



HAL
open science

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de l'interaction entre la grande sous unité de CAF-1 et la protéine d'hétérochromatine HP1 chez la drosophile

Mathieu Leroux-Coyau

► **To cite this version:**

Mathieu Leroux-Coyau. Caractérisation biochimique et fonctionnelle de l'interaction entre la grande sous unité de CAF-1 et la protéine d'hétérochromatine HP1 chez la drosophile . Génomique, Transcription et Protéomique [q-bio.GN]. 2012. hal-01464930

HAL Id: hal-01464930

<https://ephe.hal.science/hal-01464930>

Submitted on 10 Feb 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.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

Mathieu LEROUX-COYAU

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'INTERACTION
ENTRE LA GRANDE SOUS-UNITE DE CAF-1 ET LA PROTEINE
D'HETEROCHROMATINE HP1 CHEZ LA DROSOPHILE**

Soutenu le 31 octobre 2012 devant le jury suivant :

Andràs Paldi - Président

Nathalie Dostatni - Tuteur scientifique

Flore Renaud-Païtra – Tuteur pédagogique

Juliette Salvaing - Rapporteur

Sébastien Bloyer - Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme Nathalie Dostatni

UMR 218 Dynamique Nucléaire et Plasticité du Génome. Directeur: Geneviève Almouzni

Mme Flore Renaud-Païtra

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, FRE 3216 CNRS/UVSQ/EPHE

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'INTERACTION ENTRE LA GRANDE SOUS-UNITE DE CAF-1 ET LA PROTEINE D'HETEROCHROMATINE HP1 CHEZ LA DROSOPHILE

LEROUX-COYAU Mathieu

*Le complexe trimérique CAF-1 a été initialement isolé et caractérisé comme un chaperon d'histones capable d'assembler *in vitro* les dimères d'histone H3-H4 sur l'ADN nouvellement synthétisé. Des études menées dans les cellules murines en culture indiquent que l'interaction de la grande sous-unité de CAF-1 avec la protéine d'hétérochromatine HP1 est nécessaire à la duplication et au maintien des régions d'hétérochromatine en phase S du cycle cellulaire et que cette interaction est essentielle à la prolifération cellulaire. Ces deux fonctions distinctes décrites pour la grande sous-unité de CAF-1 impliquent des niveaux différents de l'organisation de la chromatine. Ces propriétés sont également conservées chez la drosophile. D'une part, la grande sous-unité de CAF-1, P180 chez *Drosophila melanogaster*, est impliquée dans l'incorporation des dimères d'histones H3-H4 lorsque l'ADN est nouvellement synthétisé : l'étude d'un allèle nul pour le gène codant la protéine P180 montre que cette fonction est essentielle à la viabilité larvaire car elle est requise pour la réplication efficace des régions euchromatiques du génome et l'organisation des nucléosomes sur l'ADN nouvellement répliqué. D'autre part, la grande sous-unité de CAF-1 interagit directement avec la protéine HP1a et mes travaux ont permis d'identifier, par la technique de GST pull-down, un petit domaine de vingt-sept acides aminés situé dans la partie carboxyterminale de la protéine P180 nécessaire à cette interaction. L'obtention de lignées transgéniques exprimant la protéine P180 tronquée de son domaine d'interaction avec HP1a m'a permis de montrer que l'interaction de la grande sous-unité de CAF-1 avec HP1a n'est pas nécessaire à la viabilité des larves de drosophiles: cette forme tronquée de la grande sous-unité de CAF-1 permet donc l'assemblage des dimères H3/H4 sur l'ADN nouvellement répliqué. En revanche, la perte de l'interaction entre P180 et HP1a i) induit la désorganisation de l'hétérochromatine à un locus soumis au phénomène de variégation par effet de position et ii) provoque des défauts de ségrégation des chromosomes qui n'ont pas recombiné au cours de la première division de méiose dans les ovocytes chez la femelle. Ces défauts sont corrélés à une perte du maintien de l'appariement des régions péricentromériques nécessaire à ce mode de ségrégation atypique. Ainsi mes travaux ont permis de séparer les deux fonctions de la grande sous-unité de CAF-1 chez la drosophile. Ils fournissent un outil puissant pour analyser les multiples phénotypes qui restent à explorer dans les différents types cellulaires de cet organisme.*

Mots clés : Drosophila melanogaster, CAF-1, HP1, hétérochromatine, variégation par effet de position, méiose, ségrégation achiasmatique.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	8
<u>I. La chromatine : une structure dynamique</u>	9
<u>I.1 Structure de la chromatine</u>	9
<u>I.1.1 Le nucléosome, unité de base de la chromatine</u>	9
<u>I.1.2 Compactions d'ordre supérieur</u>	10
<u>I.1.3 Une forme de chromatine compacte : l'hétérochromatine</u>	11
<u>I.2 Organisation fonctionnelle de la chromatine</u>	14
<u>I.2.1 Les variants d'histones</u>	14
<u>I.2.2 Les modifications post-traductionnelles des histones</u>	15
<u>I.2.3 La méthylation de l'ADN</u>	19
<u>II. La protéine d'hétérochromatine 1 (HP1)</u>	20
<u>II.1 La variégation par effet de position</u>	20
<u>II.2 Structure des protéines de la famille HP1</u>	21
<u>II.3 Localisation nucléaire d'HP1</u>	22
<u>II.4 Les multiples fonctions d'HP1</u>	23
<u>II.4.1 Fonctions d'HP1 au niveau de l'hétérochromatine et de la répression transcriptionnelle</u>	23

<u>II.4.2 Fonction des protéines HP1 dans la structure des chromosomes</u>	26
<u>II.4.3 Fonction d'HP1a dans l'activation transcriptionnelle chez la drosophile</u>	26
<u>II.4.4 Les protéines HP1 interagissent avec de nombreuses protéines</u>	27
<u>II.4.5 Les différents paralogues d'HP1 chez la drosophile</u>	27
III. LES CHAPERONS D'HISTONES	28
<u>III.1 Le chaperon ASF1</u>	29
<u>III.1.1 Un donneur d'histone pour l'assemblage de la chromatine</u>	29
<u>III.1.2 Rôle d'ASF1 au cours de la réplication</u>	30
<u>III.2 Le complexe HIRA</u>	30
<u>III.2.1 L'assemblage de la chromatine indépendant de la réplication</u>	30
<u>III.2.2 Importance fonctionnelle d'HIRA au cours de l'embryogenèse</u>	31
<u>III.3 Le complexe protéique CAF-1</u>	32
<u>III.3.1 Structure et domaines des sous-unités de CAF-1</u>	32
<u>III.3.2 CAF-1 et l'assemblage couplé à la synthèse d'ADN</u>	33
<u>III.3.3 Rôle de CAF-1 dans les différents organismes</u>	35
<u>III.3.4 Rôle de la grande sous-unité de CAF-1 dans le maintien de l'hétérochromatine</u>	36
<u>III.3.5 Rôle de P180 dans la ségrégation des chromosomes pendant la méiose</u>	37
IV. RESULTATS PRELIMINAIRES OBTENUS AU LABORATOIRE	40
<u>IV.1 Analyse du mutant p180³</u>	40
<u>IV.1.1 Obtention du mutant p180³</u>	40
<u>IV.1.2 La contribution maternelle de P180</u>	40
<u>IV.1.3 Rôle de CAF-1 dans l'organisation de la chromatine</u>	41

<i><u>IV.2 Analyse du rôle de P180 dans le système de ségrégation achiasmatique</u></i>	42
<i><u>IV.2.1 Défauts de ségrégation</u></i>	42
<i><u>IV.2.2 Maintien de l'appariement péricentrique</u></i>	42
<i><u>IV.2.3 Rôle d'HP1a dans la ségrégation achiasmatique</u></i>	43
<i><u>IV.2.4 P150 murin : un outil pour séparer les fonctions de P180</u></i>	44
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	46

ADN	Acide DésoxyriboNucléique	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ARN <i>pombe</i>	Acide RiboNucléique	<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
ASF1	Anti-Silencing Function 1	<i>Sb</i>	Stubble
BLM	Bloom Syndrom DNA Helicase	SetDB1	Set Domain Bifurcated 1
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Sir	Silent Information Regulator
CAF-1	Chromatin Assembly 1	Su(var)	Supressor of Variegation
CO	Crossing-Over	Swi6	Switching deficient 6
CyO	Curly of Oster	UAS	Upstream Activating Sequence
DAPI Protein	4',6'-diamidino-2-phenylindole	WRN	Werner Syndrom
DNMT	DNA Methyl Transferase	Zip1	Molecular Zipper 1
Dmc1	Dosage Suppressor of mck1		
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>		
FISH	Fluorescent in situ Hybridation		
FM7	First Multiple seven		
FRAP	Fluorescent Recovery After Photo-bleaching		
Gal4	Galactose metabolism 4		
GFP	Green Fluorescent Protein		
HAT	Histone AcetylTransferase		
HDAC	Histone DeAcetylTransferase		
Hir 1-2-3	Histone Regulation 1-2-3		
HIRA	Histone regulation A		
HMG	High Mobility Group		
HP1	Heterochromatin Protein 1		
Hpc2	Histone periodic control 2		
IPTG	Isopropy1-thio-b-D-galactopyranoside		
MDB1	Methyl-CpG-Binding domain 1		

Mei-W68	<i>Meiotic W68</i>
MIR	<i>MOD Interacting Region</i>
NCO	<i>Non Crossing-Over</i>
NURF	<i>Nucleosome Remodeling Factor</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>

INTRODUCTION

1. La chromatine : une structure dynamique

*A la fin du 19^{ème} siècle, Walther Flemming, biologiste allemand fondateur de la cytogénétique, employa pour la première fois le mot "chromatine" (du grec *khroma* signifiant coloré) pour désigner la structure colorée présente dans le noyau des cellules (Flemming, 1882). Historiquement, la chromatine fut donc définie du point de vue cytologique par sa capacité à fixer les colorants basiques. La structure élémentaire de la chromatine fut depuis lors élucidée : il s'agit du nucléosome, un complexe nucléoprotéique constitué de petites protéines basiques appelées histones autour desquelles s'enroule la double hélice d'ADN (Kornberg, 1974).*

Dans cette première partie, nous allons voir comment l'architecture complexe de la chromatine permet l'organisation des chromosomes à l'intérieur du noyau.

1.1 Structure de la chromatine

1.1.1 Le nucléosome, unité de base de la chromatine

*L'existence et la définition du nucléosome ont émergé de deux séries de travaux indépendants. D'un côté, la digestion de la chromatine issue de noyaux d'hépatocytes de rat par une nucléase endogène aboutissait au clivage de l'ADN en fragments de longueurs multiples de 180-200 paires de bases (Hewish and Burgoyne, 1973) suggérant l'existence d'une structure répétée. En parallèle de ces travaux, les observations par microscopie électronique ont aussi révélé le caractère régulier et répété de la chromatine dont l'aspect rappelle celui d'un "collier de perles" (Olins and Olins, 1974). Ainsi, l'organisation élémentaire de la chromatine était proposée : il s'agit d'une structure régulière dont l'unité de base répétée est le **nucléosome** (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975). La répétition du nucléosome forme la fibre nucléosomale ou "fibre de 11 nm" qui constitue le premier niveau de compaction élémentaire de l'ADN en chromatine .*

La composition du nucléosome fut proposée par Roger Kornberg en 1974 suite à des expériences de biochimie étudiant l'association des histones entre elles en solution,

complémentées par des expériences de diffraction aux rayons X d'un complexe ADN-histones (Kornberg, 1974). Le nucléosome est composé (1) d'une particule coeur nucléosomale formée d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4 autour desquelles s'enroule 146 pb de la double hélice d'ADN et (2) d'une séquence d'ADN internucléosomale qui connecte les particules coeurs nucléosomales entre elles et dont la longueur (au minimum 50 pb) varie selon les types cellulaires, selon les organismes et selon les régions du génome considérées (Kornberg, 1977). L'octamère d'histones est composé d'un tétramère central d'histones (H3-H4)₂ flanqué de deux dimères d'histones H2A-H2B.

Les histones sont de petites protéines basiques (environ 20kDa) très conservées au cours de l'évolution. Les histones de la particule coeur sont caractérisées par la présence d'un domaine central "histone-fold", composé de trois hélices α , impliqué dans la dimérisation des histones (Arents and Moudrianakis, 1995). La résolution de la structure fine de la particule coeur du nucléosome montre l'agencement des histones entre elles et leurs contacts avec l'ADN ((Davey et al., 2002; Luger et al., 1997). Les régions N- et C-terminales des histones sont peu structurées et émergent à la surface du nucléosome (Luger et al., 1997).

Aux quatre histones de la particule coeur s'ajoute une cinquième histone, appelée "histone linker" qui se lie à l'ADN internucléosomal (ou ADN "linker") et scelle ainsi les deux tours d'ADN au niveau de son point d'entrée/sortie à la surface du nucléosome. La famille des histones "linker" dont l'histone H1 est l'exemple le mieux connu, se lie à environ 20 paires de bases de l'ADN "linker" grâce à son domaine globulaire, mais est aussi en contact avec l'ADN nucléosomal enroulé autour de l'octamère d'histones. La famille des histones H1 est impliquée dans la condensation de la chromatine en structures d'ordre supérieur au nucléosome. Au-delà de ce rôle structural, H1 pourrait jouer aussi un rôle dans la régulation de la transcription en contrôlant par exemple l'accès de la chromatine à des facteurs de remodelage (Happel and Doenecke, 2009; Happel et al., 2009).

1.1.2 Compactions d'ordre supérieur

La fibre nucléosomale est condensée en structures d'ordre supérieur permettant la compaction des deux mètres d'ADN dans le noyau qui ne fait que quelques micromètres de diamètre. Un premier niveau de compaction est permis par la présence des histones linker H1. Finch et Klug proposèrent qu'en présence de ces histones de lien ou en présence d'ions Mg^{2+} , la chaîne de nucléosomes forme une fibre au diamètre approximatif de 30nm (Finch and Klug, 1976; Thoma et al., 1979). L'organisation exacte des nucléosomes au sein de

cette fibre est toujours sujette à débat à l'heure actuelle. Deux modèles ont été proposés : (1) le modèle "one-start" (issu du modèle de la fibre solénoïde initialement proposée par Finch et Klug (1976) et Thoma et al. (1979) qui décrit l'enroulement des nucléosomes consécutifs en une hélice gauche, avec l'ADN internucléosomal au centre de la fibre (Robinson and Rhodes, 2006) et (2) le modèle "two-start" dans lequel les nucléosomes arrangés en zigzag sont reliés entre eux par l'ADN internucléosomal qui va d'un côté à l'autre du zigzag (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005). Il est à noter que la présence d'un ADN internucléosomal court favorise la formation du modèle "two-start" plus compact alors qu'un ADN internucléosomal plus long permettrait la formation du modèle "onestart" (Kruithof et al., 2009; Routh et al., 2008). De plus, il a été montré récemment que ces deux structures coexisteraient sous certaines conditions *in vitro* au sein de la fibre de 30nm (Grigoryev et al., 2009).

