEI) at a magnification of 59,000 x resulting in a pixel size on the specimen of 0.187 nm.

Image Processing.

Nucleosomal particles were selected manually using the Boxer application in the EMAN2 software package (Ludtke et al., 1999). The Contrast Transfer Function (CTF) of the microscope was determined for each micrograph using the CTFFIND3 program (Mindell and Grigorieff, 2003). CTF correction and further image analysis was performed within the RELION software package (Scheres, 2012). The molecular images of both datasets representing conventional nucleosomes and those with incorporated CENP-A were subjected to reference-free 2-D classification to remove

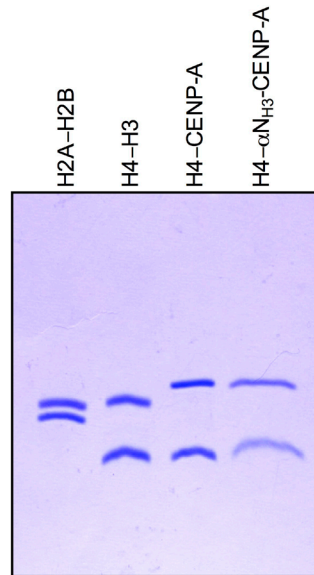
images containing contamination or damaged particles. An initial three-dimensional (3-D) model was reconstructed from the 2-D class-average images by the angular reconstitution method (Van Heel, 1987) and further refined using maximum-likelihood based methods. 3D classification was carried out to identify structural variations within the image dataset. Four or five most populated classes were selected for each of the samples. Illustrations were prepared using the Chimera visualization software (Pettersen et al., 2004).

Author Contributions. S.D. conceived and supervised the project. Y.R., K.O., M.D., L.R., M.S., S.H.S., I. N. L., R.B., E.F. G.P. , H.T., J.B. , T.G. and K.P. conducted the experiments. T.G., D.S., K.P., J.B., H.K., P.S., D.A., A.H and S.D designed the experiments and analyzed the data. S.D., A.H, P.S. and K.P. wrote the paper.

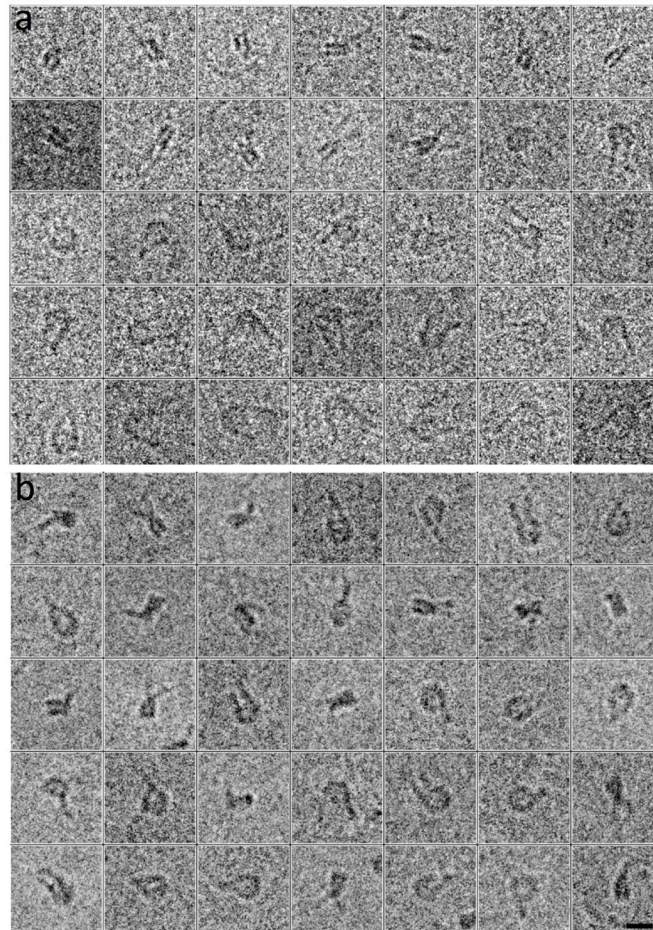
Acknowledgement

This work was supported by institutional funds from Université de Strasbourg (UDS), Université de Grenoble Alpes, CNRS, INSERM (grant Plan Cancer), and by grants from, INCA (INCa_4496, INCa_4454 and INCa PLBIO15-245), ANR (VariZome, Chromcomp and Chrome), FRM (DEP20131128521), USIAS-2015-42 (A.H), the Association pour la Recherche sur le Cancer, La Fondation pour la Recherche Médicale, La Ligue Nationale contre le Cancer Équipe labellisée (A.H). This work also benefitted from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01, and Instruct as part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI), from the High Performance Computing Center of the University of Strasbourg funded by the Equipex Equip@Meso project, and from the Labex INRT. K.P. was supported by a fellowship from La Ligue Nationale contre le Cancer. O. Tonchev and E. Bellotti are acknowledged for help in the initial stage of this work. The technical assistance of E. Bensimon is also acknowledged.

Supplemental Figures



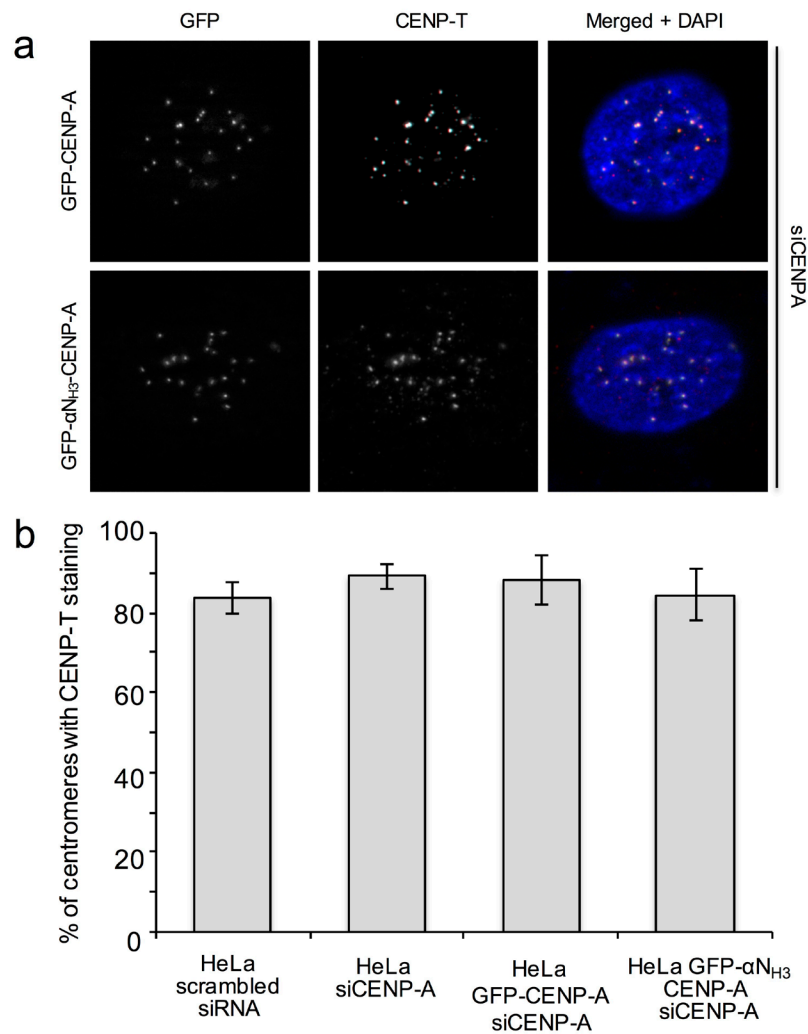
Supplemental Figure 1 (S1). 18% SDS PAGE of the indicated purified recombinant Histones used for nucleosome reconstitution.



Supplemental Figure 2 (S2). Galleries showing representative micrographs of conventional (a) and CENP-A (b) reconstituted centrally positioned nucleosomes

Protein name	Reference	WT CENP-A complex (# of peptides)	α N _{H3} -CENP-A complex (# of peptides)
CENPA	P49450	6	6
macro-H2A.1	O75367	10	10
H2B	P33778	6	6
H2A	Q96QV6	4	4
H4	P62805	5	5
H1.2	P16403	0	8
H1.1	Q02539	0	7
CENP-B	P07199	8	2
CENP-T	Q96BT3	7	7
CENP-N	Q96H22	6	6
CENP-I	Q92674	4	4
CENP-L	Q8N0S6	3	3
CENP-H	Q9H3R5	3	3
CENP-C	Q03188	10	1
HJURP	Q8NCD3	9	9
RSF-1	Q96T23	9	3
NPM1	P06748-2	7	7
SSRP1	Q08945	20	4
SPT16	Q9Y5B9	35	5
KU70	P12956	2	15
KU80	P13010	2	20
CHD-2	O14647	2	2
CHD-4	Q14839	5	10
CHD-3	Q12873	2	2
PARP-1	P09874	25	25

Supplemental Figure 3 (S3). Proteins identified in nucleosomal complexes of WT CENP-A and α N_{H3}-CENP-A mutant by mass spectrometry. The proteins, which level of association with the nucleosome particles was altered, are indicated in red.



Supplemental Figure 4 (S4). (a) Cell cycle visualization, after endogenous CENP-A depletion by siRNA treatment, of HeLa cells stably expressing either siRNA-resistant of full-length GFP-CENP-A (first row) or the swapped the α NH₃ –CENP-A mutant. GFP fluorescence was used to visualize CENP-A in GFP-fusion expressing cells. A specific anti-CENP-T antibody was used for CENP-T visualization; blue, DNA. (b) Quantification of the percentage of centromeres showing CENP-T staining in the indicated HeLa cell lines after treatment with either scrambled siRNA or with siRNA against CENP-A.

L'homme qui pense en scientifique cherche non seulement à constater les faits, mais, également à les analyser en tenants compte de leur hasard ou de leur nécessité, il tâche d'en analyser les lois que l'observation immédiate ne discerne pas et d'éliminer l'influence de ses propres penchants sur les résultats de ses réflexions.

Alexandre Zinoviev

Troisième Partie

Discussion et Perspectives

Rôle de la flexibilité de l'ADN sortant des nucléosomes CENP-A

La détermination récente de la structure du nucléosome CENP-A par cristallographie aux rayons X a permis de proposer que l'ADN entrant et sortant du nucléosome CENP-A pourrait ne pas être fermement enroulé autour de l'octamère d'histones (Tachiwana et al., 2011). Cette hypothèse était renforcée par des profils de digestions différents lorsque ces nucléosomes sont traités à la MNase (Hasson et al., 2013). Cette interaction particulière entre l'ADN et le cœur histone du nucléosome CENP-A devrait donc être une spécificité de ce nucléosome.

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail visait à montrer que cette particularité existe effectivement. Les résultats apportés par la cryo-électromicroscopie permettent d'affirmer que l'ADN entrant et sortant du nucléosome CENP-A ne présente pas le même profil que celui du nucléosome canonique. Le nucléosome conventionnel possède une conformation extrêmement fermée, où l'ADN ne présente que très peu de flexibilité. Dans le cas du nucléosome CENP-A la présence de nombreuses conformations montre au contraire que l'ADN est laissé hautement flexible par le cœur histone du nucléosome CENP-A. De plus l'ensemble de ces conformations possède une caractéristique commune, elles sont toujours plus ouvertes, montrant la faiblesse des interactions entre les parties entrantes et sortantes de l'ADN et le nucléosome.

Le second objectif de ce travail visait à déterminer si cette spécificité du nucléosome CENP-A apportait une fonction particulière à la chromatine centromérique. Nos résultats montrent que la plus grande flexibilité de l'ADN entrant et sortant du nucléosome empêche la liaison de l'histone H1 au nucléosome CENP-A (Figure D1). Cette observation peut être reliée au fait qu'une interaction stable entre le nucléosome et H1 requiert que H1 puisse interagir avec l'ADN sur l'axe de la diade mais également avec les deux brins d'ADN entrant et sortant du nucléosome (Syed et al., 2010). Il semblerait alors qu'une conformation plus ouverte telle que celle adoptée dans le nucléosome CENP-A empêche cette interaction entre H1 et l'ADN, ou en tout cas la rende suffisamment faible pour que H1 ne puisse pas se lier de façon stable avec un tel nucléosome.

Le nucléosome CENP-A étant donc plus ouvert, cela ne permet pas la liaison stable de H1, mais existe-t-il une fonction biologique à cette propriété ? Nous nous sommes donc ensuite intéressés à cette question et avons étudié les effets biologiques de la structure du nucléosome CENP-A. Nos données montrent clairement que les extrémités flexibles de l'ADN du nucléosome CENP-A sont nécessaires au déroulement correcte de la mitose. L'approche de pseudo génétique utilisée

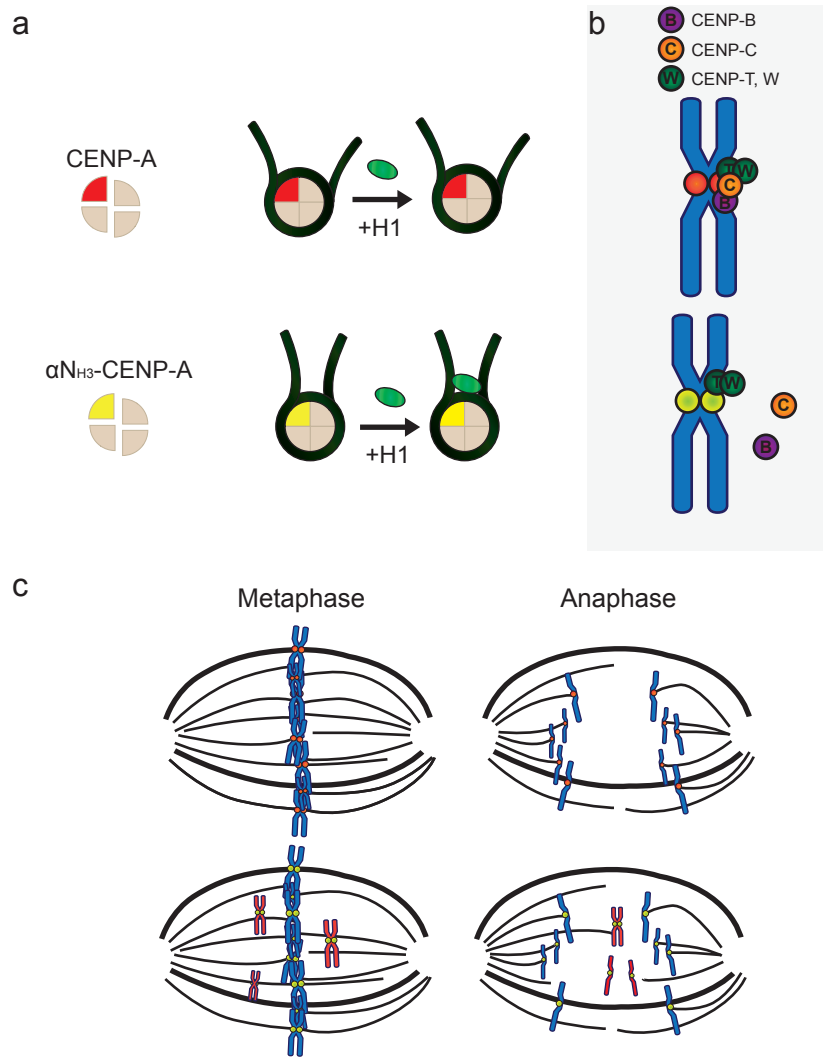


Figure D1 | Schéma récapitulatif des résultats obtenus. (a) Le nucléosome contenant CENP-A ne peut pas interagir avec l'histone de liaison H1. Rigidifier artificiellement l'ADN sortant de ce nucléosome αN_{H3} -CENP-A permet l'interaction avec H1. (b) Le nucléosome CENP-A permet de la formation du CCAN. Le nucléosome αN_{H3} -CENP-A forme un CCAN partiel dans lequel CENP-B et CENP-C sont absents. (c) Le CCAN partiel ne permet pas l'alignement correct des chromosomes en métaphase, ainsi que la ségrégation correcte des chromatides sœurs en anaphase. La flexibilité de l'ADN sortant du nucléosome CENP-A est donc nécessaire pour le bon déroulement de la mitose.

ici permet en effet de déterminer que le nucléosome CENP-A artificiellement fermé n'est pas capable de conduire à une ségrégation correcte des chromosomes durant la mitose (Figure D1). Il existe donc une nécessité de maintenir l'ADN sortant et entrant du nucléosome dans une conformation flexible.

Enfin, nos résultats montrent que la rigidité de l'ADN impacte directement le recrutement des protéines du CCAN en particulier CENP-B et CENP-C (Figure D1). La réduction de la présence de ces deux membres clés du complexe entraîne donc une formation déficiente des

kinétochores qui ne peuvent visiblement pas se lier correctement aux chromosomes. Ceci explique l'augmentation du nombre de chromosomes non-alignés en métaphase, ou de *lagging chromosome* en anaphase.

Organisation de la chromatine centromérique

Le paradoxe de la compaction

L'origine de la différence entre euchromatine et hétérochromatine provient initialement de la différence d'intensité de coloration du chromosome mitotique : peu intense pour l'euchromatine et plus forte pour l'hétérochromatine, suggérant une densité plus forte de chromatine. Du fait de la présence de cette coloration, les centromères ont été classés comme appartenant à la famille de l'hétérochromatine, en corrélation avec l'absence de gène et de transcription de ces régions. Mais la chromatine centromérique ne possède pas les caractéristiques moléculaires et cellulaires du reste de l'hétérochromatine. L'absence de PTM associée à l'hétérochromatine, (en particulier H3K9me3) est même un prérequis à l'incorporation de CENP-A (Ohzeki et al., 2012). La chromatine centromérique ne partage donc pas les mêmes caractéristiques que les autres types d'hétérochromatines. Elle reste toutefois associée à un fort niveau de compaction de l'ADN du fait de son affinité forte pour les colorants et de la présence de l'imposante structure du kinétochore. Il s'emblerait également qu'une fibre de chromatine contenant artificiellement uniquement des nucléosomes CENP-A soit plus compactée que de la chromatine contenant uniquement H3 (Geiss et al., 2014). Il existe donc un paradoxe entre ces caractéristiques de chromatine « fermée » et la présence du nucléosome CENP-A extrêmement ouvert. Ceci pose donc la question de l'organisation de la chromatine au niveau des centromères : quelle est sa composition et quelle est sa structure ?

Exclusion de H1

L'un des résultats majeurs du travail présenté dans ce mémoire et la très faible force d'interaction *in vitro* entre le nucléosome CENP-A et H1. Cette faible interaction semble se traduire *in vivo* par l'exclusion d'au moins H1.1 et H1.2 du complexe nucléosomal CENP-A. Les résultats ne permettent néanmoins pas de déterminer de façon directe si cette exclusion est une conséquence de la conformation de l'ADN, ou une nécessité pour l'assemblage du CCAN.

Dans ce cadre, il est important de noter le résultat de deux autres études. Dans un premier temps les travaux de Dunleavy et collègues en 2011 rapportent le fait qu'un autre variant, H3.3 semble remplacer de façon partielle les nucléosomes CENP-A lors de la phase S. En effet CENP-A étant incorporée en sortie de mitose/début de phase G1, il ne l'est pas durant la phase S qui suit. Il est intéressant de noter que les cellules entrent alors dans la phase de mitose suivante avec la moitié des nucléosomes CENP-A pouvant potentiellement être incorporés dans la chromatine centromérique. Il semblerait que les deux brins d'ADN formés après la phase S portent une quantité relativement équivalente des nucléosome CENP-A, et qu'au niveau des positions ainsi laissées disponibles, la présence de H3.3 soit favorisée.

Dans ce cadre une autre étude prend un sens différent. En 2009, Braunschweig et collègues démontrent que chez la drosophile, la présence de l'histone H3.3 dans le nucléosome est corrélée avec une plus faible présence de H1 sur ce même nucléosome. Ils montrent également que la déplétion de H3.3 entraîne une hausse de la présence de H1 sur ces mêmes sites. Ils concluent donc que la présence de H3.3 dans le nucléosome inhibe le recrutement de H1. Néanmoins, cette étude est basée sur une technique qui ne permet pas l'analyse des régions répétées. C'est le cas des régions centromériques chez la drosophile, ces régions ont donc été exclues de l'analyse.

Ces deux résultats mis ensemble, pourraient donc faire supposer que la fonction de la présence des histones H3.3 à la place de CENP-A serait de maintenir l'exclusion de H1 de la chromatine centromérique.

En effet, les résultats de notre propre étude permettent de supposer que l'exclusion de H1 est nécessaire à la formation correcte du kinétochore, cette exclusion spécifique étant rendue possible par la relation particulière du nucléosome CENP-A avec l'ADN qui vient s'enrouler autour. La présence de H3.3 comme remplaçant, permettrait donc de garder cette propriété du nucléosome CENP-A. Dans cette optique, l'absence de H1 pourrait également être d'une importance majeure : la présence de H1 est associée à une chromatine plus condensée sous la forme de la fibre de 30 nm. Son absence pourrait donc être interprétée comme la nécessité de maintenir la chromatine dans une conformation ouverte au niveau des centromères. Bien entendu, de nouvelles recherches seront déterminantes pour savoir si cette hypothèse est vraie.

Structure de la chromatine centromérique

La question de l'exclusion de H1 et de la probable présence de H3.3 au niveau des centromères nous guide vers une autre question concernant l'organisation de la chromatine centromérique. La présence de nucléosome CENP-A est nécessaire à la formation d'un centromère actif et permise à la formation du kinétochore, mais combien de nucléosomes CENP-A sont nécessaires pour définir un centromère actif ?

Toutes les études portant sur l'organisation interne de la chromatine centromérique arrivent à la même conclusion, les nucléosomes CENP-A ne sont pas seuls, ils seraient minoritaires et intercalés entre des nucléosomes conventionnels (Blower et al., 2002 ; Hori et al., 2008 ; Ribeiro et al., 2010). Chez *S. cerevisiae*, il existe un seul et unique nucléosome Cse4 par centromère, la question de l'organisation des nucléosomes n'a donc pas vraiment de sens. Il est estimé que *S. pombe* aurait 3 nucléosomes par centromère (Joglekar et al., 2008), les cellules de poulet DT40 ont été estimées à 30 nucléosomes CENP-A (Johnston et al., 2010). Chez l'homme il a récemment été estimé qu'un centromère actif devait contenir aux environs de 100 nucléosomes CENP-A (Bodor et al., 2014). En comparant le nombre de nucléosomes CENP-A estimés et la taille des régions d'ADN sur lesquels ces nucléosomes s'assemblent, on arrive donc à déduire qu'environ 1 nucléosome sur 8 seulement serait un nucléosome CENP-A. Les nucléosomes H3 restant sont donc majoritaires. Ces nucléosomes possèdent néanmoins également une spécificité : ils possèdent une modification post-traductionnelle : H3K4me2. Cette marque semble être spécifique des centromères et n'est pas retrouvée dans les autres types d'hétérochromatines (Sullivan and Karpen, 2004). En effet cette marque est normalement associée avec des régions où la transcription est active (Wang et al., 2014).

Il est donc supposé que c'est le repliement de la chromatine qui permet ensuite au nucléosome CENP-A de lier efficacement le kinétochore. Plusieurs modèles existent pour décrire ces repliements, groupant les nucléosomes CENP-A vers la face externe de la chromatine (Blower et al., 2002) (Figure D2a). Plusieurs structures de repliements étaient proposées, mais les dernières données remettent partiellement en cause ces modèles, pour le remplacer par un modèle unique dit du « boustrophedon », dans lequel les nucléosomes sont arrangés par couche, la couche supérieure portant un maximum de nucléosomes CENP-A (Ribeiro et al., 2010) (Figure D2b).

Il reste donc encore de nombreuses zones d'ombre concernant l'organisation des nucléosomes CENP-A entre eux. Pour comprendre la structure générale de la chromatine centromérique, la flexibilité de l'ADN sortant du nucléosome pourrait donc être une clé importante. On peut en

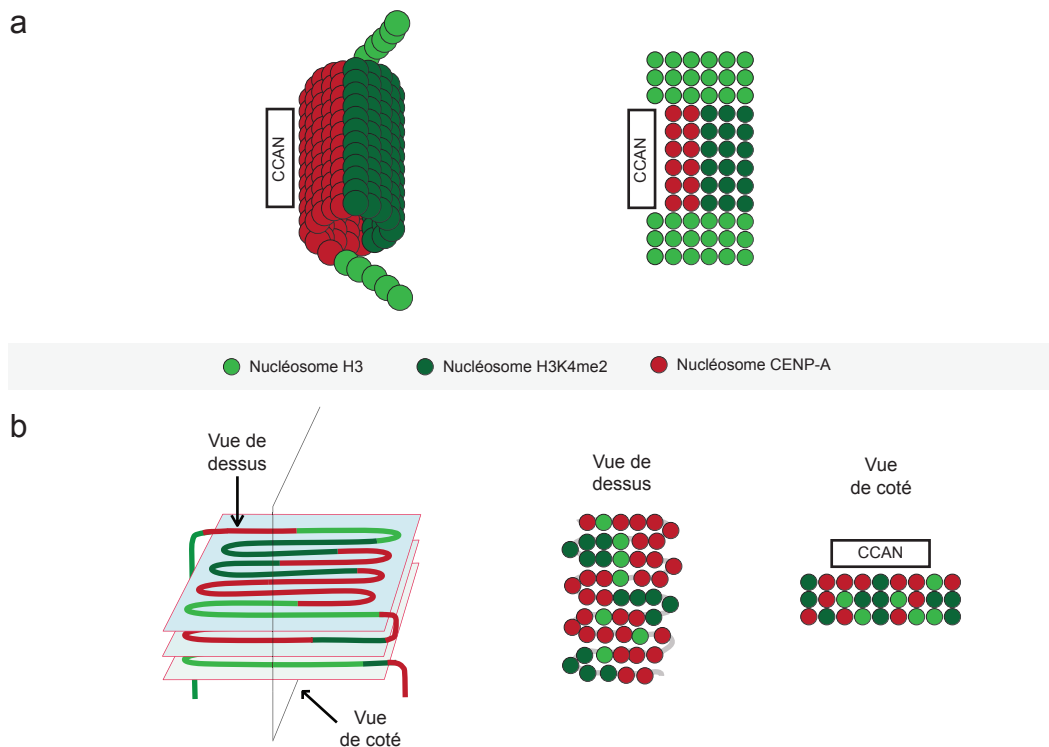


Figure D2 | Modèles de l'organisation de la chromatine centromérique. (a) Modèle solénoïde : les repliements supérieurs de la chromatine placent l'ensemble des nucléosomes CENP-A sur la face externe de la région centromérique, les nucléosomes H3K4me2 se retrouvant sur la face interne entre les chromatides sœurs (D'après Greaves et al, 2007). (b) Modèle du « boustrophedon » : les nucléosomes sont organisés en couches successives, la couche supérieure étant en contact avec le CCAN et le réseau KNM. Les nucléosomes CENP-A et H3K4me2 sont mélangés dans chacune des couches (D'après Ribeiro et al, 2010)

effet supposer que cette plus grande flexibilité de l'ADN permet des interactions différentes des nucléosomes entre eux. De plus, actuellement aucun de ces modèles ne prend en compte la présence des pseudonucléosomes CENP-TWXS : on sait que leur recrutement nécessite la présence du nucléosome CENP-A, mais on ne sait pas s'ils s'incorporent au niveau de l'ADN de liaison ou s'ils prennent la place d'un nucléosome H3. Toutefois quelque soit l'organisation structurelle des nucléosomes centromériques, celle-ci ne possède qu'un seul but : permettre l'assemblage du kinétochore via sa première couche : le CCAN.

Formation du CCAN

Pendant les années 2000, comprendre quelle était la composition du CCAN faisait partie des challenges scientifiques majeurs. Il est aujourd'hui relativement clair quel sont les différents constituant du CCAN. Il n'existe toutefois que très peu d'informations sur leurs interactions, leurs mécanismes de recrutement, ou encore sur leurs fonctions prisent individuellement. Comprendre ces particularités fait clairement partie des enjeux actuels.

L'interface entre la chromatine centromérique contenant le nucléosome CENP-A et le reste du CCAN est toutefois l'interaction la plus étudiée. Cette interface est permise principalement grâce à trois complexes distincts CENP-TWXS, CENP-C et CENP-N/CENP-L (Figure D3).

