



HAL
open science

Localisation et fonction du variant d'histone macroH2A

Flore Mietton

► **To cite this version:**

Flore Mietton. Localisation et fonction du variant d'histone macroH2A. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00183255

HAL Id: tel-00183255

<https://theses.hal.science/tel-00183255>

Submitted on 29 Oct 2007

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

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

Université Joseph Fourier-Grenoble 1
Chimie et Science du Vivant
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THÈSE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier
Discipline Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Flore MIETTON

Le 24 Octobre 2007

LOCALISATION ET FONCTION DU VARIANT D'HISTONE MACROH2A

Jury

Dr. Pierre COUBLE	Rapporteur
Dr. Giacomo CAVALLI	Rapporteur
Dr. Edith HEARD	Examinatrice
Dr. Stefan DIMITROV	Examineur
Dr. Annie MOLLA	Directrice de thèse
Pr. Stefan NONCHEV	Président du Jury

Thèse préparée au sein du laboratoire
Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation
Unité INSERM U309 Institut Albert Bonniot
Université Joseph Fourier-Grenoble I

*A Aurélien,
A mes parents*

Remerciements

Je remercie Messieurs Pierre Couble et Giacomo Cavalli d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que Edith Heard et Stefan Nonchev d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Stefan Dimitrov, qui m'a accueillie au sein de son équipe et confié ce sujet de thèse. Ses nombreux encouragements et son investissement ont permis le bon déroulement de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Annie Molla pour avoir conduit ma formation scientifique et dirigé cette thèse : sa disponibilité, ses nombreux conseils et sa bonne humeur ont fait de ces quatre années un réel plaisir.

Je rends également hommage à l'ensemble des personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ces travaux et à faire de cette thèse une expérience scientifique et humaine pleine de bons souvenirs. Je remercie l'ensemble de nos collaborateurs, ainsi que toutes les personnes de l'U309 et de l'Institut Albert Bonniot pour nos nombreux échanges. Un merci tout particulier aux filles de l'équipe MARAG, Marlène en tête, aux membres du Comité des thèses, aux « Khochbiniens » pour nos interactions diverses, et à André, Gaelh et Eric pour leurs conseils et leurs expériences.

Je remercie également l'Association pour la Recherche sur le Cancer et ses donateurs, qui ont financé une partie de ces travaux.

Je n'oublie pas ma famille et mes amis, qui m'ont soutenue et accompagnée tout au long de mes études. Une bise particulière aux membres du GPE qui se reconnaîtront, notamment à Delphine pour la relecture finale de ce manuscrit.

Tu m'as réclamé ces dernières lignes, et elles te reviennent de droit, pour ta présence, ton soutien et ton affection. Pour le merveilleux cadeau que tu m'as fait. Aurélien et Apolline, mes deux amours, une nouvelle vie commence pour nous trois...

RESUME

La structure de la chromatine et sa compaction sont modulées par la substitution des histones conventionnelles par des variants d'histones. MacroH2A est l'un de ces variants et se singularise par sa grande taille. De nombreuses données suggèrent que macroH2A pourrait participer à l'inactivation de la transcription.

Par immunofluorescence, cette protéine est retrouvée accumulée sur le territoire du chromosome X inactif (Xi) chez les mammifères femelles. Néanmoins, cette association préférentielle pourrait simplement refléter la forte concentration en nucléosomes de cette région. Pour aborder le rôle de macroH2A dans le phénomène de l'inactivation du chromosome X, notre principale approche a consisté en des expériences de «ChIP-on-CHIP» sur de la chromatine native. Nos résultats montrent un enrichissement global et modeste de macroH2A sur le chromosome X femelle, excepté sur la plupart des gènes échappant à l'inactivation. Le rôle exact de macroH2A dans la maintenance de l'inactivation du X reste néanmoins à préciser, puisque la suppression de ce variant par ARN interférence n'affecte pas à elle seule la présence de marques spécifiques du Xi.

Nous avons souhaité nous intéresser également au rôle potentiel de macroH2A dans le mécanisme de réparation de l'ADN. En effet, il a été montré que le domaine macro est capable de lier l'ADP-ribose, un nucléotide déterminant dans de nombreux processus biologiques tels que la transcription ou la réparation. Plusieurs expériences nous ont permis de démontrer que les nucléosomes macroH2A sont associés *in vivo* à l'enzyme PARP-1, protéine clef de la réparation des cassures simple brin de l'ADN. La PARP-1 associée au nucléosome variant est inactive, et le traitement par H₂O₂ va induire son relâchement et son activation. L'absence de macroH2A conduit à une sur-activation de PARP-1, ce qui compromet sévèrement la réparation de l'ADN endommagé.

Récemment, il a été montré que macroH2A recruterait la protéine PARP-1 sur le Xi. Nous proposons que c'est par la formation de ce complexe que le variant induirait la répression de la transcription. La protéine PARP-1 séquestrée par macroH2A pourrait également être relâchée rapidement et localement dans le cadre de la réparation des dommages oxydatifs.

Mots-clefs : variant d'histone, macroH2A, chromosome X inactif, «ChIP-on-CHIP», réparation de l'ADN, PARP-1, ARN interférence, répression transcriptionnelle.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES.....	3

INTRODUCTION

A. ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DE LA CHROMATINE.....	7
1) Le nucléosome, unité de base de la chromatine.....	7
a) Découverte.....	7
b) Les histones de cœur.....	7
c) Les histones de liaison.....	9
2) Organisation fonctionnelle de la chromatine.....	9
a) Les différents niveaux de structuration de la chromatine.....	11
b) Compartimentation fonctionnelle de la chromatine.....	11
3) Dynamique du nucléosome.....	13
a) Comment est contrôlée la dynamique de l'organisation de la chromatine?..	14
b) Les voies d'assemblage et désassemblage du nucléosome.....	14
c) Les facteurs de remodelage du nucléosome.....	16
d) Les modifications post-traductionnelles des histones.....	19
<i>L'acétylation des histones.....</i>	<i>20</i>
<i>La méthylation des histones.....</i>	<i>20</i>
<i>Les autres modifications.....</i>	<i>22</i>
<i>Conséquences des modifications et « code histone ».....</i>	<i>23</i>
B. LES VARIANTS D'HISTONE.....	25
1) Qu'est ce qu'un variant d'histone ?.....	25
2) Les différents variants.....	26
a) Les variants d'histones de liaison.....	26
b) Les variants de H3.....	26
<i>Le variant CENP-A.....</i>	<i>26</i>
<i>Le variant H3.3.....</i>	<i>27</i>
<i>Les autres variants.....</i>	<i>27</i>
c) Les variants de H2B.....	28
d) Les variants de H2A.....	28
<i>Le variant H2AZ.....</i>	<i>30</i>
<i>Le variant H2A.X.....</i>	<i>31</i>
<i>Le variant H2ABbd.....</i>	<i>32</i>
<i>Le variant TH2A.....</i>	<i>33</i>

C. DEUX MECANISMES IMPLIQUANT LES MARQUES EPIGENETIQUES DES HISTONES.....	35
1) L'inactivation du chromosome X.....	35
a) L'initiation de l'inactivation aléatoire du X.....	36
b) Les marques épigénétiques du X.....	39
c) Les gènes échappant à l'inactivation.....	41
d) D'un point de vue évolutif... l'inactivation par empreinte.....	43
e) L'histoire n'est pas encore finie.....	44
2) La réparation de l'ADN.....	45
a) Les dommages de l'ADN et les différents systèmes de réparation.....	45
b) La réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR).....	47
c) La réparation des cassures double brin de l'ADN (DSBR).....	53
d) La frontière entre SSBR et DSBR : pas si claire.....	56
D. MACROH2A, UN VARIANT D'HISTONE SINGULIER.....	59
1) Généralités.....	59
2) MacroH2A et le chromosome X inactif.....	60
3) MacroH2A et la répression de la transcription.....	62
a) Le nucléosome macroH2A reconstitué <i>in vitro</i>	62
b) Les données obtenues <i>in vivo</i>	63
4) MacroH2A et ADP-ribosylation.....	65

OBJECTIFS.....	69
-----------------------	-----------

MATERIEL ET METHODES

A. BIOLOGIE CELLULAIRE.....	75
1) Culture cellulaire.....	75
2) Transfections.....	75
3) Mesure de la viabilité cellulaire.....	77
B. TECHNIQUES D'ANALYSES IN SITU.....	79
1) Immunofluorescence.....	79
2) Imagerie.....	79
3) Essai Comète.....	80
C. APPROCHES DE « CHIP-ON-CHIP ».....	83
1) Préparation des nucléosomes.....	83
2) Immunoprécipitation (ChIP)	85
3) Description des puces utilisées.....	85
4) Protocoles d'utilisation des puces.....	86

D. TECHNIQUES D'ANALYSES DES PROTEINES.....	89
1) Western Blot.....	89
2) Détection du Poly(ADP-ribose).....	89
3) "GST pull down".....	90
4) Analyse des complexes e-macroH2A1.1.....	91
E. CLONAGE.....	93
1) Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	93
2) Clonage.....	93
3) Mutagenèse dirigée.....	94
4) Plasmides.....	95

RESULTATS

A. IMPLICATION DE MACROH2A DANS LE PROCESSUS D'INACTIVATION DU CHROMOSOME X.....	99
1) L'immunoprécipitation des nucléosomes macroH2A.....	99
2) La distribution génomique de macroH2A.....	101
3) Etude du marquage de protéines de fusion GFP.....	105
4) La distribution de macroH2A sur le chromosome X.....	105
5) MacroH2A et la maintenance du chromosome X inactif.....	111
B. ROLE DE MACROH2A DANS LA REPARATION DES CASSURES DE L'ADN DEPENDANTE DE PARP.....	113
1) Présentation et résultats principaux.....	113
2) Article en révision.....	113

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. MACROH2A ET LE CHROMOSOME X INACTIF.....	137
1) Comment étudier l'enrichissement en macroH2A?.....	137
2) La localisation de macroH2A sur le chromosome X.....	139
3) Quel rôle pour macroH2A dans le mécanisme de l'inactivation du X ?.....	141
B. MACROH2A, UN NOUVEAU VARIANT IMPLIQUE DANS LA REPARATION DE L'ADN.....	143
1) Une nouvelle fonction pour macroH2A.....	143
2) Le rôle de macroH2A dans la réparation de l'ADN dépendante de PARP1 est il direct?.....	144
3) Comment macroH2A interfère t'il dans la réparation des dommages oxydatifs ?.....	145

C. EN CONCLUSION : QUEL ROLE FONCTIONNEL POUR MACROH2A ?.....147

ANNEXES.....151

- Annexe 1: Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A.
- Annexe 2: Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes.
- Annexe 3: Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish.
- Annexe 4: The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....195

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine-triphosphate
BAC :	Bacteria artificial chromosome
BSA :	Bovin serum albumin
DAPI :	4', 6-diamidino-2-phénylindole
dNTP :	désoxyribonucléotides
DMSO :	Diméthyl sulfoxide
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylène-diamide-tétra acétique
EGTA :	Ethylene glycol tétra acétique
ES :	cellule souche embryonnaire
FISH :	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FRAP :	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GFP :	Green fluorescent protein
GST :	Glutathione-S-transférase
kDa :	kilo Dalton
LINE :	Long interspersed nuclear element
LTR :	Long terminal repeat
M :	Molaire
min :	minute
NF-κB :	Nuclear factor kappa B
PAC :	P1-derived artificial chromosome
pb :	paire de bases
PBS :	Phosphate-buffered saline
PCR :	Polymerization chain reaction
PFA :	Para-formaldéhyde
PMSF :	Phénylméthylsulfonylfluoride
rpm :	rotation par minute
RT-PCR :	Reverse transcriptase PCR
siRNA :	silencing interference ARN
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SVF :	Sérum de veau foetal
TCA :	Acide tri-chloroacétique
UV :	Ultraviolet
v/v :	volume par volume
Xa :	chromosome X actif
Xi :	chromosome X inactif
Xic :	X inactivation center

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Le nucléosome et ses constituants
Figure 2 : Les niveaux d'organisation de la chromatine
Figure 3 : Modélisation de la fibre de 30 nm
Figure 4 : Déplacement de l'octamère d'histone par un complexe de remodelage
Figure 5 : Les modifications post-traductionnelles des histones
Figure 6 : La nomenclature utilisée pour la dénomination des modifications post-traductionnelles des histones
Figure 7 : Les histone méthyltransférases et déméthylases
Figure 8 : Récapitulatif des variants d'histones
Figure 9 : Alignement des séquences des différents variants de H3
Figure 10 : Comparaison de séquence des principales histones de la famille H2A
Figure 11 : Le chromosome X inactif se présente sous la forme du corpuscule de Barr
Figure 12 : La région Xic (« X-inactivation center »)
Figure 13 : Les marques épigénétiques associées à l'inactivation du chromosome X
Figure 14 : L'inactivation du chromosome X chez la souris : par empreinte, puis aléatoire
Figure 15 : La réparation par excision de nucléotides (NER)
Figure 16 : La réparation par excision de bases (BER) et la réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR)
Figure 17 : Métabolisme du poly(ADP-ribose) lors de la réparation des cassures simple brin de l'ADN
Figure 18 : Les 17 membres de la superfamille des poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), et la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)
Figure 19 : La réparation des cassures double brin de l'ADN (DSBR)
Figure 20 : Représentation schématique du variant d'histone macroH2A
Figure 21 : Le corpuscule de Barr et sa co-localisation avec les histones
Figure 22 : L'épissage alternatif du variant d'histone macroH2A1 régule la fixation des métabolites NAD
Figure 23 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot et Immunofluorescence
Figure 24 : Immunoprécipitation des nucléosomes macroH2A
Figure 25 : MacroH2A présente une distribution uniforme le long du génome humain et murin
Figure 26 : Hyperacétylation et temps de réplication
Figure 27 : Le marquage préférentiel de macroH2A au niveau du Xi
Figure 28 : MacroH2A est enrichie sur le chromosome X dans le foie de souris femelle
Figure 29 : L'enrichissement en macroH2A existe dans les régions riches en gènes et dans les zones intergéniques
Figure 30 : Les gènes échappants sont appauvris en macroH2A
Figure 31 : L'élimination de macroH2A n'affecte pas la présence de marques spécifiques du chromosome X inactif
Figure 32 : Modèle d'action du complexe macroH2A-PARP-1

INTRODUCTION

A. Aspects structuraux et fonctionnels de la chromatine

B. Les variants d'histones

C. Deux mécanismes impliquant les marques épigénétiques des histones

D. MacroH2A, un variant d'histone singulier

A. ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DE LA CHROMATINE

1) Le nucléosome, unité de base de la chromatine

a) Découverte

Dans une cellule eucaryote, la grande majorité de l'ADN est associée à des protéines et forme une structure nucléoprotéique appelée la chromatine.