En conclusion, il faut garder à l'esprit la nature dynamique des fibres de nucléosomes qui suggère l'existence *in vivo* des différentes structures qui pourraient être sujettes à des transitions dynamiques d'un état à un autre (pour revues, (Maeshima et al., 2010; Tremethick, 2007)). La compaction de l'ADN génomique en structures d'ordre supérieur est plus ou moins bien caractérisée. Elle atteint un niveau de condensation extrême avec le chromosome métaphasique, qui assure la séparation correcte des deux chromatides sœurs lors de la mitose.

De nombreuses protéines non-histones participent à la compaction de la chromatine. Les protéines HMG ("High Mobility Group" A, B et N) sont des protéines "architecturales" qui organisent la chromatine en pliant de façon appropriée l'ADN. Ces protéines sont, après les histones, les protéines les plus abondantes de la chromatine. Elles participent à la régulation de la transcription par interaction avec les nucléosomes, mais aussi avec des facteurs de transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine (Bianchi and Agresti, 2005). De plus, la présence de protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1), caractéristiques de l'hétérochromatine, ou la présence d'un composant ARN, participent à la régulation de l'architecture de la chromatine. Nous allons maintenant décrire leur importance pour la formation de domaines nucléaires fonctionnels au sein du noyau.

1.1.3 Une forme de chromatine compacte : l'hétérochromatine

Historiquement, la chromatine a été divisée en deux domaines distincts sur la base d'observations microscopiques : l'hétérochromatine (préfixe hétéro- venant du grec signifiant : "l'autre" chromatine) et l'euchromatine (la "vraie" chromatine). L'hétérochromatine est définie comme les régions de chromatine qui restent condensées à

travers tout le cycle cellulaire, alors que l'euchromatine est décondensée pendant l'interphase et n'est compactée qu'au moment de la mitose (Henikoff, 2010). L'observation en microscopie électronique d'un noyau d'hépatocyte montre que l'hétérochromatine est le plus souvent située en périphérie nucléaire et autour du nucléole.

En 1928, Heitz émit l'hypothèse que l'hétérochromatine contenait les gènes silencieux et correspondait à une chromatine inactive (Heitz, 1928). La distinction est maintenant mieux caractérisée sur le plan moléculaire. L'hétérochromatine correspond en effet à des régions de la chromatine pauvres en gènes et transcriptionnellement silencieuses par opposition aux régions d'euchromatine riches en gènes et qui peuvent être transcriptionnellement actives (Craig, 2005; Delcuve et al., 2009). De plus, l'euchromatine est en général répliquée de façon précoce au cours de la phase S du cycle cellulaire, alors que l'hétérochromatine est répliquée plus tardivement (Gilbert, 2002).

Brown distingua deux types d'hétérochromatine: l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative (Brown, 1966). L'hétérochromatine facultative implique des régions du génome qui peuvent être différentes d'un type cellulaire à l'autre ou au sein d'une même cellule diploïde, d'un chromosome homologue à l'autre. L'exemple le plus connu et le mieux décrit est l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X dans les cellules de mammifères femelles au cours du développement. Ceci permet d'obtenir une compensation de dose vis-à-vis des cellules mâles qui ne possèdent qu'un seul chromosome X. Une telle inactivation est à ce jour le seul exemple d'inactivation de gènes couvrant un chromosome entier (Chow and Heard, 2009).

L'hétérochromatine constitutive implique des régions qui sont hétérochromatiques dans toutes les cellules. Elle correspond le plus souvent aux régions fonctionnelles du génome comme les centromères (hétérochromatine péricentrique encore appelée péricentromérique) ou les télomères. Chez plusieurs organismes, les blocs d'hétérochromatine péricentrique situés sur différents chromosomes se regroupent ensemble en une structure appelée chromocentre, aisément identifiable par un marquage intense de l'ADN par le colorant nucléaire DAPI (Guenatri et al., 2004; Maison et al., 2002). Le maintien conforme de l'organisation de l'hétérochromatine péricentrique est essentiel pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes lors de la mitose (Peters et al., 2001a; Taddei et al., 2001) et a donc un rôle essentiel pour le maintien de la stabilité du génome (Ekwall et al., 1997). Les régions d'hétérochromatine péricentrique sont caractérisées par la présence d'une combinaison spécifique de facteurs nécessaires à l'établissement et au maintien de ces régions chromatiniennes particulières. Ceci inclut la présence de séquences d'ADN spécifiques (séquences souvent répétées), des modifications d'histones, le recrutement de protéines spécifiques et la présence d'ARN.

L'hétérochromatine péricentrique est composée principalement de séquences répétées d'ADN riches en A-T qui favorisent la compaction de l'ADN et la fixation de protéines (Fitzgerald et al., 1994; Ugarkovic, 2005). Ces séquences incluent des éléments transposables et des séquences satellites répétées qui sont connus chez la souris sous le nom de satellites majeurs (234 pb) (Jones, 1970; Pardue and Gall, 1970) et satellites α (171 pb) chez l'homme. Chez la souris, les régions centriques sont aussi riches en séquences répétées de 120 pb qui sont appelées satellites mineurs (Plohl et al., 2008; Probst and Almouzni, 2008). Ces régions qui ne sont pas faites d'hétérochromatine, sont accolées aux chromocentres en interphase sous forme d'entités séparées. Alors que ces séquences répétées ont été longtemps considérées comme de l'ADN "poubelle", des travaux récents ont mis en lumière l'importance de ces blocs pour l'organisation structurale et fonctionnelle du génome (Plohl et al., 2008).

En plus des séquences répétées de l'ADN, l'hétérochromatine contient plusieurs marques caractéristiques telles que la méthylation de l'ADN ou la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me3) qui sont vraisemblablement transmises à travers les divisions cellulaires. Une autre marque essentielle des régions d'hétérochromatine péricentrique est la présence de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1), qui se lie grâce à un domaine spécifique à H3K9me3 (Bannister et al., 2001a; Lachner et al., 2001b). HP1 est une protéine très conservée au cours de l'évolution et possède des homologues chez de nombreux organismes de *Schizosaccharomyces pombe* (Swi6) aux mammifères où trois isoformes nommées HP1 α , HP1 β et HP1 γ ont été identifiées (Singh et al., 1991). Les protéines HP1 sont cependant absentes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Initialement, l'hétérochromatine a été perçue comme une région hautement compactée, rigide et inerte. Cependant, l'utilisation de techniques d'imagerie telle que la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a permis de mettre en évidence que de nombreuses protéines telles que la protéine HP1 ont une association dynamique avec la chromatine (Cheutin et al., 2003a; Festenstein et al., 2003a). Ceci suggère que l'hétérochromatine peut être une région potentiellement dynamique et plastique dans lequel l'accès à l'ADN n'est pas forcément impossible.

Le noyau est une structure organisée et des données de plus en plus nombreuses convergent vers l'idée que cette organisation est nécessaire au bon fonctionnement de divers processus cellulaires. Les mécanismes de régulation de cette organisation commencent à être décryptés et font intervenir une grande variété de facteurs.

1.2 Organisation fonctionnelle de la chromatine

Dans sa définition moderne, le terme épigénétique désigne les paramètres, héréditaires au cours des divisions cellulaires, qui contribuent à la régulation d'états fonctionnels au sein d'une cellule sans affecter directement la séquence d'ADN. Cette appréciation de l'importance de paramètres non codés génétiquement a pris un essor particulier avec les récents progrès réalisés dans la connaissance de l'organisation du génome au sein du noyau des cellules. C'est la chromatine et non l'ADN seul qui est impliquée dans tous les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique, à savoir la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison.

L'information épigénétique au sein de la chromatine est principalement véhiculée par des modifications de l'ADN et des histones. Je m'intéresserai dans les prochains paragraphes à la méthylation de l'ADN en tant que marque associée à la chromatine, transcriptionnellement silencieuse chez les mammifères, ainsi qu'aux différentes formes d'histones et leurs principales modifications dans la modulation de l'information épigénétique.

1.2.1 Les variants d'histones

Chaque histone de la particule cœur, excepté H4, existe dans la cellule sous plusieurs formes protéiques, qui ont des homologies de séquences variables et sont codées par des gènes différents (Franklin and Zweidler, 1977). Pour chaque histone l'ensemble de ces formes est regroupé sous le terme de « variants d'histones ». Ces variants sont souvent retrouvés associés à des régions de la chromatine présentant des propriétés distinctes.

L'étude de la composition des nucléosomes a permis de mettre en évidence la présence de différents variants pour trois des quatre histones : H2A, H2B et H3 (Polo and Almouzni, 2006; Sarma and Reinberg, 2005; Talbert and Henikoff, 2010). Ces variants peuvent être regroupés en deux catégories : i) les histones « canoniques » dont l'expression est maximale au cours de la phase S, ce qui fournit les histones nécessaires au maintien de la structure chromatinienne au cours de la réplication ; ii) les histones dites de « remplacement » dont le profil d'expression ne montre pas de changement notable au cours du cycle cellulaire. Les différentes histones de remplacement ont généralement des caractéristiques fonctionnelles différentes de l'histone canonique en raison de la présence de modifications post-traductionnelles originales et/ou de la possibilité de former des interactions avec des protéines spécifiques (Sarma and Reinberg, 2005). Ces variants peuvent diverger de

l'histone canonique d'un seul acide aminé à un domaine protéique entier. Certains d'entre eux sont conservés entre les espèces alors que d'autres apparaissent spécifiques d'un embranchement phylogénétique.

Les différents variants d'histones peuvent avoir une fonction spécifique par rapport à l'histone canonique, mettant en jeu une ou plusieurs particularités dans leurs modifications post-traductionnelles, leur voie d'incorporation dans la chromatine ou encore dans leurs interactions avec des protéines non-histones (Sarma and Reinberg, 2005). L'expression des variants d'histones apparaît aussi être régulée différemment de celle des histones canoniques. En effet, les gènes des histones canoniques sont principalement exprimés dans toutes les cellules au cours de la phase S alors que les gènes codant les variants de remplacement sont en général exprimés plus faiblement mais pendant toute la durée du cycle cellulaire et parfois dans certains types cellulaires très spécifiques (Malik and Henikoff, 2003). Cette propriété résulte en l'expression exclusive des variants d'histones en dehors de la phase S et en particulier dans les cellules différenciées qui ne se divisent plus.

1.2.2 Les modifications post-traductionnelles des histones

L'organisation fonctionnelle de la chromatine n'est pas seulement affectée par sa conformation ou la présence de variants d'histones. Les histones peuvent également subir des modifications post-traductionnelles par addition covalente d'un groupe chimique sur certains résidus (pour revue, voir Kouzarides, 2007). Ces modifications peuvent affecter les propriétés physiques de la particule cœur du nucléosome, participer au recrutement de protéines non-histones ou encore être impliquées dans des voies de signalisation. Elles participent aussi activement aux divers processus mettant en jeu la chromatine comme la transcription, la réparation ou la division cellulaire.

*L'importance de ces modifications a été récemment analysée dans plusieurs études s'intéressant au cycle de vie de souches de *S. cerevisiae* exprimant des versions mutées et non modifiables de ces histones (Dai et al., 2008; Govin et al.; Nakanishi et al., 2008). J'illustrerai le rôle de ces modifications avec l'exemple de l'acétylation des histones. Certains aspects de leur méthylation seront abordés dans la partie suivante.*

Acétylations des histones nouvellement synthétisées

L'acétylation est une modification post-traductionnelle des histones, mise en évidence dans les années 1960 (Allfrey et al., 1964). Cette modification peut notamment neutraliser la charge positive de la lysine en remplaçant un atome d'hydrogène par un groupement acétyle (H_3CO). La grande majorité des lysines des extrémités amino-terminales des

histones ainsi que certains résidus localisés dans les domaines globulaires (H3K56) peuvent être acétylés. Ces modifications sont dynamiques et relèvent d'un équilibre entre l'action de deux types d'enzymes : les Histone-Acétyl-Transferases (HAT) et les Histone-DéAcétylases (HDAC).

Des analyses à l'échelle du génome ont montré que les régions transcrites sont globalement hyperacétylées alors que les régions silencieuses sont plutôt hypoacétylées (Pokholok et al., 2005a). Les HAT de type A sont généralement des co-activateurs de la transcription. Leur rôle dans l'activité transcriptionnelle a d'abord été attribué au fait que l'acétylation neutralise la charge positive du résidu lysine et donc pourrait déstabiliser l'interaction entre l'ADN et la particule cœur du nucléosome facilitant l'accessibilité aux différents facteurs de transcription.

La méthylation des histones

De nombreuses lysines (K) et arginines (R) des histones peuvent être méthylées. Il s'agit des acides aminés R2, K4, K9, R17, R26, K27, K36 et K79 de l'histone H3 et R3 et K20 de l'histone H4 (Kouzarides, 2007). Alors que les lysines ou les sérines/thréonines ne peuvent subir qu'une seule acétylation ou qu'une seule phosphorylation, la chaîne latérale d'une lysine peut être mono-, di- ou triméthylée et celle d'une arginine peut être mono- ou diméthylée. Cette particularité augmente considérablement le nombre de combinaisons possibles pour ces modifications le long des extrémités N-terminales des histones. De manière générale, les enzymes responsables de la méthylation des lysines portent un domaine « SET » (S(u)(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) et celles responsables de la méthylation des arginines font partie de famille des PRMT (Protein Arginine (R) N-MethylTransferase) (Zhang and Reinberg, 2001). De nombreuses études ont permis de caractériser un nombre considérable de déméthylases de lysines (Shi and Whetstone, 2007). La méthylation des lysines est donc réversible mais aucune déméthylase d'arginine n'a été identifiée à ce jour. Le degré de méthylation d'une lysine ou d'une arginine dépend d'un équilibre entre les activités des « Histone-MéthylTransférases » (HMT) et des déméthylases ou des désaminases d'histones.