De son côté CENP-TWXS semble s'insérer directement au niveau de l'ADN (Hori et al., 2008) et il semble être capable de remplir la conformation et les fonctions d'un pseudo nucléosome (Takeuchi et al., 2014). Il est donc probable qu'il existe une redondance partielle entre la voie CENP-A et la voie CENP-TWXS (Fukagawa and Earnshaw, 2014), même s'il est certain qu'elles sont co-dépendantes. En effet le recrutement de CENP-T ne peut se faire sans la présence du nucléosome CENP-A et inversement (Hori et al., 2013). Les autres études portant sur l'interaction entre le nucléosome CENP-A et le reste du CCAN ont également montré que la présence de CENP-T au niveau des centromères ne semblait pas dépendre de la structure du nucléosome CENP-A mais uniquement de sa présence (Fachinetti et al., 2013, Rago et al.,

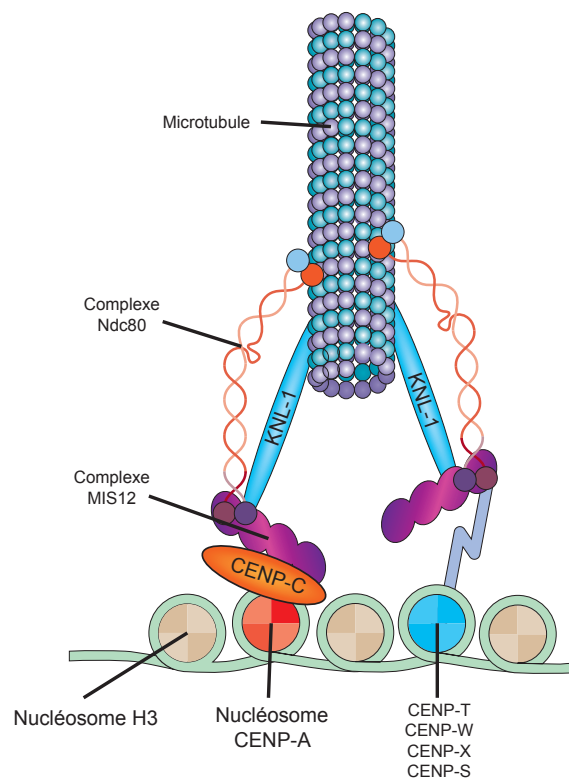


Figure D3 | Modèle simplifié de l'organisation du kinétochore durant la mitose. Sont présentées la voie passant par le nucléosome CENP-A et CENP-C et la voie passant par CENP-T. Le reste du CCAN est exclu. Les deux voies sont non redondantes et permettent le recrutement du réseau KNM. Certaines interactions directes ont été caractérisées : CENP-C est capable d'interagir directement avec le complexe Mis12 lorsque ce dernier est phosphorylé par Aurora B en mitose. Quant à CENP-T, il peut interagir directement avec le complexe Ndc80. (D'après McKinley et Cheeseman 2015)

2015). Dans ce cadre, notre étude semble également corrélérer ces résultats : nos observations en IF ou la détermination de la composition du complexe associé au nucléosome CENP-A montrent que la présence de CENP-T au centromère n'est pas affectée. On peut donc également conclure que l'interaction entre le nucléosome CENP-A et l'ADN sortant n'affecte pas la voie CENP-TWXS, la corollaire étant que le CCAN n'est pas totalement déstabilisé.

La seconde interface entre la chromatine centromérique et le CCAN est permise par le complexe CENP-N/CENP-L. Cette interface nécessite une interaction directe et spécifique avec le nucléosome CENP-A au niveau du CATD (Carroll et al., 2010). Il existe enfin un rôle majeur pour CENP-C, qui il est souvent considéré comme la pierre angulaire du CCAN de part son recoupement dans les différentes fonctions. Comment se fait cette interaction CENP-C/nucléosome CENP-A est sans doute l'un des sujets les plus étudiés au cours de ces dernières années. L'une des différences majeures entre CENP-A et H3 se trouve au niveau de la queue C-terminale. Il semblerait alors qu'elle joue un rôle prépondérant dans le recrutement de CENP-C (Kato et al., 2013). Mais la perte de cette spécificité ne permet pas la perte de 100% de CENP-C. Il en reste toujours une part importante présente dans le CCAN, montrant qu'il existe d'autres interactions possible entre CENP-C et le nucléosome CENP-A (Fachinetti et al., 2013). Dans ce cadre, il semblerait que l'extrémité N-terminale de CENP-A puisse également jouer un rôle, notamment durant la mitose (Goutte-Gattat et al., 2013). Une nouvelle étude très récente vient d'ailleurs supposer que cette interface CENP-A/CENP-C pourrait également varier durant le cycle cellulaire (Nagpal et al., 2015).

Les résultats de ce travail viennent donc ajouter un élément structural supplémentaire qui est nécessaire à la présence de CENP-C au niveau des nucléosome CENP-A : la conformation flexible de l'ADN entrant et sortant du nucléosome. En effet nos données montrent une perte partielle de CENP-C lorsque cette condition n'est pas remplie. Il reste toutefois une question à laquelle nous n'avons pas de réponse, est-ce le changement de la conformation du nucléosome qui ne permet plus le recrutement de CENP-C, ou est-ce la présence de H1 qui empêche une interaction stable entre CENP-A et CENP-C. Il n'y a par contre, d'après les connaissances actuelles, aucune raison pour que les résidus que nous avons remplacés dans notre modèle, soient responsables d'une interaction directe avec CENP-C. La perte de CENP-C viendrait donc de la structure générale du nucléosome, ou de l'encombrement stérique provoqué par la présence de H1. Des investigations supplémentaires seront donc nécessaires pour répondre à cette question.

Il est également intéressant de noter qu'il existe un second membre des protéines du kinétochore à être perdu lors de la modification de l'interaction ADN/nucléosome CENP-A. Il s'agit de CENP-B. CENP-B n'est pas à proprement parler membre du CCAN, mais il se retrouve dans de nombreux centromères chez de nombreuses espèces. Il s'agit d'une « *DNA binding protein* », qui reconnaît l'ADN via une séquence spécifique de 17 pb nommée *CENP-B box* (Masumoto et al., 1989). Cette protéine est d'autant plus particulière qu'il existe une très forte conservation entre certaines espèces, par exemple près de 92% d'identité entre l'homme et la souris, alors que l'organisation même des séquences d'ADN centromérique est très différente entre ces espèces. C'est d'autant plus intrigant que la délétion du gène est viable chez la souris (Kapoor et al., 1998), mais également que certains chromosomes sont dépourvus de *CENP-B box* et que par conséquent CENP-B n'est pas présent sur ceux-ci. C'est le cas du chromosome Y chez l'homme (Earnshaw et al., 1987), ou chez la souris (Broccoli et al., 1990). Il a été récemment montré que la présence de CENP-B permettait la stabilisation de CENP-C au niveau des centromères, ceci de façon dépendante de la présence du nucléosome CENP-A (Fachinetti et al., 2015). Cette relation pouvant également fonctionner dans l'autre sens puisque la présence du nucléosome CENP-A est nécessaire à stabiliser la présence de CENP-B (Fujita et al., 2015). CENP-B n'est donc pas nécessaire à la formation d'un kinétochore fonctionnel, mais sa présence permettrait d'augmenter la fidélité de l'assemblage du CCAN et donc d'assurer la ségrégation correcte.

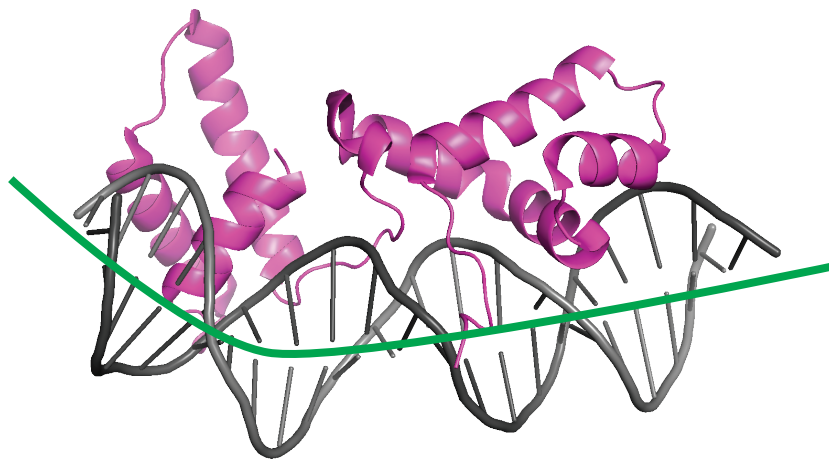


Figure D4 | Structure du complexe CENP-B avec 21 pb d'ADN. La structure comprend le domaine de liaison de CENP-B (a.a. 1–129) à l'ADN. L'ADN utilisé comprend les 17 pb de la CENP-B Box. L'interaction entre CENP-B et l'ADN entraîne une torsion de l'axe de la double hélice d'ADN (schématisée en vert) d'environ 60° (D'après Tanaka et al, 2001) PDB 1HLV.

Dans l'étude réalisée au cours de ce travail, CENP-B est donc également partiellement perdue lorsque l'ADN sortant des nucléosomes CENP-A est en conformation fermée. La structure d'interaction entre CENP-B et l'ADN est connue : cette interaction induit une forte torsion de l'hélice d'ADN (Tanaka et al., 2001) (Figure D4). On peut supposer que la flexibilité de l'ADN sortant des nucléosomes CENP-A permette cette torsion. La conséquence de la rigidification artificielle du nucléosome serait donc une impossibilité de la torsion de l'ADN et donc de l'interaction de CENP-B. On peut également supposer qu'une partie de la perte partielle de CENP-C résulte en fait de la perte de CENP-B qui n'assure plus la stabilisation de cette interaction (Fachinetti et al., 2015). Au vu du peu d'études concluantes sur la fonction exacte de CENP-B, il reste toutefois difficile de comprendre son rôle exact dans la formation et le maintien du CCAN au niveau des centromères.

Le nucléosome CENP-A permet donc l'assemblage spécifique de tout les éléments du CCAN. Il est également responsable de l'organisation particulière de la chromatine centromérique. Pour conserver ces spécificités, la régulation de son incorporation est donc un élément essentiel sinon indispensable.

Maintenance de CENP-A aux centromères

La présence de CENP-A au niveau des centromères est une caractéristique commune chez une majorité d'espèces. De façon curieuse, incorporer artificiellement des nucléosomes CENP-A en dehors du centromère n'est pas suffisant pour entraîner la formation d'un kinétochore (Van Hooser et al., 2001 ; Gascoigne et al., 2011). Cette nécessité s'explique par le fait qu'une importante partie des nucléosomes CENP-A ne sont pas incorporés au niveau des centromères, ils le sont de façon pseudo-aléatoire dans le reste de la chromatine (Shang et al., 2013 ; Bodor et al., 2014). Il existe donc un second niveau de régulation : la présence des nucléosomes CENP-A est nécessaire mais pas suffisante pour former un kinétochore fonctionnel.

L'assemblage du kinétochore est donc capable de reconnaître les nucléosomes CENP-A centromériques, des autres nucléosomes CENP-A ectopiques. La question peut également être posée de façon différente : comment la chromatine contenant le nucléosome CENP-A devient compétente pour l'assemblage du kinétochore ?

Dans cette optique il devrait donc exister un ou des marqueurs qui permettent de faire la distinction.

Régulation par le CCAN

Le premier élément nécessaire à la l'incorporation de nouveaux nucléosomes CENP-A est la présence d'un CCAN déjà formé. De nombreuses études montrent en effet qu'un certain nombre de ses membres permettent de stabiliser ou de diriger le recrutement de CENP-A. C'est en particulier le cas des protéines qui reconnaissent directement le nucléosome CENP-A : CENP-C et CENP-N (Carroll et al., 2009 ; Carroll et al., 2010). La présence de CENP-C, en particulier, permet de « verrouiller » le nucléosome CENP-A et donc de stabiliser sa présence (Falk 2015), mais il est aussi nécessaire pour recruter le complexe Mis18 et donc déposer de nouveaux nucléosomes CENP-A (Dambacher et al., 2012). Le remodelage de la chromatine est également indispensable à l'incorporation de CENP-A. Pour cela le complexe CENP-H/CENP-I recrute FACT, sans ces deux membres la déposition de CENP-A est donc également perturbée (Okada et al., 2009). De façon plus générale, il semblerait en fait qu'un grand nombre de membres du CCAN (CENP-C ; CENP-N, CENP-T...) possèdent un rôle dans le recrutement de CENP-A aux centromères (Hori et al., 2013). La présence de ce nucléosome permet ensuite le recrutement des membres du CCAN ; il existe donc une très forte inter régulation de la présence de l'un sur la présence de l'autre. Il reste encore toutefois beaucoup à comprendre concernant les interactions nécessaires à cette inter régulation nucléosome CENP-A / CCAN.

Contrôle temporelle de l'incorporation de CENP-A

Chez les eucaryotes supérieurs, les nucléosomes CENP-A sont incorporés dans la chromatine centromérique en début de phase G1, alors que le pic d'expression de la protéine CENP-A se trouve en fin de phase G2. Cela signifie que les cellules traversent la mitose avec seulement la moitié de la quantité maximale de nucléosomes CENP-A pouvant être incorporée. Au vu de l'importance de CENP-A pour la ségrégation correcte des chromosomes, cette observation est extrêmement surprenante.

En plus de sa chaperonne HJURP, l'incorporation de CENP-A est régulée par le complexe Mis18, qui est lui-même recruté au niveau des centromères via la présence de nucléosome CENP-A, mais est aussi dépendant de son interaction avec CENP-C (Moree et al., 2011) (Figure D5). Pour être actif le complexe Mis18 doit être phosphorylé par Plk1 durant la phase G1 (McKinley and Cheeseman, 2014). Mis18 n'interagit pas directement avec CENP-A, au lieu de cela, le complexe interagit avec HJURP (Dunleavy et al., 2009 ; Foltz et al., 2009). C'est donc l'activité de la chaperonne qui semble être régulée par le complexe, et donc indirectement

par Plk1. Il est donc probable que le pic d'expression de CENP-A en fin de G2 autorise l'association de CENP-A avec HJURP, cette interaction n'étant à priori par régulée. Ensuite la cellule « autorise » l'incorporation du variant dans la chromatine via Plk1 (Figure D5).

Il n'existe aujourd'hui aucune donnée qui indique pourquoi le moment d'incorporation de CENP-A doit être régulé de façon aussi précise. Néanmoins cette régulation est d'une importance clé. En effet des expériences où CENP-A est artificiellement incorporée au mauvais *timing* via le recrutement forcé de Mis18 au niveau des centromères, ont été conduites. Il est alors observé que le kinétochore ne pouvait pas se former correctement et ceci causait également des défauts importants de ségrégation en mitose (McKinley and Cheeseman, 2014).

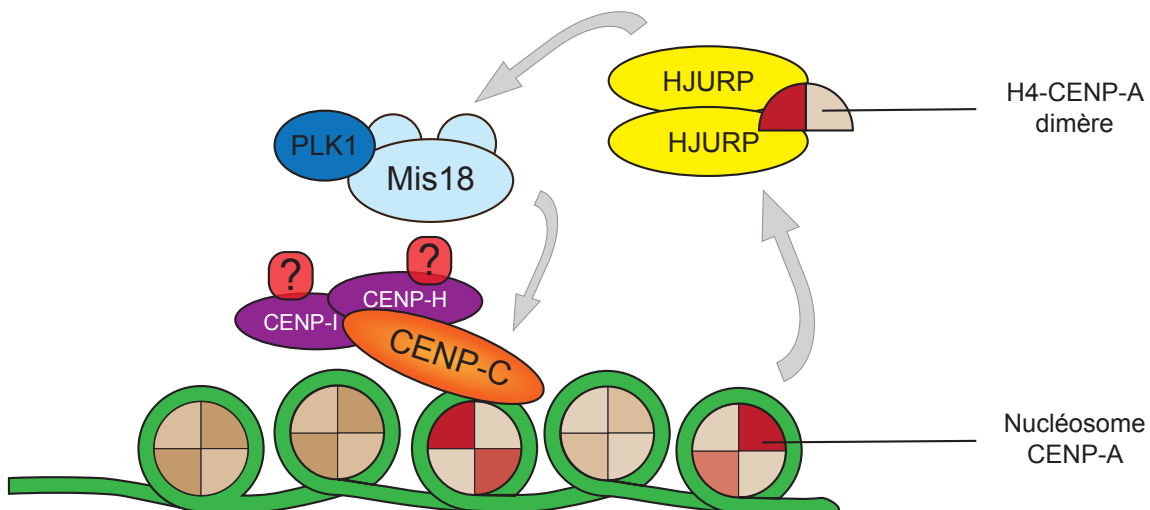


Figure D5 | Control de l'incorporation de CENP-A. Lors de la sortie de mitose le complexe Mis18 se localise au niveau des centromères sous le contrôle de PLK1. La présence de Mis18 permet le recrutement d'un dimère d'HJURP préalablement chargé du dimère H4-CENP-A. La localisation de Mis18 nécessite une interaction directe avec CENP-C. La déplétion de certains autres membres du CCAN entraîne une diminution de l'incorporation de CENP-A. Leur participation dans cette fonction reste méconnue.

Les fonctions du nucléosome CENP-A nécessite donc une interaction particulière avec l'ADN, une structure particulière, et un timing d'incorporation exact pour fonctionner parfaitement.

Rôle des modifications post-traductionnelles

La chromatine contenant les nucléosomes CENP-A possède un certain nombre de marques post-traductionnelles, dont certaines seraient impliquées dans le recrutement de CENP-A.

Une étude récente montre que la chromatine centromérique possède une distinction du reste de la chromatine : la présence de la marque H4K20me1 (Hori et al., 2014). Seul les nucléosomes contenant CENP-A et étant présents au niveau des centromères peuvent posséder cette marque, les nucléosomes CENP-A ectopiques ne possèdent donc pas cette marque. L'absence de cette marque entraîne une réduction du recrutement de certains membres du CCAN, en particulier CENP-H et CENP-T. Si l'on considère que la formation du CCAN est, de façon générale, associée à la stabilisation du nucléosome CENP-A, la présence de cette marque pourrait aider à stabiliser l'incorporation de CENP-A dans ce type de chromatine.

Parmi les autres marques de cette chromatine les plus étudiées actuellement, on trouve H3K4me2 et H3K36me2. Ces deux marques ont en commun le fait qu'elles sont généralement associées avec la chromatine en cours de transcription. La présence de ces marques facilite l'incorporation de nucléosome CENP-A (Bergmann et al., 2011). A l'opposé, H3K9me3 et H3K27me3 sont des marques spécifiques d'une chromatine non transcrite, et de l'hétérochromatine. Elles sont absentes de la chromatine CENP-A (Sullivan and Karpen, 2004). Une très récente étude reporte également le fait que placer de façon artificielle ces deux marques au niveau de la chromatine CENP-A est techniquement possible, mais la cellule va alors les retirer (Martins et al., 2015). L'absence de ces marques est donc spécifiquement contrôlée.

La présence de marques permissives et l'absence de marques répressives de la transcription est donc une caractéristique essentielle de la chromatine centromérique. Parmi les rôles possible de cette spécificité, la transcription des régions centromériques pourrait être l'une des hypothèses à envisager.

Rôle de la transcription de l'ADN centromérique

Un autre aspect qui n'a pas encore été abordé ici est la présence d'ARN au niveau de la chromatine centromérique. Nos résultats de spectrométrie de masse montrent que la présence du mutant $\alpha_{N_{H3}}$ -CENP-A induit une augmentation de la quantité d'ARN polymérase II dans le complexe associé au nucléosome CENP-A. Il est désormais établi que les ARN font parti intégrante des centromères. Mais quels sont leurs fonctions ?

Des traitements à la RNase ont mis en évidence que l'absence de ces transcrits centromériques entraînait la perte au niveau des centromères de CENP-C et de certains membres du CPC dans des cellules humaines. Ce phénomène peut être reversé si des RNA satellites sont réintroduits de façon artificielle après le traitement (Wong et al., 2007). La surexpression des transcrits

centromériques chez la souris est également responsable de la perte d'une partie du CPC au niveau des centromères. Il existe alors une partie du CPC se retrouvant délocalisé de façon aléatoire sur l'ensemble du chromosome (Bouzinba-Segard et al., 2006). Les protéines Aurora B, la survivine et CENP-A, en particulier peuvent être détectées dans des expériences de RNA pull down réalisées avec la séquence du monomère de 120 pb des séquences minor satellites (Ferri et al., 2009). La même étude met également en avant le fait que ces ARN permettent de promouvoir l'activité de kinase d'Aurora B.

Des preuves supplémentaires de l'importance des transcrits centromériques viennent d'études sur l'ARN polymérase II. En effet, elle est trouvée localisée aux centromères en corrélation avec un certain nombre de facteurs de transcription durant la mitose. Alors que la transcription au niveau global de la cellule est éteinte durant cette phase, diminuer l'activité de l'ARN Pol II avec un traitement à l' α -Amanitine réduit une nouvelle fois la présence de CENP-C aux centromères de façon corrélée avec l'augmentation des problèmes de ségrégation que provoque la perte de ce membre du CCAN (Chan et al., 2012). Il existe également des ARN centromériques chez *Schizosaccharomyces pombe*. Ils ont la particularité d'être proche des ARNm classiques, puisqu'ils sont polyadénylés en 3' et ils possèdent un G-cap en 5' (Choi et al., 2011). De façon encore plus intéressante, la présence de ces transcrits augmentait avec la diminution de la

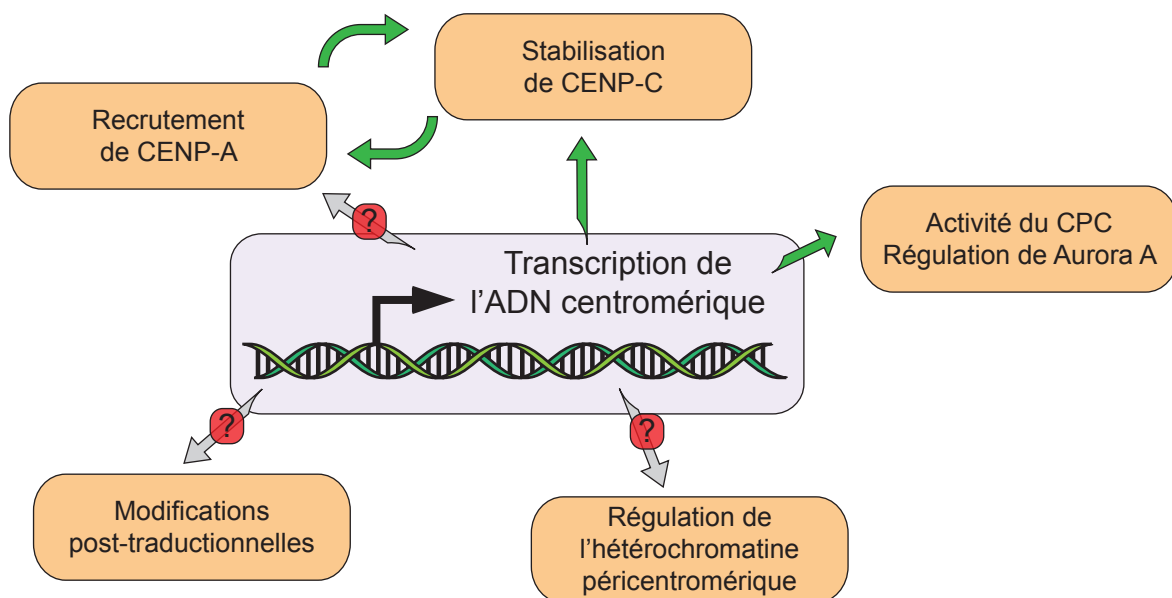


Figure D6 | Fonctions de la transcription des régions centromériques. Les flèches vertes indiquent les rôles directs actuellement identifiés, les flèches grises indiquent les rôles probables via des mécanismes indirects. Il est important de noter que l'ensemble de ses fonctions possède également des régulations autres que celle des ARN, et notamment elles interagissent directement entre elles.

quantité totale de CENP-A, suggérant que normalement ces transcrits disparaissent rapidement et qu'ils pourraient donc être nécessaires à l'incorporation de CENP-A.

Il existe donc un certain nombre d'interactions entre des ARN et CENP-C, CENP-A, Aurora B et le CPC de façon plus générale (Figure D6). La présence de ces ARN est sans doute l'aspect le moins étudié à l'heure actuelle dans le fonctionnement et l'assemblage de la chromatine centromérique. Leur nature est aujourd'hui inconnue, ainsi que la façon dont ils sont transcrits mais également la façon dont cette transcription est régulée. Ceci est d'autant plus intéressant qu'ils pourraient être la pierre manquante entre l'ADN centromérique et l'assemblage localisé des nucléosomes aux niveaux de ces centromères.

Stabilisation du nucléosome CENP-A

Le dernier aspect concernant la régulation de la présence de CENP-A aux centromères est la stabilisation du nucléosome. En effet la cellule est capable de faire la distinction entre les nucléosomes CENP-A nouvellement incorporés et ceux dont la présence est plus ancienne (Lagana et al., 2010). Ces résultats suggèrent également un processus consommateur d'énergie dans ce maintien de CENP-A puisque parmi les effecteurs se trouvent des complexes de remodelage de la chromatine, mais aussi également des GTPases. Pour l'instant, le mécanisme permettant de faire la différence entre les nouveaux et les anciens nucléosomes reste totalement inconnu.

Il existe donc plusieurs niveaux permettant de contrôler la quantité de CENP-A incorporée aux centromères : la déposition de CENP-A et ensuite le maintien des nucléosomes CENP-A nouvellement incorporés. L'objectif étant toujours identique : prévenir la « sur-incorporation » de nucléosomes CENP-A dans la chromatine.

Cette quantité est en effet déterminante pour le fonctionnement correct des centromères, la sur-incorporation ou l'incorporation à des sites ectopiques étant associée au niveau cellulaire à des instabilités chromosomiques (Thomson 2010). Ces instabilités chromosomiques au niveau cellulaire peuvent ensuite devenir la source de certaines pathologies majeures.

Perspectives

Implication de CENP-A dans les pathologies

L'histone CENP-A ne peut pas être séparée des pathologies auto-immunes. Il est en effet l'une des cibles d'auto-anticorps dirigés contre le centromère. C'est d'ailleurs de cette façon qu'ont été identifiées les premières protéines centromériques humaines, grâce à l'utilisation de sérums de patients atteints du syndrome CREST, une sclérodémie auto-immune (Palmer et al., 1987). Ces auto-anticorps sont en effet capables de perturber le bon fonctionnement du centromère, expliquant l'aneuploïdie constatée dans ces pathologies (Jabs et al., 1993).

La présence de CENP-A aux centromères est nécessaire à la correcte ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire. Des erreurs dans ce processus peuvent causer l'aneuploïdie des cellules ou encore une instabilité chromosomique (Thompson 2010). Ces événements sont souvent corrélés à l'apparition de cancers.

Un grand nombre d'observations permet de comprendre quel est le rôle précis de CENP-A dans ces maladies. Il est en particulier montré que la quantité de CENP-A est élevée dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales (Tomonaga, 2001 ; Li et al., 2011). De plus l'augmentation de l'expression de CENP-A est associée à des cancers de plus haut grade et qui sont plus invasifs (Ma et al., 2003). Ces différentes raisons ont conduit CENP-A à être incluses dans les profils génétiques prédictifs pour certains types de cancer dont les cancers du sein (Jerevall et al., 2011) ou également pour effectuer un pronostic sur l'efficacité de certains types de traitements (McGovern et al., 2012). De façon générale la surexpression de CENP-A conduit à sa déposition sur des sites non centromériques, provoquant *in fine* l'instabilité chromosomique.

En plus de la surexpression de CENP-A, la surexpression de sa chaperonne HJURP est une autre cause commune à un certain nombre de cancers (Valente et al., 2013 ; Montes de Oca et al., 2015). L'effet résultant étant identique, puisque cette surexpression conduit également à une déposition ectopique de CENP-A, et les troubles de ségrégation des chromosomes associés à cette déposition.

Il existe donc une réelle importance médicale à comprendre comment fonctionne le nucléosome CENP-A. En particulier comment se fait la régulation de son expression ainsi que les mécanismes de sa déposition dans la chromatine centromérique.

L'exception à la règle CENP-A : les kinétoplastides

La présence de CENP-A comme fondation du kinétochore est une caractéristique des eucaryotes et permet la création d'une chromatine spécialisée. Des homologues fonctionnels de CENP-A peuvent être identifiés dans presque tous les eucaryotes séquencés suggérant que la plupart des eucaryotes utilisent CENP-A pour assembler leurs kinétochores. Toutefois il existe une exception notable : les kinétoplastides. Il s'agit un groupe d'eucaryotes unicellulaires dont font parti les trypanosomes (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*...) et qui possèdent un flagelle. Le séquençage de leurs génomes n'a pas permis de trouver un homologue à CENP-A (Lowell et Cross, 2004 ; Berriman et al., 2005), ce qui pouvait alors suggérer que les kinétoplastides assemblaient leur kinétochore en l'absence de CENP-A. En accord avec cette possibilité, d'autres études ont également confirmé qu'il n'y avait pas non plus d'homologue proche aux autres membres du CCAN « classique » (Westermann et Schleiffer, 2013). Ceci est d'autant plus surprenant qu'ils possèdent par contre des systèmes très proche du système CDK/cycline, du complexe cohésine, de la séparase et également du complexe de la condensine. On retrouve également un homologue d'Aurora B et de l'APC/C; l'ensemble de ces observations suggérant que les machineries générales du cycle cellulaire sont conservées également chez ces kinétoplastides (Akiyoshi et Gull, 2013).

L'identification des premiers éléments équivalents au kinétochore a permis de montrer qu'il n'y avait effectivement que peu de points communs avec le kinétochore classique (Akiyoshi et Gull, 2014). Il n'y a d'ailleurs pas d'équivalent de CENP-A dans celui-ci.