Les progrès de la biophysique et de la microscopie électronique dans les années 1970 ont conduit à la découverte par Kornberg d'une unité de base, comprenant 146 paires de bases d'ADN, enroulées autour d'un octamère de protéines histones (Kornberg 1974). Cet élément sera baptisé « nucléosome » par Pierre Chambon en 1975.

b) Les histones de coeur

La particule coeur du nucléosome est composée de quatre paires d'histones, nommées H2A, H2B, H3 et H4. Chacune de ces histones de coeur possède une séquence peptidique qui a très peu changé au cours de l'évolution. Ce sont de petites protéines basiques (11 à 16 KDa), riches en résidus lysine et arginine.

Chaque histone est organisée en deux domaines : son extrémité N-terminale n'a pas de structure stable et compte entre 30 et 40 % d'acides aminés lysine et arginine. Le reste de l'histone adopte une structure particulière appelée domaine globulaire ou « histone fold ». Ce domaine se compose de trois hélices intercalées de deux boucles : $\alpha 1$ - L1 - $\alpha 2$ - L2 - $\alpha 3$ (Figure 1A).

Au sein du nucléosome, l'octamère se compose d'un tétramère central (H3-H4)₂, flanqué de chaque côté de deux hétérodimères (H2A-H2B) (Arents, Burlingame et al. 1991) (Figure 1C et D). La structure de cette particule coeur a été obtenue par cristallisation à partir d'histones de xénope, à une résolution de 2.8 Å (Luger, Mader et al. 1997).

Le nucléosome est positionné par un ensemble d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogène entre les groupements phosphate de l'ADN et les histones, et par des contacts non polaires avec le sucre désoxyribose de l'ADN et les histones (Khorasanizadeh 2004).

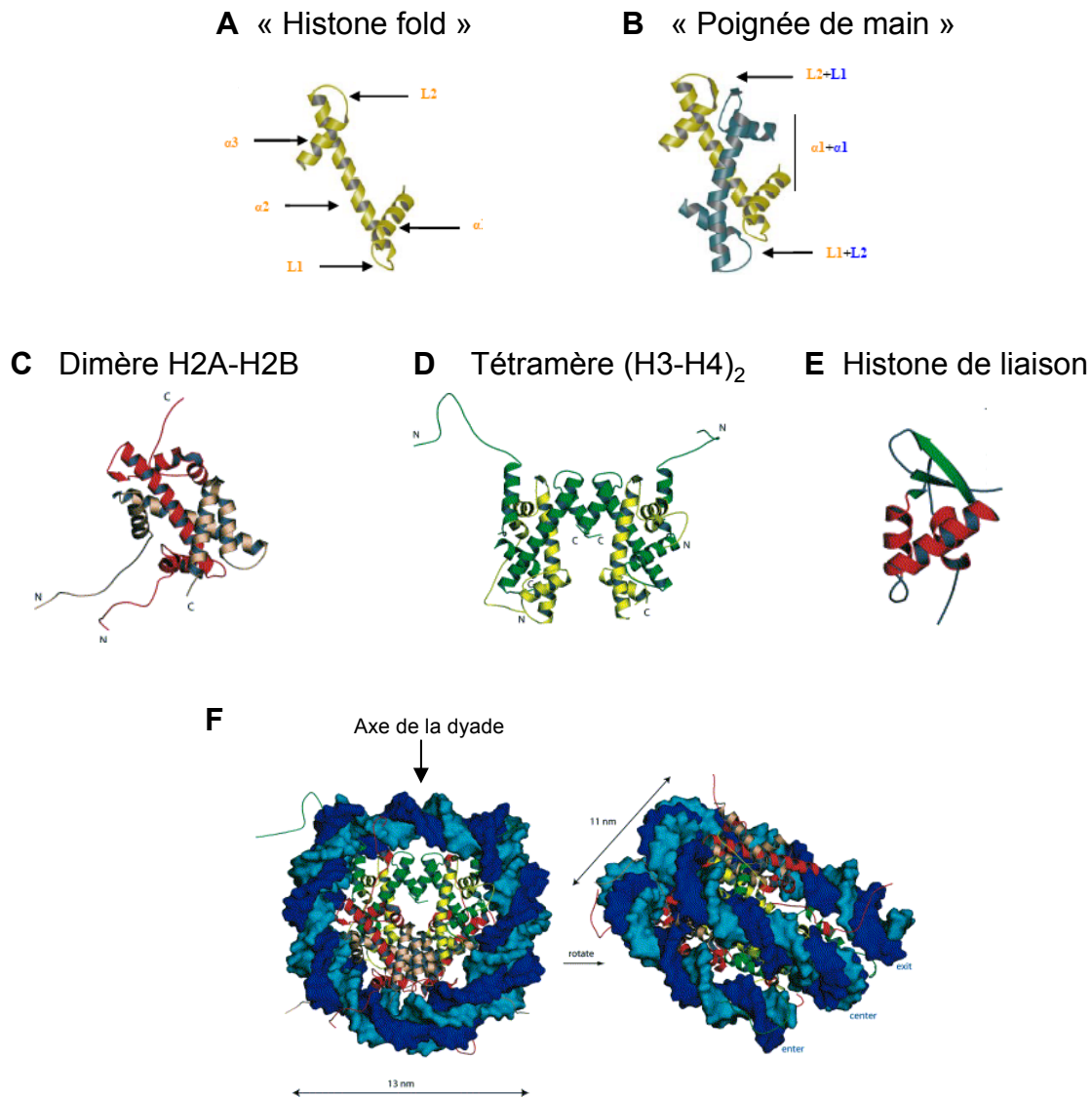


Figure 1 : Le nucléosome et ses constituants

- A.** Domaine de repliement d'une histone de cœur, construit selon l'enchaînement suivant : $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$ (Harp, 2000).
- B.** L'interaction dite en poignée de main entre deux domaines globulaires (Harp, 2000).
- C.** Structure d'un dimère H2A-H2B, respectivement en rouge et violet (Khorasanizadeh, 2004).
- D.** Structure d'un tétramère H3-H4, respectivement en vert et jaune (Khorasanizadeh, 2004).
- E.** Structure d'une histone de liaison, avec son motif en « wing-hélice » (Khorasanizadeh, 2004).
- F.** Structure du nucléosome. L'ADN s'enroule d'1,7 tours autour de la particule de cœur. Le centre de symétrie du nucléosome, ou axe de la dyade, est indiqué par une flèche. Le nucléosome est présenté de face à gauche, et de côté à droite. Chaque brin d'ADN est représenté par une teinte de bleu (Khorasanizadeh, 2004).

Le domaine globulaire des histones permet de former des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 par une interaction dite en « poignée de main ». La boucle L1 de l'une se juxtapose avec la boucle L2 de l'autre (Figure 1B).

Les extrémités N-terminales des histones de cœur, appelées queues N-terminales, se dégagent de la structure compacte formée par les domaines globulaires. Cette exposition leur confère une grande accessibilité, et explique les nombreuses modifications post-traductionnelles qui y sont retrouvées. Les extrémités de H2B et de H3 émergent entre les deux tours de la double hélice, au niveau de tunnels formés par l'alignement des sillons mineurs de l'ADN.

L'ADN nucléosomal est divisé en deux régions de 72 pb et 73 pb, présente une symétrie centrale appelée la dyade, et génère une courbure de 140°C autour de l'octamère d'histones (Richmond and Davey 2003).

c) Les histones de liaison

L'histone de liaison, nommée H1, forme la deuxième famille d'histones. Sa structure tridimensionnelle diffère de celle des histones de cœur. Elle comprend des extrémités N- et C-terminales mobiles et fortement chargées positivement, ainsi qu'un domaine globulaire central.

Les extrémités N- et C-terminales interviendraient dans l'organisation internucléosomale et la structuration de la chromatine à des niveaux supérieurs. Le domaine globulaire est très conservé, et est structuré par un motif dit « wing-hélice » (Figure 1E). Il serait positionné à l'endroit où l'ADN entre et sort du nucléosome, et n'interagit pas avec les histones de cœur (Zhou, Gerchman et al. 1998).

Contrairement aux histones de cœur, l'inactivation de l'histone de liaison n'est pas létale (Khochbin 2001), mais induit une altération globale de la structure de la chromatine (Fan, Nikitina et al. 2005).

2) Organisation fonctionnelle de la chromatine

Chez l'homme, la molécule d'ADN a une longueur d'environ deux mètres. La compaction de l'ADN au sein de chaque noyau, dont la taille est de l'ordre du micromètre, est une contrainte pour toutes les cellules vivantes. La chromatine est donc une structure qui peut adopter

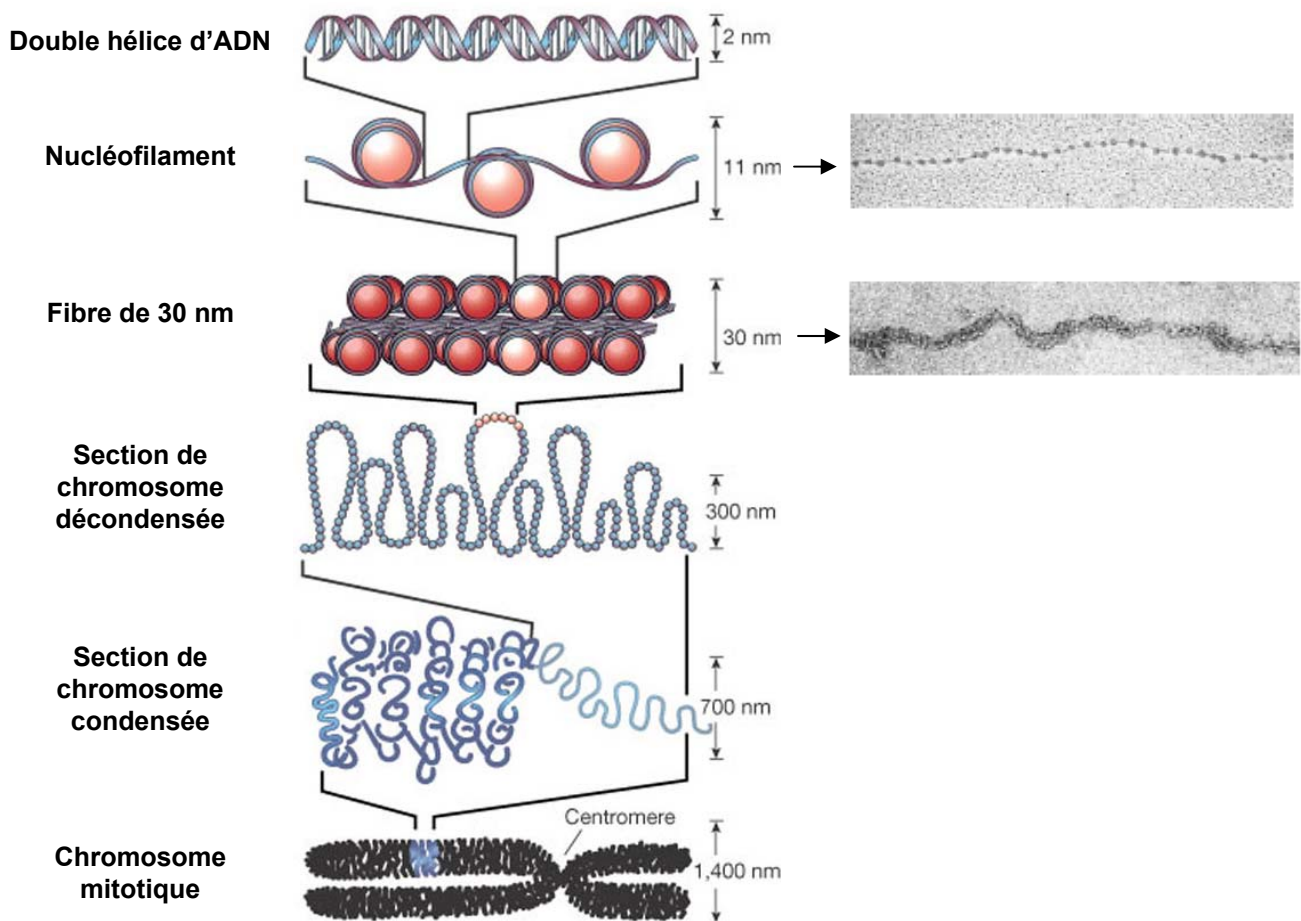


Figure 2 : Les niveaux d'organisation de la chromatine

Schématisation des différents niveaux d'organisation de la chromatine. Le niveau d'organisation de base est le nucléosome. Le collier de perles de nucléosomes se structure en fibre de 30 nm. Des images de microscopie électronique du nucléofilament et de la fibre de 30 nm sont représentées sur la droite.

Cette fibre se structure elle-même à différents niveaux, le niveau le plus compacté étant le chromosome mitotique. Une échelle approximative est indiquée à droite de chaque niveau d'organisation (Felsenfeld et Groudine, 2003).

plusieurs niveaux de compaction, selon l'avancement du cycle cellulaire (interphase ou mitose), ou son activité (réplication ou transcription).

a) Les différents niveaux de structuration de la chromatine

La compaction de l'ADN peut être découpée en trois niveaux d'organisations.

Le premier niveau d'organisation de la chromatine est bien connu : les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par de courts segments d'ADN de liaison (15 à 80 paires de bases). L'ensemble forme une structure de 11 nm de large qui ressemble à un collier de perles et que l'on appelle le nucléofilament (Figure 2).

Le second niveau d'organisation correspond à la compaction du nucléofilament. La fibre de chromatine adopte alors une structure de 30 nm de large. Cette fibre de 30 nm a été observée en microscopie électronique par de nombreuses équipes, mais son architecture n'est pas encore clairement définie. Deux modèles s'opposent actuellement : un modèle en hélice à deux brins, basé sur la cristallisation d'un tétranucléosome (Schalch, Duda et al. 2005), et un modèle à un brin (Robinson and Rhodes 2006). Ce dernier semble privilégié au vu des données de microscopie électronique (Figure 3).

La compaction de la chromatine est stabilisée par les interactions entre les extrémités des histones avec d'autres protéines (Zheng and Hayes 2003), mais également par des protéines associées à la chromatine, comme les histones de liaison (Carruthers, Bednar et al. 1998).

Au delà de la fibre de 30 nm, l'organisation de la chromatine est moins connue, ce qui s'explique par la grande difficulté à extraire et étudier la chromatine compactée. On sait néanmoins que la fibre de 30 nm forme de grandes boucles ancrées sur un squelette protéique. Des domaines sous-chromosomiques peuvent ainsi être détectés en interphase (Taddei, Hediger et al. 2004).