La méthylation des histones et l'activation transcriptionnelle

Les méthylations de deux lysines de l'histone H3 sont clairement impliquées dans l'activation de la transcription. Il s'agit des lysines 4 et 36, la plus étudiée étant la méthylation de la lysine 4. Des études à grande échelle, utilisant des anticorps spécifiques, ont montré que la forme triméthylée (H3K4me3) est retrouvée spécifiquement en 5' des séquences codantes de gènes transcrits alors que les formes mono- et diméthylées sont retrouvées aux alentours de ces séquences (Barski et al., 2007; Bernstein et al., 2005; Pokholok et al., 2005b; Schneider et al., 2004). Plusieurs études d'H3K4me3 au niveau des promoteurs de gènes transcrits indiquent clairement que cette modification est une marque permettant de recruter divers facteurs nécessaires au bon déroulement de la transcription. Contrairement à la triméthylation de la lysine 4 d'H3, la di- et triméthylation de la lysine 36 d'H3 sont préférentiellement retrouvées en 3' de ces gènes et pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de la transcription (Bannister et al., 2005; Barski et al., 2007). Il a été proposé que l'enzyme nécessaire à cette modification (Set2) interagirait avec la partie C-terminal de l'ARN polymérase II (Kizer et al., 2005).

La méthylation des histones et la répression transcriptionnelle

Les méthylations de deux autres lysines de l'histone H3, les lysines 9 et 27, ainsi que la méthylation de la lysine 20 de l'histone H4, ont été associées à la répression de la transcription. La modification la mieux caractérisée est la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Elle peut être effectuée par différentes HMT, dont Suv3-9 (Rea et al., 2000) et G9a (Tachibana et al., 2001). L'utilisation d'anticorps spécifiques pour les formes mono-, di- ou triméthylée de cette lysine ont permis de déterminer où se localisent ces différentes modifications dans le noyau. Par exemple, les di- ou triméthylations (H3K9me2 ou H3K9me3) sont globalement retrouvées au niveau des gènes réprimés alors que la monométhylation (H3K9me1) est retrouvée au niveau de certains gènes transcrits (Barski et al., 2007). De plus, H3K9me2 est spécifiquement enrichie sur le chromosome X inactif des femelles mammifères (Rougeulle et al., 2004) et H3K9me3 est principalement retrouvée dans les régions d'hétérochromatine constitutive (Peters et al., 2003). En outre, H3K9me3 permet le recrutement de la protéine d'hétérochromatine HP1 (voir le chapitre sur les fonctions d'HP1) au niveau des régions d'hétérochromatine constitutive (Bannister et al., 2001b; Jacobs and Khorasanizadeh, 2002; Lachner et al., 2001a; Nakayama et al., 2001).

La méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 présente aussi une répartition spécifique en fonction de sa mono-, di- ou triméthylation. En effet, la monométhylation (H3K27me1) est fortement retrouvée dans les régions d'hétérochromatine constitutive (Peters et al., 2003) alors que la triméthylation (H3K27me3) est spécifiquement associée au chromosome X inactif des femelles mammifères (Plath et al., 2003; Rougeulle et al., 2004; Silva et al., 2003). De manière similaire au recrutement d'HP1 par H3K9me3, la triméthylation de H3K27 est reconnue spécifiquement par le chromodomaine de la protéine Polycomb (Fischle et al., 2003; Min et al., 2003) et participe ainsi au recrutement de nombreuses protéines du groupe Polycomb. Enfin, les mono-, di- et triméthylations de la lysine 20 de l'histone H4 sont elles aussi localisées différemment et pourraient avoir des fonctions bien distinctes. Ainsi, alors que la triméthylation (H4K20me3) est associée à l'hétérochromatine constitutive, où elle jouerait un rôle dans la répression transcriptionnelle (Karachentsev et al., 2005; Schotta et al., 2004), la monométhylation (H4K20me1) est retrouvée au niveau des promoteurs des gènes transcrits (Barski et al., 2007; Talasz et al., 2005). Les fonctions des différentes méthylations des arginines des histones restent encore mal caractérisées. Toutefois, il a récemment été montré chez la levure que la diméthylation de l'arginine 2 de

l'histone H3 est associée aux régions d'hétérochromatine ainsi qu'aux gènes réprimés (Kirmizis et al., 2007).

1.2.3 La méthylation de l'ADN

La molécule d'ADN peut elle aussi être méthylée. La méthylation de l'ADN la mieux caractérisée est celle du carbone 5 des cytosines du dinucléotide CpG, qui forme une « mini » séquence palindromique CG/GC dont les deux cytosines peuvent être méthylées de manière symétrique sur l'ADN double-brins. Chez de nombreuses espèces, les CpG sont souvent retrouvés en groupes ou « îlots », localisés en 5' des gènes (Takai and Jones, 2002). Il est important de noter que si les deux cytosines d'un palindrome CG/GC sont méthylées dans une cellule mère, cette modification sera en partie héritée par les deux cellules filles après la réplication du génome et la mitose. En effet, chaque cellule fille hérite alors de l'un des deux CpG méthylés de la cellule mère, formant une séquence CG/GC hémi-méthylée qui ne portera qu'une seule cytosine méthylée. Il existe deux types d'enzymes permettant la méthylation des cytosines : la méthylation de novo et la méthylation de maintien, qui permet de compléter la méthylation d'une séquence palindromique CG/GC hémi-méthylée (pour revue, voir (Bird, 2002; Miranda and Jones, 2007)). Ce deuxième type d'enzyme explique comment la méthylation de l'ADN est propagée au cours des divisions cellulaires.

La méthylation des CpG est catalysée par des enzymes appelées DNMTs (DNA MethylTransferases). Elle est globalement associée à la répression transcriptionnelle. Ces modifications peuvent directement affecter la conformation de l'ADN et/ou bloquer le recrutement de facteurs de transcription. Elles permettent aussi le recrutement de protéines portant un domaine MBD (Methyl-DNA Binding Domain) qui sont souvent associées à la répression des gènes ou à la formation de l'hétérochromatine.

D'un point de vue fonctionnel, la méthylation de l'ADN a surtout été décrite chez les mammifères, où elle est impliquée dans de nombreux processus du développement, tels que la mise en place de l'empreinte parentale (Edwards and Ferguson-Smith, 2007), la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse (Reik et al., 2001) ou l'inactivation du chromosome X (Heard, 2005). Chez la drosophile, la méthylation des cytosines a longtemps été considérée comme inexistante jusqu'à ce qu'une méthylase d'ADN soit identifiée par l'analyse de la séquence du génome (Tweedie et al., 1999). Depuis, une très faible

méthylation des cytosines a été décrite dans cet organisme, principalement retrouvée dans l'embryon (Lyko et al., 2000). Globalement, il existe des différences de degré de méthylation et de nucléotide méthylé entre les différents organismes.

Chez la drosophile, la méthylation des cytosines a longtemps été considérée comme inexistante jusqu'à ce qu'une méthylase d'ADN soit identifiée par l'analyse de la séquence du génome (Tweedie et al., 1999). Depuis, une très faible méthylation des cytosines a été décrite dans cet organisme, principalement retrouvée dans l'embryon (Lyko et al., 2000). Globalement, il existe des différences de degré de méthylation et de nucléotide méthylé entre les différents organismes.

II. La protéine d'hétérochromatine 1 (HP1)

II.1 La variéation par effet de position

De nombreuses protéines non-histones participent à la dynamique de la structure chromatinienne. Une des plus étudiées et des mieux caractérisées est la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1). Ce sont les travaux pionniers de Joel Eisenberg et Sarah Elgin chez la drosophile qui ont éclairés la fonction de cette protéine. Le gène codant la protéine HP1 chez la drosophile a dans un premier temps été isolé comme un locus suppresseur de variéation par effet de position (PEV). Ce phénomène fut découvert dans les années 1930 par l'équipe d'Hermann Muller grâce à l'étude de réarrangements chromosomiques obtenus par irradiation de drosophiles (Schultz, 1936). L'exemple le plus classique de variéation est l'inversion chromosomique $In(1)w^{m4}$, dans laquelle le gène *white*, nécessaire pour la synthèse d'un pigment rouge exprimé dans les cellules de l'œil, est placé à proximité des régions péri-centriques du chromosome X. Le modèle le plus couramment utilisé pour expliquer ce phénomène est que la proximité des régions péri-centriques induit une propagation en *cis* de la structure hétérochromatique. Il en résulte une mise en silence stochastique du gène *white*. Les mouches présentent ainsi des yeux composés d'une mosaïque de cellules plus ou moins rouges illustrant la variabilité du niveau d'expression du gène *white*.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents au PEV, des cribles génétiques ont permis l'identification de gènes dont les mutations augmentaient ou supprimaient ce

phénomène. Le clonage d'un de ces locus, le locus *Su(var)205*, a montré qu'il correspondait à des mutations du gène codant la protéine HP1 (Eissenberg et al., 1990). HP1 avait été identifiée un peu plus tôt comme étant un composant de l'hétérochromatine (James and Elgin, 1986). Il est intéressant de noter que le phénomène de variéation est particulièrement sensible à la dose d'HP1 puisque qu'une diminution de moitié de la dose d'HP1 supprime ce phénomène alors que l'augmentation d'une dose l'amplifie (Eissenberg et al., 1992). La nature essentielle d'HP1 a depuis été analysée et la létalité due à sa perte de fonction semble majoritairement due à la formation d'aberrations chromosomiques (fusion des télomères) illustrant le rôle important d'HP1 dans la protection de l'intégrité des télomères (Fanti et al., 1998b; Kellum and Alberts, 1995).

II.2 Structure des protéines de la famille HP1

La plupart des organismes étudiés possèdent une à cinq isoformes d'HP1 (Lorentz et al., 1994; Saunders et al., 1993; Singh et al., 1991; Smothers and Henikoff, 2001b; Ye and Worman, 1996). Ainsi, la levure *S. pombe* et le champignon *Neurospora crassa* n'expriment qu'une isoforme d'HP1 alors que les mammifères en expriment trois et la drosophile cinq. Ces isoformes sont nommés HP1 α , HP1 β et HP1 γ chez les mammifères et HP1a, HP1b, HP1c, HP1d et HP1e chez la drosophile (Lomber et al., 2006b). Enfin, aucun homologue d'HP1 n'est retrouvé chez la levure *S. cerevisiae* mais les protéines Sir (Silent regulatory), qui jouent un rôle dans la répression transcriptionnelle au cours de PEV ainsi que dans la formation de régions d'hétérochromatine, pourraient représenter les homologues fonctionnels d'HP1 dans cet organisme (pour revue, voir (Moazed, 2001)). Les protéines de la famille d'HP1 sont relativement petites (15-35 kDa). Elles contiennent deux domaines protéiques très conservés, le « chromodomaine » (chromosome organization modifier) en N-terminal et le « chromo-shadowdomaine » en C-terminal. Un domaine charnière (ou « hinge »), beaucoup moins bien conservé, relie ces deux domaines.

Le chromodomaine permet à HP1 d'être recrutée au niveau de la chromatine. En effet, ce domaine d'environ 50 acides aminés interagit très spécifiquement avec la lysine 9 méthylée de l'histone H3 (Bannister et al., 2001b; Lachner et al., 2001a; Nakayama et al., 2001), principalement retrouvée dans les régions d'hétérochromatine constitutive. Cette interaction est plus forte *in vitro* lorsque H3K9 est triméthylée que lorsqu'elle est mono- ou diméthylée (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). Le chromodomaine est essentiel à la fonction d'HP1 au cours du PEV. En effet un allèle portant une mutation dans ce domaine

présente le même effet suppresseur de variéation que la perte de fonction totale de Su(var)205, vraisemblablement en empêchant le recrutement d'HP1 aux chromosomes (Jacobs et al., 2001; Platero et al., 1995).

Le chromo-shadowdomaine permet à HP1 d'interagir avec de nombreuses protéines nucléaires impliquées dans la dynamique du génome (pour revue, voir (Hiragami and Festenstein, 2005)). Ce domaine a une structure très similaire à celle du chromodomaine mais, contrairement à ce dernier, il peut se dimériser (Brasher et al., 2000; Cowieson et al., 2000). Un dimère de chromo-shadowdomains peut fixer un motif peptidique PxVxL (Proline ; Valine ; Leucine ; x indique n'importe quel acide aminé), motif retrouvé dans de nombreuses protéines avec lesquelles HP1 interagit (Smothers and Henikoff, 2000; Thiru et al., 2004).

Certaines protéines qui interagissent avec HP1 ne possèdent pas de domaine PxVxL. C'est le cas d'HP2 (Heterochromatin Protein 2), qui est elle aussi impliquée dans la répression transcriptionnelle au cours du PEV (Shaffer et al., 2002). HP2 interagit physiquement avec HP1 grâce à deux motifs peptidiques séparés par une vingtaine d'acides aminés (Stephens et al., 2005).

Le troisième domaine d'HP1, le domaine charnière, est beaucoup moins conservé entre les espèces et entre les différentes isoformes au sein d'une même espèce. Toutefois, alors que ce domaine est peu structuré, sa séquence protéique et/ou sa phosphorylation pourrait diriger les localisations spécifiques des différentes isoformes d'HP1 sur les chromosomes et ses interactions avec d'autres protéines (Badugu et al., 2005; Lomberk et al., 2006a; Smothers and Henikoff, 2001b). Certaines études suggèrent que le domaine charnière pourrait permettre à HP1 d'interagir avec les acides nucléiques, notamment l'ARN (Meehan et al., 2003; Muchardt et al., 2002).

II.3 Localisation nucléaire d'HP1

Alors que son nom la désigne comme une protéine spécifique de l'hétérochromatine, certaines isoformes d'HP1 peuvent être retrouvées dans des régions d'euchromatine. Ainsi, chez les mammifères, des marquages immunofluorescents montrent que les isoformes HP1 α et HP1 β sont majoritairement présentes au niveau des centromères alors que l'isoforme HP1 γ est à la fois présente dans des régions d'euchromatine et d'hétérochromatine (Furuta et al., 1997; Minc et al., 1999; Minc et al., 2000). Chez la drosophile, les localisations des

trois isoformes d'HP1 les mieux décrites varient aussi le long des chromosomes. Ainsi, sur des chromosomes polytènes, HP1a est principalement retrouvée au niveau des télomères et du chromocentre, une structure regroupant les centromères de tous les chromosomes dans les noyaux de certaines cellules, dont les cellules des glandes salivaires de la larve qui sont polyplœides (Fanti et al., 1998a). Si l'isoforme HP1c est localisée au niveau de régions d'euchromatine, HP1b est quant à elle retrouvée à la fois sur les fibres d'hétérochromatine et d'euchromatine (Brower-Toland et al., 2007; Smothers and Henikoff, 2001b).