L'organisation différente du génome dans cette branche des eucaryotes peut suffire à expliquer la nécessité d'un système totalement différent pour la répartition du matériel génétique. Il convient néanmoins de relativiser : il existe donc une très forte conservation de la structure et de la fonction des nucléosomes contenant CENP-A ; mais d'autres systèmes existent, y compris chez les eucaryotes.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce manuscrit confirment la relation particulière du nucléosome CENP-A avec l'ADN entrant et sortant de celui-ci. Cet ADN possède une plus grande flexibilité que l'ADN contenu dans le nucléosome H3.1. Cette caractéristique provient de différences de taille et de séquence en acides aminés de l'hélice α N, CENP-A possédant une hélice plus courte que celle de H3.1.

Il existe deux conséquences à cet état.

Dans un premier temps le nucléosome CENP-A n'est pas capable d'interagir fermement avec l'histone H1. Modifier spécifiquement l'hélice α N de CENP-A par celle de H3 permet de restaurer cette interaction.

Dans un second temps, le fait de rigidifier artificiellement le nucléosome CENP-A conduit à des défauts de mitose et de cytokinèse. La présence d'un nucléosome fermé n'est en effet pas capable d'assembler un kinétochore complet, en particulier CENP-C et CENP-B sont manquants. La réduction de la présence des éléments du CCAN étant corrélée avec des défauts de ségrégation.

Il existe donc une nécessité fonctionnelle à conserver l'ADN sortant du nucléosome CENP-A flexible.

*La bibliographie et les fiches ont remplacé,
dans la forme parasitaire d'existence qui est celle
des universités, la rhétorique et les locutions
d'autrefois. Mais le fond reste le même : vivre aux
dépends des œuvres d'autrui.*

Paul VALÉRY

Quatrième Partie

Bibliographie

Bibliographie

- Akiyoshi, Bungo, and Keith Gull. 2013. "Evolutionary Cell Biology of Chromosome Segregation: Insights From Trypanosomes.." *Open Biology* 3 (5). Royal Society Journals: 130023–23. doi:10.1098/rsob.130023.
- Akiyoshi, Bungo, and Keith Gull. 2014. "Discovery of Unconventional Kinetochores in Kinetoplastids." *Cell* 156 (6). Elsevier: 1247–58. doi:10.1016/j.cell.2014.01.049.
- Alami, Raouf, Yuhong Fan, Stephanie Pack, Timothy M Sonbuchner, Arnaud Besse, Qingcong Lin, John M Greally, Arthur I Skoultchi, and Eric E Bouhassira. 2003. "Mammalian Linker-Histone Subtypes Differentially Affect Gene Expression in Vivo.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10). National Acad Sciences: 5920–25. doi:10.1073/pnas.0736105100.
- Aldrup-Macdonald, Megan E, and Beth A Sullivan. 2014. "The Past, Present, and Future of Human Centromere Genomics.." *Genes* 5 (1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 33–50. doi:10.3390/genes5010033.
- Alkan, Can, Maria Francesca Cardone, Claudia Rita Catacchio, Francesca Antonacci, Stephen J O'Brien, Oliver A Ryder, Stefania Purgato, et al. 2011. "Genome-Wide Characterization of Centromeric Satellites From Multiple Mammalian Genomes.." *Genome Research* 21 (1). Cold Spring Harbor Lab: 137–45. doi:10.1101/gr.111278.110.
- Allfrey, V G, and A E Mirsky. 1964. "Structural Modifications of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis.." *Science (New York, N.Y.)* 144 (3618). American Association for the Advancement of Science: 559–59. doi:10.1126/science.144.3618.559.
- Allfrey, V G, R FAULKNER, and A E Mirsky. 1964. "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 51 (5). National Academy of Sciences: 786–94.
- Almagro, Sébastien, Daniel Riveline, Tatsuya Hirano, Bahram Houchmandzadeh, and Stefan Dimitrov. 2004. "The Mitotic Chromosome Is an Assembly of Rigid Elastic Axes Organized by Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) Proteins and Surrounded by a Soft Chromatin Envelope.." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (7). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 5118–26. doi:10.1074/jbc.M307221200.
- Andrews, Paul D, Yulia Ovechkina, Nick Morrice, Michael Wagenbach, Karen Duncan, Linda Wordeman, and Jason R Swedlow. 2004. "Aurora B Regulates MCAK at the Mitotic Centromere.." *Developmental Cell* 6 (2): 253–68.
- Angelov, Dimitar, Annie Molla, Pierre-Yves Perche, Fabienne Hans, Jacques Côté, Saadi Khochbin, Philippe Bouvet, and Stefan Dimitrov. 2003. "The Histone Variant macroH2A Interferes with Transcription Factor Binding and SWI/SNF Nucleosome Remodeling.." *Molecular Cell* 11 (4): 1033–41.
- Angelov, Dimitar, François Lenouvel, Fabienne Hans, Christoph W Müller, Philippe Bouvet, Jan Bednar, Evangelos N Moudrianakis, Jean Cadet, and Stefan Dimitrov. 2004. "The Histone Octamer Is Invisible When NF-kappaB Binds to the Nucleosome.." *Journal of Biological Chemistry* 279 (41). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 42374–82. doi:10.1074/jbc.M407235200.

- Antczak, Andrew J, Toshiaki Tsubota, Paul D Kaufman, and James M Berger. 2006. "Structure of the Yeast Histone H3-ASF1 Interaction: Implications for Chaperone Mechanism, Species-Specific Interactions, and Epigenetics.." *BMC Structural Biology* 6 (1). BioMed Central: 26. doi:10.1186/1472-6807-6-26.
- Arents, G, and E N Moudrianakis. 1993. "Topography of the Histone Octamer Surface: Repeating Structural Motifs Utilized in the Docking of Nucleosomal DNA.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (22): 10489–93. doi:10.1073/pnas.90.22.10489.
- Arents, G, and E N Moudrianakis. 1995. "The Histone Fold: a Ubiquitous Architectural Motif Utilized in DNA Compaction and Protein Dimerization.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (24). National Academy of Sciences: 11170–74.
- Arents, G, R W Burlingame, B C Wang, W E Love, and E N Moudrianakis. 1991. "The Nucleosomal Core Histone Octamer at 3.1 Å Resolution: a Tripartite Protein Assembly and a Left-Handed Superhelix.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22). National Academy of Sciences: 10148–52.
- Avvakumov, Nikita, Amine Nourani, and Jacques Côté. 2011. "Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks.." *Molecular Cell* 41 (5). Elsevier: 502–14. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.013.
- Bacher, Christian P, Michèle Guggiari, Benedikt Brors, Sandrine Augui, Philippe Clerc, Philip Avner, Roland Eils, and Edith Heard. 2006. "Transient Colocalization of X-Inactivation Centres Accompanies the Initiation of X Inactivation.." *Nature Cell Biology* 8 (3): 293–99. doi:10.1038/ncb1365.
- Bahe, Susanne, York-Dieter Stierhof, Christopher J Wilkinson, Florian Leiss, and Erich A Nigg. 2005. "Rootletin Forms Centriole-Associated Filaments and Functions in Centrosome Cohesion.." *The Journal of Cell Biology* 171 (1). Rockefeller Univ Press: 27–33. doi:10.1083/jcb.200504107.
- Bahmanyar, Shirin, Daniel D Kaplan, Jennifer G Deluca, Thomas H Giddings, Eileen T O'Toole, Mark Winey, Edward D Salmon, Patrick J Casey, W James Nelson, and Angela I M Barth. 2008. "Beta-Catenin Is a Nek2 Substrate Involved in Centrosome Separation.." *Genes & Development* 22 (1). Cold Spring Harbor Lab: 91–105. doi:10.1101/gad.1596308.
- Bannister, A J, P Zegerman, J F Partridge, E A Miska, J O Thomas, R C Allshire, and T Kouzarides. 2001. "Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain.." *Nature* 410 (6824): 120–24. doi:10.1038/35065138.
- Bannister, Andrew J, and Tony Kouzarides. 2011. "Regulation of Chromatin by Histone Modifications.." *Cell Research* 21 (3). Nature Publishing Group: 381–95. doi:10.1038/cr.2011.22.
- Bao, Yunhe, Kasey Konesky, Young-Jun Park, Simona Rosu, Pamela N Dyer, Danny Rangasamy, David J Tremethick, Paul J Laybourn, and Karolin Luger. 2004. "Nucleosomes Containing the Histone Variant H2A.Bbd Organize Only 118 Base Pairs of DNA.." *The EMBO Journal* 23 (16). EMBO Press: 3314–24. doi:10.1038/sj.emboj.7600316.

Bibliographie

- Barr, Francis A, and Ulrike Gruneberg. 2007. "Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut.." *Cell* 131 (5). Elsevier: 847–60. doi:10.1016/j.cell.2007.11.011.
- Barrero, María J, Borja Sese, Mercè Martí, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2013. "Macro Histone Variants Are Critical for the Differentiation of Human Pluripotent Cells.." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (22). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 16110–16. doi:10.1074/jbc.M113.466144.
- Basilico, Federica, Stefano Maffini, John R Weir, Daniel Prumbaum, Ana M Rojas, Tomasz Zimniak, Anna De Antoni, et al. 2014. "The PseudoGTPase CENP-M Drives Human Kinetochore Assembly.." *eLife* 3. eLife Sciences Publications, Ltd: e02978. doi:10.7554/eLife.02978.
- Bednar, J, R A Horowitz, S A Grigoryev, L M Carruthers, J C Hansen, A J Koster, and C L Woodcock. 1998. "Nucleosomes, Linker DNA, and Linker Histone Form a Unique Structural Motif That Directs the Higher-Order Folding and Compaction of Chromatin.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (24). National Academy of Sciences: 14173–78.
- Belmont, A S, J W Sedat, and D A Agard. 1987. "A Three-Dimensional Approach to Mitotic Chromosome Structure: Evidence for a Complex Hierarchical Organization.." *The Journal of Cell Biology* 105 (1). The Rockefeller University Press: 77–92.
- Bergmann, Jan H, Mariluz Gómez Rodríguez, Nuno M C Martins, Hiroshi Kimura, David A Kelly, Hiroshi Masumoto, Vladimir Larionov, Lars E T Jansen, and William C Earnshaw. 2011. "Epigenetic Engineering Shows H3K4me2 Is Required for HJURP Targeting and CENP-a Assembly on a Synthetic Human Kinetochore.." *The EMBO Journal* 30 (2). EMBO Press: 328–40. doi:10.1038/emboj.2010.329.
- Bernad, Rafael, Patricia Sánchez, Teresa Rivera, Miriam Rodríguez-Corsino, Ekaterina Boyarchuk, Isabelle Vassias, Dominique Ray-Gallet, et al. 2011. "Xenopus HJURP and Condensin II Are Required for CENP-a Assembly.." *The Journal of Cell Biology* 192 (4). Rockefeller Univ Press: 569–82. doi:10.1083/jcb.201005136.
- Berriman, Matthew, Elodie Ghedin, Christiane Hertz-Fowler, Gaëlle Blandin, Hubert Renault, Daniella C Bartholomeu, Nicola J Lennard, et al. 2005. "The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma Brucei*.." *Science (New York, N.Y.)* 309 (5733). American Association for the Advancement of Science: 416–22. doi:10.1126/science.1112642.
- Black, Ben E, and Emily A Bassett. 2008. "The Histone Variant CENP-a and Centromere Specification." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (1): 91–100. doi:10.1016/j.ceb.2007.11.007.
- Black, Ben E, Daniel R Foltz, Srinivas Chakravarthy, Karolin Luger, Virgil L Woods, and Don W Cleveland. 2004. "Structural Determinants for Generating Centromeric Chromatin.." *Nature* 430 (6999): 578–82. doi:10.1038/nature02766.
- Blower, Michael D, Beth A Sullivan, and Gary H Karpen. 2002. "Conserved Organization of Centromeric Chromatin in Flies and Humans.." *Developmental Cell* 2 (3). NIH Public Access: 319–30.
- Bodor, Dani L, João F Mata, Mikhail Sergeev, Ana Filipa David, Kevan J Salimian, Tanya Panchenko, Don W Cleveland, Ben E Black, Jagesh V Shah, and Lars Et Jansen. 2014. "The

- Quantitative Architecture of Centromeric Chromatin..” *eLife* 3. eLife Sciences Publications, Ltd: e02137. doi:10.7554/eLife.02137.
- BOLTE, S, and F P CORDELIÈRES. 2006. “A Guided Tour Into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy.” *Journal of Microscopy* 224 (3). Blackwell Publishing Ltd: 213–32. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.
- Boulard, Mathieu, Philippe Bouvet, Tapas K Kundu, and Stefan Dimitrov. 2007. “Histone Variant Nucleosomes.” In *Chromatin and Disease*, 41:73–92. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-5466-1_4.
- Boulard, Mathieu, Thierry Gautier, Gaelh Ouengue Mbele, Véronique Gerson, Ali Hamiche, Dimitar Angelov, Philippe Bouvet, and Stefan Dimitrov. 2006. “The NH2 Tail of the Novel Histone Variant H2BFWT Exhibits Properties Distinct From Conventional H2B with Respect to the Assembly of Mitotic Chromosomes..” *Molecular and Cellular Biology* 26 (4). American Society for Microbiology: 1518–26. doi:10.1128/MCB.26.4.1518-1526.2006.
- Bouzinba-Segard, Haniaa, Adeline Guais, and Claire Francastel. 2006. “Accumulation of Small Murine Minor Satellite Transcripts Leads to Impaired Centromeric Architecture and Function..” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (23). National Acad Sciences: 8709–14. doi:10.1073/pnas.0508006103.
- Braunschweig, Ulrich, Greg J Hogan, Ludo Pagie, and Bas van Steensel. 2009. “Histone H1 Binding Is Inhibited by Histone Variant H3.3..” *The EMBO Journal* 28 (23). EMBO Press: 3635–45. doi:10.1038/emboj.2009.301.
- Brenner, S, D Pepper, M W Berns, E Tan, and B R Brinkley. 1981. “Kinetochores Structure, Duplication, and Distribution in Mammalian Cells: Analysis by Human Autoantibodies From Scleroderma Patients..” *The Journal of Cell Biology* 91 (1). The Rockefeller University Press: 95–102.
- Brittle, Amy L, and Hiroyuki Ohkura. 2005. “Centrosome Maturation: Aurora Lights the Way to the Poles..” *Current Biology : CB* 15 (21). Elsevier: R880–82. doi:10.1016/j.cub.2005.10.022.
- Broccoli, D, O J Miller, and D A Miller. 1990. “Relationship of Mouse Minor Satellite DNA to Centromere Activity.” *Cytogenetic and Genome Research* 54 (3-4): 182–86. doi:10.1159/000132989.
- Brust-Mascher, I, G Civelekoglu-Scholey, M Kwon, A Mogilner, and J M Scholey. 2004. “Model for Anaphase B: Role of Three Mitotic Motors in a Switch From Poleward Flux to Spindle Elongation..” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (45). National Acad Sciences: 15938–43. doi:10.1073/pnas.0407044101.
- Brust-Mascher, Ingrid, and Jonathan M Scholey. 2002. “Microtubule Flux and Sliding in Mitotic Spindles of *Drosophila* Embryos..” *Molecular Biology of the Cell* 13 (11). American Society for Cell Biology: 3967–75. doi:10.1091/mbc.02-05-0069.
- Bui, Minh, Emiliós K Dimitriadis, Christian Hoischen, EunKyung An, Delphine Quénet, Sindy Giebe, Aleksandra Nita-Lazar, Stephan Diekmann, and Yamini Dalal. 2012. “Cell-Cycle-Dependent Structural Transitions in the Human CENP-a Nucleosome in Vivo..” *Cell* 150 (2). Elsevier: 317–26. doi:10.1016/j.cell.2012.05.035.

Bibliographie

- Buscaino, Alessia, Robin Allshire, and Alison Pidoux. 2010. "Building Centromeres: Home Sweet Home or a Nomadic Existence?." *Current Opinion in Genetics & Development* 20 (2): 118–26. doi:10.1016/j.gde.2010.01.006.
- Buschbeck, Marcus, Iris Uribealago, Indra Wibowo, Pau Rué, David Martin, Arantxa Gutierrez, Lluís Morey, Roderic Guigó, Hernán López-Schier, and Luciano Di Croce. 2009. "The Histone Variant macroH2A Is an Epigenetic Regulator of Key Developmental Genes.." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (10): 1074–79. doi:10.1038/nsmb.1665.
- Buvelot, Stéphanie, Sean Y Tatsutani, Danielle Vermaak, and Sue Biggins. 2003. "The Budding Yeast Ipl1/Aurora Protein Kinase Regulates Mitotic Spindle Disassembly.." *The Journal of Cell Biology* 160 (3). Rockefeller Univ Press: 329–39. doi:10.1083/jcb.200209018.
- Cairns, B R, Y J Kim, M H Sayre, B C Laurent, and R D Kornberg. 1994. "A Multisubunit Complex Containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 Gene Products Isolated From Yeast.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (5). National Academy of Sciences: 1950–54.
- Canzio, Daniele, Evelyn Y Chang, Smita Shankar, Kristopher M Kuchenbecker, Matthew D Simon, Hiten D Madhani, Geeta J Narlikar, and Bassem Al-Sady. 2011. "Chromodomain-Mediated Oligomerization of HP1 Suggests a Nucleosome-Bridging Mechanism for Heterochromatin Assembly.." *Molecular Cell* 41 (1). Elsevier: 67–81. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.016.
- Carroll, Christopher W, Kirstin J Milks, and Aaron F Straight. 2010. "Dual Recognition of CENP-a Nucleosomes Is Required for Centromere Assembly.." *The Journal of Cell Biology* 189 (7). Rockefeller Univ Press: 1143–55. doi:10.1083/jcb.201001013.
- Carroll, Christopher W, Mariana C C Silva, Kristina M Godek, Lars E T Jansen, and Aaron F Straight. 2009. "Centromere Assembly Requires the Direct Recognition of CENP-a Nucleosomes by CENP-N.." *Nature Cell Biology* 11 (7): 896–902. doi:10.1038/ncb1899.
- Cassimeris, L U, R A Walker, N K Pryer, and E D Salmon. 1987. "Dynamic Instability of Microtubules." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 7 (4). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 149–54. doi:10.1002/bies.950070403.
- Centonze, V E, and G G Borisy. 1991. "Pole-to-Chromosome Movements Induced at Metaphase: Sites of Microtubule Disassembly.." *Journal of Cell Science* 100 (Pt 1) (September): 205–11.
- Chadwick, B P, and H F Willard. 2001. "A Novel Chromatin Protein, Distantly Related to Histone H2A, Is Largely Excluded From the Inactive X Chromosome.." *The Journal of Cell Biology* 152 (2). The Rockefeller University Press: 375–84.
- Chakravarthy, Srinivas, and Karolin Luger. 2006. "The Histone Variant Macro-H2A Preferentially Forms «Hybrid Nucleosomes».." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (35). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 25522–31. doi:10.1074/jbc.M602258200.
- Chakravarthy, Srinivas, Sampath Kumar Y Gundimella, Cecile Caron, Pierre-Yves Perche, John R Pehrson, Saadi Khochbin, and Karolin Luger. 2005. "Structural Characterization of the Histone Variant macroH2A.." *Molecular and Cellular Biology* 25 (17). American Society for Microbiology: 7616–24. doi:10.1128/MCB.25.17.7616-7624.2005.

- Chan, F Lyn, and Lee H Wong. 2012. "Transcription in the Maintenance of Centromere Chromatin Identity.." *Nucleic Acids Research* 40 (22). Oxford University Press: 11178–88. doi:10.1093/nar/gks921.
- Chatterjee, Nilanjana, Justin A North, Mekonnen Lemma Dechassa, Mridula Manohar, Rashmi Prasad, Karolin Luger, Jennifer J Ottesen, Michael G Poirier, and Blaine Bartholomew. 2015. "Histone Acetylation Near the Nucleosome Dyad Axis Enhances Nucleosome Disassembly by RSC and SWI/SNF.." *Molecular and Cellular Biology* 35 (23). American Society for Microbiology: 4083–92. doi:10.1128/MCB.00441-15.
- Cheeseman, Iain M, and Arshad Desai. 2008. "Molecular Architecture of the Kinetochores-Microtubule Interface.." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (1): 33–46. doi:10.1038/nrm2310.
- Cheeseman, Iain M, Joshua S Chappie, Elizabeth M Wilson-Kubalek, and Arshad Desai. 2006. "The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochores.." *Cell* 127 (5). Elsevier: 983–97. doi:10.1016/j.cell.2006.09.039.
- Chen, Danyang, Miroslav Dundr, Chen Wang, Anthony Leung, Angus Lamond, Tom Misteli, and Sui Huang. 2005. "Condensed Mitotic Chromatin Is Accessible to Transcription Factors and Chromatin Structural Proteins.." *The Journal of Cell Biology* 168 (1). Rockefeller Univ Press: 41–54. doi:10.1083/jcb.200407182.
- Chen, Ping, Jicheng Zhao, Yan Wang, Min Wang, Haizhen Long, Dan Liang, Li Huang, et al. 2013. "H3.3 Actively Marks Enhancers and Primes Gene Transcription via Opening Higher-Ordered Chromatin.." *Genes & Development* 27 (19). Cold Spring Harbor Lab: 2109–24. doi:10.1101/gad.222174.113.
- Cheng, Zhukuan, Fenggao Dong, Tim Langdon, Shu Ouyang, C Robin Buell, Minghong Gu, Frederick R Blattner, and Jiming Jiang. 2002. "Functional Rice Centromeres Are Marked by a Satellite Repeat and a Centromere-Specific Retrotransposon.." *The Plant Cell* 14 (8). American Society of Plant Biologists: 1691–1704. doi:10.1105/tpc.003079.
- Choi, Eun Shik, Annelie Strålfors, Araceli G Castillo, Mickaël Durand-Dubief, Karl Ekwall, and Robin C Allshire. 2011. "Identification of Noncoding Transcripts From Within CENP-a Chromatin at Fission Yeast Centromeres.." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (26). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 23600–23607. doi:10.1074/jbc.M111.228510.
- Choi, Eun Shik, Annelie Strålfors, Sandra Catania, Araceli G Castillo, J Peter Svensson, Alison L Pidoux, Karl Ekwall, and Robin C Allshire. 2012. "Factors That Promote H3 Chromatin Integrity During Transcription Prevent Promiscuous Deposition of CENP-a(Cnp1) in Fission Yeast.." Edited by Beth A Sullivan. *PLoS Genetics* 8 (9). Public Library of Science: e1002985. doi:10.1371/journal.pgen.1002985.
- Clapier, Cedric R, and Bradley R Cairns. 2009. "The Biology of Chromatin Remodeling Complexes.." *Annual Review of Biochemistry* 78 (1). Annual Reviews: 273–304. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
- Cook, Adam J L, Zachary A Gurard-Levin, Isabelle Vassias, and Geneviève Almouzni. 2011. "A Specific Function for the Histone Chaperone NASP to Fine-Tune a Reservoir of Soluble

Bibliographie

- H3-H4 in the Histone Supply Chain..” *Molecular Cell* 44 (6). Elsevier: 918–27. doi:10.1016/j.molcel.2011.11.021.
- Costanzi, C, and J R Pehrson. 1998. “Histone macroH2A1 Is Concentrated in the Inactive X Chromosome of Female Mammals..” *Nature* 393 (6685): 599–601. doi:10.1038/31275.
- Côté, J, J Quinn, J L Workman, and C L Peterson. 1994. “Stimulation of GAL4 Derivative Binding to Nucleosomal DNA by the Yeast SWI/SNF Complex..” *Science (New York, N.Y.)* 265 (5168): 53–60.
- Cremer, Thomas, Marion Cremer, Steffen Dietzel, Stefan Müller, Irina Solovei, and Stanislav Fakan. 2006. “Chromosome Territories--a Functional Nuclear Landscape..” *Current Opinion in Cell Biology* 18 (3): 307–16. doi:10.1016/j.ceb.2006.04.007.
- Creppe, Catherine, Peggy Janich, Neus Cantariño, Marc Noguera, Vanesa Valero, Eva Musulén, Julien Douet, et al. 2012. “MacroH2A1 Regulates the Balance Between Self-Renewal and Differentiation Commitment in Embryonic and Adult Stem Cells..” *Molecular and Cellular Biology* 32 (8). American Society for Microbiology: 1442–52. doi:10.1128/MCB.06323-11.
- D’Avino, Pier Paolo, and David M Glover. 2009. “Cytokinesis: Mind the GAP..” *Nature Cell Biology*, February. doi:10.1038/ncb0209-112.
- Dambacher, Silvia, Wen Deng, Matthias Hahn, Dennis Sadic, Jonathan Fröhlich, Alexander Nuber, Christian Hoischen, Stephan Diekmann, Heinrich Leonhardt, and Gunnar Schotta. 2012. “CENP-C Facilitates the Recruitment of M18BP1 to Centromeric Chromatin..” *Nucleus (Austin, Tex.)* 3 (1). Taylor & Francis: 101–10. doi:10.4161/nucl.18955.
- De Souza, C P, A H Osmani, L P Wu, J L Spotts, and S A Osmani. 2000. “Mitotic Histone H3 Phosphorylation by the NIMA Kinase in *Aspergillus Nidulans*..” *Cell* 102 (3): 293–302.
- Desai, A, and T J Mitchison. 1997. “Microtubule Polymerization Dynamics..” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 83–117. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
- Dion, Michael F, Steven J Altschuler, Lani F Wu, and Oliver J Rando. 2005. “Genomic Characterization Reveals a Simple Histone H4 Acetylation Code..” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (15). National Acad Sciences: 5501–6. doi:10.1073/pnas.0500136102.
- Dixon, Jesse R, Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S Liu, and Bing Ren. 2012. “Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions..” *Nature* 485 (7398): 376–80. doi:10.1038/nature11082.
- Dominski, Zbigniew, and William F Marzluff. 1999. “Formation of the 3’ End of Histone mRNA.” *Gene* 239 (1): 1–14. doi:10.1016/S0378-1119(99)00367-4.
- Dorigo, Benedetta, Thomas Schalch, Alexandra Kulangara, Sylwia Duda, Rasmus R Schroeder, and Timothy J Richmond. 2004. “Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber..” *Science (New York, N.Y.)* 306 (5701). American Association for the Advancement of Science: 1571–73. doi:10.1126/science.1103124.
- Dorigo, Benedetta, Thomas Schalch, Kerstin Bystricky, and Timothy J Richmond. 2003. “Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-Terminal Tail..” *Journal of Molecular Biology* 327 (1): 85–96.

- Doyen, Cécile-Marie, Woojin An, Dimitar Angelov, Vladimir Bondarenko, Flore Mietton, Vassily M Studitsky, Ali Hamiche, Robert G Roeder, Philippe Bouvet, and Stefan Dimitrov. 2006. "Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant macroH2A.." *Molecular and Cellular Biology* 26 (3). American Society for Microbiology: 1156–64. doi:10.1128/MCB.26.3.1156-1164.2006.
- Drané, Pascal, Khalid Ouararhni, Arnaud Depaux, Muhammad Shuaib, and Ali Hamiche. 2010. "The Death-Associated Protein DAXX Is a Novel Histone Chaperone Involved in the Replication-Independent Deposition of H3.3.." *Genes & Development* 24 (12). Cold Spring Harbor Lab: 1253–65. doi:10.1101/gad.566910.
- Dubrana, Karine, Haico van Attikum, Florence Hediger, and Susan M Gasser. 2007. "The Processing of Double-Strand Breaks and Binding of Single-Strand-Binding Proteins RPA and Rad51 Modulate the Formation of ATR-Kinase Foci in Yeast.." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 23). The Company of Biologists Ltd: 4209–20. doi:10.1242/jcs.018366.
- Dumont, Sophie, E D Salmon, and Timothy J Mitchison. 2012. "Deformations Within Moving Kinetochores Reveal Different Sites of Active and Passive Force Generation.." *Science (New York, N.Y.)* 337 (6092). American Association for the Advancement of Science: 355–58. doi:10.1126/science.1221886.
- Dunleavy, Elaine M, Danièle Roche, Hideaki Tagami, Nicolas Lacoste, Dominique Ray-Gallet, Yusuke Nakamura, Yataro Daigo, Yoshihiro Nakatani, and Geneviève Almouzni-Pettinotti. 2009. "HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-a at Centromeres.." *Cell* 137 (3). Elsevier: 485–97. doi:10.1016/j.cell.2009.02.040.
- Dunleavy, Elaine M, Geneviève Almouzni, and Gary H Karpen. 2011. "H3.3 Is Deposited at Centromeres in S Phase as a Placeholder for Newly Assembled CENP-a in G1 Phase.." *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 (2). Taylor & Francis: 146–57. doi:10.4161/nucl.2.2.15211.
- Dutertre, Stéphanie, Simon Descamps, and Claude Prigent. 2002. "On the Role of Aurora-a in Centrosome Function.." *Oncogene* 21 (40). Nature Publishing Group: 6175–83. doi:10.1038/sj.onc.1205775.
- Earnshaw, W C, P S Machlin, B J Bordwell, N F Rothfield, and D W Cleveland. 1987. "Analysis of Anticentromere Autoantibodies Using Cloned Autoantigen CENP-B.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (14). National Academy of Sciences: 4979–83.
- Earnshaw, William C. 2015. *Discovering Centromere Proteins: From Cold White Hands to the a, B, C of CENPs*. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Vol. 16. doi:10.1038/nrm4001.
- Earnshaw, William C, and Barbara R Migeon. 1985. "Three Related Centromere Proteins Are Absent From the Inactive Centromere of a Stable Isodicentric Chromosome.." *Chromosoma* 92 (4). Springer-Verlag: 290–96. doi:10.1007/BF00329812.
- Eltsov, M, K M MacLellan, K Maeshima, A S Frangakis, and J Dubochet. 2008. "Analysis of Cryo-Electron Microscopy Images Does Not Support the Existence of 30-Nm Chromatin Fibers in Mitotic Chromosomes in Situ.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (50). National Acad Sciences: 19732–37. doi:10.1073/pnas.0810057105.