Ces boucles de chromatine sont organisées par les protéines Condensines pour atteindre, au cours de la mitose, le niveau maximal de compaction représenté par les chromosomes (Figure 2).

b) Compartimentation fonctionnelle de la chromatine

La chromatine n'est pas organisée de manière aléatoire au sein du noyau. Dès 1928, Heitz s'aperçut que certaines zones du noyau étaient plus denses que d'autres, et proposa la

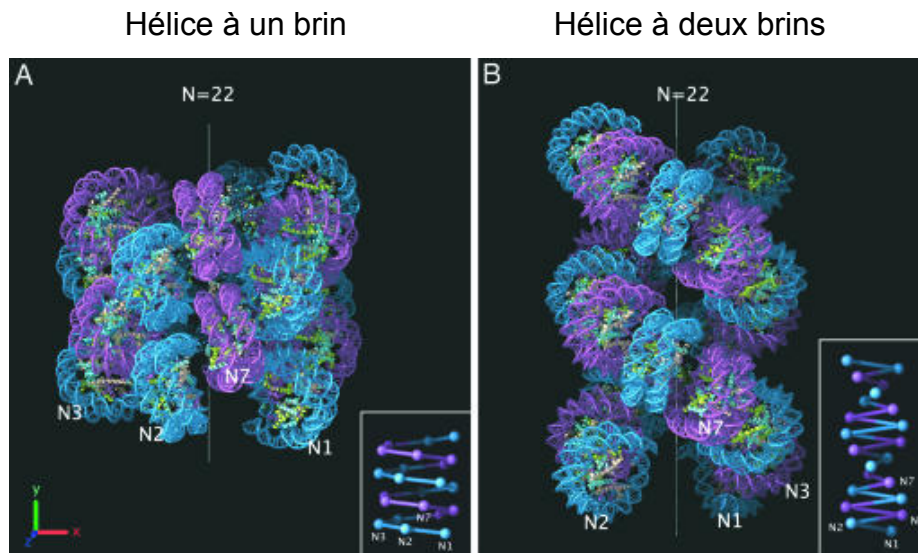


Figure 3 : Modélisation de la fibre de 30 nm

Le modèle en hélice à un brin, à gauche, est soutenu par les dernières données cristallographiques obtenues par (Robinson, 2006). Il s'oppose au modèle en hélice à deux brins (Schalch, 2005).

distinction entre euchromatine, pour la chromatine lâche, et hétérochromatine, pour la chromatine compacte.

De nos jours, l'euchromatine est définie comme associée à une transcription active des gènes. L'hétérochromatine, quant à elle, est décrite comme faiblement transcrite. Un certain nombre de marques y sont associées, telles que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 ou la présence de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1). Cependant, des données récentes réfutent un rôle unique de répression génique par HP1, puisque cette protéine est retrouvée associée à des gènes actifs chez la drosophile (de Wit, Greil et al. 2007).

On distingue l'hétérochromatine facultative, dont la transcription est très faible mais reste néanmoins réversible. C'est le cas du chromosome X inactivé chez les mammifères femelles par exemple.

L'hétérochromatine constitutive, quant à elle, est constituée de zones chromatiniennes, riches en séquences répétées, et qui ne sont jamais exprimées. Elle regroupe les télomères, les centromères et les péricentromères.

Les télomères, situés aux extrémités des chromosomes, sont formés par des répétitions de la séquence TTAGGG et la présence de protéines spécifiques. Leur structure intramoléculaire particulière protège physiquement l'ADN des activités cellulaires de dégradation. Chez les mammifères, ils sont distribués de manière aléatoire au sein du noyau (Luderus, van Steensel et al. 1996).

Le centromère est le site chromosomal qui capture les microtubules en mitose pour permettre la ségrégation. Il assure la distribution équilibrée des chromosomes lors des divisions cellulaires.

3) Dynamique du nucléosome

La structure de la chromatine va être altérée lors des différents événements de la vie cellulaire. Une réorganisation très dynamique de cette structure est indispensable pour permettre l'accès aux machineries moléculaires de la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN.

a) Comment est contrôlée la dynamique de l'organisation de la chromatine ?

Lors de la réplication, les nucléosomes sont désassemblés puis de nouveaux nucléosomes prennent place sur les brins néo-synthétisés. De plus, le nucléosome est un obstacle important à l'accessibilité de l'ADN. Sa stabilité et sa structure vont ainsi jouer un rôle important dans la régulation de la transcription.

A l'aspect purement structural de la chromatine s'ajoute aujourd'hui une nouvelle dimension, l'épigénétique. Elle se définit comme une information non codée par la séquence de l'ADN et qui participe de manière stable et héréditaire à la détermination du devenir cellulaire (Wu and Morris 2001).

A l'échelle du nucléosome, cette dynamique est ainsi contrôlée par :

- Les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de la chromatine, par des chaperons spécifiques qui permettent le transfert des histones.
- Les facteurs de remodelage, qui régulent la mobilité des nucléosomes.
- La présence de nombreuses informations épigénétiques, telles que les modifications post-traductionnelles des histones et la présence de variants d'histone, qui vont conditionner sa fonctionnalité.

b) Les voies d'assemblage et désassemblage du nucléosome

L'assemblage de la chromatine se fait majoritairement lors de la réplication : un tétramère (H3-H4)₂ est d'abord associé à l'ADN, suivi d'un puis de deux dimères H2A-H2B, et enfin de l'histone de liaison H1. Le désassemblage se fait globalement en sens inverse. Il existe néanmoins, pour certains variants d'histones, une incorporation indépendante de la réplication.

Le transfert d'histones sur l'ADN est réalisé par des protéines chaperonnes telles que la nucléoplasmine, les NAPs, CAF1, FACT, HIRA, Asf1...qui diffèrent par leur affinité pour certaines histones.

Les NAPs (nucleosome assembly protein) assemblent les dimères H2A-H2B lors de la réplication (Park, Chodaparambil et al. 2005). Chez la levure, deux formes existent, NAP1 et NAP2. Chez les mammifères, cinq gènes (NAP1L1 à NAP1L5) ont été identifiés. D'abord définis comme chaperons d'histones et facteurs d'assemblages, les membres de cette famille remplissent aussi d'autres fonctions de régulation de la transcription et du cycle cellulaire.

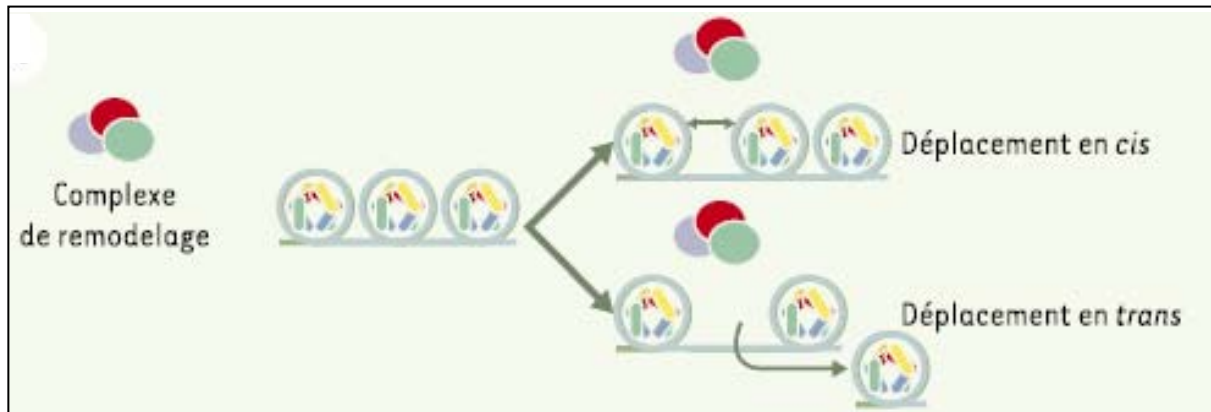


Figure 4 : Déplacement de l'octamère d'histone par un complexe de remodelage

L'octamère d'histone peut être déplacé par glissement sur l'ADN (déplacement en cis) ou par transfert sur un autre fragment (déplacement en trans) (Perche, 2003).

Le complexe CAF1 (chromatin assembly factor I) comprend trois sous unités chez l'homme, p150, p60 et p48. p150 prend en charge les histones H3 et H4 nouvellement synthétisées dans le cytoplasme. Une fois importées dans le noyau, CAF1 permet l'assemblage de deux dimères H3-H4. La purification du complexe CAF1 indique que H3 et H4 existent en hétérodimères, ce qui réfute le système classique, où H3 et H4 sont incorporées en tétramères (Tagami, Ray-Gallet et al. 2004). Ceci permettrait le maintien des marques épigénétiques, puisque après réplication, chaque nouveau tétramère pourrait contenir un ancien et un nouvel exemplaire de H3 et de H4.

FACT (Facilitates Chromatin Transcription) permet l'enlèvement des dimères H2A-H2B lors du passage de l'ARN Polymérase. Une fois la transcription réalisée, ce chaperon serait également responsable de la reconstitution des nucléosomes (Pavri, Zhu et al. 2006).

De nouvelles chaperonnes continuent d'être découvertes : récemment, une phosphatase 2C γ a été identifiée comme pouvant lier et déphosphoryler les dimères H2A-H2B (Kimura, Takizawa et al. 2006).

c) Les facteurs de remodelage du nucléosome

Les facteurs de remodelage de la chromatine sont présents chez tous les eucaryotes. Ils ont d'abord été décrits comme capables de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine, mais leurs activités sont aujourd'hui étendues : ils sont également impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et l'assemblage de la chromatine (Lusser and Kadonaga 2003).

Tous les facteurs identifiés sont des complexes multiprotéiques contenant une sous-unité ATPase appartenant à la famille Snf2. L'hydrolyse de l'ATP altère les interactions ADN-histones au sein du nucléosome (Becker and Horz 2002). Ces réactions vont permettre de positionner les nucléosomes le long de la fibre de chromatine, et de désorganiser leur espacement pour augmenter ou restreindre l'accès des facteurs régulateurs à leurs sites.

On distingue quatre famille de facteurs de remodelage en fonction de leur sous unité catalytique : SWI/SNF, ISWI, Mi-2/CHD/NURD, et les complexes Ino80-SWR1.

Les membres de la famille SWI/SNF altèrent la structure de la chromatine en désorganisant les nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes (Martens and Winston 2003). Les histones du promoteur sont acétylées par les complexes histone acétyltransférases NuA4 et/ou

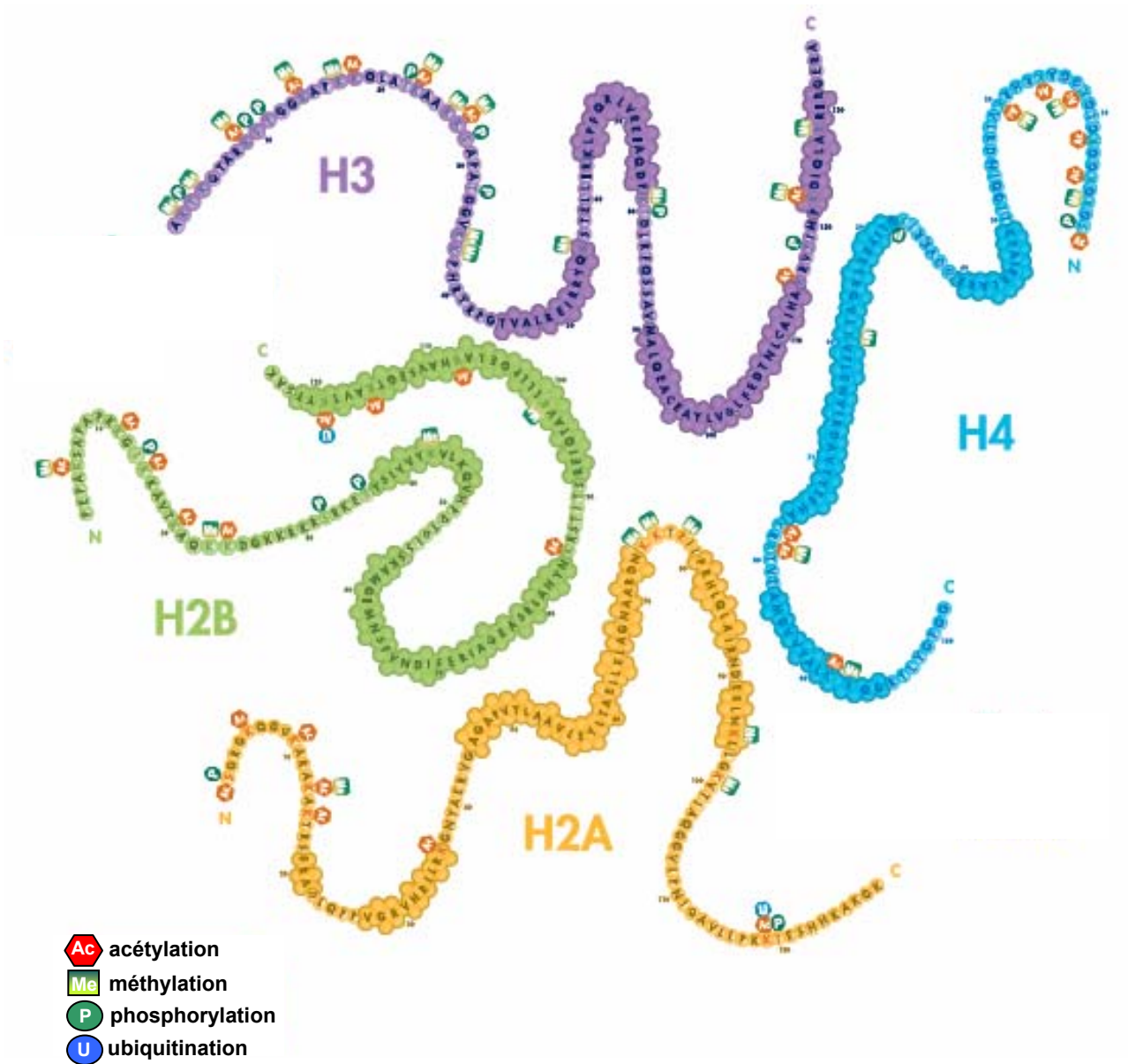


Figure 5 : Les modifications post-traductionnelles des histones

Etat des lieux des principales modifications post-traductionnelles des histones de cœur identifiées chez l'homme (upstate.com).

Modifying group	Amino acid(s) modified	Level of modification	Abbreviation for modification	Examples of modified residues
Acetyl-	Lysine	mono-	ac	H3K9ac
Methyl-	Arginine	mono-	me1	H3R17me1
	Arginine	di-, symmetrical	me2s	H3R2me2s
	Arginine	di-, asymmetrical	me2a	H3R17me2a
	Lysine	mono-	me1	H3K4me1
	Lysine	di-	me2	H3K4me2
	Lysine	tri-	me3	H3K4me3
Phosphoryl-	Serine or threonine	mono-	ph	H3S10ph
Ubiquityl-	Lysine	mono-	ub1	H2BK123ub1
SUMOyl-	Lysine	mono-	su	H4K5su
ADP ribosyl-	Glutamate	mono-	ar1	H2BE2ar1
	Glutamate	poly-	am	H2BE2arn

Figure 6 : La nomenclature utilisée pour la dénomination des modifications post-traductionnelles des histones (Turner, 2005).