L'un des facteurs pouvant réguler la localisation des protéines HP1 est leur interaction avec l'enveloppe nucléaire. En effet, même si la fonction d'une telle régulation n'est pas claire, plusieurs études suggèrent une interaction dynamique entre la lamine B de la membrane nucléaire et HP1 α ou HP1 γ (Kourmouli et al., 2000; Ye and Worman, 1996). Par ailleurs, les isoformes HP1 α , HP1 β et HP1 γ se séparent des chromosomes lorsqu'ils sont condensés au cours de la mitose (Fischle et al., 2005), indiquant que la localisation des protéines HP1 varie aussi au cours du cycle cellulaire. Enfin, des expériences de « photoblanchiment » (ou FRAP, pour Fluorescence Recovery After Photo-bleaching) réalisées sur des protéines HP1 fluorescentes montrent qu'elles sont plutôt mobiles dans la chromatine (Cheutin et al., 2003b; Festenstein et al., 2003b). Ce résultat suggère que la stabilité apparente de l'hétérochromatine résulte en fait d'interactions dynamiques entre des facteurs non-histones et les nucléosomes.

II.4 Les multiples fonctions d'HP1

L'ensemble des études visant à caractériser la fonction des isoformes d'HP1 indique que ces protéines possèdent plusieurs fonctions distinctes, dont notamment la formation de « plateformes » qui pourraient permettre de recruter diverses protéines de la chromatine au niveau de certaines régions du génome.

II.4.1 Fonctions d'HP1 au niveau de l'hétérochromatine et de la répression transcriptionnelle

Le rôle le mieux caractérisé des isoformes d'HP1 est leur implication dans la structure de l'hétérochromatine, qui est généralement associée à une répression transcriptionnelle. Par exemple, des expériences dans des cellules de mammifères en culture montrent que certaines isoformes d'HP1, qui n'ont pas pu être différenciées, sont recrutées au niveau du promoteur du gène de la Cycline E lorsque celui-ci est réprimé par la protéine Rb

(Retinoblastoma) (Nielsen et al., 2001). Une autre étude montre que la répression d'un gène rapporteur, localisé dans l'euchromatine, est corrélée à sa re-localisation dans une région d'hétérochromatine ainsi qu'au recrutement d'HP1 α à son promoteur (Ayyanathan et al., 2003). Cette répression transcriptionnelle apparaît très stable puisqu'elle est maintenue au cours de nombreuses divisions cellulaires en absence du signal répresseur (Ayyanathan et al., 2003). Chez la drosophile, le recrutement artificiel d'HP1 α dans certaines régions où la transcription est active peut être suffisant pour induire une répression transcriptionnelle de type PEV dans ces régions (Li et al., 2003; Seum et al., 2001).

Le modèle actuellement le plus plausible expliquant la formation d'une région d'hétérochromatine est fondé sur l'existence d'une « boucle » de stabilisation qui permet le recrutement des isoformes d'HP1 associées à l'hétérochromatine et de l'histone-méthyltransférase Suv3-9. Ce modèle propose un mécanisme en deux temps. Dans un premier temps, Suv3-9 méthylerait H3K9 dans la région d'hétérochromatine en cours de formation et recruterait HP1. HP1 serait ensuite maintenue au niveau de cette région par son interaction avec H3K9me. Dans un second temps, cette isoforme d'HP1 recruterait de nouvelles protéines Suv3-9 qui méthyleraient à leur tour les H3K9 adjacentes de manière à recruter de nouvelles protéines HP1 dans ces régions. Ces deux étapes se succèderaient ainsi pour étendre la région d'hétérochromatine.

*Plusieurs données expérimentales soutiennent ce modèle. Ainsi, il a été montré que l'isoforme HP1 α de drosophile et les trois isoformes d'HP1 des vertébrés interagissent *in vivo* avec Suv3-9 (Schotta et al., 2002; Stewart et al., 2005; Yamamoto and Sonoda, 2003). De plus, chez la drosophile, ces protéines co-localisent au niveau de régions d'hétérochromatine des chromosomes polytènes (Schotta et al., 2002). En outre, l'absence de Suv3-9 chez la drosophile induit une forte diminution de la méthylation d'H3K9 dans les régions d'hétérochromatine constitutive et perturbe fortement le recrutement d'HP1 α (Schotta et al., 2002). Réciproquement, l'absence d'HP1 α perturbe fortement le recrutement de Suv3-9 (Schotta et al., 2002). Ces deux protéines semblent avoir une fonction similaire dans la répression transcriptionnelle puisque, chez la drosophile, les pertes de fonction des gènes *Su(var)3-9* (codant Suv3-9) ou *Su(var)205* (codant HP1 α) induisent chacune une suppression de PEV (Schotta et al., 2002). Par ailleurs, chez la drosophile, la formation de l'hétérochromatine est corrélée à la phosphorylation d'HP1 α (Eissenberg et al., 1994; Zhao and Eissenberg, 1999), suggérant que la formation de régions d'hétérochromatine pourrait nécessiter certaines modifications post-traductionnelles des isoformes d'HP1.*

*Outre cette coopération entre certaines isoformes d'HP1 et Suv3-9, plusieurs études indiquent que la méthylation d'H3K9, le recrutement de Suv3-9 et/ou le recrutement d'une isoforme d'HP1, favorisent le recrutement de différents facteurs jouant un rôle dans la répression transcriptionnelle et dans la formation de l'hétérochromatine. Ainsi, Suv3-9 interagit *in vitro* avec plusieurs histone-déacétylases, dont les activités de déacétylation des histones favorisent la méthylation de l'histone H3 par Suv3-9 (Czermin et al., 2001; Vaute et al., 2002). En outre, H3K9me et/ou HP1 α/β peuvent être nécessaires pour recruter des méthylases d'ADN (Freitag et al., 2004; Smallwood et al., 2007; Tamaru and Selker, 2001).*

II.4.2 Fonction des protéines HP1 dans la structure des chromosomes

En plus du rôle d'HP1 et de Suv3-9 dans l'établissement de l'hétérochromatine, ces protéines sont aussi impliquées dans la cohésion des centromères et des régions du génome composées d'hétérochromatine constitutive. Ainsi, l'absence de Swi6, l'homologue d'HP1 chez la levure *S. pombe*, induit des défauts de ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Bernard et al., 2001; Ekwall et al., 1995). De même, l'absence de Suv3-9 chez la souris induit des défauts de ségrégation des chromosomes au cours de la méiose (Peters et al., 2001b). Cette fonction des protéines HP1 dans la ségrégation des chromosomes pourrait être liée à leur interaction avec la Cohésine, qui a pour le moment été caractérisée chez la levure (Nonaka et al., 2002). En effet, dans cet organisme, la cohésine est un complexe nécessaire à la « cohésion » entre les deux chromatides sœurs au cours de la mitose et les délétions des gènes codant ses sous-unités induisent des défauts de ségrégation des chromosomes (Tomonaga et al., 2000).

Chez la drosophile, HP1a est aussi retrouvée au niveau des télomères des chromosomes. L'une des fonctions d'HP1a serait de contribuer à la répression transcriptionnelle de ces séquences, bloquant ainsi l'élongation des télomères (Savitsky et al., 2002). Toutefois, la présence d'HP1a au niveau des télomères ne dépend pas de la présence des séquences télomériques puisque cette protéine est présente au niveau des extrémités de chromosomes dont les télomères ont été tronqués. En outre, l'absence d'HP1a chez la drosophile induit de nombreuses fusions de télomères, générant une forte instabilité génomique (Fanti and Pimpinelli, 2008). L'analyse phénotypique de différents mutants d'HP1a chez la drosophile suggère que cette protéine serait recrutée aux télomères en deux temps (Perrini et al., 2004). Dans un premier temps, une interaction directe entre HP1a et l'ADN télomérique, indépendante du chromodomaine d'HP1a, permettrait son recrutement au télomère (*capping*). Dans un second temps, cette interaction permettrait le recrutement de Suv3-9 dans ces régions pour former une structure d'hétérochromatine. Ces observations suggèrent un mécanisme de ciblage d'HP1a au niveau de certaines régions génomiques, indépendamment des modifications post-traductionnelles des histones via une interaction directe avec les acides nucléiques, non spécifique de la séquence.

II.4.3 Fonction d'HP1a dans l'activation transcriptionnelle chez la drosophile

De manière intrigante, et en contraste avec le lien étroit mis en évidence entre certaines isoformes d'HP1 et l'hétérochromatine, ces protéines ne jouent pas uniquement un rôle

dans la répression transcriptionnelle. En effet, la perte de fonction d'HP1a chez la drosophile induit clairement une diminution d'expression des gènes *rolled* et *light* localisés dans des régions d'hétérochromatine (Lu et al., 2000). Toutefois, il est possible qu'une telle fonction d'HP1a dans l'activation transcriptionnelle au sein de l'hétérochromatine ne soit pas directe mais liée à la répression, par le biais d'HP1a, d'un facteur qui réprime normalement ces deux gènes. Outre cette fonction « contradictoire » au sein de l'hétérochromatine, HP1a semble aussi jouer un rôle non négligeable dans l'activation transcriptionnelle de certains gènes de l'euchromatine. En effet, l'activation d'un gène de réponse au choc thermique peut induire le recrutement d'HP1a à ce gène chez la drosophile (Piacentini et al., 2003). De plus, des études à l'échelle du génome de la drosophile montrent que de nombreuses séquences codantes de gènes exprimés sont enrichies en HP1a (Cryderman et al., 2005; de Wit et al., 2007). Ainsi, ces observations montrent que le rôle d'HP1a dans le contrôle de l'expression du génome chez la drosophile est sans doute plus subtil qu'il n'en a l'air.

II.4.4 Les protéines HP1 interagissent avec de nombreuses protéines

Le chromo-shadowdomaine permet aux protéines HP1 d'interagir avec de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes ou dans la dynamique de la chromatine. Ainsi, les différentes isoformes d'HP1 peuvent interagir avec des protéines impliquées dans la ségrégation des chromosomes (INCENP), dans la régulation de la transcription (TAFII130), dans des processus de réplication (ORC), de réparation (Ku70) ou dans l'assemblage des nucléosomes (CAF-1) (pour revue, voir (Hiragami and Festenstein, 2005; Lomberk et al., 2006b)). Une telle diversité de partenaires interagissant avec HP1 suggère que, une fois ancrées à la chromatine, les protéines HP1 constituent des « plateformes » sur lesquelles de nombreux facteurs peuvent être recrutés, de manière modulable en fonction du contexte. De manière intéressante, le chromo-shadowdomaine des protéines HP1 peut se dimériser et ainsi former des dimères d'HP1 (Brasher et al., 2000; Cowieson et al., 2000). Cette particularité suggère que les dimères d'HP1 peuvent être composés de la même isoforme (homodimères) ou de deux isoformes différentes (hétérodimères). De plus, on peut supposer qu'il existe de nombreuses combinaisons d'interactions entre les isoformes d'HP1 dans une même région génomique (*en cis*) mais aussi entre plusieurs régions génomiques distantes (*en trans*), de manière à affecter l'organisation nucléaire.

II.4.5 Les différents paralogues d'HP1 chez la drosophile

Le génome de *D. melanogaster* code cinq paralogues d'HP1 et probablement un sixième qui a perdu son chromodomaine récemment au cours de l'évolution (Vermaak and Malik, 2009). Ces isoformes ont été nommés HP1a, HP1b, HP1c, HP1d, HP1e et HP6 (HP1a étant la première décrite comme suppresseur de variéation et codée par le gène *Su(var)205*). La caractérisation de ces paralogues est restée longtemps un domaine peu exploré mais des études récentes commencent à lever le voile sur les fonctions partagées et divergentes des protéines constituant cette famille.

Une première étude analysant la localisation nucléaire de ces différents isoformes sur des cellules en culture a permis de mettre en évidence des localisations extrêmement différentes entre ces protéines (Smothers and Henikoff, 2001a; Vermaak et al., 2005). Bien qu'HP1a et HP1d soient recrutées spécifiquement dans les régions hétérochromatiques, HP1c est principalement localisé dans l'euchromatine et HP1b montre une distribution intermédiaire, à la fois dans l'hétérochromatine et l'euchromatine. L'analyse du profil d'expression montre par ailleurs que HP1a, HP1b et HP1c sont exprimées de manière ubiquiste alors que HP1d et HP1e sont plus spécifiquement exprimées dans la lignée germinale, chez la femelle pour HP1d et le mâle pour HP1e (Vermaak et al., 2005).

Enfin, les analyses phylogénétiques des paralogues d'HP1 réalisées sur les chromo- ou chromoshadowdomaine ainsi que les informations données par le séquençage de 12 espèces de drosophiles montrent une très large diversité qui pourrait expliquer la divergence de fonction des paralogues d'HP1 (Vermaak and Malik, 2009).

La déplétion d'HP1b induit une dérégulation transcriptionnelle importante (Zhang et al., 2011). Le recrutement dirigé d'HP1c au promoteur de gènes rapporteurs indique qu'elle aurait plutôt un rôle positif sur la transcription, en accord avec sa localisation euchromatique (Font-Burgada et al., 2008). En outre, bien que le chromodomaine d'HP1c soit capable *in vitro* d'interagir avec l'histone H3 méthylée sur la lysine 9, sa localisation semble liée à la présence de facteurs de transcription dans des régions relativement pauvres pour cette marque (Font-Burgada et al., 2008).

III. LES CHAPERONS D'HISTONES

De nombreuses études montrent que l'organisation de la chromatine est extrêmement dynamique. Ainsi, au cours de la vie cellulaire, les protéines chromatiniennes

et notamment les histones ne restent pas nécessairement associées de manière continue à l'ADN. Les histones nouvellement synthétisées, par exemple, doivent être prises en charge et transportées à leur site d'incorporation alors que les histones endommagées doivent être enlevées et dégradées. De plus, divers processus, tels que la transcription, la réplication ou la réparation nécessitent vraisemblablement une éviction transitoire des histones pour accéder à la molécule d'ADN. Enfin, les histones sont des protéines fortement basiques et leur accumulation peut être toxique pour la cellule. Tous ces problèmes sont la raison d'être des chaperons d'histone : ce groupe de molécules escorte les histones depuis le cytoplasme, empêche toute interaction néfaste avec d'autres facteurs et participe à l'incorporation des histones dans la chromatine au moment opportun.

Les chaperons d'histones se définissent donc comme des facteurs s'associant à des histones stimulant des réactions impliquant un transfert d'histone (de chaperon à chaperon ou directement l'incorporation dans la chromatine) sans faire partie du produit final. De nombreux chaperons ont été identifiés et associés à des fonctions cellulaires précises (pour revue, voir (De Koning et al., 2007)). Dans ce chapitre, je détaillerai les différents rôles des protéines chaperons d'histones ASF1 (anti-silencing function 1), HIRA (histone regulatory A) et plus particulièrement le complexe protéique CAF-1 (chromatin assembly 1) dans la dynamique de la chromatine.