Bibliographie

- English, Christine M, Nasib K Maluf, Brian Tripet, Mair E A Churchill, and Jessica K Tyler. 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 (42). American Chemical Society: 13673–82. doi:10.1021/bi051333h.
- Fachinetti, Daniele, H Diego Folco, Yael Nechemia-Arbely, Luis P Valente, Kristen Nguyen, Alex J Wong, Quan Zhu, et al. 2013. "A Two-Step Mechanism for Epigenetic Specification of Centromere Identity and Function.." *Nature Cell Biology* 15 (9): 1056–66. doi:10.1038/ncb2805.
- Fachinetti, Daniele, Joo Seok Han, Moira A McMahon, Peter Ly, Amira Abdullah, Alex J Wong, and Don W Cleveland. 2015. "DNA Sequence-Specific Binding of CENP-B Enhances the Fidelity of Human Centromere Function.." *Developmental Cell* 33 (3). Elsevier: 314–27. doi:10.1016/j.devcel.2015.03.020.
- Falk, Samantha J, Lucie Y Guo, Nikolina Sekulic, Evan M Smoak, Tomoyasu Mani, Glennis A Logsdon, Kushol Gupta, et al. 2015. "Chromosomes. CENP-C Reshapes and Stabilizes CENP-a Nucleosomes at the Centromere.." *Science (New York, N.Y.)* 348 (6235). American Association for the Advancement of Science: 699–703. doi:10.1126/science.1259308.
- Fantz, D A, W R Hatfield, G Horvath, M K Kistler, and W S Kistler. 2001. "Mice with a Targeted Disruption of the H1t Gene Are Fertile and Undergo Normal Changes in Structural Chromosomal Proteins During Spermiogenesis.." *Biology of Reproduction* 64 (2): 425–31.
- Fededa, Juan Pablo, and Daniel W Gerlich. 2012. "Molecular Control of Animal Cell Cytokinesis.." *Nature Cell Biology* 14 (5): 440–47. doi:10.1038/ncb2482.
- Ferri, Federica, Haniaa Bouzinba-Segard, Guillaume Velasco, Florent Hubé, and Claire Francastel. 2009. "Non-Coding Murine Centromeric Transcripts Associate with and Potentiate Aurora B Kinase.." *Nucleic Acids Research* 37 (15). Oxford University Press: 5071–80. doi:10.1093/nar/gkp529.
- Finch, J T, and A Klug. 1976. "Solenoidal Model for Superstructure in Chromatin.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73 (6). National Acad Sciences: 1897–1901. doi:10.1073/pnas.73.6.1897.
- Fischle, W. 2003. "Molecular Basis for the Discrimination of Repressive Methyl-Lysine Marks in Histone H3 by Polycomb and HP1 Chromodomains.." *Genes & Development* 17 (15). Cold Spring Harbor Lab: 1870–81. doi:10.1101/gad.1110503.
- Foltz, Daniel R, Lars E T Jansen, Aaron O Bailey, John R Yates, Emily A Bassett, Stacey Wood, Ben E Black, and Don W Cleveland. 2009. "Centromere-Specific Assembly of CENP-a Nucleosomes Is Mediated by HJURP.." *Cell* 137 (3). Elsevier: 472–84. doi:10.1016/j.cell.2009.02.039.
- Foltz, Daniel R, Lars E T Jansen, Ben E Black, Aaron O Bailey, John R Yates, and Don W Cleveland. 2006. "The Human CENP-a Centromeric Nucleosome-Associated Complex.." *Nature Cell Biology* 8 (5): 458–69. doi:10.1038/ncb1397.
- Fujita, Risa, Koichiro Otake, Yasuhiro Arimura, Naoki Horikoshi, Yuta Miya, Tatsuya Shiga, Akihisa Osakabe, et al. 2015. "Stable Complex Formation of CENP-B with the CENP-a

- Nucleosome..” *Nucleic Acids Research* 43 (10). Oxford University Press: 4909–22. doi:10.1093/nar/gkv405.
- Fujita, Yohta, Takeshi Hayashi, Tomomi Kiyomitsu, Yusuke Toyoda, Aya Kokubu, Chikashi Obuse, and Mitsuhiro Yanagida. 2007. “Priming of Centromere for CENP-a Recruitment by Human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1..” *Developmental Cell* 12 (1). Elsevier: 17–30. doi:10.1016/j.devcel.2006.11.002.
- Fukagawa, Tatsuo, and William C Earnshaw. 2014. “The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery..” *Developmental Cell* 30 (5). Elsevier: 496–508. doi:10.1016/j.devcel.2014.08.016.
- Furuyama, Takehito, and Steven Henikoff. 2009. “Centromeric Nucleosomes Induce Positive DNA Supercoils..” *Cell* 138 (1). Elsevier: 104–13. doi:10.1016/j.cell.2009.04.049.
- Gabrilovich, Dmitry I, Pingyan Cheng, Yuhong Fan, Bin Yu, Ekaterina Nikitina, Allen Sirotkin, Michael Shurin, et al. 2002. “H1(0) Histone and Differentiation of Dendritic Cells. a Molecular Target for Tumor-Derived Factors..” *Journal of Leukocyte Biology* 72 (2): 285–96.
- Gaetz, Jedidiah, and Tarun M Kapoor. 2004. “Dynein/Dynactin Regulate Metaphase Spindle Length by Targeting Depolymerizing Activities to Spindle Poles..” *The Journal of Cell Biology* 166 (4). Rockefeller Univ Press: 465–71. doi:10.1083/jcb.200404015.
- Ganem, Neil J, and Duane A Compton. 2004. “The KinI Kinesin Kif2a Is Required for Bipolar Spindle Assembly Through a Functional Relationship with MCAK..” *The Journal of Cell Biology* 166 (4). Rockefeller Univ Press: 473–78. doi:10.1083/jcb.200404012.
- Gascoigne, Karen E, Kozo Takeuchi, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, and Iain M Cheeseman. 2011. “Induced Ectopic Kinetochore Assembly Bypasses the Requirement for CENP-a Nucleosomes..” *Cell* 145 (3). Elsevier: 410–22. doi:10.1016/j.cell.2011.03.031.
- Gaspar-Maia, Alexandre, Zulekha A Qadeer, Dan Hasson, Kajan Ratnakumar, N Adrian Leu, Gary Leroy, Shichong Liu, et al. 2013. “MacroH2A Histone Variants Act as a Barrier Upon Reprogramming Towards Pluripotency..” *Nature Communications* 4: 1565. doi:10.1038/ncomms2582.
- Gautier, Thierry, D Wade Abbott, Annie Molla, Andre Verdell, Juan Ausio, and Stefan Dimitrov. 2004. “Histone Variant H2ABbd Confers Lower Stability to the Nucleosome..” *EMBO Reports* 5 (7). EMBO Press: 715–20. doi:10.1038/sj.embor.7400182.
- Ge, Sheng, Jeffrey R Skaar, and Michele Pagano. 2009. “APC/C- and Mad2-Mediated Degradation of Cdc20 During Spindle Checkpoint Activation..” *Cell Cycle* 8 (1). NIH Public Access: 167–71.
- Geiss, Christian P, Dimitra Keramisanou, Nikolina Sekulic, Margot P Scheffer, Ben E Black, and Achilleas S Frangakis. 2014. “CENP-a Arrays Are More Condensed Than Canonical Arrays at Low Ionic Strength..” *Biophysical Journal* 106 (4). Elsevier: 875–82. doi:10.1016/j.bpj.2014.01.005.

Bibliographie

- Giet, Régis, Clotilde Petretti, and Claude Prigent. 2005. "Aurora Kinases, Aneuploidy and Cancer, a Coincidence or a Real Link?." *Trends in Cell Biology* 15 (5). Elsevier: 241–50. doi:10.1016/j.tcb.2005.03.004.
- Glotzer, Michael. 2005. "The Molecular Requirements for Cytokinesis.." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5716): 1735–39. doi:10.1126/science.1096896.
- Golan, Amnon, Yana Yudkovsky, and Avram Hershko. 2002. "The Cyclin-Ubiquitin Ligase Activity of Cyclosome/APC Is Jointly Activated by Protein Kinases Cdk1-Cyclin B and Plk.." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (18). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 15552–57. doi:10.1074/jbc.M111476200.
- Gong, Zhiyun, Yufeng Wu, Andrea Koblízková, Giovana A Torres, Kai Wang, Marina Iovene, Pavel Neumann, et al. 2012. "Repeatless and Repeat-Based Centromeres in Potato: Implications for Centromere Evolution.." *The Plant Cell* 24 (9). American Society of Plant Biologists: 3559–74. doi:10.1105/tpc.112.100511.
- Gorbsky, G J, P J Sammak, and G G Borisy. 1987. "Chromosomes Move Poleward in Anaphase Along Stationary Microtubules That Coordinately Disassemble From Their Kinetochore Ends.." *The Journal of Cell Biology* 104 (1). The Rockefeller University Press: 9–18.
- Gorbsky, G J, P J Sammak, and G G Borisy. 1988. "Microtubule Dynamics and Chromosome Motion Visualized in Living Anaphase Cells.." *The Journal of Cell Biology* 106 (4). The Rockefeller University Press: 1185–92.
- Goutte-Gattat, Damien, Muhammad Shuaib, Khalid Ouararhni, Thierry Gautier, Dimitrios A Skoufias, Ali Hamiche, and Stefan Dimitrov. 2013. "Phosphorylation of the CENP-a Amino-Terminus in Mitotic Centromeric Chromatin Is Required for Kinetochore Function.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21). National Acad Sciences: 8579–84. doi:10.1073/pnas.1302955110.
- Greaves, Ian K, Danny Rangasamy, Patricia Ridgway, and David J Tremethick. 2007. "H2A.Z Contributes to the Unique 3D Structure of the Centromere.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2). National Acad Sciences: 525–30. doi:10.1073/pnas.0607870104.
- Green, Erin M, Andrew J Antczak, Aaron O Bailey, Alexa A Franco, Kevin J Wu, John R Yates, and Paul D Kaufman. 2005. "Replication-Independent Histone Deposition by the HIR Complex and Asf1.." *Current Biology : CB* 15 (22). Elsevier: 2044–49. doi:10.1016/j.cub.2005.10.053.
- Grigoryev, Sergei A, Gaurav Arya, Sarah Correll, Christopher L Woodcock, and Tamar Schlick. 2009. "Evidence for Heteromorphic Chromatin Fibers From Analysis of Nucleosome Interactions.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32). National Acad Sciences: 13317–22. doi:10.1073/pnas.0903280106.
- Gross, Michael. 2015. William Earnshaw. *Current Biology : CB*. doi:10.1016/j.cub.2015.03.003.
- Haering, Christian H, and Kim Nasmyth. 2003. "Building and Breaking Bridges Between Sister Chromatids.." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 25 (12). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 1178–91. doi:10.1002/bies.10361.

- Hake, S B, and C D Allis. 2006. "Histone H3 Variants and Their Potential Role in Indexing Mammalian Genomes: the 'H3 Barcode Hypothesis'." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (17). National Acad Sciences: 6428–35. doi:10.1073/pnas.0600803103.
- Hamiche, A, P Schultz, V Ramakrishnan, P Oudet, and A Prunell. 1996. "Linker Histone-Dependent DNA Structure in Linear Mononucleosomes.." *Journal of Molecular Biology* 257 (1): 30–42. doi:10.1006/jmbi.1996.0144.
- Hammoud, Saher Sue, David A Nix, Haiying Zhang, Jahnvi Purwar, Douglas T Carrell, and Bradley R Cairns. 2009. "Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development." *Nature*, June. doi:10.1038/nature08162.
- Hannak, E, M Kirkham, A A Hyman, and K Oegema. 2001. "Aurora-a Kinase Is Required for Centrosome Maturation in *Caenorhabditis Elegans*.." *The Journal of Cell Biology* 155 (7). Rockefeller Univ Press: 1109–16. doi:10.1083/jcb.200108051.
- Hans, F, and S Dimitrov. 2001. "Histone H3 Phosphorylation and Cell Division.." *Oncogene* 20 (24). Nature Publishing Group: 3021–27. doi:10.1038/sj.onc.1204326.
- Hansen, Jeffrey C. 2002. "Conformational Dynamics of the Chromatin Fiber in Solution: Determinants, Mechanisms, and Functions.." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 361–92. doi:10.1146/annurev.biophys.31.101101.140858.
- Happel, Nicole, and Detlef Doenecke. 2009. "Histone H1 and Its Isoforms: Contribution to Chromatin Structure and Function.." *Gene* 431 (1-2): 1–12. doi:10.1016/j.gene.2008.11.003.
- Harp, J M, B L Hanson, D E Timm, and G J Bunick. 2000. "Asymmetries in the Nucleosome Core Particle at 2.5 a Resolution.." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 56 (Pt 12): 1513–34.
- Hasson, Dan, Tanya Panchenko, Kevan J Salimian, Mishah U Salman, Nikolina Sekulic, Alicia Alonso, Peter E Warburton, and Ben E Black. 2013. "The Octamer Is the Major Form of CENP-a Nucleosomes at Human Centromeres.." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (6): 687–95. doi:10.1038/nsmb.2562.
- Heckmann, Stefan, Jirí Macas, Katrin Kumke, Jörg Fuchs, Veit Schubert, Lu Ma, Petr Novák, et al. 2013. "The Holocentric Species *Luzula Elegans* Shows Interplay Between Centromere and Large-Scale Genome Organization.." *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 73 (4): 555–65. doi:10.1111/tpj.12054.
- Henikoff, Steven, and Yamini Dalal. 2005. "Centromeric Chromatin: What Makes It Unique?." *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (2): 177–84. doi:10.1016/j.gde.2005.01.004.
- Herzog, Franz, Ivana Primorac, Prakash Dube, Péter Lénárt, Björn Sander, Karl Mechtler, Holger Stark, and Jan-Michael Peters. 2009. "Structure of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Interacting with a Mitotic Checkpoint Complex.." *Science (New York, N.Y.)* 323 (5920). American Association for the Advancement of Science: 1477–81. doi:10.1126/science.1163300.

Bibliographie

- Hinshaw, Stephen M, and Stephen C Harrison. 2013. "An Iml3-Chl4 Heterodimer Links the Core Centromere to Factors Required for Accurate Chromosome Segregation.." *Cell Reports* 5 (1). Elsevier: 29–36. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.036.
- Hon, Gary, Wei Wang, and Bing Ren. 2009. "Discovery and Annotation of Functional Chromatin Signatures in the Human Genome.." Edited by Eran Segal. *PLoS Computational Biology* 5 (11). Public Library of Science: e1000566. doi:10.1371/journal.pcbi.1000566.
- Hondele, Maria, and Andreas G Ladurner. 2011. "The Chaperone-Histone Partnership: for the Greater Good of Histone Traffic and Chromatin Plasticity.." *Current Opinion in Structural Biology* 21 (6): 698–708. doi:10.1016/j.sbi.2011.10.003.
- Hong, L, G P Schroth, H R Matthews, P Yau, and E M Bradbury. 1993. "Studies of the DNA Binding Properties of Histone H4 Amino Terminus. Thermal Denaturation Studies Reveal That Acetylation Markedly Reduces the Binding Constant of the H4 'Tail' to DNA.." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1): 305–14.
- Hori, Tetsuya, Miho Amano, Aussie Suzuki, Chelsea B Backer, Julie P Welburn, Yimin Dong, Bruce F McEwen, et al. 2008. "CCAN Makes Multiple Contacts with Centromeric DNA to Provide Distinct Pathways to the Outer Kinetochore.." *Cell* 135 (6). Elsevier: 1039–52. doi:10.1016/j.cell.2008.10.019.
- Hori, Tetsuya, Wei-Hao Shang, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Norikazu Monma, Kazuho Ikeo, Oscar Molina, et al. 2014. "Histone H4 Lys 20 Monomethylation of the CENP-a Nucleosome Is Essential for Kinetochore Assembly.." *Developmental Cell* 29 (6). Elsevier: 740–49. doi:10.1016/j.devcel.2014.05.001.
- Hori, Tetsuya, Wei-Hao Shang, Kozo Takeuchi, and Tatsuo Fukagawa. 2013. "The CCAN Recruits CENP-a to the Centromere and Forms the Structural Core for Kinetochore Assembly.." *The Journal of Cell Biology* 200 (1). Rockefeller Univ Press: 45–60. doi:10.1083/jcb.201210106.
- Howell, Bonnie J, Ben Moree, Emily M Farrar, Scott Stewart, Guowei Fang, and E D Salmon. 2004. "Spindle Checkpoint Protein Dynamics at Kinetochores in Living Cells.." *Current Biology* : CB 14 (11). Elsevier: 953–64. doi:10.1016/j.cub.2004.05.053.
- Ideue, Takashi, Yukiko Cho, Kanako Nishimura, and Tokio Tani. 2014. "Involvement of Satellite I Noncoding RNA in Regulation of Chromosome Segregation.." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 19 (6): 528–38. doi:10.1111/gtc.12149.
- Izzo, Annalisa, Kinga Kamieniarz, and Robert Schneider. 2008. "The Histone H1 Family: Specific Members, Specific Functions?." *Biological Chemistry* 389 (4): 333–43. doi:10.1515/BC.2008.037.
- Jabs, E W, C M Tuck-Muller, G J Anhalt, W Earnshaw, R A Wise, and F Wigley. 1993. "Cytogenetic Survey in Systemic Sclerosis: Correlation of Aneuploidy with the Presence of Anticentromere Antibodies.." *Cytogenetics and Cell Genetics* 63 (3): 169–75.
- Jansen, Lars E T, Ben E Black, Daniel R Foltz, and Don W Cleveland. 2007. "Propagation of Centromeric Chromatin Requires Exit From Mitosis.." *The Journal of Cell Biology* 176 (6). Rockefeller Univ Press: 795–805. doi:10.1083/jcb.200701066.

- Jerevall, P-L, X-J Ma, H Li, R Salunga, N C Kesty, M G Erlander, D C Sgroi, et al. 2011. "Prognostic Utility of HOXB13:IL17BR and Molecular Grade Index in Early-Stage Breast Cancer Patients From the Stockholm Trial." *British Journal of Cancer* 104 (11). Nature Publishing Group: 1762–69. doi:10.1038/bjc.2011.145.
- Jin, Chunyuan, Chongzhi Zang, Gang Wei, Kairong Cui, Weiqun Peng, Keji Zhao, and Gary Felsenfeld. 2009. "H3.3/H2A.Z Double Variant-Containing Nucleosomes Mark 'Nucleosome-Free Regions' of Active Promoters and Other Regulatory Regions.." *Nature Genetics* 41 (8): 941–45. doi:10.1038/ng.409.
- Joglekar, Ajit P, David Bouck, Ken Finley, Xingkun Liu, Yakun Wan, Judith Berman, Xiangwei He, E D Salmon, and Kerry S Bloom. 2008. "Molecular Architecture of the Kinetochores-Microtubule Attachment Site Is Conserved Between Point and Regional Centromeres.." *The Journal of Cell Biology* 181 (4): 587–94. doi:10.1083/jcb.200803027.
- Joglekar, Ajit P, E D Salmon, and Kerry S Bloom. 2008. "Counting Kinetochores Protein Numbers in Budding Yeast Using Genetically Encoded Fluorescent Proteins.." *Methods in Cell Biology* 85: 127–51. doi:10.1016/S0091-679X(08)85007-8.
- Johnston, Katherine, Ajit Joglekar, Tetsuya Hori, Aussie Suzuki, Tatsuo Fukagawa, and E D Salmon. 2010. "Vertebrate Kinetochores Protein Architecture: Protein Copy Number.." *The Journal of Cell Biology* 189 (6). Rockefeller Univ Press: 937–43. doi:10.1083/jcb.200912022.
- Jokelainen, P T. 1967. "The Ultrastructure and Spatial Organization of the Metaphase Kinetochores in Mitotic Rat Cells.." *Journal of Ultrastructure Research* 19 (1): 19–44.
- Kadauke, Stephan, and Gerd A Blobel. 2013. "Mitotic Bookmarking by Transcription Factors.." *Epigenetics & Chromatin* 6 (1). BioMed Central Ltd: 6. doi:10.1186/1756-8935-6-6.
- Kagawa, Naoko, Tetsuya Hori, Yuko Hoki, Osamu Hosoya, Kimiko Tsutsui, Yumiko Saga, Takashi Sado, and Tatsuo Fukagawa. 2014. "The CENP-O Complex Requirement Varies Among Different Cell Types.." *Chromosome Research : an International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 22 (3). Springer Netherlands: 293–303. doi:10.1007/s10577-014-9404-1.
- Kapoor, M, R Montes de Oca Luna, G Liu, G Lozano, C Cummings, M Mancini, I Ouspenski, B R Brinkley, and G S May. 1998. "The cenpB Gene Is Not Essential in Mice.." *Chromosoma* 107 (8): 570–76.
- Kapoor, Tarun M, Michael A Lampson, Polla Hergert, Lisa Cameron, Daniela Cimini, E D Salmon, Bruce F McEwen, and Alexey Khodjakov. 2006. "Chromosomes Can Congress to the Metaphase Plate Before Biorientation.." *Science (New York, N.Y.)* 311 (5759). American Association for the Advancement of Science: 388–91. doi:10.1126/science.1122142.
- Katan-Khaykovich, Yael, and Kevin Struhl. 2002. "Dynamics of Global Histone Acetylation and Deacetylation in Vivo: Rapid Restoration of Normal Histone Acetylation Status Upon Removal of Activators and Repressors.." *Genes & Development* 16 (6). Cold Spring Harbor Lab: 743–52. doi:10.1101/gad.967302.
- Kato, Hidenori, Jiansheng Jiang, Bing-Rui Zhou, Marieke Rozendaal, Hanqiao Feng, Rodolfo Ghirlando, T Sam Xiao, Aaron F Straight, and Yawen Bai. 2013. "A Conserved Mechanism

Bibliographie

for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C..” *Science* (New York, N.Y.) 340 (6136). American Association for the Advancement of Science: 1110–13. doi:10.1126/science.1235532.

Kehle, J, D Beuchle, S Treuheit, B Christen, J A Kennison, M Bienz, and J Müller. 1998. “dMi-2, a Hunchback-Interacting Protein That Functions in Polycomb Repression..” *Science* (New York, N.Y.) 282 (5395): 1897–1900.

Kelly, Alexander E, and Hironori Funabiki. 2009. “Correcting Aberrant Kinetochores Microtubule Attachments: an Aurora B-Centric View..” *Current Opinion in Cell Biology* 21 (1): 51–58. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.004.

Khattak, Shahryar, Bo Ra Lee, Sung Hoon Cho, Joohong Ahn, and Nikolaus A Spoerl. 2002. “Genetic Characterization of *Drosophila* Mi-2 ATPase..” *Gene* 293 (1-2): 107–14.

Khodjakov, A, and C L Rieder. 1996. “Kinetochores Moving Away From Their Associated Pole Do Not Exert a Significant Pushing Force on the Chromosome..” *The Journal of Cell Biology* 135 (2). The Rockefeller University Press: 315–27.

Khodjakov, A, and C L Rieder. 1999a. “The Sudden Recruitment of Gamma-Tubulin to the Centrosome at the Onset of Mitosis and Its Dynamic Exchange Throughout the Cell Cycle, Do Not Require Microtubules..” *The Journal of Cell Biology* 146 (3). The Rockefeller University Press: 585–96.

Khodjakov, A, and C L Rieder. 1999b. “The Sudden Recruitment of γ -Tubulin to the Centrosome at the Onset of Mitosis and Its Dynamic Exchange Throughout the Cell Cycle, Do Not Require Microtubules.” *The Journal of Cell Biology* 146 (3): 585–96. doi:10.1083/jcb.146.3.585.

Kingston, I J, J S Y Yung, and M R Singleton. 2011. “Biophysical Characterization of the Centromere-Specific Nucleosome From Budding Yeast.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (5). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 4021–26. doi:10.1074/jbc.M110.189340.

Kireeva, Natashe, Margot Lakonishok, Igor Kireev, Tatsuya Hirano, and Andrew S Belmont. 2004. “Visualization of Early Chromosome Condensation: a Hierarchical Folding, Axial Glue Model of Chromosome Structure..” *The Journal of Cell Biology* 166 (6). Rockefeller Univ Press: 775–85. doi:10.1083/jcb.200406049.

Krien, M J, S J Bugg, M Palatsides, G Asouline, M Morimyo, and M J O’Connell. 1998. “A NIMA Homologue Promotes Chromatin Condensation in Fission Yeast..” *Journal of Cell Science* 111 (Pt 7) (April): 967–76.

Kuznetsova, I, O Podgornaya, and M A Ferguson-Smith. 2006. “High-Resolution Organization of Mouse Centromeric and Pericentromeric DNA..” *Cytogenetic and Genome Research* 112 (3-4): 248–55. doi:10.1159/000089878.

Lagana, Anaïck, Jonas F Dorn, Valérie De Rop, Anne-Marie Ladouceur, Amy S Maddox, and Paul S Maddox. 2010. “A Small GTPase Molecular Switch Regulates Epigenetic Centromere Maintenance by Stabilizing Newly Incorporated CENP-a..” *Nature Cell Biology* 12 (12): 1186–93. doi:10.1038/ncb2129.

- Lewis, Peter W, Simon J Elsaesser, Kyung-Min Noh, Sonja C Stadler, and C David Allis. 2010. "Daxx Is an H3.3-Specific Histone Chaperone and Cooperates with ATRX in Replication-Independent Chromatin Assembly at Telomeres.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32). National Acad Sciences: 14075–80. doi:10.1073/pnas.1008850107.
- Li, Andra, Allison H Maffey, Wade D Abbott, Natalia Conde e Silva, Ariel Prunell, Joseph Siino, Dmitrii Churikov, Andrei O Zalensky, and Juan Ausio. 2005. "Characterization of Nucleosomes Consisting of the Human Testis/Sperm-Specific Histone H2B Variant (hTSH2B).." *Biochemistry* 44 (7). American Chemical Society: 2529–35. doi:10.1021/bi048061n.
- Li, Baochun, Frédéric Choulet, Yanfang Heng, Weiwei Hao, Etienne Paux, Zhao Liu, Wei Yue, Weiwei Jin, Catherine Feuillet, and Xueyong Zhang. 2013. "Wheat Centromeric Retrotransposons: the New Ones Take a Major Role in Centromeric Structure.." *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 73 (6): 952–65. doi:10.1111/tpj.12086.
- Li, Yongmei, Zhi Zhu, Shuhui Zhang, Danghui Yu, Hongyu Yu, Lina Liu, Xiaozhe Cao, Li Wang, Hengjun Gao, and Minghua Zhu. 2011. "ShRNA-Targeted Centromere Protein a Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth.." Edited by Frank Lyko. *PloS One* 6 (3). Public Library of Science: e17794. doi:10.1371/journal.pone.0017794.
- Liang, Zhangyi, Denise Zickler, Mara Prentiss, Frederick S Chang, Guillaume Witz, Kazuhiro Maeshima, and Nancy Kleckner. 2015. "Chromosomes Progress to Metaphase in Multiple Discrete Steps via Global Compaction/Expansion Cycles.." *Cell* 161 (5). Elsevier: 1124–37. doi:10.1016/j.cell.2015.04.030.
- Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragozy, Agnes Telling, Ido Amit, et al. 2009. "Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome.." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5950). American Association for the Advancement of Science: 289–93. doi:10.1126/science.1181369.
- Lohe, A R, A J Hilliker, and P A Roberts. 1993. "Mapping Simple Repeated DNA Sequences in Heterochromatin of *Drosophila Melanogaster*.." *Genetics* 134 (4). Genetics Society of America: 1149–74.
- Loppin, Benjamin, Emilie Bonnefoy, Caroline Anselme, Anne Laurençon, Timothy L Karr, and Pierre Couble. 2005. "The Histone H3.3 Chaperone HIRA Is Essential for Chromatin Assembly in the Male Pronucleus.." *Nature* 437 (7063): 1386–90. doi:10.1038/nature04059.
- Lowell, Joanna E, and George A M Cross. 2004. "A Variant Histone H3 Is Enriched at Telomeres in *Trypanosoma Brucei*.." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 24). The Company of Biologists Ltd: 5937–47. doi:10.1242/jcs.01515.
- Ludtke, Steven J, Philip R Baldwin, and Wah Chiu. 1999. "EMAN: Semiautomated Software for High-Resolution Single-Particle Reconstructions.." *Journal of Structural Biology* 128 (1): 82–97. doi:10.1006/jsbi.1999.4174.
- Luger, K, A W Mader, R K Richmond, D F Sargent, and T J Richmond. 1997. "Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution.." *Nature* 389 (6648): 251–60. doi:10.1038/38444.