SAGA. Le complexe SWI/SNF est alors recruté par le bromodomaine de sa sous unité ATPase, qui est un motif reconnaissant spécifiquement les histones acétylées (Hassan, Prochasson et al. 2002).

Ces facteurs peuvent déplacer l'octamère d'histone par glissement sur l'ADN (on parle de déplacement en cis) ou par transfert sur un autre fragment (en trans) (Figure 4). Ces déplacements impliquent des changements de structure interne et la rupture des liaisons ADN-histones. A l'heure actuelle, le modèle retenu suppose qu'un bourrelet d'ADN serait glissé le long du nucléosome afin de rompre petit à petit ces liaisons (Zofall, Persinger et al. 2006).

Le mécanisme d'action des facteurs de la famille ISWI est sensiblement le même que pour la famille SWI/SNF. Leur ATPase est caractérisée par la présence de deux domaines carboxy-terminaux SANT, qui interagissent avec les queues N-terminales des histones et l'ADN nucléosomal (Grune, Brzeski et al. 2003). Chez l'homme, ce complexe cumulerait les fonctions de facteur de remodelage et de chaperon d'histones (Loyola, LeRoy et al. 2001).

Le complexe Ino80 est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN (van Attikum, Fritsch et al. 2004). Le complexe SWR1, identifié plus récemment, est requis pour la déposition du variant d'histone H2A.X (Kobor, Venkatasubrahmanyam et al. 2004). Ceci suggère une implication plus large des facteurs de remodelage au sein de la dynamique de la chromatine.

d) Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont porteuses d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles, dont il existe plusieurs types : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, l'ubiquitination, la biotinylation (Figure 5) (pour revue, (Khorasanizadeh 2004) et (Nightingale, O'Neill et al. 2006)). L'impact de ces modifications sur la régulation de la structure chromatinienne et l'activité des gènes n'a émergé que récemment.

Chez l'homme on recense plus de cinquante acides aminés modifiables au sein des histones, et on évalue à plus d'un milliard de milliards le nombre de combinaisons possibles au sein d'un seul nucléosome. Ces modifications post-traductionnelles sont covalentes et réversibles. Elles vont altérer les charges électrostatiques des histones et modifier leurs propriétés structurales.

Une nomenclature de la dénomination de ces modifications a été proposée par Turner (Figure 6), et sera utilisée dans la suite de ce document (Turner 2005).

L'acétylation et la méthylation sont les deux modifications les plus étudiées actuellement.

L'acétylation des histones

L'acétylation des résidus lysine est très dynamique et repose sur l'équilibre entre les histone acétyltransférases (HAT) et histone déacétylases (HDAC).

Les HAT forment le plus souvent des complexes multiprotéiques et sont divisées en quatre familles : la superfamille des GNAT (GCN5, related Nacetyltransferase), la superfamille MYST, p300/CBP et les récepteurs nucléaires (Lee and Workman 2007). Les HAT nucléaires agissent comme co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription, mais sont également impliquées dans la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Elles ont pour substrat les histones, mais peuvent aussi acétyler des facteurs de transcription.

Les HDAC sont sub-divisées en trois classes : Les HDAC de classe I sont homologues à la protéine Rpd3 de levure, celles de classe II à Hda1 et celles de classe III à Sir2 (Gregorette, Lee et al. 2004). HDAC1 et HDAC2 font partie de plusieurs complexes répresseurs de la transcription, dont Sin3, NURD et CoREST (You, Tong et al. 2001).

Les complexes HAT et HDAC sont recrutés spécifiquement sur des promoteurs et peuvent modifier les histones. Un résidu acétylé peut être reconnu spécifiquement par des protéines contenant un bromodomaine. Cette modification était plutôt associée à l'origine à une activation de la transcription (les gènes actifs de l'euchromatine sont riches en histones hyperacétylées), mais on sait aujourd'hui qu'elle peut également conduire à une répression du gène concerné.

La méthylation des histones

La méthylation est une modification beaucoup plus stable, qui ne modifie pas la charge globale de l'histone.

Les histones méthyl-transférases (HMT) catalysent le transfert des groupements méthyls : les lysine methyltransferase (HKMT) modifient les lysines, qui peuvent être mono, di ou tri méthylées. Toutes les HKMT possèdent un domaine catalytique SET, à l'exception de l'enzyme Dot1 ; les protein arginine methyltransferase (PRMT) modifient les arginines, qui sont mono et diméthylées de manière symétrique ou asymétrique (Kouzarides 2002).

On a longtemps cru qu'il n'y avait pas d'enzymes capables de déméthyliser les histones. Pourtant ces protéines ont récemment été identifiées (pour revue (Klose and Zhang 2007)).

Famille d'enzymes	Enzymes	Spécificité de substrat
Histone Méthyltransférases		
PRMT	PRMT1	H4R3 (protéines non histones)
	PRMT2	Inconnue
	PRMT3	Inconnue
	PRMT4 / CARM1	H3R2, H3R17, H3R26
	PRMT5	H2A, H4 (protéines non histones)
HKMT	Suv39H1 / Suv39H2	H3K9
	G9a	H3K9, H3K27
	ASH1	H3K4, H3K9, H4K20
	Set1	H3K4
	Set2	H3K36
	Set7	H4K20
	Set9	H3K4
	ESC-E(Z)	H3K27
	SETDB1	H3K9
	Dot1	H3K79
Histone Déméthylases		
PADI	PADI4	H3R2, H3R8, H3R17, H3R26, H4R3
LSD	LSD1	H3K4me2, H3K4me1
	LSD2	Inconnue
JMJC	JHDM1	H3K36me2, H3K36me1
	JHDM2	H3K9me2, H3K9me1
	JHDM3 / JMJD2	H3K9me3, H3K9me2, K36me3, K36me2
	JARID	H3K4me3, H3K4me2
	PHF8 / PHF2	Inconnue
	UTX / UTY	Inconnue
	Jmjc only	Asn hydroxylation et inconnue

Figure 7 : Les histone méthyltransférases et déméthylases

Liste des principales enzymes identifiées à ce jour comme intervenant dans la méthylation des histones. Leur spécificité d'action est indiquée selon la nomenclature de Turner (d'après Vaquero, 2003 et Klose, 2007).

Les protéines à domaines JmJC sont les dernières en date décrites comme ayant une activité déméthylase. Leur nombre important élargit la gamme d'enzymes potentiellement impliquées dans le processus de méthylation des histones.

Les spécificités d'action des HMT et des déméthylases sont indiquées dans la figure 7.

Les protéines capables d'interactions spécifiques avec les résidus méthylés sont celles contenant un chromodomaine (comme HP1), un « tudor domain », ou un « WD-40 repeat domain ».

La méthylation des histones joue un rôle fonctionnel important dans de nombreux mécanismes tels que :

- la formation de l'hétérochromatine : H3K9me₃, H4K20me₃ et H3K27me₁ sont des marques spécifiques de l'hétérochromatine constitutive.
- le « silencing » transcriptionnel : H3K27me₃ est une modification impliquée dans des phénomènes tels que l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale ou la régulation transcriptionnelle des gènes homéotiques. Si on cible la méthyltransférase G9a sur la chromatine d'œufs de xénope, il s'ensuit une augmentation de la méthylation de H3K9 et de la répression transcriptionnelle (Stewart, Li et al. 2005).
- l'activation transcriptionnelle : certaines modifications, comme H3K4me₂, H3K4me₃ ou H3K36, sont retrouvées spécifiquement associées à des gènes activement transcrits.
- la réparation de l'ADN : H3K79 jouerait un rôle dans ce mécanisme complexe.

Les autres modifications

La phosphorylation des histones a lieu sur les résidus sérine et est régulée par des couples de kinases-phosphatases tels que Ipl1/aurora kinase et Glc7/PP1 phosphatase. Cette modification joue un rôle dans la régulation de la transcription, le déroulement de la mitose et la réparation de l'ADN (la phosphorylation du variant H2A.X est déterminante, voir partie suivante).

L'ubiquitination des résidus lysine est une mono-ubiquitination (Liu, Oughtred et al. 2005), dont la fonction reste encore incertaine mais pourrait être une répression de la transcription.

L'ADPribosylation, quant à elle, est plutôt associée à une activation de la transcription.

La fonction des autres modifications d'histones (biotinylation, sumoylation, glycosylation) reste encore à découvrir.

Conséquences des modifications et « code histone »

Les modifications des histones peuvent agir de plusieurs façons sur la structure générale du nucléosome. Le changement de la densité de charge des extrémités des histones pourrait avoir un impact sur leurs interactions avec l'ADN. D'ailleurs, des modifications sont retrouvées sur la partie globulaire du nucléosome, au niveau des résidus qui interagissent avec l'ADN (Cosgrove, Boeke et al. 2004). Cependant, un nucléosome porteur de nombreuses modifications a été cristallisé, et sa structure est pratiquement identique à celle d'un nucléosome natif (Harp, Uberbacher et al. 1996). Au delà de l'effet purement structural, il apparaît que les modifications des histones agissent de manière subtile.

Ces modifications peuvent être reconnues spécifiquement par certaines protéines : elles serviraient donc de signal de reconnaissance pour le recrutement de complexes sur la chromatine.

Les modifications des histones peuvent interférer les unes avec les autres, et chaque combinaison conduirait à une réponse biologique spécifique. C'est pourquoi Allis a proposé en 2000 l'existence d'un « code histone », qui regroupe toutes les combinaisons.

Selon ce principe, chaque combinaison pourrait être lue par des protéines spécifiques, et leur interprétation régulerait l'expression des gènes (Turner 2002). Les différentes modifications permettraient également de définir des territoires chromatinien (Jenuwein and Allis 2001).

De plus, la modification d'un résidu peut influencer sur les autres modifications potentielles de la même histone, ou d'une autre histone.

En guise d'exemple, on peut citer le cas de la régulation de la transcription chez la levure *S.cerevisiae* : H2B est ubiquitinilé sur la lysine 123. Cette ubiquitination permet la méthylation de H3K4 et H3K79. Ces modifications vont favoriser l'ouverture de la chromatine et la poursuite de l'élongation (Sun and Allis 2002). A l'inverse, la modification H3K9 interfère avec l'acétylation des histones H3 et H4, ce qui conduit à une répression de la transcription (Margueron, Trojer et al. 2005).

Cet entrelacement de signaux portés par les histones révèle des voies de signalisation épigénétiques complexes, encore à l'étude aujourd'hui.

B. LES VARIANTS D'HISTONE

1) Qu'est ce qu'un variant d'histone ?

Les variants d'histones sont une autre voie permettant la modulation du rôle nucléosomal au sein de la cellule.

Ce sont des isoformes non alléliques des histones conventionnelles. Ils sont présents chez tous les organismes eucaryotes, bien que certains d'entre eux soient plutôt restreints aux eucaryotes supérieurs. A l'heure actuelle, il a été découvert des variants pour toutes les classes d'histones, sauf pour H4, qui est une protéine extrêmement conservée au sein des espèces.

Ils possèdent un domaine de repliement composé de trois hélices et de deux boucles. Les ARN de certains variants sont épissés et polyadénylés, alors que ce n'est pas le cas des histones conventionnelles.

La définition exacte d'un variant d'histone pose le problème du choix de l'histone de référence. Longtemps, on a considéré que l'histone incorporée lors de la réplication constituait cette référence (Marzluff and Duronio 2002). Mais cette règle est trop simpliste puisque certains variants peuvent également être incorporés lors de la réplication. De plus, ils ne diffèrent parfois que très peu de l'histone canonique.

Deux classifications des variants ont été proposées : la première est basée sur la structure et distingue les variants homéomorphes (qui ne diffèrent de leurs homologues conventionnels que par quelques substitutions d'acides aminés qui ne modifient pas leur mobilité électrophorétique) des variants hétéromorphes (présentant des extrémités et une séquence variables au point d'en modifier la mobilité électrophorétique) (Franklin and Zweidler 1977; West and Bonner 1980).

La seconde repose sur des critères plus fonctionnels, comme la spécificité tissulaire, la dépendance ou non de leur synthèse par rapport à la réplication.

La figure 8 résume l'ensemble des variants identifiés à ce jour.

2) Les différents variants d'histone

a) Les variants d'histones de liaison

Actuellement on recense dix isoformes d'histones de liaison (Figure 8). La majeure partie des variations est présente dans les zones N- et C-terminales (Khochbin 2001).

Aucun rôle fonctionnel ne semble se dégager pour chacune de ces isoformes : chez la souris, une délétion d'un variant de H1 élève le taux des autres variants, suggérant un effet redondant de ces protéines (Fan, Nikitina et al. 2003). Plus encore, ni la délétion de H1°, exprimé au cours du développement, ni celle de H1t, spécifique du testicule, n'affecte la survie ou les grandes fonctions cellulaires.

Néanmoins, l'invalidation du gène du dernier variant d'histone de liaison découvert, H1T2, spécifique du testicule, causerait une stérilité chez les souris mâles, probablement à cause de problèmes de restructuration du noyau (Martianov, Brancorsini et al. 2005).

Le rôle épigénétique précis de ces variants reste donc encore à définir.

b) Les variants de H3

On distingue cinq isoformes de H3: CENP-A, H3.1, H3.2, H3.3 et H3.1t (Figure 9).

CENP-A et H3.3 sont des variants exprimés dans la plupart des organismes eucaryotes. Les plantes, insectes, batraciens et oiseaux possèdent également le variant H3.2, qui ne diffère de H3.3 que par quatre acides aminés.

Chez les mammifères, deux variants supplémentaires existent : H3.1, qui ne diffère de H3.2 que par la cystéine remplaçant la sérine en position 96, et H3.1t, spécifique du testicule, possédant quatre acides aminés différents de H3.1 (Figure 9).

Le variant CENP-A

CENP-A est un variant très conservé qui possède 50% d'homologie avec le domaine de repliement de H3 (Yoda, Ando et al. 2000).

CENP-A est un marqueur conservé et spécifique de la chromatine centromérique. Il contient un motif de recrutement au centromère, compris entre la boucle 1 et l'hélice 2 de son « histone fold » (Black, Brock et al. 2007). Ce motif confère également au nucléosome CENP-A une conformation plus rigide comparé au nucléosome conventionnel.

L'incorporation de CENP-A se produirait de manière indépendante de la réplication mais de façon strictement couplée à la progression de la mitose (Schuh, Lehner et al. 2007).

Le variant CENP-A est requis pour l'assemblage des protéines du kinétochore et la ségrégation des chromosomes en mitose (Sullivan, Blower et al. 2001).

La déplétion de ce variant chez la souris conduit à des défauts dans le maintien de la localisation des kinétochores (Regnier, Vagnarelli et al. 2005). Chez la drosophile, CENP-A est en complexe avec H4 et la protéine chaperonne RbAp48 : ce complexe relativement simple serait suffisant pour l'assemblage de la chromatine centromérique (Furuyama, Dalal et al. 2006). La protéine non histone Scm3 vient récemment d'être identifiée chez la levure comme permettant l'assemblage et le maintien du dimère CENP-A/H4 sur les centromères (Mizuguchi, Xiao et al. 2007).