III.1 Le chaperon ASF1

III.1.1 Un donneur d'histone pour l'assemblage de la chromatine

*La protéine ASF1 fut d'abord isolée par crible génétique visant à identifier des gènes dont la surexpression réprime la mise en silence des loci particuliers chez la levure bourgeonnante, d'où son nom d'*anti-silencing function 1* (Le et al., 1997). Le rôle de chaperon d'histone de la protéine ASF1 fut clairement mis en évidence par la suite par la purification, chez la drosophile, d'un complexe nommé RCAF (pour Replication-Coupling Assembly Factor) composé des histones H3-H4 et de l'homologue d'ASF1 (Tyler et al., 1999). Ce complexe n'est pas intrinsèquement capable d'assembler des dimères H3/H4 sur l'ADN. En revanche il stimule leur incorporation par un autre chaperon d'histone: CAF-1.*

*Par ailleurs, une interaction entre ASF1 et la sous-unité moyenne du complexe CAF-1 a été mise en évidence chez la drosophile, l'homme et la levure *S. cerevisiae* (Mello et al., 2002; Tyler et al., 2001). ASF1 interagit également avec le chaperon HIRA (pour Histone*

Regulatory A), un facteur d'assemblage dont l'activité est indépendante de la réplication (Tagami et al., 2004).

La purification, à l'aide d'histones étiquetées, des complexes contenant les variants d'histones H3.1 et H3.3 non encore incorporés confirme qu'ASF1 fait partie des voies d'assemblage de la chromatine des histones canoniques et de remplacement (Tagami et al., 2004). La présence d'ASF1 au sein de ces complexes et son incapacité à incorporer ces histones dans la chromatine suggèrent que ce chaperon pourrait servir de fournisseur d'histones pour CAF-1 et HIRA. Ces deux derniers assureraient alors l'incorporation des dimères H3-H4 dans la chromatine par des mécanismes distincts. (Tagami et al., 2004).

III.1.2 Rôle d'ASF1 au cours de la réplication

La réplication est une étape charnière de la dynamique de la chromatine puisque la progression de la fourche nécessite l'éviction des nucléosomes placés en amont et un réassemblage en aval sur les brins nouvellement synthétisés. ASF1 apparaît comme un excellent candidat pour assurer l'éviction des nucléosomes. En effet, des analyses biochimiques et structurales suggèrent qu'ASF1 peut disloquer un tétramère (H3-H4)₂ en deux dimères H3-H4 (English et al., 2006; Natsume et al., 2007). De plus, ASF1 a été copurifiée avec les hélicases MCM (*minichromosome maintenance*) chargées de séparer les deux brins d'ADN en amont de la fourche de réplication (Groth et al., 2007). Enfin, la déplétion d'ASF1 entraîne une accumulation des cellules en phase S, illustrant ainsi un allongement significatif de la phase S (Groth et al., 2007). Ces résultats indiquent que le chaperon ASF1 pourrait être recruté par les MCM et participer au désassemblage des nucléosomes en amont de la fourche de réplication.

III.2 Le complexe HIRA

III.2.1 L'assemblage de la chromatine indépendant de la réplication

Tout comme ASF1, les protéines de la famille Hir ont d'abord été identifiées chez la levure (Sherwood & Osley 1991) avant que des homologues soient mis en évidence dans la plupart des organismes, notamment chez l'homme (Lamour et al., 1995), la drosophile (Kirov et al., 1998) et le xénope (Ray-Gallet et al., 2002). Cependant, le complexe Hir identifié chez *S. cerevisiae* contient quatre sous-unités Hir1, Hir2, Hir3 et Hpc2 alors que la plupart des eucaryotes expriment un complexe trimérique composé de HIRA, qui porte à la

fois les domaines fonctionnels de Hir1 et Hir2, et les protéines Cabine 1 et Ubinucléine 1/2, les homologues respectifs de Hir3 et Hpc2.

L'utilisation des extraits d'oeufs de *Xénope* a été très utile pour évaluer la capacité des chaperons d'histones à fonctionner comme de vrais facteurs d'incorporation d'histones *in vivo*. Lorsqu'ils sont déplétés en une protéine impliquée dans la déposition des histones, ces extraits perdent leur capacité à promouvoir l'assemblage de la chromatine, mais cette propriété peut être restaurée par l'addition de la protéine manquante (Ray-Gallet and Almouzni, 2004). Cette méthode fut utilisée avec succès pour identifier la protéine HIRA (Histone Regulator A) comme un facteur de déposition des histones H3-H4 de manière indépendante de la synthèse d'ADN (Ray-Gallet et al., 2002). Cette fonction est conservée chez la levure (Green et al, 2005; Sharp et al, 2001). Alors que CAF-1 fonctionne spécifiquement dans l'assemblage des nouvelles histones H3.1-H4 de façon couplée à la réplication (voir chapitre III.3), HIRA permet l'incorporation des histones H3.3-H4 sous forme de dimères de façon indépendante à la réplication (Tagami et al, 2004). Des études récentes suggèrent qu'HIRA participe à l'incorporation d'H3.3 plus spécifiquement au niveau des régions géniques, mais non au niveau des régions répétées telles que les télomères (Elsaesser et al, 2010; Goldberg et al, 2010). De plus, au cours du développement de la *Drosophile*, HIRA joue aussi un rôle essentiel pour l'assemblage d'H3.3 dans la chromatine du génome paternel lors de la fécondation (Bonnefoy et al, 2007).

III.2.2 Importance fonctionnelle d'HIRA au cours de l'embryogenèse

La fécondation déclenche d'importants changements de la structure chromatinienne du génome paternel transmis par le spermatozoïde. De nombreuses étapes impliquant une décondensation de ce noyau et l'échange des protamines par des histones fournies par le cytoplasme de l'ovocyte sont nécessaires pour permettre le développement correct de la cellule œuf. L'étude d'un mutant ponctuel du gène codant la protéine HIRA chez la *drosophile* a permis de mettre en évidence un rôle essentiel de ce chaperon dans ce processus (Loppin et al. 2005). Ainsi, la protéine HIRA d'origine maternelle, exprimée dans le cytoplasme de l'ovocyte, s'accumule dans le pro-noyau mâle après la fécondation. Contrairement aux embryons sauvages, les embryons de femelles homozygotes mutantes pour HIRA n'incorporent pas le variant H3.3 dans ce pro-noyau en formation. Ce défaut d'incorporation, associé à l'absence de décondensation du noyau mâle entraîne le développement d'embryons haploïdes qui meurent en fin d'embryogenèse (Loppin et al. 2005).

III.3 Le complexe protéique CAF-1

Le facteur d'assemblage de la chromatine CAF-1 (Chromatin Assembly Factor-1) a été initialement isolé à partir d'extraits de cellules humaines pour sa capacité à assembler *in vitro* des nucléosomes sur l'ADN d'un minichromosome portant l'origine de réplication du virus simien SV40 (Smith & Bruce Stillman 1989). Une étude ultérieure a permis de préciser le rôle de CAF-1 dans ce processus puisque ce complexe n'assemble pas des nucléosomes entiers, il n'est responsable que de l'incorporation des histones H3 et H4 sur l'ADN nouvellement synthétisé (Smith & Bruce Stillman 1991b). D'autres chaperons sont ensuite requis pour assembler les histones H2A et H2B dans un mécanisme indépendant de CAF-1.

III.3.1 Structure et domaines des sous-unités de CAF-1

La caractérisation biochimique de CAF-1 a montré que ce complexe est composé chez l'homme de trois sous-unités nommées P150, P60 et P48 en raison de leurs poids moléculaires (Smith & Bruce Stillman 1991a). Des homologues de ce complexe ont été identifiés et caractérisés chez la levure *S. cerevisiae* (Kaufman et al. 1995), la drosophile (Kamakaka et al. 1996), le xénope (Gaillard et al. 1996), la souris (Murzina et al. 1999), la plante *Arabidopsis Thaliana* (H Kaya et al. 2001) et le poulet (Takami et al. 2007) et des analyses *in vitro* ont permis de montrer que la capacité d'assemblage de la chromatine couplée à la réplication est conservée chez toutes ces espèces.

Cependant, malgré une importante conservation de fonction, la conservation de séquence est relativement faible notamment pour les deux plus grandes sous-unités. Par exemple, les sous-unités moyennes et grandes de drosophile présentent une identité de 38% et 26% respectivement avec leurs homologues humains. Il faut par ailleurs noter que chez la drosophile, la sous-unité moyenne est présente sous deux formes, une forme de 105kDa et une autre forme de 75kDa correspondant aux trois quart N-terminaux de P105 (Tyler et al. 2001). La petite sous-unité est bien mieux conservée, probablement en raison du fait qu'elle n'est pas spécifique de CAF-1 et participe à la formation de nombreux complexes impliqués dans la dynamique de la chromatine comme le complexe de remodelage de la chromatine NURF (NUcleosome Remodeling Factor) (Martínez-Balbás et al. 1998), ou encore le

complexe Polycomb Repressing Complex 2 (PRC2) associé à la répression transcriptionnelle par les protéines du groupe Polycomb (Tie et al. 2001).

Les sous-unités P48 et P60 portent toutes les deux sept répétitions WD bien conservées au cours de l'évolution. Ces domaines riches en tryptophanes (W) et acides aspartiques (D) peuvent adopter une structure en forme d'hélice apte à former des interactions protéine-protéine (Hudson & Cooley 2008). Comme indiqué précédemment, la sous-unité moyenne de CAF-1 interagit avec le chaperon ASF1 par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale (Tyler et al. 2001; Mello et al. 2002).

La grande sous-unité P150 possède deux domaines acides : KER, riche en lysines (K), acides glutamiques (E) et arginines (R) et ED, riche en acides glutamiques et aspartiques (D). Ces domaines, localisés au cœur de la protéine, créent vraisemblablement une région fortement acide capable d'interagir avec les histones qui eux sont basiques (Kaufman et al. 1995). Tout comme la sous-unité moyenne, P150 porte un domaine PEST, riche en prolines (P), acides glutamiques (E), sérines (S) et thréonine (T), qui pourrait être impliqué dans la régulation de sa stabilité (Rogers et al. 1986). La grande sous-unité interagit avec P60 par l'intermédiaire d'un domaine en C-terminal, essentiel pour l'activité correcte du complexe CAF-1 (Kaufman et al. 1995). Chez l'homme et le xénope, un domaine de dimérisation a également été identifié en C-terminal des grandes sous-unités de CAF-1 (Quivy et al. 2001). Le rôle de cette dimérisation n'est pas clair, mais pourrait contribuer à la régulation de la fonction CAF-1 au cours du cycle cellulaire par des modifications post-traductionnelles (A. Gérard et al. 2006). D'autres protéines comme les hélicases Bloom et Werner (Jiao et al. 2004; Jiao et al. 2007) ou la recombinase Dmc1 (Ishii et al. 2008) ont été identifiées comme interagissant avec la grande sous-unité de CAF-1 dans différentes espèces.

Des domaines d'interaction entre la grande sous-unité de CAF-1 et PCNA (proliferating cell nuclear antigen), l'anneau de processivité de l'ADN polymérase, ont été mis en évidence chez l'homme (Moggs et al. 2000; K.-ichi Shibahara & Bruce Stillman 1999) et pourraient permettre le ciblage du complexe CAF-1 au niveau des sites de synthèse d'ADN.

Enfin, chez les vertébrés, P150 porte un motif de type PxVxL lui permettant d'interagir avec le chromoshadowdomaine des protéines de type HP1 (Murzina et al. 1999; Takami et al. 2007). Les implications fonctionnelles de ces deux dernières interactions feront l'objet des prochains paragraphes.

III.3.2 CAF-1 et l'assemblage couplé à la synthèse d'ADN

Au cours de la réplication

Les expériences initiales sur des systèmes *in vitro* indiquent que la capacité du complexe CAF-1 à assembler la chromatine est strictement dépendante du processus de réplication (Smith & Bruce Stillman 1989). En effet, l'ajout de complexe purifié à différents temps après le démarrage de la réplication montre une importante corrélation entre la quantité de dimères H3-H4 incorporée et la durée de réplication en présence de complexe CAF-1. La purification des complexes de pré-déposition des histones dans des lignées exprimant des histones étiquetées a ensuite permis de montrer que ce complexe fait partie avec ASF1 des protéines associées à l'histone H3.1. Enfin des expériences de co-marquage permettant de détecter une co-localisation quasi parfaite entre CAF-1 et l'ADN nouvellement synthétisée ou PCNA (Krude 1995; K.-ichi Shibahara & Bruce Stillman 1999) confirment que CAF-1 est vraisemblablement impliqué *in vivo* dans l'incorporation des histones H3.1-H4 couplée à la réplication. Le recrutement de CAF-1 au niveau des fourches de réplication dépend très certainement de l'interaction entre PCNA et la grande sous-unité du complexe CAF-1. Il est important de noter que cette interaction pourrait être régulée au cours du cycle cellulaire.

Au cours de la réparation des dommages à l'ADN

La réponse aux dommages à l'ADN mobilise une importante machinerie de réparation. Or, dans les cellules eucaryotes, cette réparation doit pouvoir s'effectuer dans un contexte où le génome est organisé en chromatine. Un modèle, baptisé « Access, Repair and Restore », a été proposé pour rendre compte des importants réarrangements de chromatine nécessaires au cours de ce processus (Green & Almouzni 2002). Notamment, la région lésée doit devenir accessible aux machineries de réparation (access) et une fois réparée, elle doit retrouver une structure chromatinienne la plus proche possible de sa configuration initiale (restore). L'utilisation de systèmes modèles *in vitro* a permis de montrer que CAF-1 est capable d'assembler des nucléosomes sur un plasmide irradié au cours du processus de réparation par excision de nucléotides (Gaillard et al. 1996). Le recrutement de CAF-1 dans le cadre de ce processus de réparation est vraisemblablement similaire à celui observé au cours de la réplication puisque la réparation par excision de nucléotide nécessite une synthèse d'ADN et donc le recrutement de PCNA au niveau des foyers de réparation. Ces données ont par la suite été confirmées par l'observation *in situ* du recrutement de CAF-1 aux sites de cassures dans des cellules en culture (Martini et al. 1998; Nabatiyan et al. 2006; Moggs et al. 2000). Il est intéressant de noter que CAF-1 ne recycle vraisemblablement pas les histones au cours de ce processus. En effet, une partie des histones incorporées en réponse à des dégâts par irradiation ultra-violette portent des marques d'histones nouvellement synthétisées (Polo et al. 2006) et on ne sait actuellement

pas dans quelle mesure un tel mécanisme de restauration permet un retour à la structure chromatinienne d'origine.