Bibliographie

- Macûrek, Libor, Arne Lindqvist, Dan Lim, Michael A Lampson, Rob Klompmaker, Raimundo Freire, Christophe Clouin, Stephen S Taylor, Michael B Yaffe, and René H Medema. 2008. "Polo-Like Kinase-1 Is Activated by Aurora a to Promote Checkpoint Recovery.." *Nature* 455 (7209): 119–23. doi:10.1038/nature07185.
- Mahoney, Nicole M, Gohta Goshima, Adam D Douglass, and Ronald D Vale. 2006. "Making Microtubules and Mitotic Spindles in Cells Without Functional Centrosomes.." *Current Biology* : CB 16 (6). Elsevier: 564–69. doi:10.1016/j.cub.2006.01.053.
- Maiato, Helder, Conly L Rieder, and Alexey Khodjakov. 2004. "Kinetochore-Driven Formation of Kinetochore Fibers Contributes to Spindle Assembly During Animal Mitosis.." *The Journal of Cell Biology* 167 (5). Rockefeller Univ Press: 831–40. doi:10.1083/jcb.200407090.
- MAKAROV, Vladimir L, Stephan I DIMITROV, and Peter T PETROV. 1983. "Salt-Induced Conformational Transitions in Chromatin. a Flow Linear Dichroism Study." *European Journal of Biochemistry* 133 (3). Blackwell Publishing Ltd: 491–97. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07491.x.
- Malik, Harmit S, and Steven Henikoff. 2009. "Major Evolutionary Transitions in Centromere Complexity." *Cell* 138 (6). Elsevier: 1067–82. doi:10.1016/j.cell.2009.08.036.
- Mamnun, Yasmine M, Satoshi Katayama, and Takashi Toda. 2006. "Fission Yeast Mcl1 Interacts with SCF(Pof3) and Is Required for Centromere Formation.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (1): 125–30. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.024.
- Margolis, R L, and L Wilson. 1998. "Microtubule Treadmilling: What Goes Around Comes Around.." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20 (10). John Wiley & Sons, Inc.: 830–36. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199810)20:10<830::AID-BIES8>3.0.CO;2-N.
- Marques, André, Tiago Ribeiro, Pavel Neumann, Jirí Macas, Petr Novák, Veit Schubert, Marco Pellino, et al. 2015. "Holocentromeres in Rhynchospora Are Associated with Genome-Wide Centromere-Specific Repeat Arrays Interspersed Among Euchromatin.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (44). National Acad Sciences: 13633–38. doi:10.1073/pnas.1512255112.
- Marsden, M P F, and U K Laemmli. 1979. "Metaphase Chromosome Structure: Evidence for a Radial Loop Model." *Cell* 17 (4). Elsevier: 849–58. doi:10.1016/0092-8674(79)90325-8.
- Marshall, Owen J, Anderly C Chueh, Lee H Wong, and K H Andy Choo. 2008. "Neocentromeres: New Insights Into Centromere Structure, Disease Development, and Karyotype Evolution.." *American Journal of Human Genetics* 82 (2). Elsevier: 261–82. doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.009.
- Martin, Amy M, Derek J Pouchnik, Jennifer L Walker, and John J Wyrick. 2004. "Redundant Roles for Histone H3 N-Terminal Lysine Residues in Subtelomeric Gene Repression in *Saccharomyces Cerevisiae*.." *Genetics* 167 (3). Genetics Society of America: 1123–32. doi:10.1534/genetics.104.026674.
- Martins, Nuno M C, Jan H Bergmann, Nobuaki Shono, Hiroshi Kimura, Vladimir Larionov, Hiroshi Masumoto, and William C Earnshaw. 2015. "Epigenetic Engineering Shows That a Human Centromere Resists Silencing Mediated by H3K27me3/K9me3.." *Molecular Biology*

- of the Cell, November. American Society for Cell Biology, mbc.E15–08–0605. doi:10.1091/mbc.E15-08-0605.
- Marzluff, William F, Preetam Gongidi, Keith R Woods, Jianping Jin, and Lois J Maltais. 2002. “The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes..” *Genomics* 80 (5): 487–98.
- Masumoto, H, H Masukata, Y Muro, N Nozaki, and T Okazaki. 1989. “A Human Centromere Antigen (CENP-B) Interacts with a Short Specific Sequence in Alphoid DNA, a Human Centromeric Satellite..” *The Journal of Cell Biology* 109 (5). The Rockefeller University Press: 1963–73.
- McAinsh, Andrew D, Jessica D Tytell, and Peter K Sorger. 2003. “Structure, Function, and Regulation of Budding Yeast Kinetochores..” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 519–39. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155607.
- McGovern, Susan L, Yuan Qi, Lajos Pusztai, William F Symmans, and Thomas A Buchholz. 2012. “Centromere Protein-a, an Essential Centromere Protein, Is a Prognostic Marker for Relapse in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer..” *Breast Cancer Research : BCR* 14 (3). BioMed Central Ltd: R72. doi:10.1186/bcr3181.
- McIntosh, J Richard, Ekaterina L Grishchuk, and Robert R West. 2002. “Chromosome-Microtubule Interactions During Mitosis..” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 193–219. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.032002.132412.
- McKinley, Kara L, and Iain M Cheeseman. 2014. “Polo-Like Kinase 1 Licenses CENP-a Deposition at Centromeres..” *Cell* 158 (2). Elsevier: 397–411. doi:10.1016/j.cell.2014.06.016.
- McKinley, Kara L, Nikolina Sekulic, Lucie Y Guo, Tonia Tsinman, Ben E Black, and Iain M Cheeseman. 2015. “The CENP-L-N Complex Forms a Critical Node in an Integrated Meshwork of Interactions at the Centromere-Kinetochore Interface.” *Molecular Cell* 60 (6). Elsevier: 886–98. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.027.
- Meistrich, M L, L R Bucci, P K Trostle-Weige, and W A Brock. 1985. “Histone Variants in Rat Spermatogonia and Primary Spermatocytes..” *Developmental Biology* 112 (1): 230–40.
- Meneghini, Marc D, Michelle Wu, and Hiten D Madhani. 2003. “Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin From the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin..” *Cell* 112 (5): 725–36.
- Menoni, H, M S Shukla, V Gerson, S Dimitrov, and D Angelov. 2012. “Base Excision Repair of 8-oxoG in Dinucleosomes.” *Nucleic Acids Research* 40 (2). Oxford University Press: 692–700. doi:10.1093/nar/gkr761.
- Menoni, Hervé, Didier Gasparutto, Ali Hamiche, Jean Cadet, Stefan Dimitrov, Philippe Bouvet, and Dimitar Angelov. 2007. “ATP-Dependent Chromatin Remodeling Is Required for Base Excision Repair in Conventional but Not in Variant H2A.Bbd Nucleosomes..” *Molecular and Cellular Biology* 27 (17). American Society for Microbiology: 5949–56. doi:10.1128/MCB.00376-07.

Bibliographie

- Miell, Matthew D D, Colin J Fuller, Annika Guse, Helena M Barysz, Andrew Downes, Tom Owen-Hughes, Juri Rappsilber, Aaron F Straight, and Robin C Allshire. 2013. "CENP-a Confers a Reduction in Height on Octameric Nucleosomes.." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (6): 763–65. doi:10.1038/nsmb.2574.
- Mindell, Joseph A, and Nikolaus Grigorieff. 2003. "Accurate Determination of Local Defocus and Specimen Tilt in Electron Microscopy." *Journal of Structural Biology* 142 (3): 334–47. doi:10.1016/S1047-8477(03)00069-8.
- Minoshima, Yukinori, Toshiyuki Kawashima, Koichi Hirose, Yukio Tonozuka, Aie Kawajiri, Ying Chun Bao, Xingming Deng, et al. 2003. "Phosphorylation by Aurora B Converts MgcRacGAP to a RhoGAP During Cytokinesis.." *Developmental Cell* 4 (4): 549–60.
- Mito, Yoshiko, Jorja G Henikoff, and Steven Henikoff. 2005. "Genome-Scale Profiling of Histone H3.3 Replacement Patterns.." *Nature Genetics* 37 (10): 1090–97. doi:10.1038/ng1637.
- Mizuguchi, Gaku, Hua Xiao, Jan Wisniewski, M Mitchell Smith, and Carl Wu. 2007. "Nonhistone Scm3 and Histones CenH3-H4 Assemble the Core of Centromere-Specific Nucleosomes.." *Cell* 129 (6). Elsevier: 1153–64. doi:10.1016/j.cell.2007.04.026.
- Mizuguchi, Gaku, Xuetong Shen, Joe Landry, Wei-Hua Wu, Subhojit Sen, and Carl Wu. 2004. "ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex.." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5656). American Association for the Advancement of Science: 343–48. doi:10.1126/science.1090701.
- Montellier, Emilie, Fayçal Boussouar, Sophie Rousseaux, Kai Zhang, Thierry Buchou, François Fenaille, Hitoshi Shiota, et al. 2013. "Chromatin-to-Nucleoprotamine Transition Is Controlled by the Histone H2B Variant TH2B.." *Genes & Development* 27 (15). Cold Spring Harbor Lab: 1680–92. doi:10.1101/gad.220095.113.
- Montes de Oca, Rocío, Zachary A Gurard-Levin, Frédérique Berger, Haniya Rehman, Elise Martel, Armelle Corpet, Leanne de Koning, et al. 2015. "The Histone Chaperone HJURP Is a New Independent Prognostic Marker for Luminal a Breast Carcinoma.." *Molecular Oncology* 9 (3). Elsevier: 657–74. doi:10.1016/j.molonc.2014.11.002.
- Moree, Ben, Corey B Meyer, Colin J Fuller, and Aaron F Straight. 2011. "CENP-C Recruits M18BP1 to Centromeres to Promote CENP-a Chromatin Assembly.." *The Journal of Cell Biology* 194 (6). Rockefeller Univ Press: 855–71. doi:10.1083/jcb.201106079.
- Morrison, Ashby J, Jessica Highland, Nevan J Krogan, Ayelet Arbel-Eden, Jack F Greenblatt, James E Haber, and Xuetong Shen. 2004. "INO80 and Gamma-H2AX Interaction Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling to DNA Damage Repair.." *Cell* 119 (6). Elsevier: 767–75. doi:10.1016/j.cell.2004.11.037.
- Murawska, Magdalena, and Alexander Brehm. 2011. "CHD Chromatin Remodelers and the Transcription Cycle.." *Transcription* 2 (6). Taylor & Francis: 244–53. doi:10.4161/trns.2.6.17840.
- Musacchio, Andrea, and Edward D Salmon. 2007. "The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (5): 379–93. doi:10.1038/nrm2163.

- Nagpal, Harsh, Tetsuya Hori, Ayako Furukawa, Kenji Sugase, Akihisa Osakabe, Hitoshi Kurumizaka, and Tatsuo Fukagawa. 2015. "Dynamic Changes in CCAN Organization Through CENP-C During Cell-Cycle Progression.." *Molecular Biology of the Cell* 26 (21). American Society for Cell Biology: 3768–76. doi:10.1091/mbc.E15-07-0531.
- Nekrasov, Maxim, Jana Amrichova, Brian J Parker, Tatiana A Soboleva, Cameron Jack, Rohan Williams, Gavin A Huttley, and David J Tremethick. 2012. "Histone H2A.Z Inheritance During the Cell Cycle and Its Impact on Promoter Organization and Dynamics.." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (11): 1076–83. doi:10.1038/nsmb.2424.
- Neumann, Pavel, Alice Navrátilová, Elizabeth Schroeder-Reiter, Andrea Koblízková, Veronika Steinbauerová, Eva Chocholová, Petr Novák, Gerhard Wanner, and Jirí Macas. 2012. "Stretching the Rules: Monocentric Chromosomes with Multiple Centromere Domains.." Edited by Beth A Sullivan. *PLoS Genetics* 8 (6). Public Library of Science: e1002777. doi:10.1371/journal.pgen.1002777.
- Nilsson, Jakob, Mona Yekezare, Jeremy Minshull, and Jonathon Pines. 2008. "The APC/C Maintains the Spindle Assembly Checkpoint by Targeting Cdc20 for Destruction.." *Nature Cell Biology* 10 (12): 1411–20. doi:10.1038/ncb1799.
- Nishino, Tatsuya, Kozo Takeuchi, Karen E Gascoigne, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Takuji Oyama, Kosuke Morikawa, Iain M Cheeseman, and Tatsuo Fukagawa. 2012. "CENP-T-W-S-X Forms a Unique Centromeric Chromatin Structure with a Histone-Like Fold.." *Cell* 148 (3). Elsevier: 487–501. doi:10.1016/j.cell.2011.11.061.
- Nogales, E. 2001. "Structural Insight Into Microtubule Function.." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 397–420. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.397.
- Nora, Elphège P, Bryan R Lajoie, Edda G Schulz, Luca Giorgetti, Ikuhiro Okamoto, Nicolas Servant, Tristan Piolot, et al. 2012. "Spatial Partitioning of the Regulatory Landscape of the X-Inactivation Centre.." *Nature* 485 (7398): 381–85. doi:10.1038/nature11049.
- Obri, Arnaud, Khalid Ouararhni, Christophe Papin, Marie-Laure Diebold, Kiran Padmanabhan, Martin Marek, Isabelle Stoll, et al. 2014. "ANP32E Is a Histone Chaperone That Removes H2A.Z From Chromatin.." *Nature* 505 (7485): 648–53. doi:10.1038/nature12922.
- Obuse, Chikashi, Hua Yang, Naohito Nozaki, Shouhei Goto, Tuneko Okazaki, and Kinya Yoda. 2004. "Proteomics Analysis of the Centromere Complex From HeLa Interphase Cells: UV-Damaged DNA Binding Protein 1 (DDB-1) Is a Component of the CEN-Complex, While BMI-1 Is Transiently Co-Localized with the Centromeric Region in Interphase.." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 9 (2): 105–20.
- Ohzeki, Jun-ichirou, Jan H Bergmann, Natalay Kouprina, Vladimir N Noskov, Megumi Nakano, Hiroshi Kimura, William C Earnshaw, Vladimir Larionov, and Hiroshi Masumoto. 2012. "Breaking the HAC Barrier: Histone H3K9 Acetyl/Methyl Balance Regulates CENP-a Assembly.." *The EMBO Journal* 31 (10). EMBO Press: 2391–2402. doi:10.1038/emboj.2012.82.
- Okada, Masahiro, Iain M Cheeseman, Tetsuya Hori, Katsuya Okawa, Ian X McLeod, John R Yates, Arshad Desai, and Tatsuo Fukagawa. 2006. "The CENP-H-I Complex Is Required for

Bibliographie

the Efficient Incorporation of Newly Synthesized CENP-a Into Centromeres..” *Nature Cell Biology* 8 (5): 446–57. doi:10.1038/ncb1396.

Okada, Masahiro, Katsuya Okawa, Toshiaki Isobe, and Tatsuo Fukagawa. 2009. “CENP-H-Containing Complex Facilitates Centromere Deposition of CENP-a in Cooperation with FACT and CHD1..” *Molecular Biology of the Cell* 20 (18). American Society for Cell Biology: 3986–95. doi:10.1091/mbc.E09-01-0065.

Ono, Takao, Yuda Fang, David L Spector, and Tatsuya Hirano. 2004. “Spatial and Temporal Regulation of Condensins I and II in Mitotic Chromosome Assembly in Human Cells..” *Molecular Biology of the Cell* 15 (7). American Society for Cell Biology: 3296–3308. doi:10.1091/mbc.E04-03-0242.

Padeganeh, Abbas, Joël Ryan, Jacques Boisvert, Anne-Marie Ladouceur, Jonas F Dorn, and Paul S Maddox. 2013. “Octameric CENP-a Nucleosomes Are Present at Human Centromeres Throughout the Cell Cycle..” *Current Biology : CB* 23 (9). Elsevier: 764–69. doi:10.1016/j.cub.2013.03.037.

Palmer, D K, K O’Day, M H Wener, B S Andrews, and R L Margolis. 1987. “A 17-kD Centromere Protein (CENP-a) Copurifies with Nucleosome Core Particles and with Histones..” *The Journal of Cell Biology* 104 (4). The Rockefeller University Press: 805–15.

Pan, Jing, and Rey-Huei Chen. 2004. “Spindle Checkpoint Regulates Cdc20p Stability in *Saccharomyces Cerevisiae*..” *Genes & Development* 18 (12). Cold Spring Harbor Lab: 1439–51. doi:10.1101/gad.1184204.

Parsons, G G, and C A Spencer. 1997. “Mitotic Repression of RNA Polymerase II Transcription Is Accompanied by Release of Transcription Elongation Complexes..” *Molecular and Cellular Biology* 17 (10). American Society for Microbiology (ASM): 5791–5802.

Pasque, Vincent, Astrid Gillich, Nigel Garrett, and John B Gurdon. 2011. “Histone Variant macroH2A Confers Resistance to Nuclear Reprogramming..” *The EMBO Journal* 30 (12). EMBO Press: 2373–87. doi:10.1038/emboj.2011.144.

Paull, T T, E P Rogakou, V Yamazaki, C U Kirchgessner, M Gellert, and W M Bonner. 2000. “A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci After DNA Damage..” *Current Biology : CB* 10 (15): 886–95.

Perpelescu, Marinela, and Tatsuo Fukagawa. 2011. “The ABCs of CENPs..” *Chromosoma* 120 (5). Springer-Verlag: 425–46. doi:10.1007/s00412-011-0330-0.

Perpelescu, Marinela, Naohito Nozaki, Chikashi Obuse, Hua Yang, and Kinya Yoda. 2009. “Active Establishment of Centromeric CENP-a Chromatin by RSF Complex..” *The Journal of Cell Biology* 185 (3). Rockefeller Univ Press: 397–407. doi:10.1083/jcb.200903088.

Petronczki, Mark, Péter Lénárt, and Jan-Michael Peters. 2008. “Polo on the Rise-From Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1..” *Developmental Cell* 14 (5). Elsevier: 646–59. doi:10.1016/j.devcel.2008.04.014.

Pettersen, Eric F, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, and Thomas E Ferrin. 2004. “UCSF Chimera? a Visualization System for

- Exploratory Research and Analysis.” *Journal of Computational Chemistry* 25 (13). John Wiley & Sons, Inc.: 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084.
- Pfarr, C M, M Coue, P M Grissom, T S Hays, M E Porter, and J R McIntosh. 1990. “Cytoplasmic Dynein Is Localized to Kinetochores During Mitosis..” *Nature* 345 (6272). Nature Publishing Group: 263–65. doi:10.1038/345263a0.
- Piehl, Michelle, U Serdar Tulu, Pat Wadsworth, and Lynne Cassimeris. 2004. “Centrosome Maturation: Measurement of Microtubule Nucleation Throughout the Cell Cycle by Using GFP-Tagged EB1..” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (6). National Acad Sciences: 1584–88. doi:10.1073/pnas.0308205100.
- Piras, Francesca M, Solomon G Nergadze, Elisa Magnani, Livia Bertoni, Carmen Attolini, Lela Khorjiauli, Elena Raimondi, and Elena Giulotto. 2010. “Uncoupling of Satellite DNA and Centromeric Function in the Genus *Equus*..” Edited by K H Andy Choo. *PLoS Genetics* 6 (2). Public Library of Science: e1000845. doi:10.1371/journal.pgen.1000845.
- Pluta, A F, A M Mackay, A M Ainsztein, I G Goldberg, and W C Earnshaw. 1995. “The Centromere: Hub of Chromosomal Activities..” *Science (New York, N.Y.)* 270 (5242): 1591–94.
- Pogo, B G, V G Allfrey, and A E Mirsky. 1966. “RNA Synthesis and Histone Acetylation During the Course of Gene Activation in Lymphocytes..” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55 (4). National Academy of Sciences: 805–12.
- Quénet, Delphine, and Yamini Dalal. 2014. “A Long Non-Coding RNA Is Required for Targeting Centromeric Protein a to the Human Centromere..” Edited by Ali Shilatifard. *eLife* 3. eLife Sciences Publications Limited: e03254. doi:10.7554/eLife.03254.
- Rago, Florencia, Karen E Gascoigne, and Iain M Cheeseman. 2015. “Distinct Organization and Regulation of the Outer Kinetochores KMN Network Downstream of CENP-C and CENP-T..” *Current Biology : CB* 25 (5). Elsevier: 671–77. doi:10.1016/j.cub.2015.01.059.
- Raychaudhuri, Nitika, Raphaele Dubruille, Guillermo A Orsi, Homayoun C Bagheri, Benjamin Loppin, and Christian F Lehner. 2012. “Transgenerational Propagation and Quantitative Maintenance of Paternal Centromeres Depends on Cid/Cenp-a Presence in *Drosophila* Sperm.” Edited by David M Glover. *PLoS Biology* 10 (12). Public Library of Science: e1001434. doi:10.1371/journal.pbio.1001434.
- Régnier, Vinciane, Paola Vagnarelli, Tatsuo Fukagawa, Tatiana Zerjal, Elizabeth Burns, Didier Trouche, William Earnshaw, and William Brown. 2005. “CENP-a Is Required for Accurate Chromosome Segregation and Sustained Kinetochores Association of BubR1..” *Molecular and Cellular Biology* 25 (10). American Society for Microbiology: 3967–81. doi:10.1128/MCB.25.10.3967-3981.2005.
- Ribeiro, Susana Abreu, Paola Vagnarelli, Yimin Dong, Tetsuya Hori, Bruce F McEwen, Tatsuo Fukagawa, Cristina Flors, and William C Earnshaw. 2010. “A Super-Resolution Map of the Vertebrate Kinetochores..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23). National Acad Sciences: 10484–89. doi:10.1073/pnas.1002325107.

Bibliographie

- Rieder, C L, A Schultz, R Cole, and G Sluder. 1994. "Anaphase Onset in Vertebrate Somatic Cells Is Controlled by a Checkpoint That Monitors Sister Kinetochore Attachment to the Spindle.." *The Journal of Cell Biology* 127 (5). The Rockefeller University Press: 1301–10.
- Robinson, Philip J J, Louise Fairall, Van A T Huynh, and Daniela Rhodes. 2006. "EM Measurements Define the Dimensions of the '30-Nm' Chromatin Fiber: Evidence for a Compact, Interdigitated Structure.." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (17). National Acad Sciences: 6506–11. doi:10.1073/pnas.0601212103.
- Rocchi, M, N Archidiacono, W Schempp, O Capozzi, and R Stanyon. 2012. "Centromere Repositioning in Mammals.." *Heredity* 108 (1). Nature Publishing Group: 59–67. doi:10.1038/hdy.2011.101.
- Rogakou, E P, D R Pilch, A H Orr, V S Ivanova, and W M Bonner. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139.." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68.
- Roque, Alicia, Ibon Iloro, Imma Ponte, José Luis R Arrondo, and Pedro Suau. 2005. "DNA-Induced Secondary Structure of the Carboxyl-Terminal Domain of Histone H1.." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (37). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 32141–47. doi:10.1074/jbc.M505636200.
- Rosenblatt, Jody. 2005. "Spindle Assembly: Asters Part Their Separate Ways.." *Nature Cell Biology* 7 (3): 219–22. doi:10.1038/ncb0305-219.
- Roshak, A K, E A Capper, C Imburgia, J Fornwald, G Scott, and L A Marshall. 2000. "The Human Polo-Like Kinase, PLK, Regulates Cdc2/Cyclin B Through Phosphorylation and Activation of the cdc25C Phosphatase.." *Cellular Signalling* 12 (6): 405–11.
- Rošić, Silvana, Florian Köhler, and Sylvia Erhardt. 2014. "Repetitive Centromeric Satellite RNA Is Essential for Kinetochore Formation and Cell Division.." *The Journal of Cell Biology* 207 (3). Rockefeller Univ Press: 335–49. doi:10.1083/jcb.201404097.
- Saffery, Richard, Huseyin Sumer, Sara Hassan, Lee H Wong, Jeffrey M Craig, Kazuo Todokoro, Melissa Anderson, Angela Stafford, and K H Andy Choo. 2003. "Transcription Within a Functional Human Centromere.." *Molecular Cell* 12 (2): 509–16.
- Salaun, Patrick, Yoann Rannou, and Claude Prigent. 2008. "Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the Mitotic Bodyguards.." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 617. Inserm: 41–56.
- Samoshkin, Alexander, Alexei Arnautov, Lars E T Jansen, Ilia Ouspenski, Louis Dye, Tatiana Karpova, James McNally, Mary Dasso, Don W Cleveland, and Alexander Strunnikov. 2009. "Human Condensin Function Is Essential for Centromeric Chromatin Assembly and Proper Sister Kinetochore Orientation.." Edited by Michael Lichten. *PloS One* 4 (8). Public Library of Science: e6831. doi:10.1371/journal.pone.0006831.
- Schalch, Thomas, Sylwia Duda, David F Sargent, and Timothy J Richmond. 2005. "X-Ray Structure of a Tetranucleosome and Its Implications for the Chromatin Fibre.." *Nature* 436 (7047): 138–41. doi:10.1038/nature03686.

- Schenk, Raphael, Andreas Jenke, Matthias Zilbauer, Stefan Wirth, and Jan Postberg. 2011. "H3.5 Is a Novel Hominid-Specific Histone H3 Variant That Is Specifically Expressed in the Seminiferous Tubules of Human Testes.." *Chromosoma* 120 (3). Springer-Verlag: 275–85. doi:10.1007/s00412-011-0310-4.
- Schwartz, Brian E, and Kami Ahmad. 2005. "Transcriptional Activation Triggers Deposition and Removal of the Histone Variant H3.3.." *Genes & Development* 19 (7). Cold Spring Harbor Lab: 804–14. doi:10.1101/gad.1259805.
- Screpanti, Emanuela, Stefano Santaguida, Tam Nguyen, Romano Silvestri, Rick Gussio, Andrea Musacchio, Ernest Hamel, and Peter De Wulf. 2010. "A Screen for Kinetochore-Microtubule Interaction Inhibitors Identifies Novel Antitubulin Compounds." Edited by Daniela Cimini. *PloS One* 5 (7). Public Library of Science: e11603. doi:10.1371/journal.pone.0011603.
- Seki, Akiko, Judith A Coppinger, Chang-Young Jang, John R Yates, and Guowei Fang. 2008. "Bora and the Kinase Aurora a Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry.." *Science (New York, N.Y.)* 320 (5883): 1655–58. doi:10.1126/science.1157425.
- Sekulic, Nikolina, Emily A Bassett, Danielle J Rogers, and Ben E Black. 2010. "The Structure of (CENP-a-H4)(2) Reveals Physical Features That Mark Centromeres.." *Nature* 467 (7313): 347–51. doi:10.1038/nature09323.
- Shah, Jagesh V, Elliot Botvinick, Zahid Bonday, Frank Furnari, Michael Berns, and Don W Cleveland. 2004. "Dynamics of Centromere and Kinetochore Proteins; Implications for Checkpoint Signaling and Silencing.." *Current Biology : CB* 14 (11). Elsevier: 942–52. doi:10.1016/j.cub.2004.05.046.
- Shang, Wei-Hao, Tetsuya Hori, Nuno M C Martins, Atsushi Toyoda, Sadahiko Misu, Norikazu Monma, Ichiro Hiratani, et al. 2013. "Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres.." *Developmental Cell* 24 (6). Elsevier: 635–48. doi:10.1016/j.devcel.2013.02.009.
- Shivaraju, Manjunatha, Jay R Unruh, Brian D Slaughter, Mark Mattingly, Judith Berman, and Jennifer L Gerton. 2012. "Cell-Cycle-Coupled Structural Oscillation of Centromeric Nucleosomes in Yeast." *Cell* 150 (2). Elsevier: 304–16. doi:10.1016/j.cell.2012.05.034.
- Shuaib, Muhammad, Khalid Ouararhni, Stefan Dimitrov, and Ali Hamiche. 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 of the United States of America* 107 (4). National Acad Sciences: 1349–54. doi:10.1073/pnas.0913709107.
- Steuer, E R, L Wordeman, T A Schroer, and M P Sheetz. 1990. "Localization of Cytoplasmic Dynein to Mitotic Spindles and Kinetochores.." *Nature* 345 (6272). Nature Publishing Group: 266–68. doi:10.1038/345266a0.
- Strahl, B D, and C D Allis. 2000. "The Language of Covalent Histone Modifications.." *Nature* 403 (6765): 41–45. doi:10.1038/47412.
- Sullivan, Beth A, and Gary H Karpen. 2004. "Centromeric Chromatin Exhibits a Histone Modification Pattern That Is Distinct From Both Euchromatin and Heterochromatin.." *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (11): 1076–83. doi:10.1038/nsmb845.