Le variant H3.3

Le variant H3.3 est enrichi dans les zones de transcription active chez les insectes, les plantes et l'homme (Ahmad and Henikoff 2002) ((Chow, Georgiou et al. 2005). On le retrouve à la fois sur les promoteurs et les régions codantes des gènes actifs (Daury, Chailleux et al. 2006). Il est également enrichi en modifications signant la transcription active, c'est-à-dire une hyperacétylation et une diméthylation de H3K36 et H3K79 (Hake, Garcia et al. 2006).

L'incorporation de H3.3 est assurée spécifiquement par HIRA, de façon indépendante de la réplication (Tagami, Ray-Gallet et al. 2004). Sa déposition serait directement couplée à la transcription (Schwartz and Ahmad 2005).

Chez *C.elegans*, l'incorporation de H3.3 débute lors de la première division germinale, se poursuit en méiose et semble encore présente dans le sperme mature à la fin de la spermatogenèse (Ooi, Priess et al. 2006).

Les autres variants

H3.1 et H3.2 sont, à l'inverse de H3.3, déposées lors de la réplication. CAF1 a été identifiée comme la chaperonne spécifique permettant l'incorporation de H3.1 (Tagami, Ray-Gallet et al. 2004).

H3.2 est méthylé sur H3K27 et serait impliqué dans la répression de la transcription, alors que H3.1 possède des marques associées à la fois à l'activation et à la répression de l'expression des gènes (H3K14ac et H3K9me2) (Hake, Garcia et al. 2006).

L'acide aminé cystéine que possèdent en plus les variants H3.1 et H3.1t pourrait jouer un rôle dans la compaction en formant des ponts disulfures.

Ces variants très similaires possèdent des modifications post-traductionnelles différentes. Chaque variant porterait ainsi une information épigénétique particulière, ce qui expliquerait leur rôle fonctionnel propre (Hake and Allis 2006).

c) Les variants de H2B

Les variants de H2B identifiés sont tous spécifiques du testicule. En effet, au cours de la spermatogenèse, plusieurs variants d'histones prennent la place des histones conventionnelles, avant d'être définitivement remplacés par des protamines (Li, Maffey et al. 2005).

La plupart des différences entre les trois variants connus et l'histone canonique H2B est localisée dans la queue N-terminale.

TH2B est un variant retrouvé particulièrement conservé chez la souris et le rat (Choi, Gu et al. 1996). Chez l'homme, une forme a été identifiée et appelée TSH2B, présentant 93% d'homologie avec la séquence murine. Ce variant est exprimé dans les spermatogonies, et son taux d'expression diminue lors de l'allongement des spermatides. Un faible taux de TH2B se maintiendrait néanmoins dans les spermatozoïdes humains (Zalensky, Siino et al. 2002).

Récemment, un autre variant a été découvert, H2BFWT (Churikov, Siino et al. 2004). Il présente très peu d'homologie avec H2B. Les nucléosomes reconstitués avec H2BFWT ont la même stabilité que les nucléosomes conventionnels, et peuvent être remodelés par les facteurs SWI/SNF. Par contre, ils ne parviennent pas à recruter les facteurs de condensation et à participer à l'assemblage des chromosomes en mitose. Cette histone pourrait donc avoir un rôle spécifique dans la réorganisation de la chromatine pendant la spermatogenèse (Boulard, Gautier et al. 2006).

Enfin, un variant découvert chez le bovin, nommé SubH2Bv, serait associé à la membrane entourant le noyau spermatique. Il serait donc possible que les variants d'H2B aient également une fonction non chromatinienne (Tovich and Oko 2003).

d) Les variants de H2A

Il existe cinq variants de l'histone H2A : H2AZ, H2A.X, H2ABbd, macroH2A et TH2A, spécifique du testicule (Figure 10). MacroH2A sera décrit en détail dans la partie D de l'introduction de ce manuscrit.

Le variant H2AZ

H2AZ possède 63 % d'homologie avec la séquence de l'histone conventionnelle, et est le variant de H2A le plus conservé au cours de l'évolution. On le trouve chez les mammifères, les oiseaux (H2A.F), la levure (Htz1), la drosophile (H2Av), *C. elegans* et certains champignons dont *Tetrahymena* (H2Ahv1) (Raisner, Hartley et al. 2005).

H2AZ est requis pour le développement précoce des mammifères, ainsi que pour la croissance des levures (Liu, Li et al. 1996; Faast, Thonglairoam et al. 2001).

Ce variant est retrouvé surexprimé au sein de tumeurs colorectales, carcinomes et autres cancers (Rhodes, Yu et al. 2004; Zucchi, Mento et al. 2004).

La structure des nucléosomes contenant H2AZ a été établie à une résolution de 2,6 Å (Suto, Clarkson et al. 2000). La co-existence d'un dimère H2AZ-H2B et d'un dimère H2A-H2B semblant défavorable, les données obtenues suggèrent que H2AZ remplacerait les deux histones H2A d'un même nucléosome. Certains acides aminés spécifiques de H2AZ, comme une histidine capable de lier un ion divalent, peuvent entraîner des changements de structure du nucléosome. Ceci pourrait modifier le recrutement de facteurs spécifiques (Suto, Clarkson et al. 2000).

Le complexe de déposition de H2AZ a été identifié chez la levure : il s'agit du complexe SWR1-Com, qui partage quatre sous unités avec le complexe HAT NuA4 (Mizuguchi, Shen et al. 2004). L'incorporation d'H2AZ nécessiterait également la présence d'un patron d'acétylation (H3K9, H3K14, H4K5 et H4K12) (Raisner, Hartley et al. 2005).

Chez la drosophile, le complexe Tip60, qui rassemble les homologues de Nu4 et SWR1, incorpore H2Av. Cette déposition est couplée à l'avancement de l'ARN polymérase II lors de la transcription (Studitsky, Walter et al. 2004).

Néanmoins, le mécanisme de déposition du variant H2AZ semble assez complexe : le chaperon d'histone NAP1 a également été décrit comme capable de prendre en charge H2AZ (Park, Chodaparambil et al. 2005), et très récemment une nouvelle chaperonne, Chz1, a été identifiée chez la levure comme ayant une préférence pour ce variant (Luk, Vu et al. 2007).

De nombreuses données contradictoires ont été publiées concernant ce variant : tout d'abord, des nucléosomes reconstitués *in vitro* avec H2AZ auraient une stabilité réduite (Abbott, Ivanova et al. 2001), alors que d'autres études indiquent que sa présence stabiliserait l'octamère d'histone (Thambirajah, Dryhurst et al. 2006). De plus, H2AZ est retrouvé associé à des gènes actifs (Stargell, Bowen et al. 1993), mais ce variant se trouve aussi impliqué dans

la répression transcriptionnelle (Dhillon and Kamakaka 2000). H2AZ protégerait l'euchromatine de la progression ectopique de l'hétérochromatine, et permettrait donc de définir des domaines chromatiniens (Meneghini, Wu et al. 2003).

Les données les plus récentes, obtenues chez la levure, confirment que H2AZ est localisé sur les promoteurs des gènes inactifs. Ces nucléosomes variants seraient bien organisés autour du site de départ de transcription, à l'inverse de ce que l'on peut observer au niveau des gènes actifs. L'activation du promoteur serait facilitée par le départ d'H2AZ (Guillemette, Bataille et al. 2005; Raisner, Hartley et al. 2005; Zhang, Roberts et al. 2005). Dans les régions proches des télomères, où H2AZ régule positivement les gènes pour définir la limite eu/hétérochromatine, la distribution de ce variant est plus large et ne se limite pas au promoteur. H2AZ y est alors acétylé sur la lysine 14 par une combinaison de NuA4 et de SAGA (Babiarz, Halley et al. 2006; Millar, Xu et al. 2006).

Le rôle de H2AZ dans le contrôle de l'expression des gènes semble donc double : sur les promoteurs des gènes inactifs, il permet un remodelage rapide qui induit la transcription ; et dans les régions télomériques, il crée des domaines réfractaires au « silencing » par l'hétérochromatine.

De nouvelles fonctions émergent pour H2AZ : son élimination par ARN interférence conduit à la rupture des interactions d'HP1 avec l'hétérochromatine, et à des défauts de ségrégation des chromosomes (Rangasamy, Greaves et al. 2004). Chez la levure, des mutants de H2AZ présentent une difficulté à lancer la réplication en phase S et à poursuivre le cycle cellulaire (Dhillon, Oki et al. 2006). Enfin, H2AZ a été identifié récemment comme un nouveau composant du centromère, où sa distribution s'intercalerait avec celle du variant CENP-A (Greaves, Rangasamy et al. 2007).

Le variant H2A.X

H2A.X est un variant ubiquitaire, fortement conservé chez les eucaryotes et qui subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Il correspond à 10 % de l'ensemble des histones H2A chez les mammifères. Chez l'homme, ce variant est codé par un gène situé en 11q23, une région altérée dans de nombreux cancers (Bassing, Suh et al. 2003). Les souris déficientes en H2A.X sont infertiles et immunodéprimées (Celeste, Petersen et al. 2002).

La queue C-terminale de H2A.X contient vingt acides aminés de plus que l'histone conventionnelle, dont le motif SQE (Redon, Pilch et al. 2002). Cette sérine en position 139

peut être phosphorylée par les trois membres de la famille des protéines kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (Rad3-related) et DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Pilch, Sedelnikova et al. 2003). Un taux basal de la forme phosphorylée d'H2A.X, appelée γ H2A.X, existe normalement au sein d'une cellule mammifère. Ce niveau augmente massivement dans tous les mécanismes cellulaires mettant en jeu des cassures double brin, principalement la réparation de l'ADN, mais aussi l'apoptose, la recombinaison des zones V(D)J ou la réplication. Les molécules γ H2A.X s'accumulent en foyers nucléaires au niveau des dommages de l'ADN (Paull, Rogakou et al. 2000).

Le rôle précis de γ H2A.X dans la réparation des cassures double brin de l'ADN sera détaillé dans la partie suivante.

Le variant H2ABbd

C'est le variant de H2A découvert le plus récemment. Il possède 47 % d'homologie avec l'histone canonique. Son extrémité C-terminale est tronquée, et son domaine N-terminal est extrêmement basique. Toutefois, il ne possède pas de résidu lysine, site classique de modification post-traductionnelle (Chadwick and Willard 2001). Son domaine de repliement est la région la plus conservée.

La localisation cellulaire de H2ABbd est exclusivement nucléaire : dans les cellules mammifères femelle, il est exclu de la zone dense dite du corpuscule de Barr, qui correspond au chromosome X inactif. Cette observation de microscopie lui confère son nom, H2ABbd pour « Barr body deficient », en opposition au variant macroH2A (voir partie D). Ce variant est fortement associé aux régions euchromatiques acétylées, et vraisemblablement aux zones transcriptionnellement actives (Chadwick and Willard 2001).

Les nucléosomes contenant H2ABbd, reconstitués *in vitro*, ont une structure plus ouverte que les nucléosomes conventionnels. Des expériences de FRAP montrent que la protéine GFP-H2ABbd s'échange plus rapidement que GFP-H2A (Gautier, Abbott et al. 2004). Ces données suggèrent que ce variant confère une stabilité moins importante au nucléosome.

Le nucléosome contenant H2ABbd aurait une structure plus lâche, avec seulement 118 paires de bases d'ADN (Bao, Konesky et al. 2004). Ce résultat est remis en cause par des expériences de microscopie à force atomique et de cryo-microscopie électronique, qui démontrent qu'il y a en réalité 130 paires de bases d'ADN autour du nucléosome H2ABbd. La faible stabilité du nucléosome variant s'expliquerait par un angle d'entrée et de sortie de

l'ADN nucléosomal de 180 degrés. Le domaine « histone fold » dans sa totalité est responsable des propriétés inhabituelles de ce variant (Doyen, Montel et al. 2006).

Les facteurs de remodelage SWI/SNF sont incapables de mobiliser les nucléosomes contenant le variant H2ABbd. De plus, la présence de H2ABbd augmente le niveau d'acétylation des histones dans la chromatine *in vitro* et stimule l'effet de l'activation transcriptionnelle de la protéine p300 (Angelov, Verdel et al. 2004).

H2ABbd pourrait, en créant une structure plus ouverte de la chromatine et en facilitant l'accès à la polymérase ou à certains facteurs de transcription, être associé *in vivo* à une activation de l'expression des gènes.

Le variant TH2A

Ce variant ne diffère de l'histone canonique que par huit acides aminés. TH2A est synthétisé activement et incorporé à la chromatine lors de la spermatogenèse. Il représente 60 % des histones H2A dans les spermatocytes au stade pachytène (Rao, Brahmachari et al. 1983).

Récemment, une approche protéomique a permis d'identifier deux nouveaux variants d'histones, baptisés H2AL1 et H2AL2 en raison de leur similarité à H2A. Ces variants sont spécifiques du testicule et enrichis dans les derniers stades de la spermatogenèse. Leur incorporation serait facilitée en présence du variant TH2B, et les nucléosomes formés moins stables que les nucléosomes conventionnels (Govin, Escoffier et al. 2007).

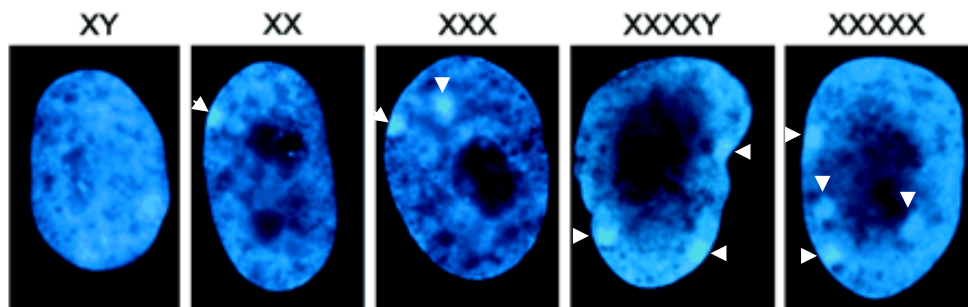


Figure 11 : Le chromosome X inactif se présente sous la forme du corpuscule de Barr

Différentes lignées de fibroblastes primaires sont marquées par le DAPI (46,XY, 46,XX, 47,XXX, 49,XXXXY, et 49,XXXXX). Les chromosomes X inactifs apparaissent comme des zones denses, le plus souvent à la périphérie du noyau, appelées corpuscules de Barr (flèches blanches). Leur nombre varie selon la loi du « n -1 », où n est le nombre total de chromosomes X de la cellule (d'après Chadwick, 2001).