III.3.3 Rôle de CAF-1 dans les différents organismes

Malgré le rôle apparemment central du complexe CAF-1 dans le maintien de la structure chromatinienne couplé à la synthèse d'ADN, les phénotypes générés par la perte de fonction des gènes codant les sous-unités de CAF-1 varient d'un organisme à l'autre ou d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même organisme. Par exemple, la perte de fonction des gènes codant les sous-unités de CAF-1 chez la levure *S. cerevisiae* n'est pas létale mais induit des défauts de répression transcriptionnelle et une hypersensibilité aux traitements génotoxiques (Kaufman et al. 1997; Enomoto & Bernat 1998). De même, l'inactivation des sous-unités moyenne et grande chez la plante *Arabidopsis thaliana* n'est pas létale mais entraîne des défauts de développement, d'organisation nucléaire et de maintien de l'intégrité du génome (Endo et al. 2006; Schönrock et al. 2006; H Kaya et al. 2001).

La perte de fonction de CAF-1 dans les différents modèles animaux induit un phénotype beaucoup plus drastique et généralement une létalité précoce de l'organisme en développement. L'injection d'ARN messagers codant la grande sous-unité humaine de CAF-1 dans des embryons de xénope induit, par exemple, un arrêt rapide du développement embryonnaire précoce (Quivy et al. 2001). L'analyse de l'impact de l'injection d'ARN codant diverses formes tronquées de la protéine a permis de montrer que cet effet est dû à la présence du domaine de dimérisation dans les grandes sous-unités de xénope et humaine permettant la formation d'un hétérodimère de ces deux sous-unités. Chez le poisson zèbre, une mutation ponctuelle du gène codant la sous-unité moyenne induit également une létalité associée à divers défauts d'organogenèse. Enfin, des embryons de souris mutants pour la grande sous-unité arrêtent leur développement au stade seize cellules et présentent d'importants défauts d'organisation nucléaire (Houlard et al. 2006).

Le phénotype de lignées mutantes pour le gène *p180*, codant la grande sous-unité du complexe CAF-1 chez la drosophile, a également été analysé. Les individus mutants présentent une létalité après 48 heures de développement larvaire associée à une réduction de la taille des larves (Song et al. 2007; Klapholz et al. 2009). En outre, la surexpression et l'obtention de clones somatiques mutants pour *p180* dans les yeux de la mouche adulte induisent de forts défauts de prolifération cellulaire montrant ainsi une importante sensibilité de ce modèle à la dose de *P180* exprimée (Song et al., 2007). Des expériences de carence nutritive ont également permis d'attribuer la létalité observée à un défaut de progression des cellules endocyclantes larvaires (Klapholz et al., 2009). Ces cellules, qui

présentent un cycle cellulaire atypique dont la phase mitotique est absente, amplifient leur génome et particulièrement dans les régions euchromatiques. L'analyse du mutant pour la grande sous-unité de CAF-1 a révélé dans ces cellules des défauts de réplication des régions euchromatiques, une accumulation de cassures d'ADN et un défaut d'organisation des nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé (Klapholz et al., 2009).

*Ces données, couplées à la mise en évidence d'une interaction génétique entre des allèles mutants des gènes *p180* et *asf1* suggèrent que la fonction d'assemblage de la chromatine du complexe CAF-1 est vraisemblablement la fonction essentielle de ce complexe chez la drosophile (Klapholz et al., 2009).*

De nombreuses expériences sur des cellules en culture ont également montré que la déplétion de la grande sous-unité du complexe CAF-1 induit un fort défaut de prolifération pouvant entraîner une létalité cellulaire (Hoek and Stillman, 2003; Houlard et al., 2006; Quivy et al., 2004; Takami et al., 2007; Ye et al., 2003). Ces études mettent en évidence des défauts d'organisation des nucléosomes

(Nabatiyan and Krude, 2004; Quivy et al., 2004; Takami et al., 2007; Ye et al., 2003), une accumulation de cellules en phase S parfois liée à l'activation de points de contrôle spécifiques de cette phase (Hoek and Stillman, 2003; Quivy et al., 2004; Takami et al., 2007), des défauts de ségrégation des chromosomes mitotiques (Takami et al. 2007) ainsi que des défauts d'organisation des régions d'hétérochromatine péricentriques (Houlard et al., 2006; Quivy et al., 2004). Il est important cependant de noter que certains de ces défauts semblent spécifiques de la déplétion de la grande sous-unité, puisque la déplétion de la sous-unité moyenne, elle aussi spécifique du complexe CAF-1, n'induit pas toujours de défaut de prolifération (Nabatiyan and Krude, 2004; Polo et al., 2006; Quivy et al., 2004). L'ensemble de ces travaux suggère que la grande sous-unité du complexe CAF-1 chez les mammifères pourrait porter une fonction essentielle pour la prolifération cellulaire indépendante du complexe CAF-1 lui-même et de son rôle canonique dans l'assemblage de la chromatine couplé à la synthèse d'ADN.

III.3.4 Rôle de la grande sous-unité de CAF-1 dans le maintien de l'hétérochromatine

Un crible double-hybride ayant pour objectif d'identifier des partenaires d'HP1 a montré que, chez la souris, cette protéine interagit de manière spécifique avec la grande

sous-unité de CAF-1, mP150 (m pour *mouse*) (Murzina et al., 1999). Cette étude a donc rapidement suggéré que la grande sous-unité de CAF-1 pourrait aussi être impliquée dans la formation et/ou le maintien d'un niveau supérieur d'organisation de la chromatine : l'hétérochromatine.

Une étude récente a permis de confirmer cette hypothèse et d'apporter un éclairage sur cette fonction spécifique de la grande sous-unité : dans un modèle de cellules murines, les déplétions de la grande sous-unité de CAF-1, mP150, ou de la sous-unité moyenne, mP60, ont des effets analogues sur la distribution des nucléosomes mais seule la déplétion de la grande sous-unité induit une accumulation de cellules en phase S (Quivy et al., 2008).

Des expériences de sauvetage ont alors permis de montrer que cette accumulation des cellules en phase S était strictement dépendante de la capacité de mP150 à interagir avec les protéines de type HP1 par l'intermédiaire de son motif PxVxL. De surcroît la déplétion de mP150 entraîne d'importants défauts de réplication spécifiques des régions d'hétérochromatine enrichies en protéines HP1 (Quivy et al., 2008). Ces données ainsi que la purification d'un complexe contenant mP150, HP1 α , HP1 γ et l'histone H3K9 méthyl-transférase SetDB1 mais dans lequel ne se trouvent ni les autres sous-unités de CAF-1 ni les histones H3 et H4 (Loyola et al., 2009; Quivy et al., 2004) suggèrent un rôle important de la grande sous-unité, indépendant du complexe CAF-1, dans le maintien des régions d'hétérochromatine au cours de la réplication dans les cellules murines.

Le rôle de la grande sous-unité du complexe CAF-1 dans le maintien de l'hétérochromatine a également été mis en évidence chez la drosophile. En effet, la déplétion de la grande sous-unité de CAF-1 chez la drosophile, P180, par des approches d'ARN interférent sur l'organisme entier montre des défauts de recrutement de nombreuses marques d'hétérochromatine dans les régions péri-centriques des chromosomes qui dépendent de la dose de P180 exprimée (Huang et al., 2010). En outre, deux allèles du gène *p180* ont un effet de suppresseur de PEV qui peut être compensé par la surexpression de la protéine HP1a. Ainsi, bien que la fonction essentielle de cette protéine chez la drosophile semble liée au rôle du complexe CAF-1 dans l'assemblage de la chromatine, la grande sous-unité de CAF-1 participe vraisemblablement aussi au maintien de la structure d'hétérochromatine, dans le cadre d'un mécanisme impliquant son interaction potentielle avec la protéine HP1a.

III.3.5 Rôle de P180 dans la ségrégation des chromosomes pendant la méiose

Afin de mieux comprendre comment la grande sous-unité de CAF-1 chez la drosophile jouerait un rôle dans la ségrégation des chromosomes homologues pendant la méiose, il convient de décrire ce processus chez la drosophile. Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire pour cette fonction particulière de P180 seront quant à eux évoqués page 83.

Déroulement de la méiose chez la drosophile

Chez la drosophile, l'ovaire est composé d'environ seize ovarioles qui sont des unités indépendantes de fabrication des ovocytes. Dans la région antérieure de chaque ovariole se trouve le germarium qui contient les cellules souches germinales. La division asymétrique de l'une d'entre elles produit une cellule souche germinale ainsi qu'un cystoblaste qui subissent encore quatre mitoses incomplètes pour former seize cellules interconnectées par des ponts intercytoplasmiques. A leur sortie du germarium, ces seize cellules sont ensuite recouvertes d'une couche de cellules somatiques, appelées cellules folliculaires pour former ainsi une structure, la chambre ovarienne, au sein de laquelle les différents types cellulaires accompliront les tâches nécessaires à la maturation de l'ovocyte.

C'est dans le germarium que s'effectue la différenciation de l'ovocyte. Les quatre mitoses incomplètes forment notamment deux cellules topologiquement identiques reliées par des ponts intercytoplasmiques à quatre autres cellules. Ces deux cellules entrent en méiose puis une de ces cellules est choisie et poursuit le programme méiotique alors que l'autre se différencie en cellule nourricière. Tous les événements précoces d'alignement progressif des chromosomes homologues et de recombinaison méiotique ont lieu à mesure que l'ovocyte progresse vers l'extrémité postérieure du germarium. Lorsque la chambre ovarienne est formée, l'ovocyte sort petit à petit du stade pachytène. Le programme méiotique chez la femelle drosophile ne présente pas de stade diplotène-diacinèse et le noyau de l'ovocyte se condense alors pour former une structure compacte appelée karyosome et reste bloqué dans cet état jusqu'à son entrée en prométaphase. Les quinze autres cellules germinales entrent dans une phase de croissance massive et subissent plusieurs cycles d'endoréplication (réplications successives du génome en absence de mitose) pour se différencier en cellules nourricières (Edgar et al. 2001).

L'étude de la transmission des caractères génétiques à la descendance et de certains aspects du processus méiotique remonte aux origines de l'étude de la drosophile comme organisme modèle. En effet, la drosophile présente de nombreux avantages qui facilitent son étude puisqu'elle est très facile à entretenir, la durée de son cycle de vie est relativement courte et chaque femelle pond un nombre important d'œufs facilitant les analyses statistiques.

La séparation des chromosomes homologues chez la drosophile

Au cours de la méiose, chez la femelle drosophile, les chromosomes homologues s'alignent en début de prophase et une structure protéique appelée complexe synaptonémal s'assemble entre les homologues et maintient cette association tout au long de la prophase. L'assemblage de ce complexe active la protéine Mei-W68 qui induit la formation de cassures double-brin le long des chromosomes. Ces cassures sont à l'origine du phénomène de recombinaison méiotique qui permet le brassage de l'information génétique dans les gamètes. La réparation de certaines de ces cassures via un mécanisme de recombinaison homologue aboutit à la formation d'un chiasma qui crée un lien physique entre les homologues, permettant leur orientation correcte sur la plaque métaphasique et leur séparation au cours de l'anaphase. Chez la femelle drosophile, les chromosomes II, III et 95% des chromosomes X ségrègent grâce à ce mécanisme dit de ségrégation chiasmatisque (McKim et al., 2002).

La femelle drosophile a également développé un mécanisme permettant de ségréger correctement des chromosomes homologues n'ayant pas recombinaison. On parle alors d'un mécanisme de ségrégation achiasmatisque. C'est notamment le cas du chromosome IV, de petite taille et largement hétérochromatique, et du chromosome X dans environ 5% des méioses. Ainsi, lorsqu'aucun chiasma ne permet de maintenir les homologues liés l'un à l'autre, l'association entre homologues est maintenue après dissolution du complexe synaptonémal, grâce à l'appariement des régions d'hétérochromatine péricentrique (Dernburg et al., 1996; Hawley and Theurkauf, 1993). L'association de ces régions constitue une étape essentielle à l'orientation et à la séparation correcte des chromosomes homologues rentrant dans la voie achiasmatisque. Pour l'heure, les mécanismes moléculaires et les facteurs rentrant en jeu lors de cet appariement sont mal compris.

Divers mécanismes moléculaires, non mutuellement exclusifs, peuvent expliquer comment cet appariement des régions péricentriques est maintenu spécifiquement entre homologues pendant la prophase (Karpen et al. 1996; Renauld et al. 1997). Le maintien de cet appariement pourrait être dû à : *i*) la reconnaissance et l'interaction directe entre séquences d'ADN homologues ou *ii*) le recrutement d'un même groupe de protéines dans les régions homologues favorisant le maintien de ces interactions en trans. De telles protéines pourraient être soit spécifiquement exprimées en méiose, soit des constituants plus général des structures hétérochromatiques qui accomplissent cette fonction particulière au cours de la prophase méiotique.

IV. RESULTATS PRELIMINAIRES OBTENUS AU LABORATOIRE

A mon arrivée au laboratoire, un allèle nul du gène p180, codant la grande sous-unité de CAF-1, avait été obtenu et le phénotype de létalité avait été décrit (Klapholz et al., 2009). Cependant, d'autres phénotypes intéressants étaient apparus au cours de l'analyse de ces mutants. Notamment, le travail de thèse de Baptiste Roelens s'était focalisé sur la caractérisation approfondie du rôle de P180 dans les divers aspects du programme méiotique chez la drosophile.

Dans cette dernière partie de l'introduction, je présenterai les résultats obtenus dans l'équipe au cours de ces cinq dernières années. Je reviendrai brièvement sur l'analyse fonctionnelle de P180 réalisée grâce aux mutants $p180^3$, et sur l'importance de la protéine P180 dans la séparation correcte des chromosomes n'ayant pas recombinaison lors de la méiose dans l'ovocyte de drosophile. Enfin, je présenterai les résultats décrivant les défauts analogues de séparation de chromosomes observés chez des femelles n'exprimant pas la protéine HP1, suggérant que la structure d'hétérochromatine est importante au cours de ce processus. A la fin de cette partie, je présenterai mes travaux qui ont permis de caractériser l'interaction de la grande sous-unité de CAF-1 murine avec la protéine HP1a de drosophile.