Bibliographie

- Sullivan, K F, M Hechenberger, and K Masri. 1994. "Human CENP-a Contains a Histone H3 Related Histone Fold Domain That Is Required for Targeting to the Centromere.." *The Journal of Cell Biology* 127 (3). The Rockefeller University Press: 581–92.
- Sun, X, J Wahlstrom, and G Karpen. 1997. "Molecular Structure of a Functional Drosophila Centromere.." *Cell* 91 (7). NIH Public Access: 1007–19.
- Swift, Susan, James Lorens, Philip Achacoso, and Garry P Nolan. 2001. *Rapid Production of Retroviruses for Efficient Gene Delivery to Mammalian Cells Using 293T Cell-Based Systems*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142735.im1017cs31.
- Syed, Sajad Hussain, Damien Goutte-Gattat, Nils Becker, Sam Meyer, Manu Shubhdarshan Shukla, Jeffrey J Hayes, Ralf Everaers, Dimitar Angelov, Jan Bednar, and Stefan Dimitrov. 2010. "Single-Base Resolution Mapping of H1-Nucleosome Interactions and 3D Organization of the Nucleosome.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21). National Acad Sciences: 9620–25. doi:10.1073/pnas.1000309107.
- Tachiwana, Hiroaki, Sebastian Müller, Julia Blümer, Kerstin Klare, Andrea Musacchio, and Geneviève Almouzni. 2015. "HJURP Involvement in De Novo CenH3(CENP-a) and CENP-C Recruitment.." *Cell Reports* 11 (1). Elsevier: 22–32. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.013.
- Tachiwana, Hiroaki, Wataru Kagawa, Akihisa Osakabe, Koichiro Kawaguchi, Tatsuya Shiga, Yoko Hayashi-Takanaka, Hiroshi Kimura, and Hitoshi Kurumizaka. 2010. "Structural Basis of Instability of the Nucleosome Containing a Testis-Specific Histone Variant, Human H3T.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23). National Acad Sciences: 10454–59. doi:10.1073/pnas.1003064107.
- Tachiwana, Hiroaki, Wataru Kagawa, and Hitoshi Kurumizaka. 2012. "Comparison Between the CENP-a and Histone H3 Structures in Nucleosomes.." *Nucleus (Austin, Tex.)* 3 (1): 6–11.
- Tachiwana, Hiroaki, Wataru Kagawa, Tatsuya Shiga, Akihisa Osakabe, Yuta Miya, Kengo Saito, Yoko Hayashi-Takanaka, et al. 2011. "Crystal Structure of the Human Centromeric Nucleosome Containing CENP-a.." *Nature* 476 (7359): 232–35. doi:10.1038/nature10258.
- Takayama, Yuko, Hiroshi Sato, Shigeaki Saitoh, Yuki Ogiyama, Fumie Masuda, and Kohta Takahashi. 2008. "Biphasic Incorporation of Centromeric Histone CENP-a in Fission Yeast.." *Molecular Biology of the Cell* 19 (2). American Society for Cell Biology: 682–90. doi:10.1091/mbc.E07-05-0504.
- Takeuchi, Kozo, Tatsuya Nishino, Kouta Mayanagi, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Tetsuya Hori, Hitoshi Kurumizaka, and Tatsuo Fukagawa. 2014. "The Centromeric Nucleosome-Like CENP-T-W-S-X Complex Induces Positive Supercoils Into DNA.." *Nucleic Acids Research* 42 (3). Oxford University Press: 1644–55. doi:10.1093/nar/gkt1124.
- Tanaka, Hiromitsu, Naoko Iguchi, Ayako Isotani, Kouichi Kitamura, Yoshiro Toyama, Yasuhiro Matsuoka, Masayoshi Onishi, et al. 2005. "HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility.." *Molecular and Cellular Biology* 25 (16). American Society for Microbiology: 7107–19. doi:10.1128/MCB.25.16.7107-7119.2005.
- Tanaka, Masatsugu, Atsuhisa Ueda, Heiwa Kanamori, Haruko Ideguchi, Jun Yang, Shigetaka Kitajima, and Yoshiaki Ishigatsubo. 2002. "Cell-Cycle-Dependent Regulation of Human Aurora

a Transcription Is Mediated by Periodic Repression of E4TF1..” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 10719–26. doi:10.1074/jbc.M108252200.

Tanaka, Y, O Nureki, H Kurumizaka, S Fukai, S Kawaguchi, M Ikuta, J Iwahara, T Okazaki, and S Yokoyama. 2001. “Crystal Structure of the CENP-B Protein-DNA Complex: the DNA-Binding Domains of CENP-B Induce Kinks in the CENP-B Box DNA..” *The EMBO Journal* 20 (23). EMBO Press: 6612–18. doi:10.1093/emboj/20.23.6612.

Tanaka, Yoshinori, Maki Tawaramoto-Sasanuma, Shinichi Kawaguchi, Tsutomu Ohta, Kinya Yoda, Hitoshi Kurumizaka, and Shigeyuki Yokoyama. 2004. “Expression and Purification of Recombinant Human Histones..” *Methods (San Diego, Calif.)* 33 (1): 3–11. doi:10.1016/j.ymeth.2003.10.024.

Thakar, Amit, Pooja Gupta, Toyotaka Ishibashi, Ron Finn, Begonia Silva-Moreno, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui, Miroslav Tomschik, Juan Ausio, and Jordanka Zlatanova. 2009. “H2A.Z and H3.3 Histone Variants Affect Nucleosome Structure: Biochemical and Biophysical Studies..” *Biochemistry* 48 (46). American Chemical Society: 10852–57. doi:10.1021/bi901129e.

Thoma, F, T Koller, and A Klug. 1979. “Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin..” *The Journal of Cell Biology* 83 (2 Pt 1). The Rockefeller University Press: 403–27.

Tolstorukov, Michael Y, Joseph A Goldman, Cristele Gilbert, Vasily Ogryzko, Robert E Kingston, and Peter J Park. 2012. “Histone Variant H2A.Bbd Is Associated with Active Transcription and mRNA Processing in Human Cells..” *Molecular Cell* 47 (4). Elsevier: 596–607. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.011.

TOMONAGA, Masao. 2001. “Immune Pathology of Myelodysplastic Syndromes.” *Internal Medicine* 40 (10): 985–86. doi:10.2169/internalmedicine.40.985.

Tremethick, David J. 2007. “Higher-Order Structures of Chromatin: the Elusive 30 Nm Fiber..” *Cell* 128 (4). Elsevier: 651–54. doi:10.1016/j.cell.2007.02.008.

Tropberger, Philipp, and Robert Schneider. 2013. “Scratching the (Lateral) Surface of Chromatin Regulation by Histone Modifications..” *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (6): 657–61. doi:10.1038/nsmb.2581.

Urbani, L, and T Stearns. 1999. “The Centrosome..” *Current Biology : CB* 9 (9): R315–17.

Valente, Valeria, Rodolfo Bortolozzo Serafim, Leonardo Cesar de Oliveira, Fernando Soares Adorni, Raul Torrieri, Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, Enilza Maria Espreafico, et al. 2013. “Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) Levels Is Correlated with Glioblastoma Cells Survival..” Edited by Svetlana Kotliarova. *PloS One* 8 (4). Public Library of Science: e62200. doi:10.1371/journal.pone.0062200.

van Attikum, Haico, Olivier Fritsch, Barbara Hohn, and Susan M Gasser. 2004. “Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair..” *Cell* 119 (6). Elsevier: 777–88. doi:10.1016/j.cell.2004.11.033.

Bibliographie

- van de Weerd, Barbara C M, and René H Medema. 2006. "Polo-Like Kinases: a Team in Control of the Division." *Cell Cycle* 5 (8): 853–64. doi:10.4161/cc.5.8.2692.
- Van Holde, K E, J R Allen, K Tatchell, W O Weischet, and D Lohr. 1980. "DNA-Histone Interactions in Nucleosomes." *Biophysical Journal* 32 (1). Elsevier: 271–82. doi:10.1016/S0006-3495(80)84956-3.
- van Holde, K, and J Zlatanova. 1999. "The Nucleosome Core Particle: Does It Have Structural and Physiologic Relevance?." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21 (9). John Wiley & Sons, Inc.: 776–80. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199909)21:9<776::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z.
- Van Hooser, A A, I I Ouspenski, H C Gregson, D A Starr, T J Yen, M L Goldberg, K Yokomori, W C Earnshaw, K F Sullivan, and B R Brinkley. 2001. "Specification of Kinetochore-Forming Chromatin by the Histone H3 Variant CENP-a.." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19): 3529–42.
- Venkatesh, Swaminathan, and Jerry L Workman. 2015. "Histone Exchange, Chromatin Structure and the Regulation of Transcription.." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (3): 178–89. doi:10.1038/nrm3941.
- Ventura, Mario, Francesca Antonacci, Maria Francesca Cardone, Roscoe Stanyon, Pietro D'Addabbo, Angelo Cellamare, L James Sprague, Evan E Eichler, Nicoletta Archidiacono, and Mariano Rocchi. 2007. "Evolutionary Formation of New Centromeres in Macaque.." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5822): 243–46. doi:10.1126/science.1140615.
- Wang, Ying, Xiaoman Li, and Haiyan Hu. 2014. "H3K4me2 Reliably Defines Transcription Factor Binding Regions in Different Cells.." *Genomics* 103 (2-3): 222–28. doi:10.1016/j.ygeno.2014.02.002.
- Welburn, Julie P I, and Iain M Cheeseman. 2008. "Toward a Molecular Structure of the Eukaryotic Kinetochore.." *Developmental Cell* 15 (5). Elsevier: 645–55. doi:10.1016/j.devcel.2008.10.011.
- Welburn, Julie P I, Mathijs Vleugel, Dan Liu, John R Yates, Michael A Lampson, Tatsuo Fukagawa, and Iain M Cheeseman. 2010. "Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochore-Microtubule Interface.." *Molecular Cell* 38 (3). Elsevier: 383–92. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.034.
- Westermann, Stefan, and Alexander Schleiffer. 2013. "Family Matters: Structural and Functional Conservation of Centromere-Associated Proteins From Yeast to Humans.." *Trends in Cell Biology* 23 (6). Elsevier: 260–69. doi:10.1016/j.tcb.2013.01.010.
- Westermann, Stefan, David G Drubin, and Georjana Barnes. 2007. "Structures and Functions of Yeast Kinetochore Complexes.." *Annual Review of Biochemistry* 76 (1). Annual Reviews: 563–91. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.160607.
- Wiedemann, Sonja M, Silke N Mildner, Clemens Bönisch, Lars Israel, Andreas Maiser, Sarah Matheisl, Tobias Straub, et al. 2010. "Identification and Characterization of Two Novel Primate-Specific Histone H3 Variants, H3.X and H3.Y.." *The Journal of Cell Biology* 190 (5). Rockefeller Univ Press: 777–91. doi:10.1083/jcb.201002043.

- Wilkins, Bryan J, Nils A Rall, Yogesh Ostwal, Tom Kruitwagen, Kyoko Hiragami-Hamada, Marco Winkler, Yves Barral, Wolfgang Fischle, and Heinz Neumann. 2014. "A Cascade of Histone Modifications Induces Chromatin Condensation in Mitosis.." *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166). American Association for the Advancement of Science: 77–80. doi:10.1126/science.1244508.
- Williams, Jessica S, Takeshi Hayashi, Mitsuhiro Yanagida, and Paul Russell. 2009. "Fission Yeast Scm3 Mediates Stable Assembly of Cnp1/CENP-a Into Centromeric Chromatin.." *Molecular Cell* 33 (3). Elsevier: 287–98. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.017.
- Winkler, Duane D, and Karolin Luger. 2011. "The Histone Chaperone FACT: Structural Insights and Mechanisms for Nucleosome Reorganization.." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (21). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 18369–74. doi:10.1074/jbc.R110.180778.
- Witt, O, W Albig, and D Doenecke. 1996. "Testis-Specific Expression of a Novel Human H3 Histone Gene.." *Experimental Cell Research* 229 (2): 301–6. doi:10.1006/excr.1996.0375.
- Wolfgruber, Thomas K, Anupma Sharma, Kevin L Schneider, Patrice S Albert, Dal-Hoe Koo, Jinghua Shi, Zhi Gao, et al. 2009. "Maize Centromere Structure and Evolution: Sequence Analysis of Centromeres 2 and 5 Reveals Dynamic Loci Shaped Primarily by Retrotransposons.." Edited by Harmit S Malik. *PLoS Genetics* 5 (11). Public Library of Science: e1000743. doi:10.1371/journal.pgen.1000743.
- Wong, Jonathan, Yuko Nakajima, Stefan Westermann, Ching Shang, Jung-Seog Kang, Crystal Goodner, Pantea Houshmand, et al. 2007. "A Protein Interaction Map of the Mitotic Spindle.." *Molecular Biology of the Cell* 18 (10). American Society for Cell Biology: 3800–3809. doi:10.1091/mbc.E07-06-0536.
- Wong, Lee H, Hua Ren, Evan Williams, James McGhie, Soyeon Ahn, Marcus Sim, Angela Tam, et al. 2009. "Histone H3.3 Incorporation Provides a Unique and Functionally Essential Telomeric Chromatin in Embryonic Stem Cells.." *Genome Research* 19 (3). Cold Spring Harbor Lab: 404–14. doi:10.1101/gr.084947.108.
- Wong, Lee H, Kate H Brettingham-Moore, Lyn Chan, Julie M Quach, Melissa A Anderson, Emma L Northrop, Ross Hannan, et al. 2007. "Centromere RNA Is a Key Component for the Assembly of Nucleoproteins at the Nucleolus and Centromere.." *Genome Research* 17 (8). Cold Spring Harbor Lab: 1146–60. doi:10.1101/gr.6022807.
- Woodcock, C L, and S Dimitrov. 2001. "Higher-Order Structure of Chromatin and Chromosomes.." *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (2): 130–35.
- Woodcock, C L, L L Frado, and J B Rattner. 1984. "The Higher-Order Structure of Chromatin: Evidence for a Helical Ribbon Arrangement.." *The Journal of Cell Biology* 99 (1 Pt 1). The Rockefeller University Press: 42–52.
- Xiao, Hua, Gaku Mizuguchi, Jan Wisniewski, Yingzi Huang, Debbie Wei, and Carl Wu. 2011. "Nonhistone Scm3 Binds to at-Rich DNA to Organize Atypical Centromeric Nucleosome of Budding Yeast.." *Molecular Cell* 43 (3). Elsevier: 369–80. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.009.

Bibliographie

- Xu, Na, Chia-Lun Tsai, and Jeannie T Lee. 2006. "Transient Homologous Chromosome Pairing Marks the Onset of X Inactivation.." *Science (New York, N.Y.)* 311 (5764). American Association for the Advancement of Science: 1149–52. doi:10.1126/science.1122984.
- Yan, Huihuang, Hidetaka Ito, Kan Nobuta, Shu Ouyang, Weiwei Jin, Shulan Tian, Cheng Lu, et al. 2006. "Genomic and Genetic Characterization of Rice Cen3 Reveals Extensive Transcription and Evolutionary Implications of a Complex Centromere.." *The Plant Cell* 18 (9). American Society of Plant Biologists: 2123–33. doi:10.1105/tpc.106.043794.
- Yüce, Ozlem, Alisa Piekny, and Michael Glotzer. 2005. "An ECT2-Centralspindlin Complex Regulates the Localization and Function of RhoA.." *The Journal of Cell Biology* 170 (4). Rockefeller Univ Press: 571–82. doi:10.1083/jcb.200501097.
- Zheng, Y, M L Wong, B Alberts, and T Mitchison. 1995. "Nucleation of Microtubule Assembly by a Gamma-Tubulin-Containing Ring Complex.." *Nature* 378 (6557). Nature Publishing Group: 578–83. doi:10.1038/378578a0.
- Zhu, Changjun, Jian Zhao, Marina Bibikova, Joel D Levenson, Ella Bossy-Wetzel, Jian-Bing Fan, Robert T Abraham, and Wei Jiang. 2005. "Functional Analysis of Human Microtubule-Based Motor Proteins, the Kinesins and Dyneins, in Mitosis/Cytokinesis Using RNA Interference.." *Molecular Biology of the Cell* 16 (7). American Society for Cell Biology: 3187–99. doi:10.1091/mbc.E05-02-0167.
- Zlatanova, Jordanka, Corrine Seebart, and Miroslav Tomschik. 2008. "The Linker-Protein Network: Control of Nucleosomal DNA Accessibility.." *Trends in Biochemical Sciences* 33 (6). Elsevier: 247–53. doi:10.1016/j.tibs.2008.04.001.

Annexes

Autres publications

FACT assists BER by boosting the remodeling activity of RSC

John Lalith Charles Richard^{1,2#},Manu Shubhdarshan Shukla^{1,2#}, Khalid Ouararhni³, Imtiaz Nisar Lone², Yohan Roulland¹, Christophe Papin³, Tapas Kundu⁴, Dimitar Angelov^{2*}, Ali Hamiche^{3*}and Stefan Dimitrov¹

¹Université Joseph Fourier-Grenoble 1, INSERM Institut Albert Bonniot U823, Site Santé, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

²Université de Lyon, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 7, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Ilkirch Cedex, France

⁴Transcription and Disease Laboratory, Molecular Biology and Genetics Unit

Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Jakkur P. O. Bangalore 560064, INDIA

#These authors contributed equally to this work

Highlights

FACT is recruited to the sites of DNA lesions

FACT complex in DNA damaged cells is associated with remodelers from the SWI/SNF family

FACT assists RSC in both nucleosome remodeling and mobilization

FACT facilitates RSC-dependent removal of uracil by UDG from nucleosomal templates

Summary

Here we show that FACT is involved in DNA repair and we decipher the mechanism of FACT function in BER. We found that upon DNA damage induction, FACT is released from transcribed chromatin together with repair proteins and chromatin remodelers from the SWI/SNF family, and is recruited to the sites of damage. This reveals a role of FACT in DNA repair. We next analyzed how FACT assists UDG, a BER enzyme, in the removal of uracil from nucleosomal DNA. We show that the simultaneous presence of FACT and RSC (a SWI/SNF family remodeler), but not FACT alone, allows a very efficient removal of uracil by UDG. This was achieved thanks to the un-expected novel property of FACT to greatly enhance the remodeling activity of RSC. Taken as a whole the data suggests that in vivo FACT acts in concert with RSC in the repair of damaged DNA.

Introduction

DNA is packaged under the form of chromatin in the eukaryotic nucleus. The nucleosome, the repeating unit of chromatin, consists of an octamer of core histones (two each of H2A, H2B, H3 and H4), around which DNA is wrapped in close to two superhelical turns (van Holde, 1988). DNA, connecting the consecutive nucleosomes, is called linker DNA and a fifth histone, termed linker histone, interacts with it (van Holde, 1988). Each core histone contains a structured domain, the histone fold, and an unstructured NH₂-terminus (Arents et al., 1991; Arents and Moudrianakis, 1993; Luger et al., 1997). Both the linker histone and the core NH₂-termini are involved in the assembly and maintenance of both the 30 nm chromatin fiber (Makarov et al., 1983; Thoma et al., 1979) and the mitotic chromosome (de la Barre et al., 2001; Scrittore et al., 2001).

The nucleosome is a barrier for numerous processes requiring access to the naked DNA underlying sequences (Beato and Einfeld, 1997). The three main strategies that the cell uses to overcome the nucleosome barrier are the posttranslational modifications of core histones (Strahl and Allis, 2000), the incorporation of histone variants in chromatin (Angelov et al., 2004; Doyen et al., 2006a) and the chromatin remodelers (Becker and Horz, 2002; Clapier and Cairns, 2009). The chromatin remodelers are very sophisticated nanomachines able to perturb the histone-DNA interactions and to mobilize the histone

octamer along DNA by using the energy freed by the hydrolysis of ATP (Becker and Horz, 2002; Clapier and Cairns, 2009; Havas et al., 2001; Langst and Becker, 2001 ; Peterson and Tamkun, 1995). Depending on the type of ATPase that the chromatin remodelers contain, they are classified in at least four main groups, namely the SWI/SNF, ISWI, CHD and INO80 families (Bao and Shen, 2007). The chromatin remodeler RSC belongs to the SWI/SNF family and it is involved in the repair of damaged DNA (Cairns et al., 1996; Gangaraju and Bartholomew, 2007). RSC contains a central cavity sufficient for binding of a single nucleosome (Chaban et al., 2008). We have recently analyzed the mechanism of RSC-induced nucleosome mobilization and have shown that RSC generates initially an ensemble of particles with highly altered histone-DNA interactions, which are further mobilized by RSC (Shukla et al., 2010).

Base Excision Repair (BER) is the major pathway that the cell uses to repair lesions induced upon oxidative stress. The different steps of BER functioning on naked DNA are well understood, but how BER functions on chromatinized templates remains elusive. The reported data show that the presence of nucleosomes interferes strongly with BER, although the different BER enzymes are affected in distinct manner (Beard et al., 2005; Beard et al., 2003; Jagannathan et al., 2006; Nilsen et al., 2002; Odell et al., 2010). For example, the accessibility in nucleosome DNA of uracil DNA glycosylase (UDG) is reduced down to 30-fold and the removal of histone octamer facing uracil, in contrast to the removal of solution facing uracil, is greatly (up to 3 orders of magnitude) inhibited (Cole et al., 2010). No such rotational position dependence of the BER enzyme OGG1 removal of 8-oxoG, the major oxidative lesion, was, however, observed (Menoni et al., 2007; Menoni et al., 2012). Indeed, in this later case the nucleosome remodeling by SWI/SNF was a prerequisite for efficient repair (Menoni et al., 2007; Menoni et al., 2012).

Human FACT (Facilitates Chromatin Transcription) protein consists of two subunits, hSpt16 and SSRP1, which are both required for functionality (Orphanides et al., 1999). FACT exhibits a histone chaperone activity, it makes a complex with the H2A-H2B dimer and the (H3-H4)₂ tetramer and is able to deposit them on DNA (Belotserkovskaya et al., 2003; Orphanides et al., 1999). Few reports indicate that, in addition to its role in transcription, FACT might be implicated in the repair of damaged DNA (Heo et al., 2008; Keller and Lu, 2002; Keller et al., 2001). FACT was found in a complex with casein kinase 2 (CK2), which is known to phosphorylate p53 in a DNA damage dependent

manner. This results in an increase of p53 activity (Keller and Lu, 2002; Keller et al., 2001). FACT appears also to be involved in both phosphorylation and exchange of histone variant H2A.X, two events related to the repair of DNA damage (Heo et al., 2008). No other data supporting the implication of FACT in DNA repair are, however, available.

In this work we show that upon *in vivo* induction of damages in DNA, FACT behaves as a DNA repair protein and together with chromatin remodelers from the SWI/SNF family, is recruited to the sites of DNA damage. This behavior of FACT points to its direct involvement in repair of DNA lesions. To decipher the mechanism of FACT in this process, we have carried out a series of *in vitro* experiments using uracil containing nucleosomes. Our data show that FACT greatly facilitates the removal of uracil by UDG from nucleosomal DNA by a novel mechanism implicating boosting of the activity of the involved in DNA repair chromatin remodeler RSC. The experimental results evidence that FACT assists DNA repair through increasing the efficiency of RSC to transform the energy freed by ATP hydrolysis into “mechanical” work.

Results

FACT is recruited to the sites of DNA damage

Some available data indicate that FACT, in addition to transcription, is involved in repair of damaged DNA (Heo et al., 2008; Keller and Lu, 2002; Keller et al., 2001). If FACT is directly implicated in the repair of damaged DNA it should be recruited to the sites of induced lesions in DNA. To test this we used HeLa cells transiently expressing fluorescently labeled FACT, i.e. a fusion of RFP with SSRP1 (RFP-SSRP1), the smaller subunit of FACT. As controls, HeLa cells expressing fluorescently labeled either the repair protein XRRC1 (GFP-XRRC1) or the histone variant H2A.Z (GFP-H2A.Z) were used. These cells were treated with Hoescht 33342 and microirradiated to induce lesions of DNA within a spatially defined region (the “laser cut”) in the nucleus. Upon microirradiation, dsSSRP1, similarly to the repair fusion GFP-XRRC1, was rapidly recruited to the laser-cut sites (Figure 1 A, the first two rows). As expected, no recruitment of the histone H2A.Z to the laser cut region was detected (Figure 1A, third row). We conclude that FACT behaves as a DNA repair protein being rapidly recruited to the sites of chromatin lesions.

To further consolidate this conclusion we have carried out a series of biochemistry experiments. Briefly, we generated stable HeLa cell lines expressing HA-tagged SSRP1 (HA-SSRP1) and treated them with H₂O₂ to damage chromatin DNA. Then we isolated the chromatin-associated HA-SSRP1 complex (HA-SSRP1.com) from both control (non-H₂O₂ treated) and H₂O₂-treated cells by immuno-affinity using anti-HA antibody. Both complexes were next run on SDS gels and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry and Western blotting (Figure 1 B). As seen (Figure 1 B, left panel), the HA-SSRP1 complex, isolated from H₂O₂-treated HeLa cells, contains many additional polypeptides compared to the one isolated from the control untreated cells. Mass spectrometry analysis shows that a large number of proteins involved in repair of damaged DNA (DDB1, DDB2, XRRC1, CUL1, MRE11A, XRCC4, PARP-1, etc.) as well as SMARCA1, SMARCA4 and SMARCC2 proteins, subunits of the human SWI/SNF family remodelers BRG1 and BRAHMA, co-immunopurify with the HA-SSRP1 complex, isolated from H₂O₂ treated HeLa cells (see Figure 1B,C and Supplementary Table 1). Note that these proteins were not found associated with the HA-SSRP1 complex purified from the control HeLa cells (Figure 1B,C and Supplementary Table 1). This last complex contains, however, proteins involved in transcriptional control (PolR2A, PolR2B, PAF1, HIRIP3, TRIM24, TRIM33), which were not found in the HA-SSRP1 complex, isolated from the DNA damaged cells (Figure 1 B, C and Supplementary Table 1). Western blotting analysis further confirmed this conclusion (Figure 1 B, lower part of the left panel). Therefore, induction of DNA damages results in release of FACT from transcriptionally regulated chromatin loci and in its association with chromatin regions containing both repair proteins and SWI/SNF type of chromatin remodelers. Note that chromatin remodelers of the SWI/SNF family are known to be implicated in DNA repair (Menoni et al., 2007; Menoni et al., 2012; Park et al., 2006). Taken as a whole, this set of data reveals that FACT participates directly in the repair of damaged DNA.

Effect of FACT on the efficiency of UDG removal of uracil from nucleosomal DNA

How does FACT function in the repair of DNA damages? To address this we have concentrated on the role of FACT in BER and have analyzed the effect of FACT on UDG removal of uracil from nucleosomal DNA using centrally positioned nucleosomes. FACT was purified to homogeneity from HeLa cells by double immuno-affinity procedure (Supplementary Figure 1C and Materials and Methods). The histone octamer was

assembled with highly purified recombinant core histones (Supplementary Figure 1 A) and the nucleosome reconstitution was carried out by using the 601 sequence, containing randomly incorporated uracil (Cole et al., 2010). The reconstitution conditions were optimized and essentially all DNA was assembled into nucleosomes (Supplementary figure 1B). The \bullet OH and DNase I footprintings (Figures 2, 3) showed clear 10 bp cleavage pattern further confirming the proper wrapping of the nucleosomal DNA around the histone octamer in the reconstituted samples.

The reconstituted nucleosome samples were then incubated with increasing amount of UDG (Figure 2, lanes 3-6), DNA was isolated and, after APE1 treatment (to cleave the DNA phosphor-backbone at the abasic sites generated upon removal of uracil by UDG), the cleaved DNA was run on a PAGE under denaturing conditions. The cleavage pattern of the free DNA arms of the nucleosome DNA is identical to the cleavage pattern of the naked DNA (Figure 2, bottom of the gel, compare lanes 3-6 with lanes 21-24). Although, the cleavage pattern of the nucleosomal DNA strongly differed from the naked DNA (upper part of the gel, compare lanes 3-6 with lanes 21-24). Comparison with the \bullet OH footprinting of the nucleosome particles (lanes 1 and 25) shows that even at the highest concentration of UDG used, cleavage in nucleosomal DNA is only observed at the sites facing the solution, which are also accessible to \bullet OH radicals. This result is in perfect agreement with the reported data (Cole et al., 2010) and illustrates the inability of UDG to remove uracil from sites facing the histone octamer. Noteworthy, the presence of 1.6 pmol FACT in the reaction mixture does affect neither the efficiency nor the pattern of removal of uracil by UDG (compare lane 13 with lane 4; note that in both cases the same concentration of UDG (9-2 units) was used).

Pretreatment of the nucleosome samples with increasing amount of RSC changed, however, completely the UDG cleavage pattern of nucleosomal DNA, i.e. it became qualitatively indistinguishable from this of naked DNA (compare lanes 8-12 with lanes 21-24). Thus, the RSC induced remodeling of the nucleosomes renders all uracil residues (including the ones facing the histone octamer) accessible to UDG. Intriguingly, the same effect was observed when a very small amount (0.15 Units) of RSC (this amount of RSC was unable to change the UDG accessibility to uracil, see lane 8) and increasing amount of FACT was used for the pretreatment of nucleosomes (compare lanes 14-19 with lanes 21-24). This shows that in vitro FACT and RSC act in concert to facilitate the UDG removal of uracil from nucleosomal DNA and suggests that in vivo they could act similarly to assist BER.

FACT boosts both the remodeling activity and the capacity of RSC to mobilize the nucleosomes

Bearing in mind the above described results, we hypothesized that FACT facilitates UDG accessibility to uracil in nucleosomal DNA by acting on the remodeling activity of RSC. To address this we have used DNase I footprinting. Briefly, we incubated 601 end-positioned nucleosomes with RSC either in the absence or presence of FACT and after arresting the remodeling reaction, the samples were treated in controlled manner with DNase I. The cleaved DNA was then purified and analyzed on a PAGE under denaturing conditions (Figure 3 A). The presence of FACT alone, as expected, did not change the clear 10 bp cleavage pattern of nucleosomal DNA (Figure 3 A, compare lane 1 with lane 2). This reveals that under the conditions of the experiment, FACT does not alter the structure of the nucleosome. When incubated with 0.2 units of RSC, the nucleosomes exhibited some alterations in the DNase I cleavage pattern, testifying for some relatively small perturbations in the histone-DNA interactions induced by RSC (compare lane 3 with lanes 1 and 2). Remarkably, the treatment of the nucleosomes with the same amount of RSC, but in the presence of 1.6 pmol of FACT, resulted in very pronounced alterations in the DNase I digestion pattern (lane 4). The same altered DNase I digestion pattern was observed with 5-fold more RSC in the absence of FACT (1 unit, lane 5). We conclude that FACT exhibits strong “co-remodeling” activity and is able to boost no less that 5-fold the remodeling activity of RSC.