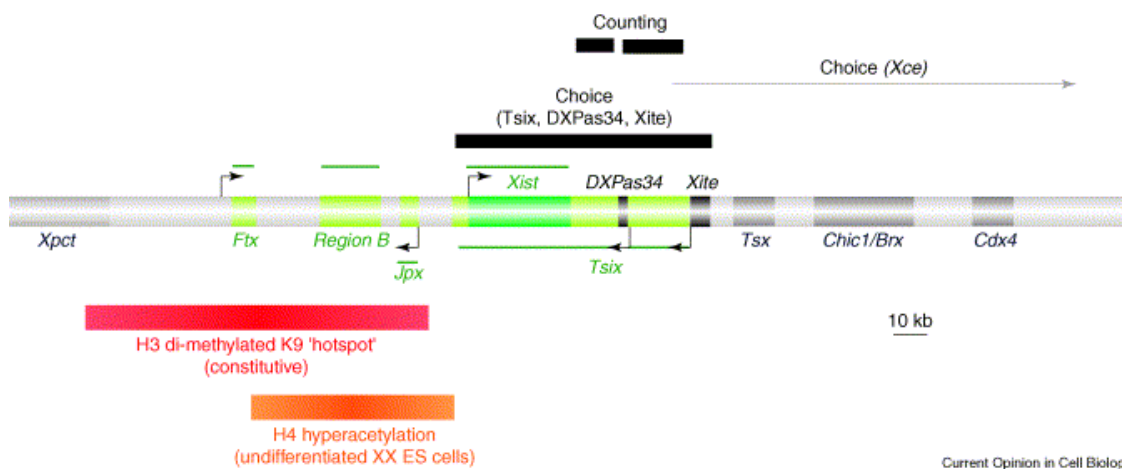


Figure 12 : La région Xic (« X-inactivation center »)

Les gènes colorés en vert produisent des transcrits non traduits. Les régions en noir sont celles identifiées comme impliquées dans les processus de comptage et de choix du chromosome X à inactiver. La barre rouge représente le « point chaud » de H3K9me2, constitutivement présent dans les cellules souches embryonnaires (ES) mâles et femelles. La barre orange représente la zone d'hyperacétylation de H4 qui est retrouvée dans les cellules ES femelles avant la différenciation (Heard E, 2004).

C. DEUX MECANISMES IMPLIQUANT LES MARQUES EPIGENETIQUES DES HISTONES

L'ensemble des modifications épigénétiques portées par les histones, que ce soit les modifications post-traductionnelles ou la présence de variants, constitue un véritable dialogue impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Cette partie va s'attacher à détailler deux mécanismes complexes où apparaissent des exemples caractéristiques de ce dialogue épigénétique : l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles d'une part, et la réparation de l'ADN d'autre part.

1) L'inactivation du chromosome X

Les mammifères femelles possèdent deux chromosomes X, alors que les mâles n'en ont qu'un seul. Par un mécanisme évolutif complexe, connu sous le nom d'« inactivation du chromosome X », un des deux chromosomes X de la femelle passe d'un état euchromatique actif à un état hétérochromatique inactif. Ceci va assurer la compensation de dose entre les sexes. Une fois établie, l'inactivation est stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires (Pour revue : (Heard 2005; Heard and Distèche 2006)).

En 1949, Murray Barr découvre une structure sombre et dense dans les cellules de mammifères femelles. Il ne sait pas encore que ce corpuscule, appelé toujours aujourd'hui « corpuscule de Barr », est le chromosome X inactivé (Figure 11). L'histoire de cette découverte fait un grand pas en 1961, quand Mary Lyon propose pour la première fois l'idée que l'un des deux chromosomes X est inactivé aléatoirement, en observant des souris et des chats mutés pour un gène contrôlant la couleur du poil porté par le X (Lyon 1961).

Depuis, ce processus d'inactivation du chromosome X a continué de fasciner des décennies de chercheurs : en particulier, comment l'extinction transcriptionnelle de plus d'un millier de gènes peut-elle toucher un chromosome X alors que son homologue, présent dans le même

noyau, reste actif ? Quels sont les mécanismes qui conduisent à ce traitement différentiel entre les deux chromosomes X ? Qu'en est-il au sein des différentes espèces ?

Bien que l'inactivation du chromosome X soit aujourd'hui l'exemple le plus cité de régulation épigénétique, il reste encore de nombreuses choses à découvrir sur ses mécanismes.

Actuellement, le phénomène d'inactivation du X est principalement étudié chez la souris, grâce à l'utilisation des cellules souches embryonnaires (ES) indifférenciées.

a) L'initiation de l'inactivation aléatoire du X

Pour déclencher l'inactivation, la cellule doit tout d'abord compter le nombre de X présents dans le noyau : s'il y en a plus d'un, elle va en laisser un seul actif et inactiver le ou les autres, selon la loi du « n-1 » (Figure 11). Elle doit ensuite choisir quel chromosome X sera éteint, avant d'amorcer l'inactivation. Chacune de ces étapes requiert une zone particulière du chromosome X de un mégabase appelé Xic, pour « X inactivation center ». Cette région est le cœur du processus de comptage, et permet d'assurer qu'un seul X reste actif par cellule diploïde (Avner and Heard 2001).

Ce centre d'inactivation Xic comprend le gène *Xist* (X-inactive-specific transcript), qui code pour un transcrit non traduit unique de 17 kb qui va se propager en cis le long du chromosome, totalement le recouvrir et permettre son inactivation. Lors des premières divisions, le gène *Xist* et son antisens *Tsix* sont exprimés faiblement. A un moment critique du développement embryonnaire (au stade blastocyste mûr chez la souris), l'expression de l'antisens *Tsix* s'efface, et les transcrits *Xist* sont stabilisés sur le futur chromosome X inactif ou Xi (Lee, Davidow et al. 1999). A l'inverse, l'expression de *Tsix* perdure sur le chromosome X actif (Xa).

Des expériences de délétion et de transgénèse ont montré que le Xic est un locus très complexe (Figure 12).

Une région de 37 kb en 3' de *Xist* est nécessaire pour le comptage des chromosomes X : une délétion de cette zone affecte ce comptage et conduit à une inactivation inappropriée du X après différenciation (Morey, Navarro et al. 2004).

Plusieurs zones de Xic semblent impliquées dans le choix du chromosome X à inactiver : le locus *Xce*, qui s'étend du *Xist* jusqu'à 100 Kb en 3' a d'abord été identifié (Avner, Prissette et al. 1998). L'antisens *Tsix* est actuellement l'objet de toutes les attentions concernant un rôle potentiel dans le comptage et le choix. Il est lui-même régulé par un autre transcrit, *Xite*. La

délétion d'une petite zone en 3' de *Xist*, dans laquelle se trouvent *Tsix* et *Xite*, affecte le processus de choix aléatoire du X : c'est toujours le chromosome portant l'allèle délété qui est inactivé.

L'hypothèse d'un facteur autosomal, produit en petite quantité et qui bloquerait l'action d'un Xic par cellule, a été maintes fois évoquée. La délétion de la région DXPas 34, en 5' de *Xist*, affecte l'expression de *Tsix* et pourrait donc être la séquence cible. Cette région possède plusieurs sites de fixation à CTCF (CCCTC binding factor), qui serait le « facteur de blocage » : sa fixation empêcherait la transcription de *Xist* mais renforcerait celle de *Tsix*, ce qui déterminerait donc le X actif (Clerc and Avner 2003). Néanmoins, cette hypothèse reste encore très controversée.

De nouvelles données de FISH mettent en évidence le rapprochement des deux Xics dans les premiers instants de l'inactivation, juste avant l'accumulation de *Xist* à partir d'un des deux allèles. Les transcrits *Tsix* et *Xite*, par des régions de 3.7 et 5.6 Kb respectivement, sont nécessaires à cet accollement des deux Xics. Cette communication entre les deux chromosomes pourrait faciliter les processus de comptage et de choix (Bacher, Guggiari et al. 2006; Xu, Tsai et al. 2006).

L'ARN *Xist* s'accumule le long du chromosome dont il est transcrit et l'inactive en cis, en induisant des changements dans la structure de la chromatine. Il permet le recrutement des facteurs d'hétérochromatine et des enzymes de modification des histones (HDAC et HMT) qui provoquent l'inactivation transcriptionnelle des gènes liés au X ciblé. Un « point chaud », constitutivement enrichi en H3K9me2 en 5' du *Xist*, est le centre de nucléation à partir duquel l'hétérochromatine s'étend (Figure 12). Cette région est totalement nécessaire pour l'initiation de l'inactivation. Elle rassemble tous les autres ARN de Xic (*Xist* et *Tsix* mis à part) et est également riche en histone H4 hyperacétylée (O'Neill, Keohane et al. 1999).

Mille à deux mille copies de *Xist* vont ainsi décorer le chromosome. Contrairement aux autres grands ARN, le transcrit *Xist* est immobile et très stable. L'association du *Xist* avec la chromatine et sa fonction de « silencing » sont distinctes : la première est assurée par la liaison de faible affinité de facteurs sur des séquences distribuées le long du transcrit, alors que la deuxième requiert une région répétée positionnée en 5' (Wutz, Rasmussen et al. 2002). Le facteur SAF-A (scaffold attachment factor) est un composant de la structure stable du chromosome X inactif, et est un candidat plausible pour l'immobilisation du *Xist* sur la chromatine (Fackelmayer 2005).

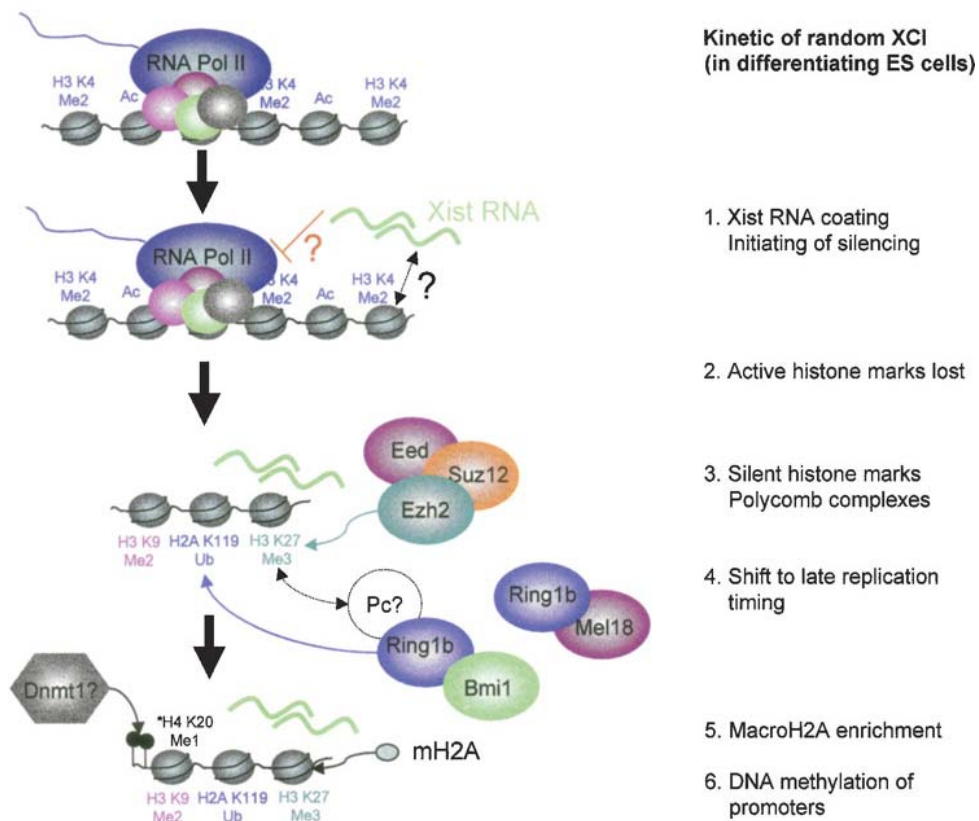


Figure 13 : Les marques épigénétiques associées à l'inactivation du chromosome X

La chronologie d'apparition de ces marques durant la différenciation de cellules souches embryonnaires femelles est indiquée : le transcrite *Xist* recouvre le chromosome et induit la répression transcriptionnelle. Les modifications post-traductionnelles des histones associées à l'activation, comme H3K4me2, H3ac et H4ac, sont perdues. Le complexe Polycomb PRC2 est ensuite recruté, et H3K27me3 apparaît. Le décalage dans la vitesse de réplication suit ces événements. Le variant macroH2A apparaît comme enrichi sur le Xi plus tardivement. Enfin, l'ADN des promoteurs des gènes liés au Xi est méthylé (d'après Heard and Disteché, 2006).

Une translocation ou une induction de *Xist* dans des cellules humaines différenciées ne peut pas établir de chromatine silencieuse supplémentaire. Par contre, cela fonctionne dans des cellules ES non différenciées. La fonction de *Xist* est donc restreinte lors de la différenciation, vraisemblablement par l'action limitée de voies épigénétiques (Savarese, Flahndorfer et al. 2006).

b) Les marques épigénétiques du X

La chromatine du chromosome X inactif présente un certain nombre de caractéristiques que l'on peut lister :

- enrichissement en H3K9me2, H3K27me3, H4K20me1 et H2AK119ub1
- appauvrissement en H3K4me2, H3K36me2, H3R17me2, H3ac et H4ac
- association des protéines du groupe Polycomb
- réplication tardive en phase S
- présence du variant d'histone macroH2A
- accumulation des protéines HMG (High Mobility Group)
- méthylation des promoteurs sur îlots CpG
- exclusion de l'ARN polymérase II

La cinétique de ces changements a été étudiée dans les cellules ES et est représentée dans la figure 13.

Les protéines du groupe Polycomb forment des complexes de répression nommé PRC1 (contenant Ring 1a et 1b) et PRC2 (contenant Eed, Suz12 et Ezh2), qui sont impliqués dans l'inactivation des gènes homéotiques. Ces protéines sont recrutées rapidement lors de l'inactivation du chromosome X. Néanmoins, un transcrit *Xist* tronqué et incapable d'induire la répression transcriptionnelle peut toujours recruter les Polycomb, ce qui indique que leur fonction n'est pas essentielle (Plath, Fang et al. 2003). La mono-ubiquitination de l'histone H2A dépend des protéines du complexe PRC1 (de Napoles, Mermoud et al. 2004). La protéine Ezh2 apparaît comme étant la méthyltransférase responsable de H3K27me3 (Silva, Mak et al. 2003). Elle aurait également une activité de méthylation de H3K9. Ces deux modifications ont une distribution différente dans les cellules somatiques : H3K27me3 est très spécifique des gènes du Xi alors que H3K9 est distribué plus largement dans le noyau (Rougeulle, Chaumeil et al. 2004).

La combinaison exacte des modifications d'histones sur une région du chromosome X inactif peut varier selon la lignée, lors du développement ou pendant le cycle cellulaire, comme c'est le cas pour H4K20me1 (Kohlmaier, Savarese et al. 2004).