IV.1 Analyse du mutant $p180^3$

IV.1.1 Obtention du mutant $p180^3$

Afin d'étudier la fonction de CAF-1 chez la drosophile, Bruce Dietrich, au laboratoire, a obtenu par excision imprécise d'un élément transposable P inséré en amont du gène codant la grande sous-unité de CAF-1 ($p180$), l'allèle $p180^3$, qui porte une délétion d'environ 80% de la région codant pour la protéine P180. Alors que les embryons mutants ont un développement normal, les mâles hémizygotes $p180^3/Y$ présentent un fort défaut de croissance larvaire et meurent après environ 48 heures de développement larvaire.

IV.1.2 La contribution maternelle de P180

L'expression de la protéine P180 a été analysée par western blot dans des extraits d'embryons sauvages et de larves sauvages ou mutantes. Cette analyse montre l'existence d'une contribution maternelle de P180, fortement présente au début de l'embryogenèse et

indélectable en fin d'embryogenèse. Ces expériences montrent en outre que les larves mutantes éclosent et se développent pendant 48 heures en absence de protéine P180 zygotique détectable. En outre, l'obtention de clones germinaux mutants qui ne se développent pas montre que CAF-1 est essentiel au développement de la lignée germinale femelle au cours de l'ovogenèse.

IV.1.3 Rôle de CAF-1 dans l'organisation de la chromatine

*Connaissant la fonction biochimique de CAF-1 pour l'assemblage des nucléosomes sur l'ADN au cours de la réplication, Benjamin Klapholz a cherché à analyser l'organisation des nucléosomes dans les larves mutantes qui survivent pendant plusieurs heures en absence de protéine P180 détectable. Après 40 heures de développement larvaire, la chromatine des larves mutantes présente une altération de l'organisation des nucléosomes, particulièrement prononcée sur l'ADN nouvellement synthétisé, défaut révélé par la digestion à la Mnase (nucléase micrococcale) d'ADN de noyaux purifiés issus de mouches sauvages ou de mouches mutantes *p180*³.*

*De plus, chez les mutants *p180*³, Benjamin Klapholz a observé une baisse de l'efficacité de réplication comme en témoigne le marquage DAPI sur les cellules endocyclantes de glandes salivaires et la mesure de la quantité d'ADN par cellule. En effet, chez le mutant, les noyaux apparaissent plus petits et la quantité d'ADN répliqué plus faible, comme le montre d'une part la faible incorporation du nucléotide synthétique BrdU (Bromodéoxyuridine) chez les mutants *p180*³ et d'autre part la détection quantitative de régions spécifiques du génome.*

*Toujours en rapport avec le rôle de la grande sous-unité de CAF-1 dans l'incorporation des nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé, le marquage des extrémités 3'-OH de l'ADN des noyaux des cellules de glandes salivaires a montré une augmentation significative des cassures de l'ADN chez les mouches exprimant l'allèle nul de *p180*.*

*Enfin, la létalité des mouches et ces défauts ont été sauvés par l'expression ubiquiste en transgènèse de P180 à l'aide de la technique *Gal4/UAS* (Brand et al. 1993).*

L'ensemble de ces résultats rassemblés dans une publication (Klapholz et al., 2009) a permis de mettre en évidence le rôle de la grande sous-unité de CAF-1 dans l'organisation de la chromatine et dans l'efficacité du processus de réplication chez la drosophile.

IV.2 Analyse du rôle de P180 dans le système de ségrégation achiasmatique

IV.2.1 Défauts de ségrégation

Au cours des nombreux croisements nécessaires à l'analyse du mutant *p180*³, une ségrégation inattendue de marqueurs phénotypiques a été observée et le génotypage par PCR de ces descendants inattendus nous a permis de constater qu'ils étaient la conséquence de défauts de ségrégation méiotique du chromosome X chez les femelles hétérozygotes pour *p180*³. Un schéma de croisement permettant de suivre, à l'aide de marqueurs phénotypiques, la transmission des chromosomes sexuels a permis à Baptiste Roelens de mesurer ces défauts et de déterminer à quelle division méiotique ils avaient lieu. Les femelles hétérozygotes pour l'allèle *p180*³ présentent une augmentation faible mais significative des défauts de séparation des chromosomes homologues en première division méiotique. En outre, ces défauts sont sauvés par l'expression transgénique de P180, ce qui indique que la dose correcte de P180 est critique pour ce processus.

Ces défauts initialement observés concernent la paire de chromosomes X qui est capable de recombiner et ségrège par la voie chiasmatique dépendant de la recombinaison méiotique dans 95% des méioses et par la voie achiasmatique dans les 5% restants. Les défauts observés pouvaient donc révéler un rôle de P180 dans les voies de ségrégation chiasmatiques ou achiasmatiques. Des expériences génétiques ont permis de montrer que le processus de recombinaison méiotique n'est pas affecté par la diminution de la dose de P180 et que la voie de ségrégation chiasmatique n'était donc pas impliquée.

La ségrégation des chromosomes achiasmatiques a alors été analysée à l'aide de chromosomes balanceurs inhibant la recombinaison entre les chromosomes homologues. L'analyse montre que la ségrégation optimale des chromosomes X achiasmatiques nécessite une dose normale de P180 (2 copies du gène *p180* intact). Par ailleurs, ces défauts ne sont pas spécifiques du chromosome X puisque la ségrégation du chromosome 4 qui ne recombine pas et qui est toujours achiasmatique, montre également une dépendance à la dose de P180.

IV.2.2 Maintien de l'appariement péricentrique

Etant donné, le rôle décrit chez les mammifères de la grande sous-unité du complexe CAF-1 dans la formation et/ou le maintien de la structure d'hétérochromatine, il paraissait logique d'examiner l'étape de maintien de l'appariement des régions péricentriques

homologues, décrite comme vraisemblablement essentielle au processus de ségrégation achiasmatique.

L'organisation des régions d'hétérochromatine péricentrique et l'alignement de ces régions au cours des stades précoces (stades 2 à 5) et plus tardif (stades 6 à 10) de la prophase de méiose ont été mesurés par Baptiste Roelens. L'évaluation de l'alignement des régions péricentriques a été rendue possible par l'utilisation d'une sonde capable de détecter une séquence répétée de 359pb qui couvre 11Mb d'ADN hétérochromatique situé à proximité du centromère du chromosome X sauvage. Les mesures ont été effectuées dans un contexte homozygote pour le chromosome X et dans un contexte hétérozygote avec l'utilisation du chromosome balancier du chromosome X appelé FM7. Même si le chromosome FM7 présente de larges inversions de séquences entraînant la séparation distale de la région péricentrique incluant la région répétée de 359pb, des analyses récentes ont montré que le chromosome FM7 était capable de s'aligner dans la plupart des cas correctement avec le chromosome X sauvage. (Dernburg et al., 1996; Subramanian and Bickel, 2009).

L'analyse cytologique par hybridation *in situ* fluorescente du comportement des régions péricentriques homologues au cours de la prophase a permis à Baptiste Roelens de mettre en évidence un défaut de maintien de cet appariement ainsi que des défauts structuraux puisque ces régions présentent une décondensation caractéristique dans les ovocytes produits par les femelles homozygotes et hétérozygotes pour l'allèle *p180*³. Là encore, ces défauts d'appariement et de condensation sont strictement dépendants de la dose de P180 puisque l'expression transgénique de P180 permet de les sauver dans les femelles hétérozygotes. Plus précisément, ces observations indiquent qu'en présence d'une dose réduite de P180, l'alignement des régions péricentriques homologues se déroule correctement mais que cet alignement n'est pas maintenu aux étapes plus tardives de prophase de méiose.

IV.2.3 Rôle d'HP1a dans la ségrégation achiasmatique

Des données obtenues chez les mammifères et plus récemment chez la drosophile indiquent que la grande sous-unité du complexe CAF-1 est impliquée dans la formation et/ou le maintien de la structure d'hétérochromatine via une interaction directe avec la protéine d'hétérochromatine HP1a (Quivy et al. 2008; Huang et al. 2010). Au laboratoire, B. Roelens a analysé l'effet de la diminution de dose d'HP1a sur la ségrégation achiasmatique et le maintien de l'appariement péricentrique. L'étude s'est portée sur les

drosophiles femelles portant l'allèle $Su(var)205^5$ (allèle nul de $Su(var)205$ codant pour HP1a et (Eissenberg et al., 1992)).

De manière remarquable, les défauts observés pour ces deux processus sont du même ordre de grandeur que ceux observés pour la diminution de la dose de P180. Comme P180, la protéine d'hétérochromatine HP1a interviendrait donc pour le maintien des régions péricentriques nécessaires à la ségrégation des chromosomes homologues en première division méiotique.

IV.2.4 P150 murin : un outil pour séparer les fonctions de P180

Si l'interaction entre la grande sous-unité de CAF-1 et la protéine HP1a est importante pour la ségrégation achiasmatique, l'élimination des sites d'interaction entre les deux protéines devrait également avoir un impact sur ce processus. Lorsque j'ai rejoint le laboratoire nous avons très peu d'informations concernant l'interaction de la grande sous-unité de CAF-1 avec HP1 chez la drosophile mais en revanche, le domaine d'interaction des deux protéines murines était bien caractérisé. Malheureusement, le domaine de la grande sous-unité murine de CAF-1, mP150, permettant son interaction avec la protéine mHP1 α n'est pas conservé chez P180. Au cours de mes premiers travaux, j'ai pu observer que mP150 n'interagit pas avec la protéine HP1a de drosophile.

*Ayant sous la main une version de la grande sous-unité de CAF-1 (mP150) n'interagissant pas avec la protéine HP1a de drosophile, Baptise Roelens a choisi d'exploiter cette conservation pour étudier dans un premier temps le rôle de cette interaction *in vivo* chez la drosophile. De manière intéressante, l'expression ubiquiste de mP150 par transgénèse sauve la létalité du mutant $p180^3$. Ceci suggère que mP150 porte la fonction de P180 essentielle pour la viabilité, qui implique la fonction du complexe CAF-1 dans l'assemblage des dimères H3-H4 (Klapholz et al. 2009)*

En outre, il a été montré à l'aide d'un modèle de variévation par effet de position que l'expression de mP150 ne sauvait pas les défauts de variévation observés en diminuant la dose de P180. Ceci suggère que contrairement à P180, mP150 n'est pas capable, chez la drosophile, de contribuer à la formation et/ou au maintien de la structure d'hétérochromatine et il est très probable que ce défaut résulte de l'absence d'interaction entre mP150 et HP1a.

L'expression ubiquiste de la protéine murine P150 a été utilisée pour identifier les fonctions de la grande sous-unité de CAF-1 nécessaires au maintien de l'appariement péricentrique et à la ségrégation des chromosomes achiasmatiques. Pour cela, les capacités des protéines P180 et mP150 à sauver les défauts observés chez les femelles hétérozygotes pour $p180^3$ ont été étudiés. De manière remarquable, si l'expression transgénique de P180 permet de sauver ces défauts, l'expression de mP150 ne permet aucun sauvetage détectable suggérant ainsi que la fonction de la grande sous-unité du complexe CAF-1 dans le maintien de la structure d'hétérochromatine est importante pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes achiasmatiques.

L'utilisation de mP150 s'est donc révélée initialement être un outil génétique efficace pour séparer les deux fonctions caractérisées de P180 d'une part dans l'assemblage des dimères H3-H4 et d'autre part dans le maintien de la structure d'hétérochromatine. Toutefois, comme évoqué précédemment, la protéine mP150 et P180 présentent seulement 26% d'homologie. Comme ces deux protéines pouvaient avoir de nombreuses autres différences (hormis leur interaction avec la protéine HP1a de drosophile), il était nécessaire d'identifier le domaine de P180 responsable de l'interaction avec HP1a.

Dans le reste de ce manuscrit, je présenterai l'ensemble de mes travaux qui ont permis de caractériser l'interaction entre la grande sous-unité CAF-1 de drosophile et la protéine HP1a. L'identification de la région responsable de cette interaction et l'obtention de drosophiles exprimant l'allèle $p180$ tronqué de ce domaine ont permis de mesurer l'importance fonctionnelle de l'interaction entre CAF-1 et HP1 pour la viabilité et le processus méiotique chez la drosophile.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11170-11174.
- Ayyanathan, K., Lechner, M.S., Bell, P., Maul, G.G., Schultz, D.C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher, F.J., III (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes and Development* 17, 1855-1869.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B., and Kellum, R. (2005). Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* 113, 370-384.
- Bannister, A.J., Schneider, R., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2005). Spatial Distribution of Di- and Tri-methyl Lysine 36 of Histone H3 at Active Genes. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17732-17736.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001a). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001b). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bernard, P., Maure, J.-F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.-P., and Allshire, R.C. (2001). Requirement of Heterochromatin for Cohesion at Centromeres. *Science* 294, 2539-2542.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* 120, 169-181.
- Bianchi, M.E., and Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 15, 496-506.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* 16, 6-21.
- Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P.R., Broadhurst, R.W., Ball, L.J., Murzina, N.V., and Laue, E.D. (2000). The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J* 19, 1587-1597.
- Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C.R., and Lin, H. (2007). Drosophila PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes and Development* 21, 2300-2311.
- Brown, S.W. (1966). Heterochromatin. *Science* 151, 417-425.

- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., and Misteli, T. (2003a). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721-725.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., and Misteli, T. (2003b). Maintenance of Stable Heterochromatin Domains by Dynamic HP1 Binding. *Science* 299, 721-725.
- Chow, J., and Heard, E. (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol* 21, 359-366.
- Cowieson, N.P., Partridge, J.F., Allshire, R.C., and McLaughlin, P.J. (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Current Biology* 10, 517-525.
- Craig, J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27, 17-28.
- Cryderman, D.E., Grade, S.K., Li, Y., Fanti, L., Pimpinelli, S., and Wallrath, L.L. (2005). Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn* 232, 767-774.
- Czermin, B., Schotta, G., Hulsmann, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G., and Imhof, A. (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2, 915-919.
- Dai, J., Hyland, E.M., Yuan, D.S., Huang, H., Bader, J.S., and Boeke, J.D. (2008). Probing nucleosome function: a highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants. *Cell* 134, 1066-1078.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 319, 1097-1113.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 14, 997-1007.
- de Wit, E., Greil, F., and van Steensel, B. (2007). High-Resolution Mapping Reveals Links of HP1 with Active and Inactive Chromatin Components. *PLoS Genetics* 3, e38.
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., and Davie, J.R. (2009). Epigenetic control. *J Cell Physiol* 219, 243-250.
- Dernburg, A.F., Sedat, J.W., and Hawley, R.S. (1996). Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 86, 135-146.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., and Richmond, T.J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571-1573.
- Edwards, C.A., and Ferguson-Smith, A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 281-289.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y.W., and Hartnett, T. (1994). Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21315-21321.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., and Elgin, S.C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9923-9927.
- Eissenberg, J.C., Morris, G.D., Reuter, G., and Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131, 345-352.