The effect of FACT on the efficiency on nucleosome mobilization by RSC was studied by EMSA (Figure 3 B, C). Treatment with 0.2 units of RSC led to mobilization of a very small part of the nucleosomes (not exceeding 15%, see Figure 3 B and quantification on Figure 3 C). The presence of increasing amount of FACT in the reaction mixture led to a strong increase of the amount of slid nucleosomes and already at the highest concentration (1.6 pmol) of FACT, the slid nucleosomes represent ~60% from the overall nucleosome population (Figure 3 C). Similarly, the presence of FACT in the remodeling mixture led to strong increase in the time-course of the mobilization reaction (Supplementary Figure 2). Therefore, FACT boosts the RSC ability to mobilize the nucleosomes.

FACT efficiently assists RSC to generate nucleosome-like structures exhibiting high accessibility to restriction enzyme

Our recent high-resolution microscopy and biochemical data suggested an intriguing compartment of RSC nucleosome remodeling (Shukla et al., 2010). This consists of a formation of a stable, non-mobilized particle, termed remosome, which contains ~ 180-190 bp of DNA loosely attached to the histone octamer. The remosome is formed by RSC-pumping of ~ 15-20 bp from each end of the free DNA linkers of the nucleosome without repositioning of the histone octamer. Subsequently, the remosome is mobilized by RSC (Shukla et al., 2010).

The main characteristic of the remosome is the higher accessibility of its DNA to restriction enzymes. To test if FACT was able to modify distinct compartments of RSC induced nucleosome remodeling, we have used the recently developed “in gel one pot assay” (Shukla et al., 2010). This approach detects quantitatively the alterations in histone-DNA interactions with a 10 bp resolution all along the nucleosomal DNA (Figure 4 and (Shukla et al., 2010; Wu and Travers, 2004)). Briefly, eight mutated 32P-end labeled 255 bp 601.2 sequences were used to reconstitute centrally positioned nucleosomes. A single HaeIII restriction site (designated as d0 to d7, where the subscript refers to the number of helical turns from the nucleosome dyad) was inserted within each of these sequences. An equimolar mixture of the eight reconstituted nucleosomes was incubated with appropriate amount of RSC either alone (to produce 10-15% of slid nucleosomes) or in the presence of increasing amount of FACT (Figure 4 A). A FACT-concentration dependent mobilization of the nucleosome is observed as judged by the EMSA (Figure 4 A). The upper electrophoretic band, containing the remosome fraction as well as the designated slid nucleosome fraction were excised and in gel digested with HaeIII. The digested DNA was purified from the gel and run on an 8% PAGE under denaturing conditions. A similar experiment using either control nucleosomes or nucleosomes treated with FACT (in the absence of RSC) was also performed. The gel was then dried and the product bands were visualized by exposure on a Phosphor Imager and quantified. As seen (Figure 4 B, C), and in agreement with the reported data (Shukla et al., 2010), the accessibility of the control particles (in the absence of FACT) to the restriction enzyme strongly decreases from d7 to d0. FACT does not affect this behavior of the HaeIII digestion pattern. In fact, d7 and d6 behaved differently compared to the other positions and showed a high percent of cleavage

(up to 50% in the case of d7). In contrast, the internally located positions (from d4 to d0) were poorly cleaved. This agrees with the available data and reflects the mode of association of the histone octamer with the nucleosomal DNA (Wu and Travers, 2004). Noteworthy, these results reveal that FACT alone in the concentrations used does not destabilize the histone-DNA interactions within the nucleosome.

However, upon incubation with both RSC and FACT, all sites along nucleosomal DNA exhibited highly altered accessibility (Figure 4 B, C). The accessibility of d7 decreased relative to the control particles (this effect is due to the “pumping” of linker DNA in the nucleosome), while that of the other positions strongly increased. This increase in the HaeIII accessibility profile is concomitant with the increase of FACT concentration used in the remodeling reaction. Since this altered HaeIII accessibility profile is a remosome specific structural “signature” (Shukla et al., 2010), we conclude that FACT assists RSC in perturbing the histone-DNA interactions in the nucleosome, while maintaining the distinct compartments of remodeling.

UDG removes histone octamer faced uracil from both remosomes and slid nucleosomes with the same efficiency

Since FACT increases impressively the capacity of RSC to generate remosomes and slid nucleosomes, its involvement in repair might be mainly associated with this specific to it property. If this was the case, one should expect remosomal damaged DNA to be easier repaired. We have addressed this question by studying the ability of UDG to remove uracil from remosomes (Figure 5). In agreement with the data in Figure 2, UDG was unable to excise histone octamer facing uracil from the control nucleosome (Figure 5, “nucleosomes”). Although, even at the lowest concentration of UDG (0.003 units) used in the experiments, in addition to solution facing uracil, the histone octamer facing uracil was rather efficiently removed (Figure 5, “remosomes”). Upon increasing the amount of UDG, the efficiency of removal increases and achieves saturation at $\sim 5 \times 10^{-1}$ units of UDG (Figure 5, “remosomes”). Excision of uracil from slid nucleosomes exhibits essentially the same behavior (Figure 5, “slid”). These results reveal that the alterations of either the histone-DNA interactions in the remosome or mobilization of the nucleosome allow achieving efficient repair.

The presence of FACT increases the efficiency of RSC to transform the energy freed by ATP hydrolysis into “mechanical“ work

The above presented data reveals that FACT assists very efficiently RSC to both alter the histone-DNA interaction and to mobilize the nucleosome in an ATP-dependent manner. To achieve this, FACT could either act on the nucleosomal substrate or on RSC or on both of them. To differentiate between these possibilities we have carried out the RSC nucleosome mobilization assay at increasing concentration of FACT, but at low ATP concentration (120 μ M). At this low concentration of ATP it is possible to precisely measure the amount of ATP hydrolyzed by RSC and thus, to precisely determine the percentage of nucleosomes mobilized by the hydrolysis of a “unit” of ATP. Under the conditions of the experiment, the increase of the FACT concentration results in a \sim 4 fold increase (from 16 % to 64 %) of the slid by RSC nucleosomes (Figure 6A). Remarkably, under the same experimental conditions no changes in the amount of hydrolyzed ATP was detected (Figure 6B). This demonstrates that the presence of FACT does not affect the ATPase activity of RSC, while it boosts very strongly the generation of slid nucleosomes, i.e. \sim 4-times more slid nucleosomes are generated per unit of hydrolyzed ATP in the presence of the highest amount of FACT (1.6pmol) used in the experiments. In other words, the presence of FACT allows RSC to transform much more efficiently the energy freed by the ATP hydrolysis into mechanical work. Since FACT does not affect the ATPase activity of RSC, it should act on the nucleosomes making them more prone to remodeling.

Discussion

Numerous reports clearly demonstrated the involvement of FACT in assisting the transcription of chromatin DNA (Belotserkovskaya et al., 2003; Hsieh et al., 2013; Orphanides et al., 1999; Pavri et al., 2006). The available data on the potential implication of FACT in DNA repair are, however, scarce. Here we show that FACT is directly implicated in repair of damaged DNA and we decipher how FACT functions in BER.

Our in vivo data reveals that upon DNA damage, FACT is released from transcribed chromatin and it is relocated to chromatin loci associated with both repair proteins and chromatin remodelers involved in DNA repair. This intriguing behavior of FACT points to a direct function in repair of DNA lesions. To address this we have analyzed in vitro the effect of FACT on BER by using chromatinized templates containing uracil. Our data shows that FACT alone has no effect on the removal of uracil by UDG from nucleosomal DNA. Although, FACT exhibits a strong “co-remodeling” activity and it is able to increase many-fold the efficiency of the involved in DNA repair chromatin remodeler RSC to both remodel and mobilize the nucleosomes. FACT does not affect the ATPase activity of RSC, but instead makes the nucleosomes easier to be remodeled and mobilized, i.e. it increases the efficiency of transformation of the energy freed by the RSC-induced hydrolysis of ATP into mechanical work. This allows, in turn, very low amount of RSC to be sufficient to strongly alter the histone-DNA interactions as well as to slide the nucleosomes and thus, the lesions in chromatin DNA to be efficiently repaired. Our data suggest that in vivo FACT acts in BER, via RSC, by increasing the efficiency of repair of DNA lesions.

We would like to note that upon H₂O₂ treatment, FACT relocates to chromatin regions associated, in addition to BER proteins, with proteins involved in Nucleotide Excision Repair (NER) as well as with proteins implicated in the repair of double strand breaks (DSB) (Figure 1 C and Supplementary Table 1). We speculate that FACT could assist also these distinct repair pathways by using similar to the described “co-remodeling” mechanism acting in BER.

FACT (at the concentrations used in the experiments) does not affect nucleosome structure as judged by both DNase I footprinting and the very sensitive restriction enzyme accessibility assay (one pot assay). In addition, no stable binding of FACT to the nucleosome was detected by EMSA. Then how does FACT act on the nucleosome substrate to make it much easily “remodelable”? It is difficult to answer to this question. Obviously, some transient FACT-nucleosome interactions during the RSC remodeling process should be generated allowing the remodeler to function with much higher efficiency. Noteworthy, genetic analysis in yeast has revealed evidences for functional relationship between the N-terminal domain of Spt16, one of the FACT subunits, and the docking domain of H2A (Xin et al., 2009). The proper folding and integrity of the docking domain of H2A is, however, required for chromatin remodeling (Shukla et al.,

2011). For example, nucleosome reconstituted with deleted docking domain H2A or with the histone variant H2A.Bbd (which possesses defective docking domain) cannot be both remodeled and mobilized by remodelers from both SWI/SNF and ISWI family (Doyen et al., 2006b; Shukla et al., 2011). Recently, Hondele et al., have provided structural insights into Spt16 binding to H2A-H2B dimers (Hondele et al., 2013) and suggested a possible mechanism of unraveling of the outer 30 base pairs of the nucleosome by invasion of FACT. Although, data are reported that FACT alone is able to alter the overall nucleosome structure and to destabilize both histone-DNA and histone-histone interactions without any histone eviction (Xin et al., 2009). In these last experiments the molar ratio FACT:nucleosome exceeded, however, at least 50 fold the ratio of FACT:nucleosome used in our experiments (see Materials and Methods). Thus, the reported FACT-induced destabilization of the nucleosome would reflect the very high concentrations of FACT in the earlier reported experiments (Xin et al., 2009). Displacement or transfer of histone dimers as a result of nucleosome remodeling has been reported (Yang et al., 2007) indicative of destabilization of nucleosomes in the process. As mentioned above, H2A variants or experimental mutations which weaken the H3-H4 tetramer and H2A-H2B dimer interface result in unwrapping of DNA from the nucleosomal ends and associated loss of remodeling. An attractive possibility is that depending on the local concentration of FACT, the equilibrium can be shifted into a 'dynamically stable' conformation of nucleosomes, which facilitates efficient nucleosome remodeling.

Interestingly, FACT facilitates also very efficiently the nucleosome mobilization by ACF (Supplementary Figure S3), a remodeler belonging to the ISWI family. FACT was also found stably recruited to the CENP-A nucleosomal complexes (Foltz et al., 2006) and RSF, a chromatin remodeler, is also a member of this complex (Perpelescu and Fukagawa, 2011; Perpelescu et al., 2009). In addition, FACT was shown to physically interact with CHD1, another chromatin remodeler (Okada et al., 2009). Thus, the cell appears to use the FACT nucleosome reorganization ability to control the activity of distinct remodelers belonging to different families for different purposes in different processes. The transient interaction of FACT with the docking domain of H2A would be determinant for this peculiar property of FACT and the cell may use it not only to modulate the remodeling capacity of chromatin remodeling machines but also to control other "machines" working on chromatin. A typical example is the activity of

FACT during transcription, which requires a transient interaction with the H2A/H2B dimer (Hsieh et al., 2013).

Experimental procedures

Preparation of DNA fragments

The 255 bp 601 DNA probe used for reconstitution of centrally positioned nucleosomes was PCR amplified from pGEM-3Z-601.1 plasmid (kindly provided by J. Widom). 5' end labelling was performed by using γ -³²P-labeled primer in PCR.

For 'One Pot Restriction enzyme Assay' a set of eight pGEM-3Z-601.2 mutants were utilized, each containing HaeIII site at a different superhelical location, as described before ((Wu and Travers, 2004); note that the "dyad 7" fragment contains an additional HaeIII site located at 4 bp away from the d7 site). Briefly, a 281 bp fragment was amplified using primers targeting the vector specific sequence flanking the 601.2 sequence. Labelling of the fragment was done as described above. The fragments were subsequently digested with SphI to get a fragment of 255 bp with 57 and 51 bp linker DNA on left and right side respectively.

For repair assays uracil was randomly incorporated in the 601 sequence by PCR using a dNTP mix containing dUTP/dTTP in a 5/95% ratio

(Cole et al., 2010). Top strand was 5' end labelled using γ -³²P-labeled primer in PCR as described.

For DNase I footprinting, a 200-bp fragment with 601 positioning sequence at one end was obtained by digestion of 255 bp 601 with Not I. Fragments were labelled by gap filling using Klenow enzyme with [α -³²P]CTP in the presence of 50 μ M dGTP.

For end positioned nucleosomes used for ACF induced nucleosome sliding assays, a 241bp fragment was PCR amplified from p199.1 plasmid to generate 601 DNA with 601 sequence at the end and labelled using γ -³²P-labeled primer in PCR.

All the DNA fragments were purified on 6% native acrylamide gel prior to use for nucleosome reconstitutions.

Proteins

The chromatin associated FACT complex was affinity purified from HeLa cell extracts as described previously (Ouararhni et al., 2006). Recombinant histones H2A, H2B, H3 and H4 from *Xenopus laevis* were expressed in *Echerichia coli* strain BL21 (DE3) in and purified to homogeneity in denaturing conditions as described (Luger et al., 1999). *Saccharomyces cerevisiae* RSC complex was purified using standard tandem affinity purification as described (Shukla et al., 2010). ACF remodelling complex was purified according the protocol described in (Angelov et al., 2006).

Purification of e-FACT complex

Native FACT complex was purified from HeLa chromatin fraction. Briefly, nuclear pellets prepared from HeLa cells expressing the SSRP-1 protein fused with N-terminal double-HA and double-Flag epitope tags (e-SSRP-1) were digested with micrococcal nuclease to give predominantly mononucleosomes. Mononucleosomes containing e-SSRP-1 were purified from the resulting material by immunoprecipitation on anti-Flag antibody-conjugated agarose. After elution with the Flag peptide, the e-SSRP-1 bound nucleosomes were incubated with 1M NaCl and further fractionated on a 15-45% glycerol gradient to dissociate FACT from the nucleosome. The e-SSRP-1 complex was further affinity-purified by anti-HA antibody-conjugated agarose and eluted with the HA peptide.

Photoinduction of DNA lesions.

Damages in DNA were induced mainly as described in (Bradshaw et al., 2005). HeLa cells transfected with the indicated Fuisions with either dsRED or EGFP were grown on Labteks (Nunc) in DMEM medium at ~60-70% of confluence and were treated with 0.5 mg/ml of Hoechst 33342 for 10 minutes, washed with phosphate-buffered saline and then submitted to 780 nm radiation provided by a femtosecond Ti:Sapphire laser (Chameleon, Vision II) coupled with inversed microscope (Zeiss AxioObserver Z1). The irradiation was performed at 10% (976 mW) of the maximal laser power. After irradiation pictures at every 30 seconds were taken until 15 minutes.

Reconstitution of nucleosomes

Nucleosomes were reconstituted using the salt dialysis procedure (Mutskov et al., 1998, MCB). Briefly, 2.4 µg of chicken erythrocyte carrier DNA and 100ng of abovementioned labelled DNA probes were mixed with pre-reconstituted core histone octamers in an equimolar

ratio. The nucleosome reconstitution buffer was composed of 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5mM β - mercaptoethanol and 2 M NaCl. Reconstitution mixtures were dialyzed at 4°C against a smoothly decreasing NaCl concentration up to 10 mM final. Efficiency and quality of nucleosome reconstitutions were checked on a 5% native PAGE run with 0.25X TBE.

Nucleosome remodeling assays

Nucleosome sliding reactions were performed with 30 ng of nucleosomes and the indicated amount of RSC or ACF in remodeling buffer (RB) consisting of 10 mM Tris pH 7.4, 5% glycerol, 1 mM rATP, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mg/ml BSA, 50 mM NaCl, 0.01% NP40 in a volume of 7.5 μ l at 29°C for 50 minutes. Reactions were stopped by addition of 0.1 units of apyrase. Sliding products were analysed, when indicated, on a 5% native PAGE by quantifying the exposed autoradiographs. Similar conditions were used for remodeling assays to be probed by DNase I or followed by repair assays if not mentioned otherwise.

DNase I and •OH footprinting

One mg of plasmid DNA was added to the end positioned control or remodelled nucleosomes after stopping the reaction by addition of apyrase. Samples were digested with 0.5 units of DNase I at room temperature. After stopping the reaction by addition of SDS and EDTA to 0.1% and 20mM respectively, DNA was extracted with phenol-chloroform, ethanol precipitated and run on 8% denaturing PAGE. Dried gels were exposed imaged on Fuji-FLA5100 phosphorimager.

Nucleosomes (50ng) assembled on the end labelled 255 bp 601 DNA were adjusted to 5 mM Tris (pH 7.4) and 0.25 mM EDTA in a 15 ml volume. The hydroxyl radical reaction was carried out by mixing 2.5 μ l each of 2 mM FeAMSO₄ and 4mM EDTA, 1M Ascorbate and 0.12 % H₂O₂ in a drop on the side of the tube cap before mixing it with the nucleosome solution. The reaction was stopped by adding 0.1% SDS, 25mM EDTA, 1% glycerol and 100 mM Tris (pH 7.4). DNA was purified and analysed as described above.

BER Initiation Assays

For carrying out the repair assay the DNA or nucleosomes incorporated Uracil were incubated with indicated amount of Uracil DNA glycosylase (UDG) in the remodeling buffer at 29°C for one hour. DNA was phenol chloroform extracted and precipitated with ethanol. Abasic sites generated by UDG were cleaved by incubation with 1 unit of APE1. DNA was extracted, processed and imaged as described above.

In Gel One Pot assay

A sliding reaction was carried out in the presence of increasing concentrations of FACT. Prior to loading on 5% native polyacrylamide gel, 6.25 pmol of cold 255 bp 601 middle positioned nucleosomes were added to each reaction as a carrier in order to maintain stability during subsequent procedures. Remodelling products were resolved on 5 % native polyacrylamide gel. Bands corresponding to control unremodeled and unmobilized remodelled nucleosomes were excised, collected in siliconized eppendorf tubes, crushed very gently and immersed with 50 μ l restriction buffer (10 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT and 100 μ g/ml BSA) containing 8 units/ μ l of HaeIII for 5 minutes at 29°C. The reaction was stopped by addition an equal volume (50 μ l) of 2x stop buffer containing 0.2% SDS and 40 mM EDTA. DNA was eluted from the gel slices, purified as described above, and run on 8% denaturing gel. The quantification of extent of accessibility at different superhelical locations in the nucleosome was performed using Multi- Gauge Software (Fuji) as described (Shukla et al., 2010)

Gel purification of nucleosomes, remosomes and slid fractions

Centrally positioned 601 nucleosomes were incubated with RSC in the remodeling reaction as described above. Reaction was stopped at 50 minutes by addition of 0.1 units of Apyrase and 1 μ g of plasmid DNA, as under these conditions the non-mobilized fraction contains essentially remodelled nucleosome particles. Reaction products were resolved on 5% native polyacrylamide gel. Bands, corresponding to plain nucleosome fraction from 0, un-mobilized fractions from 50 minute, and mobilized fraction from 50 minute reaction time points were excised. Excised bands were then cut in small pieces and soaked in 80 ml Elution Buffer (EB) containing Tris 10 mM pH 7.4, 0.25 mM EDTA and 10 mM NaCl, at 4°C for 3 hours with gentle shaking. 0.75 nmol of cold 601 255 bp nucleosomes were added in the elution buffer to maintain the stability of eluted nucleosomes. Eluted nucleosomes were filtered through glass fibre filter under low

speed centrifugation (200g) to remove acrylamide particles, and concentrated when needed, using 100 kDa cut off spin filters.

Eluted nucleosomes, remosomes and slid particles were divided into equal aliquots, and uracil repair efficiency was assessed by incubating the fractions with UDG in increasing concentrations. Samples were processed for further analysis as described above.

ATPase assay

The ATPase assays were carried out in the remodeling reaction buffer with rATP concentration at 120 μ M. To the reaction mixture 1 μ l of the source ³²P ATP was added. The remodelling reaction was carried out at 29° C for 50 minutes, the reaction was stopped by adding formamide dye and SDS to 0.1%. A fraction of the sample was loaded on a 13% denaturing PAGE with 8M Urea and migrated at 150 volts for 35 minutes. The gels were exposed and imaged and quantified as described above.

Aknowledgements

This work was supported by funding from: the European Community's Seventh Framework Programme FP7/ 2007-2013 under Grant agreement number 289611 ("HEM_ID"); the Association pour la Recherche sur le Cancer - ARC (Grant SFI20101201424); the Agence Nationale de la Recherche: ANR-12-BSV5-0017-03 Blanc SVSE 5 "CHROME" (to D.A. and S.D.); ANR VariZome, contract n° ANR-12-BSV8-0018-01 and INCA (PLBIO11-162GE). S.D. acknowledges the funding from La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisé La Ligue).

References

Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., et al. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* 25, 1669-1679.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., et al. (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J* 23, 3815-3824.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.-C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10148-10152.

- Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10489-10493.
- Bao, Y., and Shen, X. (2007). SnapShot: chromatin remodeling complexes. *Cell* 129, 632.
- Beard, B.C., Stevenson, J.J., Wilson, S.H., and Smerdon, M.J. (2005). Base excision repair in nucleosomes lacking histone tails. *DNA Repair (Amst)* 4, 203-209.
- Beard, B.C., Wilson, S.H., and Smerdon, M.J. (2003). Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7465-7470.
- Beato, M., and Eisfeld, K. (1997). Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25, 3559-3563.
- Becker, P.B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-273.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.
- Bradshaw, P.S., Stavropoulos, D.J., and Meyn, M.S. (2005). Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 37, 193-197.
- Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249-1260.
- Chaban, Y., Ezeokonkwo, C., Chung, W.H., Zhang, F., Kornberg, R.D., Maier-Davis, B., Lorch, Y., and Asturias, F.J. (2008). Structure of a RSC-nucleosome complex and insights into chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1272-1277.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.
- Cole, H.A., Tabor-Godwin, J.M., and Hayes, J.J. (2010). Uracil DNA glycosylase activity on nucleosomal DNA depends on rotational orientation of targets. *J Biol Chem* 285, 2876-2885.
- de la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A., and Dimitrov, S. (2001). The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J* 20, 6383-6393.
- Doyen, C.M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2006a). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* 26, 1156-1164.
- Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., et al. (2006b). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J* 25, 4234-4244.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., 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.*
- Gangaraju, V.K., and Bartholomew, B. (2007). Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* 618, 3-17.
- Havas, K., Whitehouse, I., and Owen-Hughes, T. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell Mol Life Sci* 58, 673-682.
- Heo, K., Kim, H., Choi, S.H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M.R., Yang, A.S., and An, W. (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Molecular cell* 30, 86-97.
- Hondele, M., Stuwe, T., Hassler, M., Halbach, F., Bowman, A., Zhang, E.T., Nijmeijer, B., Kotthoff, C., Rybin, V., Amlacher, S., et al. (2013). Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT. *Nature.*
- Hsieh, F.K., Kulaeva, O.I., Patel, S.S., Dyer, P.N., Luger, K., Reinberg, D., and Studitsky, V.M. (2013). Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7654-7659.

Annexes - Autres Publications

- Jagannathan, I., Cole, H.A., and Hayes, J.J. (2006). Base excision repair in nucleosome substrates. *Chromosome Res* 14, 27-37.
- Keller, D.M., and Lu, H. (2002). p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 50206-50213.
- Keller, D.M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q.H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y., and Lu, H. (2001). A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Molecular cell* 7, 283-292.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2001). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Science* 114, 2561-2568.
- 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.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999). Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* 119, 1-16.
- Makarov, V.L., Dimitrov, S.I., and Petrov, P.T. (1983). Salt-induced conformational transitions in chromatin. A flow linear dichroism study. *Eur J Biochem* 133, 491-497.
- Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., Bouvet, P., and Angelov, D. (2007). ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A.Bbd nucleosomes. *Mol Cell Biol* 27, 5949-5956.
- Menoni, H., Shukla, M.S., Gerson, V., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2012). Base excision repair of 8-oxoG in dinucleosomes. *Nucleic acids research* 40, 692-700.
- Nilsen, H., Lindahl, T., and Verreault, A. (2002). DNA base excision repair of uracil residues in reconstituted nucleosome core particles. *EMBO J* 21, 5943-5952.
- Odell, I.D., Newick, K., Heintz, N.H., Wallace, S.S., and Pederson, D.S. (2010). Non-specific DNA binding interferes with the efficient excision of oxidative lesions from chromatin by the human DNA glycosylase, NEIL1. *DNA Repair (Amst)* 9, 134-143.
- Okada, M., Okawa, K., Isobe, T., and Fukagawa, T. (2009). CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Mol Biol Cell* 20, 3986-3995.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284-288.
- 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 Dev* 20, 3324-3336.
- Park, J.H., Park, E.J., Lee, H.S., Kim, S.J., Hur, S.K., Imbalzano, A.N., and Kwon, J. (2006). Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction. *EMBO J* 25, 3986-3997.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703-717.
- Perpelescu, M., and Fukagawa, T. (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma*.
- Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H., and Yoda, K. (2009). Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *The Journal of cell biology* 185, 397-407.
- Peterson, C.L., and Tamkun, J.W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* 20, 143-146.
- Scrittore, L., Hans, F., Angelov, D., Charra, M., Prigent, C., and Dimitrov, S. (2001). pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem* 276, 30002-30010.

Shukla, M.S., Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Richard, J.L., Montel, F., Hamiche, A., Travers, A., Faivre-Moskalenko, C., Bednar, J., Hayes, J.J., et al. (2011). The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling. *Nucleic Acids Res* 39, 2559-2570.

Shukla, M.S., Syed, S.H., Montel, F., Faivre-Moskalenko, C., Bednar, J., Travers, A., Angelov, D., and Dimitrov, S. (2010). Remosomes: RSC generated non-mobilized particles with approximately 180 bp DNA loosely associated with the histone octamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1936-1941.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

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.

van Holde, K. (1988). *Chromatin*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

Wu, C., and Travers, A. (2004). A 'one-pot' assay for the accessibility of DNA in a nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res* 32, e122.

Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, D.J., and Formosa, T. (2009). yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement. *Molecular cell* 35, 365-376.

Yang, X., Zaurin, R., Beato, M., and Peterson, C.L. (2007). Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol* 14, 540-547.

Figure Legends

Figure 1. FACT is implicated in the repair of damaged DNA. (A) FACT is recruited to the site of DNA damage. HeLa cells labeled with Hoescht 33342 and transiently expressing either GFP-XRCC1 or RFP-FACT or GFP-H2A.Z were microirradiated (the zone of microirradiation is designated with the two arrowheads). a-d show the initial phases of recruitment of the fluorescent fusions. (B) Treatment of cells with H₂O₂ results in release of FACT from transcribed chromatin and in binding to chromatin regions associated with both DNA repair proteins and chromatin remodeling factors. Stable HeLa cell lines expressing a fusion of HA with SSRP1 (the smaller subunit of FACT), treated or not with H₂O₂, were used to immunopurify the chromatin bound FACT complexes; left, silver staining of the proteins associated with either control FACT chromatin bound complex (-) or with the FACT chromatin bound complex isolated from H₂O₂ treated cells (+). The lower part of the panel shows the association of the indicated proteins identified by Western blotting in the respective complexes. (C) Mass spectrometry identification of the polypeptides associated with control FACT chromatin bound complex (-) or with the FACT chromatin bound complex, isolated from H₂O₂ treated cells (+). Proteins present in the e-SSRP1.com together with the number of identified peptides are indicated. Proteins involved in transcription are shown in red. DNA repair proteins and chromatin remodelers are shown in blue.