L'incorporation du variant d'histone macroH2A et la méthylation de l'ADN des gènes du Xi sont des marques qui apparaissent plus tardivement, une fois que le processus d'inactivation est irréversible. Elles participeraient à la maintenance de l'état inactif du chromosome. Le rôle exact de macroH2A reste encore un mystère. L'étude des embryons mutant *Dnmt1*^{-/-} ont montré que la méthylation de l'ADN est requise pour un maintien stable de l'état réprimé des gènes sur le Xi (Sado, Fenner et al. 2000). Cependant, une étude récente sur la distribution globale de la méthylation montre que le Xa serait deux fois plus méthylé que le Xi (Hellman and Chess 2007).

En plus des marques épigénétiques, le chromosome X inactif présente une isolation temporelle et spatiale. La réplication tardive du Xi n'est pas due à une altération de l'origine de réplication, mais à un décalage dans l'initiation de la réplication, conséquence de la structure de la chromatine (Gomez and Brockdorff 2004). Cela minimiserait le contact avec les facteurs de transcription et aiderait au maintien de l'état inactif par la présence prolongée des enzymes appropriées.

La ségrégation spatiale du Xi dans le noyau peut aussi être un facteur important dans la maintenance et même dans l'initiation de l'inactivation. Dernièrement, une étude a montré que l'ARN *Xist* définit un compartiment nucléaire silencieux, dont les gènes encore transcrits sont exclus jusqu'à ce que leur inactivation soit effective (Chaumeil, Le Baccon et al. 2006; Clemson, Hall et al. 2006).

Une réactivation des gènes du Xi n'arrive que rarement *in vivo* (exception faite de la lignée germinale femelle), bien qu'elle ait tendance à augmenter avec l'âge des cellules ou dans le cas des cancers (Spatz, Borg et al. 2004). La maintenance de l'état inactif semble être un mécanisme complexe et redondant. En effet, la suppression d'une seule marque comme la méthylation de l'ADN ou l'hypoacétylation des histones ne conduit jamais à une réactivation globale du chromosome X.

De nouvelles recherches se concentrent sur les protéines de la réparation, comme BRCA1 et les kinases ATM/ATR, qui participeraient à la maintenance du Xi. Le gène suppresseur de tumeur BRCA1 interagirait avec le transcrit *Xist* et interviendrait dans sa localisation (Ganesan, Silver et al. 2002). Son élimination par siRNA diminuerait la concentration de *Xist*

sur le chromosome inactif (Silver, Dimitrov et al. 2007), mais cela reste controversé : une étude multifactorielle récente sur une série de tumeurs conclue que BRCA1 n'est pas requis pour le recouvrement du chromosome par l'ARN *Xist* (Vincent-Salomon, Ganem-Elbaz et al. 2007).

c) Les gènes échappant à l'inactivation

De nombreuses maladies chromosomiques touchent le X. Les plus connues sont le syndrome de Turner (XO) et le syndrome triple X (XXX). Les turnériennes présentent une petite taille et le plus souvent une stérilité. Selon la loi du « n-1 », leurs cellules n'ont pas de chromosome X inactif. Les femmes atteintes de trisomie du chromosome X présentent deux Xi et un certain nombre de pathologies variables comme un retard mental ou des problèmes cardiovasculaires (Swerdlow, Schoemaker et al. 2005). Comment expliquer les symptômes de ces patientes, puisque la compensation de dose a bien lieu ?

En réalité, bien que l'inactivation du X touche l'ensemble du chromosome, un certain nombre de gènes échappent à l'extinction transcriptionnelle. On les appelle les gènes « escape » ou échappants. Chez la souris, ces gènes sont peu nombreux, mais chez l'homme, leur proportion atteindrait 15% ! Pour un gène donné, il peut y avoir des variations entre individus ou au sein des cellules d'un même individu (Carrel and Willard 2005).

Ces gènes échappants sont principalement localisés sur les régions pseudo-autosomales, qui sont les régions homologues entre les chromosomes X et le Y, mais pas uniquement. Ils s'organisent en domaines qui diffèrent selon les espèces : chez la souris, le gène *Jardic* est un gène échappant entouré de gènes inactifs, alors que chez l'homme ce même gène fait partie d'un large domaine qui échappe à l'inactivation. Ils sont exprimés activement, et leur structure chromatinienne dans les tissus adultes est caractéristique des gènes actifs (Filippova, Cheng et al. 2005).

Les domaines échappants semblent appauvris en séquences LTR (long terminal repeat) (Tsuchiya, Greally et al. 2004), ainsi qu'en séquences LINEs, proposées comme étant des activateurs de la propagation de l'inactivation (Carrel, Park et al. 2006; Lyon 2006).

Enfin, des sites de fixation au facteur CTCF, qui lie l'ADN de façon dépendante de la méthylation, ont été découverts en 5' des gènes échappants : ce facteur pourrait influencer la méthylation de l'ADN sur ces gènes et permettre la formation d'une frontière entre les domaines d'inactivation et d'échappement (Filippova, Cheng et al. 2005).

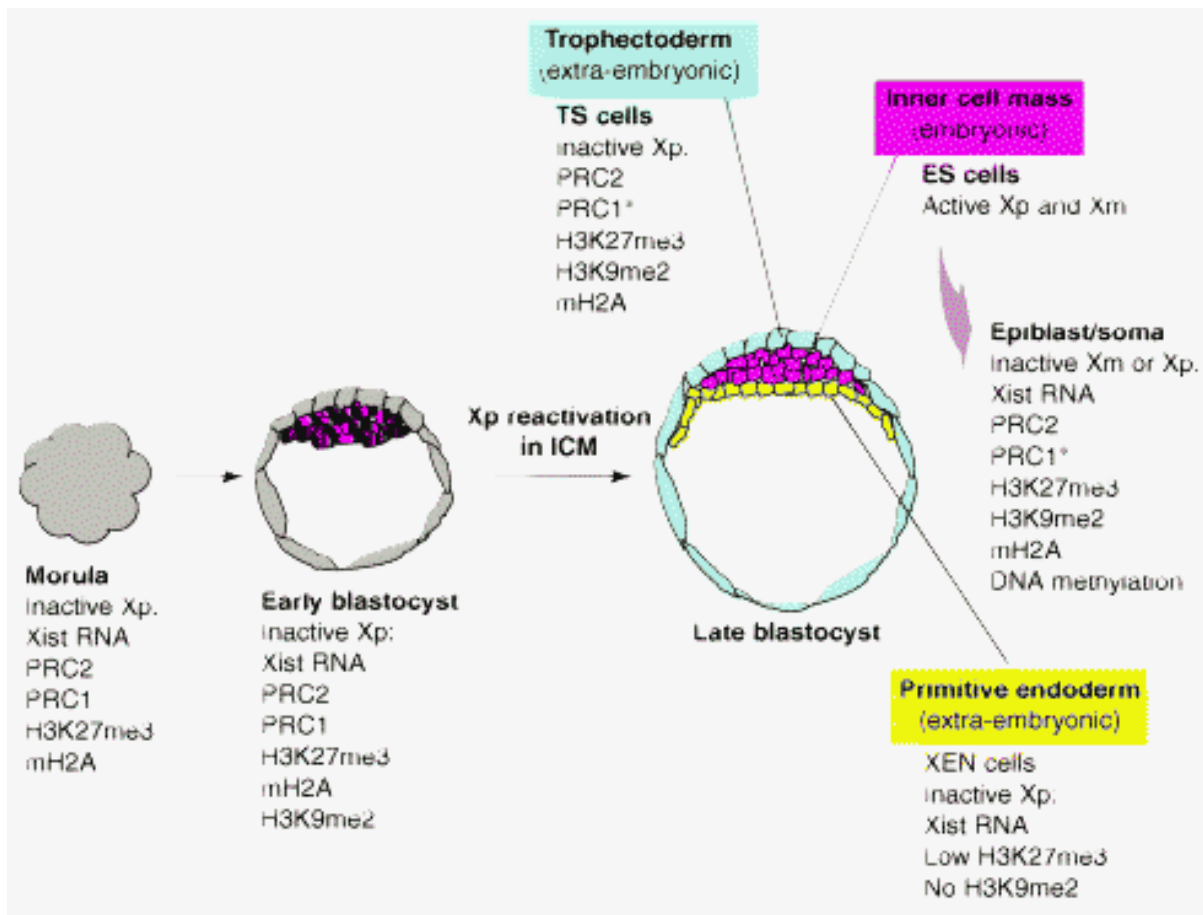


Figure 14 : L'inactivation du chromosome X chez la souris : par empreinte, puis aléatoire

Au stade morula et jeune blastocyste, le chromosome X d'origine paternelle (Xp) est inactivé dans toutes les cellules. Dans la masse cellulaire interne du blastocyste mûr, la réactivation de ce Xp a lieu, ce qui conduit à la perte de toutes les marques épigénétiques présentes.

Par contre, dans les cellules du trophoctoderme et de l'endoderme primitif, ces modifications sont maintenues. Elles ne sont pas toujours identiques : par exemple, très peu de protéines PRC2 et de H3K27me3 ont pu être identifiées dans les cellules dérivant de l'endoderme primitif. Au sein du futur embryon, l'inactivation aléatoire se met en place et conduit à la répression soit du X d'origine maternelle (Xm), soit du Xp (Heard E, 2005).

d) D'un point de vue évolutif... l'inactivation par empreinte

La régulation et l'évolution du chromosome X des mammifères est directement relié à l'évolution du chromosome Y. Le chromosome X contient 1100 gènes, reliés particulièrement aux fonctions reproductives et cérébrales. Le chromosome Y est constitué principalement d'hétérochromatine et ses gènes se sont peu à peu réduits à une centaine, ce qui a conduit au développement du mécanisme de compensation par le X.

Comme nous l'avons vu, chez les mammifères, un des deux chromosomes X de la femelle est inactivé afin de réduire de moitié, donc d'équilibrer le produit de ses gènes. Néanmoins cette stratégie n'est pas appliquée par toutes les espèces : chez la drosophile, la cellule mâle déploie un complexe MSL (male specific lethal) pour sur-exprimer d'environ deux fois son unique chromosome X (Mendjan and Akhtar 2007). Chez le nématode *C.elegans*, le mâle est XO et l'hermaphrodite XX. C'est ce dernier qui réprime la transcription de moitié sur chacun des deux X (Meyer 2000). Enfin, chez certains papillons, les gènes présents sur les chromosomes sexuels sont assez peu nombreux pour qu'aucun mécanisme de compensation n'intervienne.

Chez les euthériens (ou mammifères placentaires) l'inactivation du chromosome X affecte le chromosome paternel ou maternel de manière aléatoire durant le développement précoce. Chez les métathériens (marsupiaux), c'est toujours le chromosome X paternel qui est inactivé. On appelle cela l'inactivation « par empreinte », en opposition à l'inactivation aléatoire.

De façon surprenante, cette inactivation par empreinte a été retrouvée dans le tissu extra-embryonnaire des rongeurs (Figure 14).

Au stade deux cellules, les deux chromosomes X sont actifs. A quatre cellules, le transcrit *Xist* commence à envahir le X paternel, et les modifications épigénétiques se succèdent jusqu'à obtenir, au stade blastocyste jeune, un chromosome X paternel inactivé dans toutes les cellules. Cette inactivation par empreinte demeure dans le trophoctoderme et l'endoderme primitif. Par contre, dans la masse cellulaire interne, ou futur embryon, cet état va s'inverser au stade blastocyste mûr et laisser la place au mécanisme d'inactivation aléatoire (Okamoto, Otte et al. 2004).

Le mécanisme et les différentes marques épigénétiques intervenant lors de l'inactivation par empreinte sont de même nature que ceux de l'inactivation aléatoire. Des différences existent néanmoins. Une synthèse des observations dans les différents tissus est proposée dans la figure 14.

Cette inactivation par empreinte est proposée comme étant la forme ancestrale du processus de compensation. Elle a été décrite chez les rongeurs et les bovins, mais à l'heure actuelle, elle n'a pas été démontrée chez l'homme (Rougeulle and Avner 2003).

Chez les marsupiaux, l'inactivation par empreinte présente de nombreuses similitudes avec ce qui a été décrit chez la souris, mais le processus n'est pas régulé de la même façon. En effet, la région *Xic* est bien conservée chez tous les mammifères, mais il n'a pas été possible de trouver un équivalent de *Xist* ou de *Tsix* chez les métathériens ou les protothériens (Davidow, Breen et al. 2007; Hore, Koina et al. 2007). L'inactivation aléatoire et le *Xist* semblent n'être apparus qu'avec l'évolution du placenta chez les euthériens. Malgré la présence de cinq chromosomes X, on ne connaît pas encore le mécanisme d'inactivation qui a lieu chez les protothériens (ou monotrèmes) (Grutzner and Graves 2004).

e) L'histoire n'est pas encore finie

Le phénomène d'inactivation du chromosome X n'en finit pas de se complexifier : une nouvelle forme de compensation de dose vient d'être identifiée chez les mammifères. Afin d'équilibrer le produit des gènes du X et des autosomes, l'unique chromosome X actif des mâles et des femelles présenterait une hypertranscription !

Pour évaluer la transcription globale du X versus le reste du génome, une approche de puces à ADN a été mise en place à partir d'ADNc de tissus humains et murins. Le ratio d'expression X/autosome calculé vaut en moyenne 1, ce qui signifie que la transcription du chromosome X est clairement doublée (Nguyen and Disteché 2006). Ce phénomène aurait lieu tout de suite après la conception chez les individus mâles, après l'inactivation du chromosome X chez les femelles. Le mécanisme de cette surexpression, qui a également été découverte chez *C.elegans* (Gupta, Parisi et al. 2006), reste encore inconnu à ce jour.

2) La réparation de l'ADN

Chaque jour la cellule doit lutter pour préserver l'intégrité de son matériel génétique. La molécule d'ADN est effectivement sensible à de nombreuses modifications qui vont altérer sa structure. Les origines de ces dommages sont aussi différentes que multiples : ils peuvent provenir autant de facteurs exogènes que de l'intérieur de la cellule elle-même.

a) Les dommages de l'ADN et les différents systèmes de réparation

Parmi les sources exogènes, on dénombre les rayonnements, les radiations ionisantes et les substances chimiques mutagènes (agents alkylants, drogues, polluants). La production des espèces réactives de l'oxygène lors d'une étape du métabolisme cellulaire est la principale source de problèmes survenant de manière endogène. Des erreurs induites lors de la réplication, la méiose et la recombinaison V(D)J sont également susceptibles d'occasionner des dommages à l'ADN.

La cellule doit donc faire face à une grande diversité de dommages suite à l'exposition à l'une de ces sources : modifications de bases, mésappariements de bases, modifications covalentes de nucléotides, apparition de cassure simple brin (SSB) ou double brin (DSB). Environ 10 000 dommages touchent l'ADN d'une cellule chaque jour (Lindahl, Prigent et al. 1993). Leur accumulation peut mener à l'apoptose ou au développement de cancers. Pour lutter contre ce phénomène, la cellule dispose de six mécanismes de réparation spécialisés.

Les dommages mineurs ou de moindre importance sont réparés par trois voies principales : la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation par excision de bases (BER) ou la réparation de mésappariements de bases (MMR) (pour revue : (Gong, Kwon et al. 2005)).