- Ekwall, K., Javerzat, J.P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G., and Allshire, R. (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429-1431.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G., and Allshire, R.C. (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021-1032.
- English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* 127, 495-508.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. (1998a). The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila*. *Molecular Cell* 2, 527-538.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. (1998b). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* 2, 527-538.
- Fanti, L., and Pimpinelli, S. (2008). HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr Opin Genet Dev* 18, 169-174.
- Festenstein, R., Pagakis, S.N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B., and Kioussis, D. (2003a). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* 299, 719-721.
- Festenstein, R., Pagakis, S.N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B., and Kioussis, D. (2003b). Modulation of Heterochromatin Protein 1 Dynamics in Primary Mammalian Cells. *Science* 299, 719-721.
- Finch, J.T., and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1897-1901.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes and Development* 17, 1870-1881.
- Fitzgerald, D.J., Dryden, G.L., Bronson, E.C., Williams, J.S., and Anderson, J.N. (1994). Conserved patterns of bending in satellite and nucleosome positioning DNA. *J Biol Chem* 269, 21303-21314.
- Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H., and Azorin, F. (2008). *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* 22, 3007-3023.
- Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266, 273-275.
- Freitag, M., Hickey, P.C., Khlafallah, T.K., Read, N.D., and Selker, E.U. (2004). HP1 Is Essential for DNA Methylation in *Neurospora*. *Molecular Cell* 13, 427-434.
- Furuta, K., Chan, E.K.L., Kiyosawa, K., Reimer, G., Luderschmidt, C., and Tan, E.M. (1997). Heterochromatin protein HP1Hs (p25) and its localization with centromeres in mitosis. *Chromosoma* 106, 11-19.
- Gilbert, D.M. (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* 14, 377-383.
- Govin, J., Dorsey, J., Gaucher, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Berger, S.L. Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev* 24, 1772-1786.

- Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., and Schlick, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13317-13322.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721-733.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., and Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 166, 493-505.
- Happel, N., and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431, 1-12.
- Happel, N., Warneboldt, J., Hanecke, K., Haller, F., and Doenecke, D. (2009). H1 subtype expression during cell proliferation and growth arrest. *Cell Cycle* 8, 2226-2232.
- Hawley, R.S., and Theurkauf, W.E. (1993). Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *Trends Genet* 9, 310-317.
- Heard, E. (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 15, 482-489.
- Henikoff, S. (2010). Summary: The nucleus--a close-knit community of dynamic structures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 607-615.
- Hewish, D.R., and Burgoyne, L.A. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 504-510.
- Hiragami, K., and Festenstein, R. (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 62, 2711-2726.
- Hoek, M., and Stillman, B. (2003). Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12183-12188.
- Houlard, M., Berlivet, S., Probst, A.V., Quivy, J.P., Hery, P., Almouzni, G., and Gerard, M. (2006). CAF-1 is essential for heterochromatin organization in pluripotent embryonic cells. *PLoS Genet* 2, e181.
- Huang, H., Yu, Z., Zhang, S., Liang, X., Chen, J., Li, C., Ma, J., and Jiao, R. (2010). *Drosophila* CAF-1 regulates HP1-mediated epigenetic silencing and pericentric heterochromatin stability. *J Cell Sci* 123, 2853-2861.
- Jacobs, S.A., and Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail. *Science* 295, 2080-2083.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J* 20, 5232-5241.
- James, T.C., and Elgin, S.C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6, 3862-3872.
- Jones, K.W. (1970). Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 225, 912-915.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., and Steward, R. (2005). PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes and Development* 19, 431-435.
- Kellum, R., and Alberts, B.M. (1995). Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 108 (Pt 4), 1419-1431.

- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bahler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* 449, 928-932.
- Kirov, N., Shtilbans, A., and Rushlow, C. (1998). Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 212, 323-332.
- Kizer, K.O., Phatnani, H.P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A.L., and Strahl, B.D. (2005). A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* 25, 3305-3316.
- Klapholz, B., Dietrich, B.H., Schaffner, C., Heredia, F., Quivy, J.P., Almouzni, G., and Dostatni, N. (2009). CAF-1 is required for efficient replication of euchromatic DNA in *Drosophila* larval endocycling cells. *Chromosoma* 118, 235-248.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46, 931-954.
- Kourmouli, N., Theodoropoulos, P.A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A.S., Cowell, I.G., Singh, P.B., and Georgatos, S.D. (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J* 19, 6558-6568.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kruithof, M., Chien, F.T., Routh, A., Logie, C., Rhodes, D., and van Noort, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol* 16, 534-540.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001a). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001b). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M.A., and Lipinski, M. (1995). A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 4, 791-799.
- Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1029-1042.
- Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S., and Wallrath, L.L. (2003). Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* 130, 1817-1824.
- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E., and Urrutia, R. (2006a). Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* 8, 407-415.
- Lomberk, G., Wallrath, L., and Urrutia, R. (2006b). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology* 7, 228.
- Lorentz, A., Ostermann, K., Fleck, O., and Schmidt, H. (1994). Switching gene swi6, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene* 143, 139-143.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y., and Almouzni, G. (2009). The HP1 α -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* 10, 769-775.

- Lu, B.Y., Emtage, P.C.R., Duyf, B.J., Hilliker, A.J., and Eissenberg, J.C. (2000). Heterochromatin Protein 1 Is Required for the Normal Expression of Two Heterochromatin Genes in *Drosophila*. *Genetics* 155, 699-708.
- Luger, K., Mader, 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.
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H., and Jaenisch, R. (2000). Development: DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408, 538-540.
- Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol* 22, 291-297.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., Quivy, J.P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30, 329-334.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10, 882-891.
- McKim, K.S., Jang, J.K., and Manheim, E.A. (2002). Meiotic recombination and chromosome segregation in *Drosophila* females. *Annu Rev Genet* 36, 205-232.
- Meehan, R.R., Kao, C.F., and Pennings, S. (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* 22, 3164-3174.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep* 3, 329-334.
- Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.-M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes and Development* 17, 1823-1828.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., and Buendia, B. (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108, 220-234.
- Minc, E., Courvalin, J.C., and Buendia, B. (2000). HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 90, 279-284.
- Miranda, T.B., and Jones, P.A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213, 384-390.
- Moazed, D. (2001). Common Themes in Mechanisms of Gene Silencing. *Molecular Cell* 8, 489-498.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A., and Yaniv, M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep* 3, 975-981.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* 4, 529-540.
- Nabatiyan, A., and Krude, T. (2004). Silencing of chromatin assembly factor 1 in human cells leads to cell death and loss of chromatin assembly during DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 24, 2853-2862.
- Nakanishi, S., Sanderson, B.W., Delventhal, K.M., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., and Shilatifard, A. (2008). A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat Struct Mol Biol* 15, 881-888.

- Nakayama, J.-i., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I.S. (2001). Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* 292, 110-113.
- Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M., and Senda, T. (2007). Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* 446, 338-341.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.-M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., et al. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I.S., and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 4, 89-93.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.
- Pardue, M.L., and Gall, J.G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168, 1356-1358.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., Turano, C., Ferraro, A., and Pimpinelli, S. (2004). HP1 Controls Telomere Capping, Telomere Elongation, and Telomere Silencing by Two Different Mechanisms in *Drosophila*. *Molecular Cell* 15, 467-476.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., et al. (2001a). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323-337.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell* 12, 1577-1589.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., et al. (2001b). Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell* 107, 323-337.
- Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini, B., and Pimpinelli, S. (2003). Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *The Journal of Cell Biology* 161, 707-714.
- Platero, J.S., Hartnett, T., and Eisenberg, J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J* 14, 3977-3986.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. (2003). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science* 300, 131-135.
- Plohl, M., Luchetti, A., Mestrovic, N., and Mantovani, B. (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409, 72-82.

- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., *et al.* (2005a). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., *et al.* (2005b). Genome-wide Map of Nucleosome Acetylation and Methylation in Yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Polo, S.E., and Almouzni, G. (2006). Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16, 104-111.
- Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127, 481-493.
- Probst, A.V., and Almouzni, G. (2008). Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation* 76, 15-23.
- Quivy, J.P., Gerard, A., Cook, A.J., Roche, D., and Almouzni, G. (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat Struct Mol Biol* 15, 972-979.
- Quivy, J.P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J* 23, 3516-3526.
- Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2004). DNA synthesis-dependent and -independent chromatin assembly pathways in *Xenopus* egg extracts. *Methods Enzymol* 375, 117-131.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* 9, 1091-1100.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., *et al.* (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science* 293, 1089-1093.
- Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 16, 336-343.
- Rougeulle, C., Chaumeil, J., Sarma, K., Allis, C.D., Reinberg, D., Avner, P., and Heard, E. (2004). Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5475-5484.
- Routh, A., Sandin, S., and Rhodes, D. (2008). Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8872-8877.
- Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 139-149.
- Saunders, W.S., Chue, C., Goebel, M., Craig, C., Clark, R.F., Powers, J.A., Eissenberg, J.C., Elgin, S.C., Rothfield, N.F., and Earnshaw, W.C. (1993). Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. *Journal of Cell Science* 104, 573-582.
- Savitsky, M., Kravchuk, O., Melnikova, L., and Georgiev, P. (2002). Heterochromatin Protein 1 Is Involved in Control of Telomere Elongation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 22, 3204-3218.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436, 138-141.

- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 6, 73-77.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* 21, 1121-1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes and Development* 18, 1251-1262.
- Schultz, J. (1936). Variegation in *Drosophila* and the Inert Chromosome Regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22, 27-33.
- Seum, C., Delattre, M., Spierer, A., and Spierer, P. (2001). Ectopic HP1 promotes chromosome loops and variegated silencing in *Drosophila*. *Embo J* 20, 812-818.
- Shaffer, C.D., Stephens, G.E., Thompson, B.A., Funches, L., Bernat, J.A., Craig, C.A., and Elgin, S.C.R. (2002). Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14332-14337.
- Shi, Y., and Whetstine, J.R. (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 25, 1-14.
- Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H.F.M., Jenuwein, T., Otte, A.P., and Brockdorff, N. (2003). Establishment of Histone H3 Methylation on the Inactive X Chromosome Requires Transient Recruitment of Eed-Enx1 Polycomb Group Complexes. *Developmental Cell* 4, 481-495.
- Singh, P.B., Miller, J.R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R.D., Paro, R., James, T.C., and Gaunt, S.J. (1991). A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res* 19, 789-794.
- Smallwood, A., Esteve, P.-O., Pradhan, S., and Carey, M. (2007). Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes and Development* 21, 1169-1178.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Current Biology* 10, 27-30.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. (2001a). The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* 21, 2555-2569.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S. (2001b). The Hinge and Chromo Shadow Domain Impart Distinct Targeting of HP1-Like Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 21, 2555-2569.
- Song, Y., He, F., Xie, G., Guo, X., Xu, Y., Chen, Y., Liang, X., Stagljar, I., Egli, D., Ma, J., et al. (2007). CAF-1 is essential for *Drosophila* development and involved in the maintenance of epigenetic memory. *Dev Biol* 311, 213-222.
- Stephens, G.E., Slawson, E.E., Craig, C.A., and Elgin, S.C. (2005). Interaction of heterochromatin protein 2 with HP1 defines a novel HP1-binding domain. *Biochemistry* 44, 13394-13403.
- Stewart, M.D., Li, J., and Wong, J. (2005). Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation, Transcription Repression, and Heterochromatin Protein 1 Recruitment. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2525-2538.
- Subramanian, V.V., and Bickel, S.E. (2009). Heterochromatin-mediated association of achiasmata homologs declines with age when cohesion is compromised. *Genetics* 181, 1207-1218.

- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., and Shinkai, Y. (2001). SET Domain-containing Protein, G9a, Is a Novel Lysine-preferring Mammalian Histone Methyltransferase with Hyperactivity and Specific Selectivity to Lysines 9 and 27 of Histone H3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25309-25317.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3, 114-120.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.
- Takai, D., and Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3740-3745.
- Takami, Y., Ono, T., Fukagawa, T., Shibahara, K., and Nakayama, T. (2007). Essential role of chromatin assembly factor-1-mediated rapid nucleosome assembly for DNA replication and cell division in vertebrate cells. *Mol Biol Cell* 18, 129-141.
- Talasz, H., Lindner, H.H., Sarg, B., and Helliger, W. (2005). Histone H4-Lysine 20 Monomethylation Is Increased in Promoter and Coding Regions of Active Genes and Correlates with Hyperacetylation. *Journal of Biological Chemistry* 280, 38814-38822.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 264-275.
- Tamaru, H., and Selker, E.U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277-283.
- Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H.R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P.R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N.V., and Laue, E.D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J* 23, 489-499.
- Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 83, 403-427.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsy, S.E., Uhlmann, F., et al. (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes and Development* 14, 2757-2770.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128, 651-654.
- Tweedie, S., Ng, H.-H., Barlow, A.L., Turner, B.M., Hendrich, B., and Bird, A. (1999). Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet* 23, 389-390.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402, 555-560.
- Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol Cell Biol* 21, 6574-6584.
- Ugarkovic, D. (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* 6, 1035-1039.

- Vaute, O., Nicolas, E., Vandiel, L., and Trouche, D. (2002). Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Research* 30, 475-481.
- Vermaak, D., Henikoff, S., and Malik, H.S. (2005). Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* 1, 96-108.
- Vermaak, D., and Malik, H.S. (2009). Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 43, 467-492.
- Yamamoto, K., and Sonoda, M. (2003). Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 287-292.
- Ye, Q., and Worman, H.J. (1996). Interaction between an Integral Protein of the Nuclear Envelope Inner Membrane and Human Chromodomain Proteins Homologous to *Drosophila* HP1. *Journal of Biological Chemistry* 271, 14653-14656.
- Ye, X., Franco, A.A., Santos, H., Nelson, D.M., Kaufman, P.D., and Adams, P.D. (2003). Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell* 11, 341-351.
- Zhang, D., Wang, D., and Sun, F. (2011). *Drosophila melanogaster* heterochromatin protein HP1b plays important roles in transcriptional activation and development. *Chromosoma* 120, 97-108.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development* 15, 2343-2360.
- Zhao, T., and Eissenberg, J.C. (1999). Phosphorylation of Heterochromatin Protein 1 by Casein Kinase II Is Required for Efficient Heterochromatin Binding in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15095-15100.