Figure 2. The simultaneous presence of both FACT and RSC, but not FACT alone, is required for efficient UDG excision of uracil at nucleosomal DNA sites oriented towards the histone octamer. Centrally positioned nucleosomes were reconstituted by using 32P 5'-labeled 255 bp 601 DNA fragment containing randomly incorporated uracil residues. (A) Lanes 3-6: analysis of the UDG enzymatic activity within the nucleosomal and linker DNA. The nucleosome solution was incubated with the indicated increasing (nine fold step) amount of UDG for 60 minutes at 30°C and the cleavage pattern of the isolated DNA was analyzed using PAGE under denaturing conditions; lane 2, no UDG added lane 1; ·OH radical footprinting of the nucleosomes. (B) Lanes 8-12: RSC induces a highly efficient UDG-mediated excision of uracil at inward facing sites within the nucleosome. Nucleosomes were incubated with increasing (two-fold step) amount of RSC for 50 minutes at 30°C, and after arresting the reaction they were treated with 9-2 units of UDG and the isolated cleaved DNA analyzed on denaturing PAGE; lane 8, control with no RSC added in the reaction. (C) Lanes 14-19: FACT facilitates the RSC-dependent UDG excision of uracil at inward facing sites within the nucleosome. Nucleosomes were incubated with increasing (2 fold step) amount of FACT in the presence of 0.2 units of RSC and, after arresting the reaction they were treated with 9-2 units of UDG. The cleaved purified DNA was analyzed on denaturing PAGE; lane 13, control containing 1.6 pmol

of FACT with no RSC added. Note that this highest used in the experiment concentration of FACT does not affect the excision of uracil by UDG. (E) UDG cleavage pattern of the naked 255 bp 601 fragment. The experiment was carried out as described in (A), but with nine-fold smaller concentration of UDG at each respective point; on the left is shown schematics of the nucleosome.

Figure 3. FACT facilitates both RSC-induced remodeling and mobilization of nucleosomes. (A) DNase I footprinting. End-positioned nucleosomes, reconstituted on 32P 5'-labeled 241 bp 601 DNA fragment, were incubated with 0.2 units of RSC in the absence (lane 3) or in the presence of 1.6 pmol of FACT (lane 4) for 50 minutes at 30°C; lane 5, same as lane 3, but with 1 unit of RSC; After arresting the remodeling reaction, the samples were digested with 0.1 units of DNase I for 2 minutes, the cleaved DNA was isolated and run on 8% PAGE under denaturing conditions; lanes 1 and 2, controls showing the DNase I cleavage pattern of nucleosomes (lane 1) alone or incubated with 1.6pmol FACT under the conditions described above. (B) The presence of FACT increases the efficiency of RSC-induced nucleosome mobilization. Centrally positioned nucleosomes were incubated with 0.2 units of RSC in the presence of increasing amount of FACT, the reaction was arrested and the samples were run on native PAGE. The position of the unslid and slid nucleosomes were indicated; lane 1 control nucleosomes; lane 2, nucleosomes incubated with RSC alone (in the absence of hFACT) (C) quantification of the data presented in (B).

Figure 4. “In gel one pot assay” analysis of the effect of FACT on the DNA accessibility towards HaeIII along the length of nucleosomal DNA in control and RSC treated nucleosomes. (A, B) Effect of hFACT on RSC-induced remosome generation. (B) Preparative PAGE. Centrally positioned nucleosomes were treated with increasing amount of FACT in the presence of 0.2 units of RSC and after arresting the reaction they were separated on native PAGE; last lane, nucleosomes treated with 5-fold higher amount (1 unit) of RSC, in the absence of hFACT; the first three lanes, untreated, and treated with hFACT and with 0.2 units of RSC nucleosomes, respectively. The indicated bands (from 1 to 9) were excised from the gel and in-gel digested with 8 units of HaeIII for 10 minutes at 30°C. The cleaved DNA was then isolated and separated in 8% PAGE under denaturing conditions (B). The positions at the cleavage of the different dyads are indicated on the left; the numbers of each lane refers to the respective excised bands from the preparative PAGE (see A); ctrl, control, non-digested DNA; DNA, naked DNA used for reconstitutions of the nucleosomes digested with HaeIII. (C) Quantification of the data presented in (B).

Figure 5. Efficient UDG excision of uracil from RSC-generated remosomes and slid nucleosomes. 32P 5'-labeled 255 bp 601 DNA fragment containing randomly incorporated uracil residues was used for reconstitution of centrally positioned nucleosomes. The nucleosomes were treated with RSC either in the absence of ATP (control particles) or in the presence of ATP to produce ~ 50% mobilized particles. The remodeling reaction was arrested and the samples were separated on native PAGE. The slid nucleosomes and the non-mobilized nucleosomes (containing the remosome fraction) as well as the control nucleosomes were eluted from the gel slice. The particles were then treated with the indicated increasing concentrations of UDG, the cleaved DNA was isolated and run on 8% PAGE under denaturing conditions; DNA, naked 255 bp 601 DNA fragment digested with UDG; first and last lane, OH radical footprinting of native nucleosomes; on the right part of the figure is shown a schematics of the reconstituted nucleosome.

Figure 6. FACT increases the efficiency of the freed by the RSC-mediated hydrolysis of ATP energy used for nucleosome remodeling. (A) Nucleosome mobilization assay. Centrally positioned nucleosomes were incubated with 0.3 units of RSC at 120 μM of ATP in either the absence or presence of increasing amount of FACT for 50 minutes at 30°C. After arresting the reaction, the samples were run on native PAGE. The bands corresponding to the centrally and end-positioned nucleosomes are indicated. The lower panel represents the respective quantified data (B) ATPase hydrolysis assay. Centrally positioned nucleosomes were incubated with RSC (0.3 units) and increasing amount of FACT in the presence of 120 μM of ATP and 3.3 μM of 32P[γATP]. The products of the ATP hydrolysis were analyzed on 15% PAGE under denaturing conditions. Lower panel shows the respective quantified data.

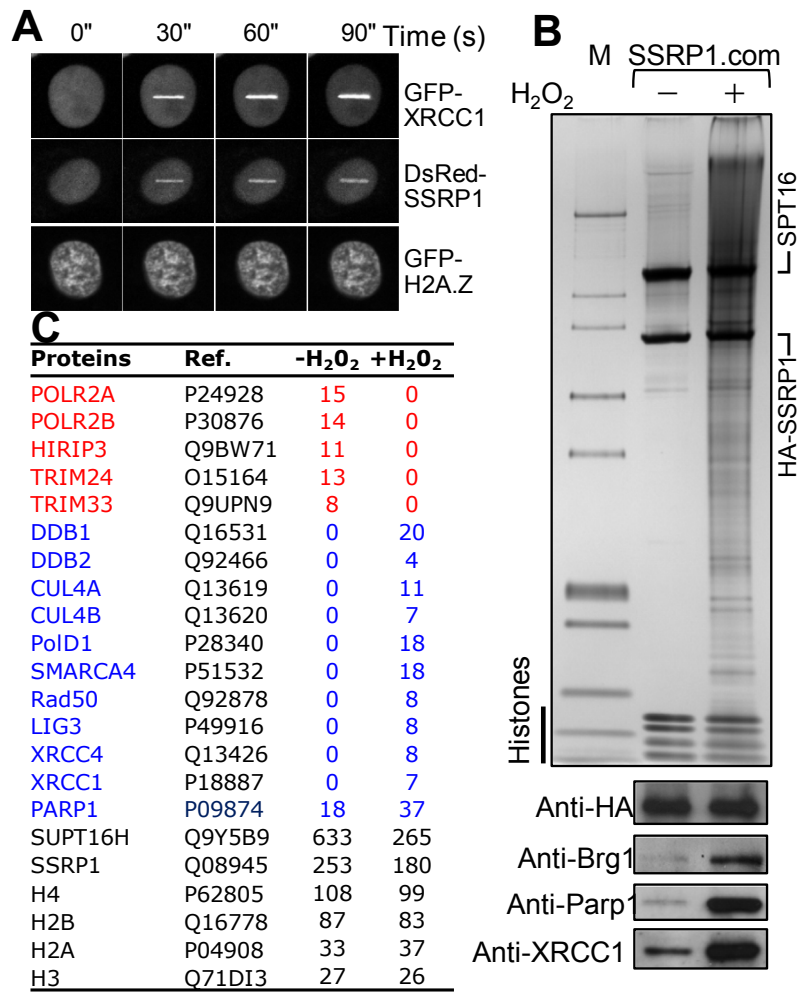


Figure 1

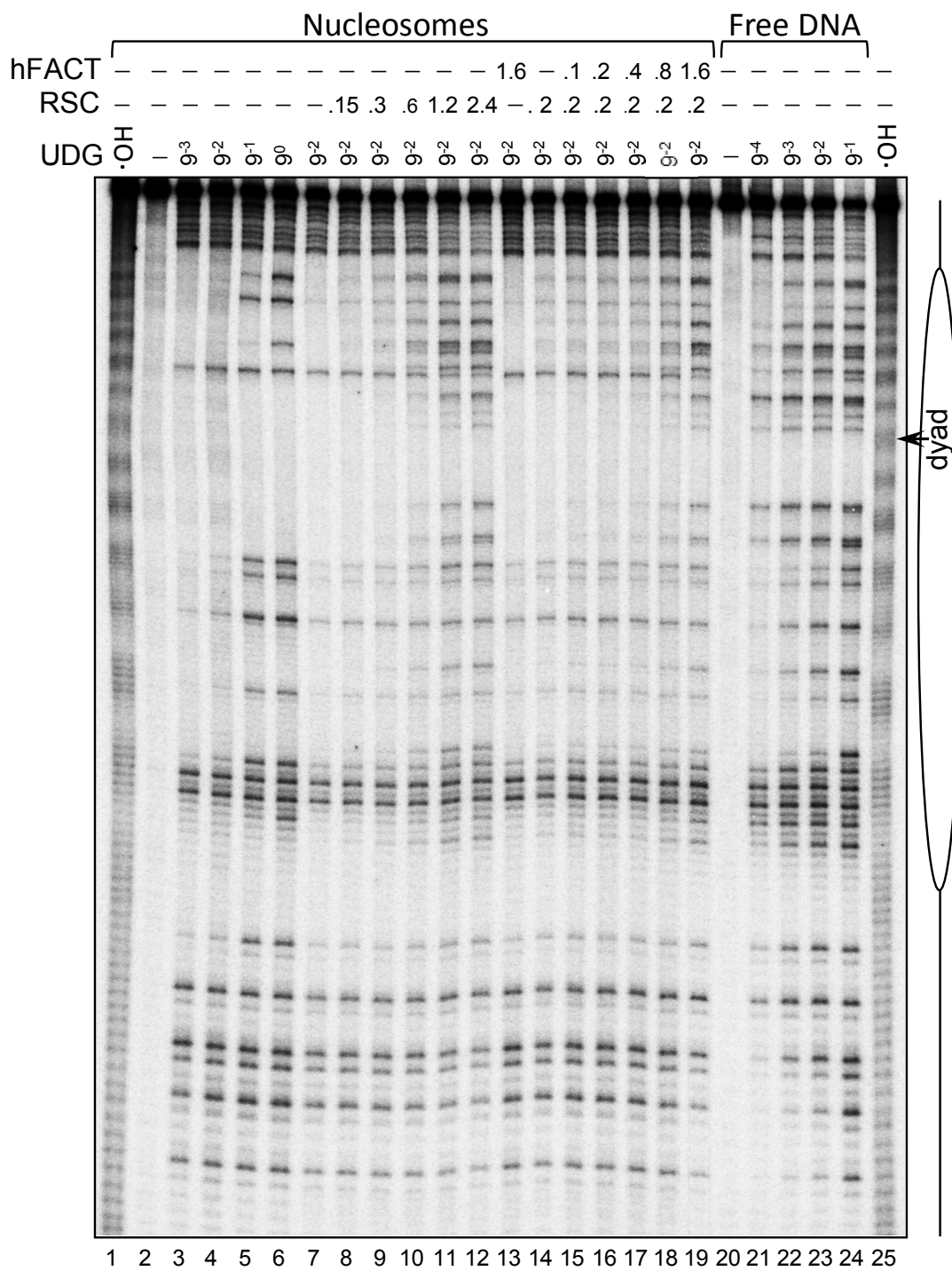


Figure 2

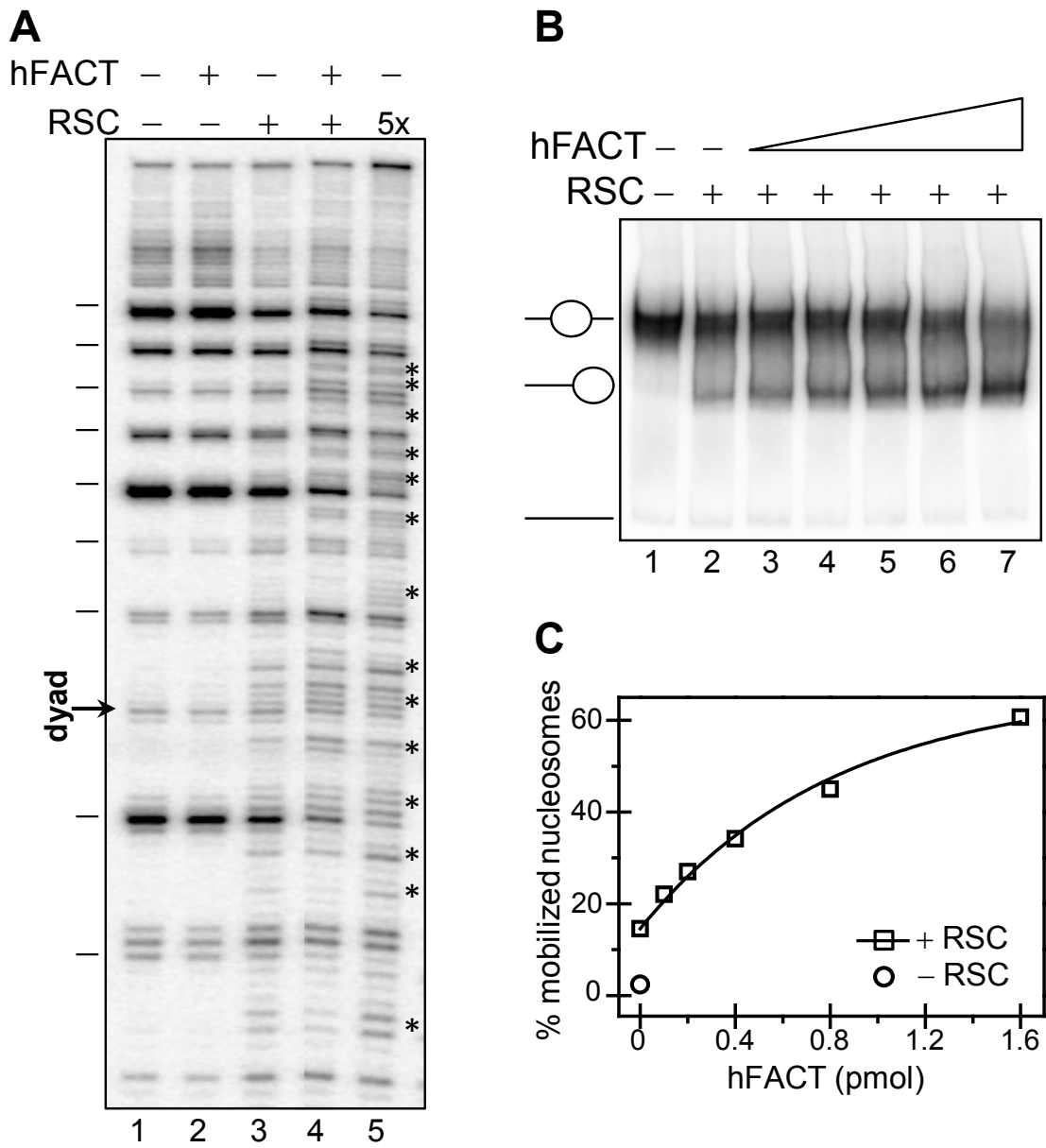


Figure 3

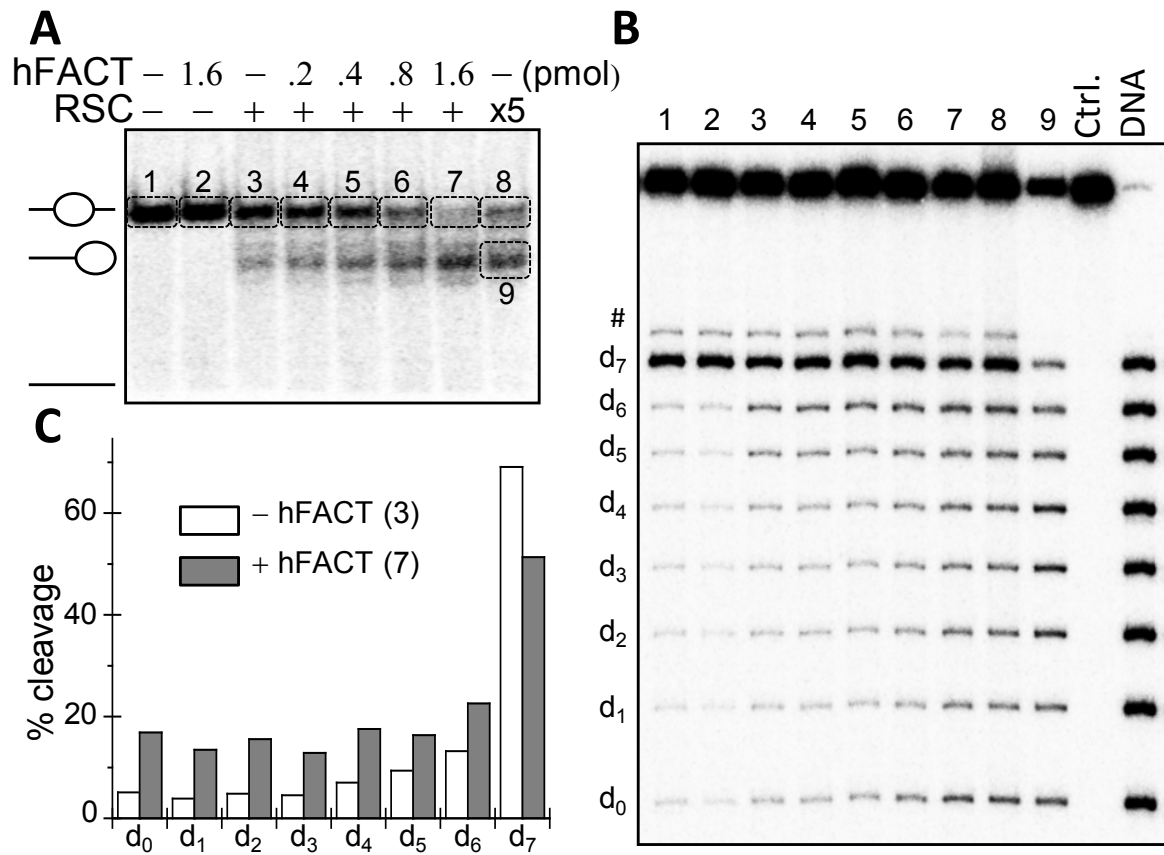


Figure 4

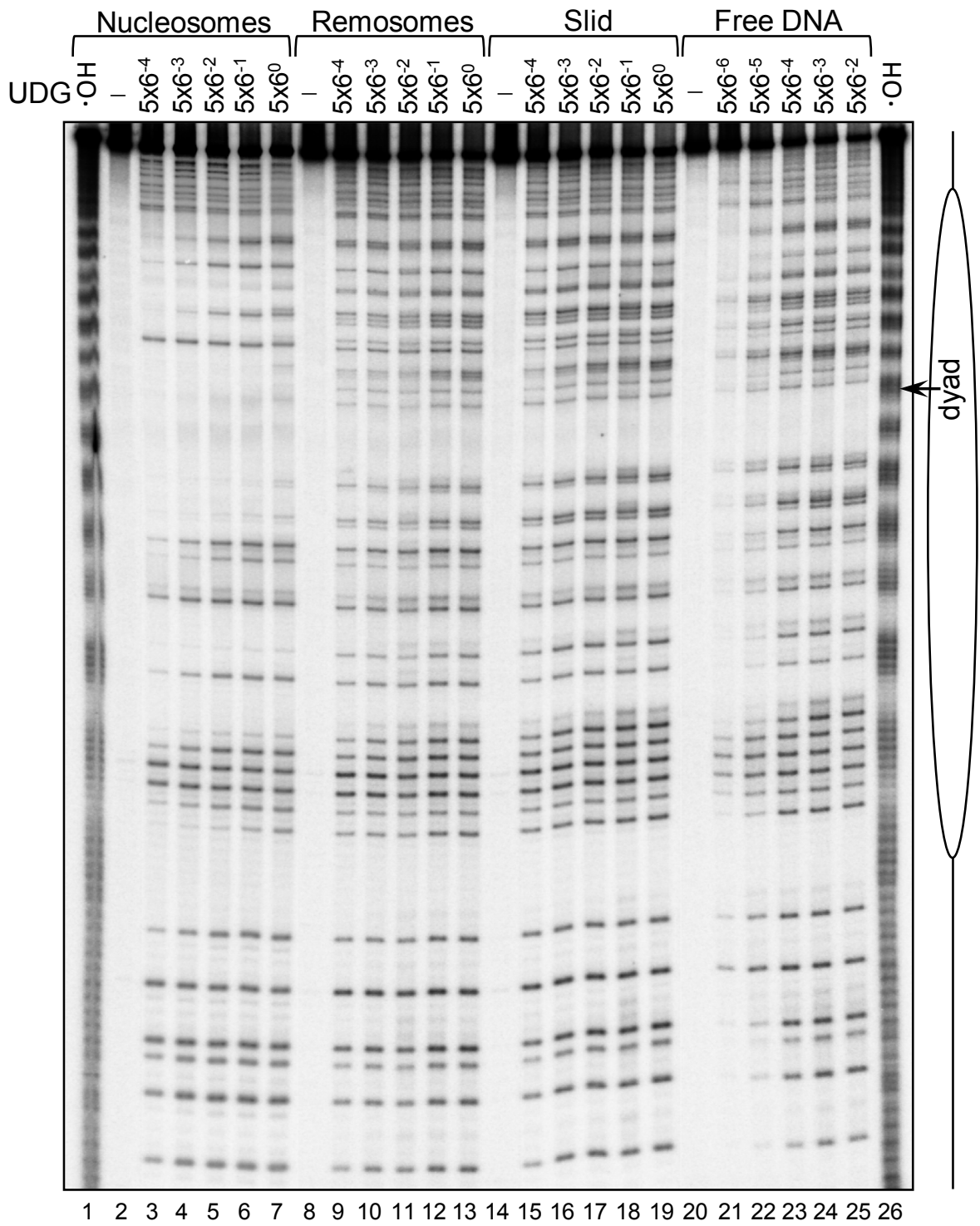


Figure 5

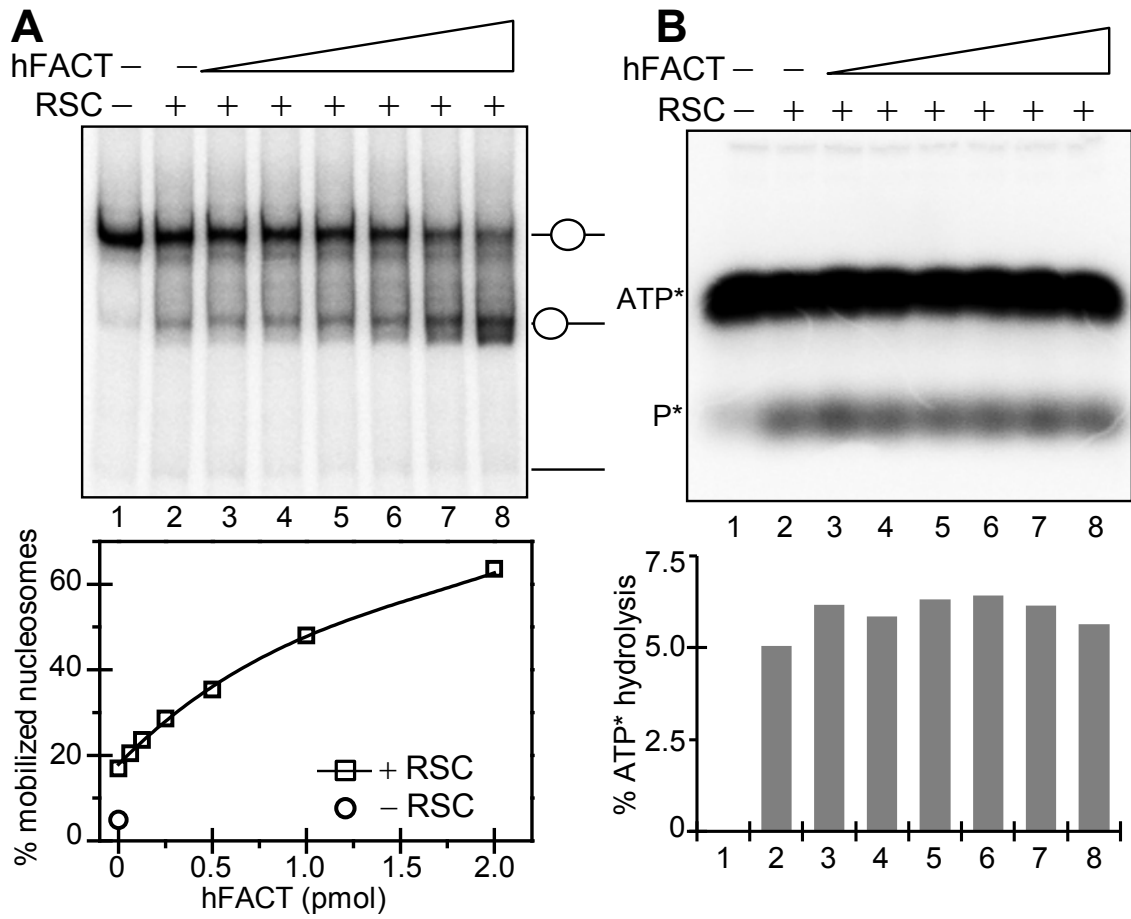


Figure 6

*Parfois notre lumière s'éteint, puis elle est
rallumée par un autre être humain. Chacun de nous
doit de sincères remerciements à ceux qui ont ravivé
leur flamme.*

Albert Schweitzer

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier les rapporteurs de ma thèse Pascal Bernard et Patrick Lomonte d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à la lecture et à la correction de ce manuscrit. Un grand merci également à Catherine Ghezzi d'avoir accepté de présider la défense de cette thèse. Enfin merci à Cyril Boyaux et Dimitrios Skoufias d'avoir guidé ce travail en tant que membre de mon jury de suivit de thèse ces dernières années.

Je tiens ensuite à remercier mes directeur et co-directeur de thèse, Stefan et Thierry de m'avoir accueilli dans le laboratoire, d'abord en master, puis ensuite en thèse. Mais plus encore que d'avoir été mes directeurs de thèse, je souhaite vous remercier de m'avoir formé, encouragé, soutenu et poussé à donner mon meilleur depuis le premier et jusqu'au dernier jour de cette thèse. Plus que le titre de docteur, je vous dois donc également une grande partie des caractéristiques du scientifique que je suis devenu aujourd'hui.

Je voulais également remercier les membres de l'équipe aussi bien présent que passé qui m'ont aidé, chacun de leur manière, à entreprendre ce travail et surtout à la vie de tout les jours dans le labo. Je remerciais tout d'abord les anciens thésards, depuis longtemps devenu docteurs, Damien et Axelle, de m'avoir formé mais surtout de m'avoir informé, lors de mes premiers pas dans l'équipe puis sur ce qui m'attendais.

Je vais en profiter pour remercier Annie, Tram, Dilek et Fabienne pour leurs conseils et les souvenirs de mon début de thèse. Il me faut également remercier les membres de l'équipe 4, les anciens, Defne, Véronique et Emeline et également ceux de l'équipe élargie, Geneviève, Anne-Sophie, Marc, Daniel et surtout Noémie et Hiba, pour chacun, avoir participé de façon bien différente à mon expérience en tant que thésard, mais tous, avoir contribué pour partie dans l'avancement de cette thèse.

Ensuite, merci aux étudiants, Garen, Carole et Lorrie, d'avoir travaillé avec moi, ce fut toujours un plaisir pour moi, et j'espère qu'il fut réciproque. En particulier, Lorrie, je tiens à te souhaiter bonne chance pour la suite de ta thèse, qui je suis certains sera une réussite !

Le plus grand des merci à Matteo, Aysegul, Jessica et Mathieu, qui m'avez parfois détesté, qui avez souvent supporté mes défauts, mais surtout qui avez été présent pour moi dans les pires et responsable d'une grande partie des meilleurs moments de ces longues années

Remerciements

de thèse. Je pense que sans vous ma thèse aurait été bien différente, et j'espère que l'on va continuer à se croiser pendant de nombreuses années après celle-ci !

Il me faut également remercier tous les autres; les autres thésards, les amis proches, moins proches, les quasi inconnus, les amis de Grenoble, les anciens de Briançon, ceux croisés au détour d'une rando, le coloc et les quasis coloc, vous tous qui avez contribué aux bons moments passés à l'intérieur comme à l'extérieur du labo et qui avez contribué à ma presque bonne santé mentale durant toute cette période. Toutefois de peur de t'oublier, toi, en particulier qui mériterais d'avoir ton nom marqué ici, je ne citerais personne, mais néanmoins, merci ! Un merci tout particulier à celle, celles et ceux qui m'ont apporté leur support, réconfort, nourriture et logement, durant les difficiles derniers mois de cette thèse.

Enfin, merci, à mes parents, mon frère et ma soeur, ma grand-mère et au reste de ma famille qui m'ont toujours épaulé et soutenu, et sans lesquels je ne serais probablement pas en train d'écrire ces quelques lignes en guise de conclusion à mes 5 années de thèse... Merci pour tout !