Les cassures simple brin disposent d'un mécanisme de réparation spécifique, le SSBR. Enfin, deux processus permettent à la cellule de réparer les cassures double brin : la recombinaison homologue (HR) et la jonction non-homologue (NHEJ).

La réparation par excision de nucléotides (NER) est un système principalement utilisé pour réparer les lésions encombrantes comme les dimères de pyrimidine, les pontages intra-brins et autres modifications causées par les UV. Il s'agit d'un mécanisme très conservé qui se joue en trois étapes :

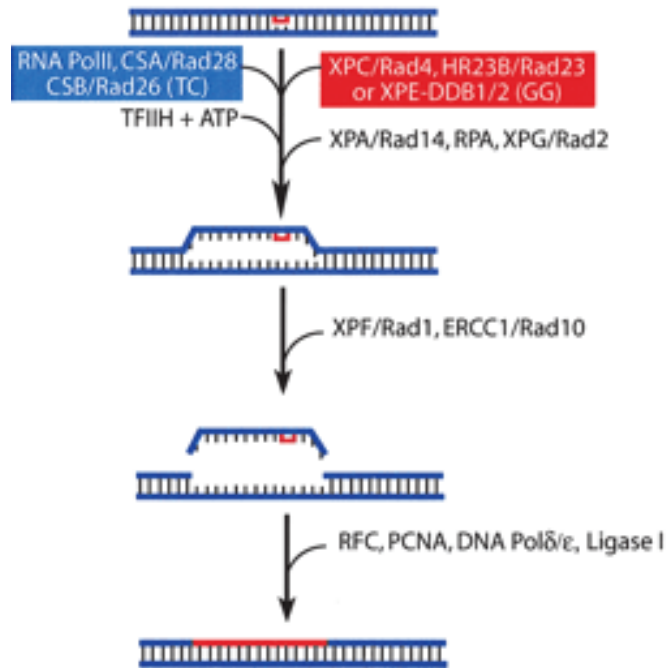


Figure 15 : La réparation par excision de nucléotides (NER)

La reconnaissance du dommage diffère si elle est couplée à la transcription (protéines citées dans la boîte bleue) ou non (boîte rouge). L'incision et l'excision de la lésion sont effectuées par les endonucléases XPG et ERCC1 / XPF. La polymérase ϵ ou δ vient combler le site vacant et la ligase I assure la fermeture de la double hélice d'ADN (Peterson and Cote, 2004).

- la reconnaissance du dommage : elle est basée sur la déformation de la structure de l'ADN générée par la lésion, et non sur la modification chimique de la base elle-même. Cette reconnaissance a lieu soit lors de la transcription, par le blocage de l'ARN polymérase sur le site lésé, soit de façon indépendante de la transcription. De nombreuses protéines sont impliquées dans cette reconnaissance (Fitch, Nakajima et al. 2003) (Figure 15).
- L'incision et l'excision : l'ADN de la zone endommagée est déroulé par le complexe TFIIH. Les endonucléases XPG et ERCC1 / XPF sont recrutées et génèrent des coupures simple brin aux extrémités 3' et 5', ce qui permet l'élimination du fragment porteur du dommage (Riedl, Hanaoka et al. 2003).
- La synthèse de novo et la ligation : la polymérase répliquative ϵ ou δ comble le site vacant en prenant comme modèle le brin complémentaire. Pour finir, la ligase I ligue la double hélice d'ADN.

La réparation par excision de bases (BER), quant à elle, répare principalement les modifications de bases (désaminations, bases alkylées ou oxydées, adduits exocycliques) (Wilson and Bohr 2007). C'est une ADN glycosylase spécifique qui reconnaît la base modifiée et procède à son élimination, conduisant à la présence d'un site abasique (Figure 16).

Une incision dans le brin d'ADN est réalisée par une AP-endonucléase (APE1 chez l'homme). Puis, dans la version la plus classique (short-patch), un seul nucléotide est ajouté et lié, alors que dans la version plus complexe (long-patch) plusieurs nucléotides viennent remplacer les anciens (Figure 16). Le mécanisme de sélection entre l'une ou l'autre de ces deux voies n'a pas encore été élucidé. Certains résultats tendent à montrer que le choix dépendrait de la glycosylase qui réalise l'excision (Fortini, Parlanti et al. 1999).

Ces dernières étapes de synthèse et de ligation sont communes avec le mécanisme de réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR). En effet, la coupure réalisée par APE1 peut être reconnue comme une SSB par les effecteurs de cette voie de réparation.

b) La réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR)

Les cassures simple brin de l'ADN reconnues par ce mécanisme peuvent être induites directement par des agents génotoxiques ou indirectement lors du processus BER. La plupart des effecteurs de cette voie de réparation sont d'ailleurs également impliqués dans le BER.

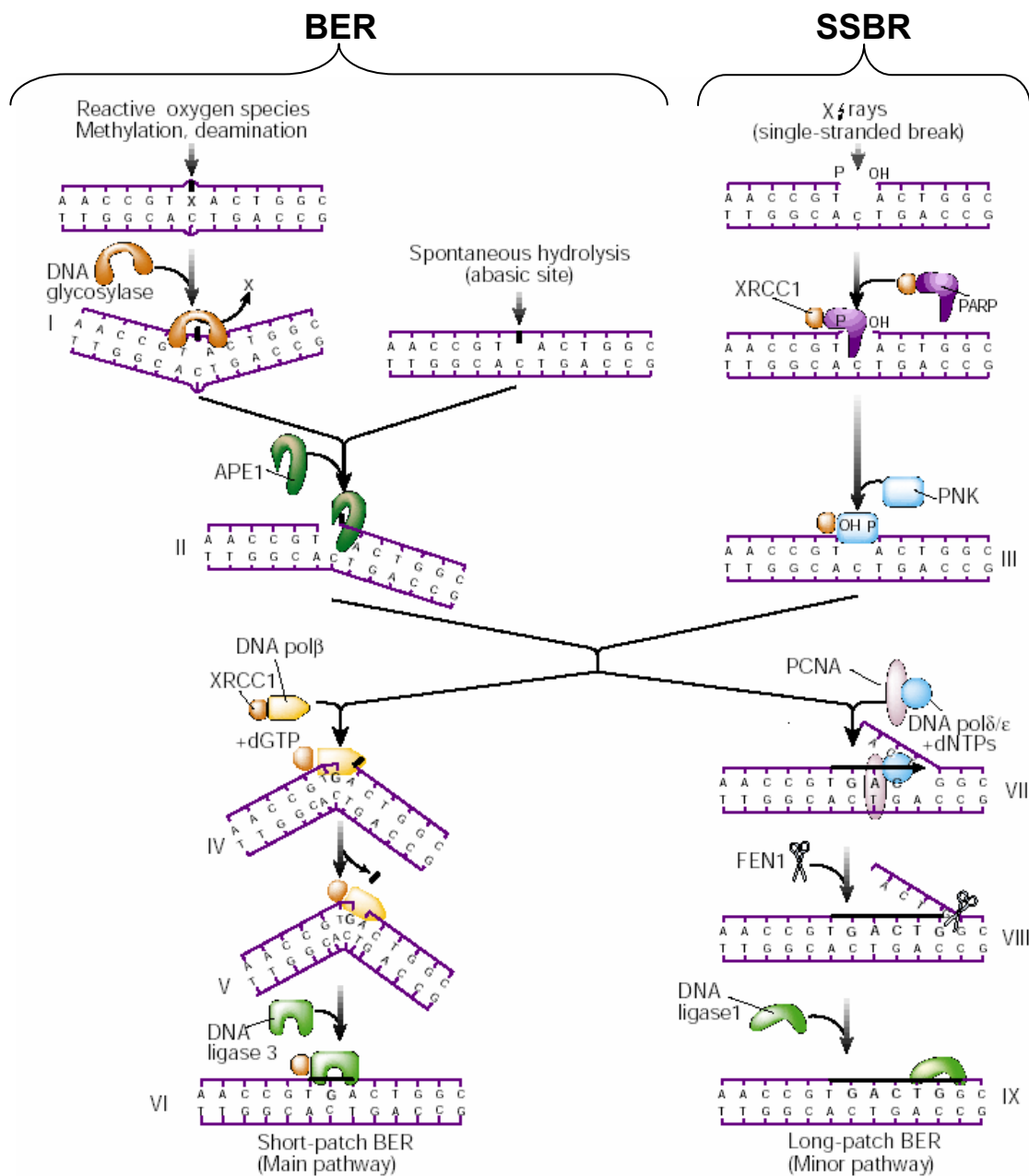


Figure 16 : La réparation par excision de bases (BER) et la réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR)

Des glycosylases spécifiques reconnaissent les bases modifiées et induisent leur élimination, ce qui conduit à la présence d'un site abasique. Ceci peut également arriver spontanément par hydrolyse. Une incision par l'endonucléase APE1 est ensuite réalisée dans le processus BER. La poly(ADP-ribose) polymérase PARP reconnaît les cassures simple brin de l'ADN et s'active, ce qui conduit au recrutement de XRCC1. Chez les mammifères, la voie « short-patch » est la plus commune pour terminer les mécanismes BER et SSBR : la polymérase β, associée à XRCC1, incorpore un à deux nucléotides, et la ligase III referme la double hélice. Le mécanisme de la voie « long-patch » est également indiqué (Hoeijmakers JH, 2001).

La protéine clé du SSBR est la poly(ADP-ribose) polymérase ou PARP.

La PARP détecte le site de clivage de l'ADN et s'y fixe, ce qui la rend active. Elle va alors catalyser la synthèse de poly(ADP-ribose) (PAR) à partir de NAD⁺ sur les résidus acide glutamique ou aspartique (D'Amours, Desnoyers et al. 1999). Cette modification post-traductionnelle est immédiate et transitoire (Figure 17). Elle touche des protéines de l'architecture de la chromatine (histones H2B et H1 principalement), du métabolisme de l'ADN (facteurs de réparation et de transcription), et la protéine PARP elle-même, qui est l'accepteur principal. Cette auto-ADP-ribosylation de PARP augmente sa charge négative jusqu'à conduire à sa dissociation de l'ADN (Faraone-Mennella 2005). Le polymère d'ADP-ribose sera ensuite rapidement dégradé par la glycohydrolase PARG (Figure 17).

La modification PAR altère la structure de la chromatine et induit une décondensation, ce qui facilite l'accès aux enzymes de réparation. Le poly(ADP-ribose) permet également le recrutement de protéines au niveau de la cassure, en particulier XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing Protein). Ce polypeptide de 70 KDa stimule la polynucléotide kinase PNK, qui « nettoie » les extrémités non liables (Figure 16).

Le plus souvent (voie short-patch), la polymérase β , associée à XRCC1, incorpore un à deux nucléotides. La ligase III, stabilisée elle aussi par XRCC1, referme ensuite la double hélice. Dans le cas de la voie long-patch, la polymérase β peut être remplacée par les polymérases ϵ ou δ associées au facteur de processivité PCNA : environ cinq à sept nucléotides sont incorporés. Une Flap endonucléase (FEN1) coupe alors l'ancien brin d'ADN afin de permettre à l'étape de ligation d'avoir lieu, cette fois par le complexe ligaseI/XRCC1 (Figure 16).

On peut noter que la protéine XRCC1 est le « chef d'orchestre » des mécanismes BER et SSBR, puisqu'elle interagit physiquement et fonctionnellement avec pratiquement tous les acteurs de la réparation, et qu'elle est présente tout le long du processus (Hoeijmakers 2001).

Les enzymes PARPs sont une grande famille de protéines présentes des archéobactéries aux mammifères (pour revue : (Schreiber, Dantzer et al. 2006)). On en dénombre à l'heure actuelle 17, dont le motif catalytique est conservé pour chacune. Parmi elles, deux tankyrases, la PARP-3 qui a un signal de localisation centromérique, et les PARPs 9, 14 et 15 qui possèdent un domaine « macro » (Figure 18).

Ces protéines, ainsi que le PAR qu'elles catalysent, sont connus pour leur implication dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques tels que la réparation de l'ADN, la réplication, la régulation de la transcription, la recombinaison et l'apoptose.

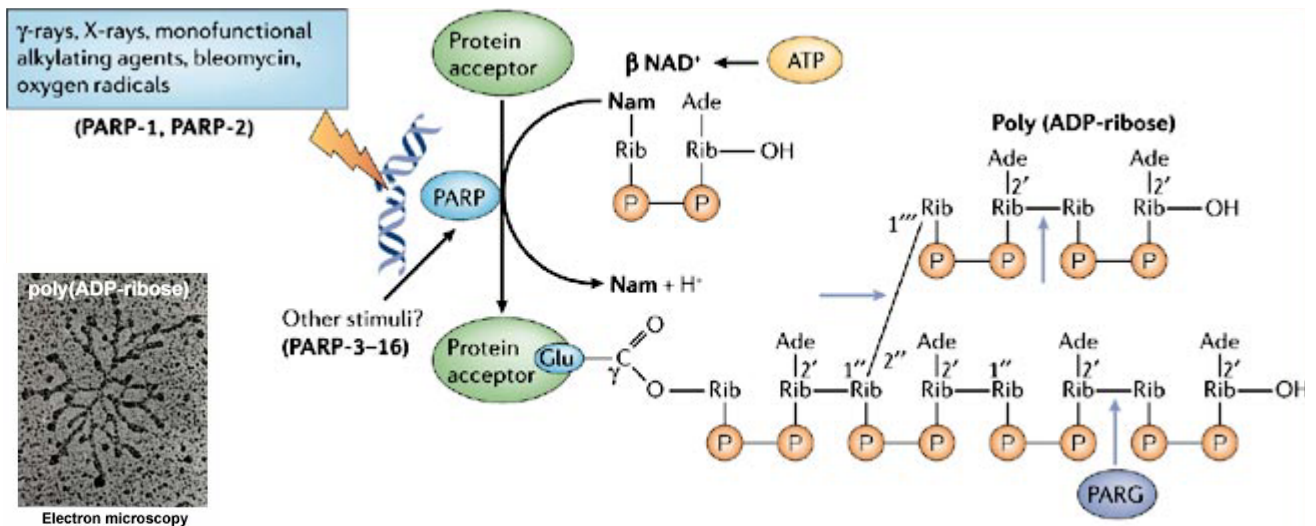


Figure 17 : Métabolisme du poly(ADP-ribose) lors de la réparation des cassures simple brin de l'ADN

En réponse aux cassures simple brin, les enzymes PARPs (spécifiquement PARP-1 et PARP-2) hydrolysent le NAD⁺ et catalysent le transfert d'unité ADP-ribose sur des protéines nucléaires acceptrices. Ceci se fait en trois étapes : l'attachement de l'ADP-ribose sur un acide aminé accepteur (acide glutamique ou aspartique), élongation du polymère jusqu'à 200 unités d'ADP-ribose, puis branchement du polymère à distances régulières (tous les 40-50 résidus). Une image de microscopie électronique à gauche permet de visualiser le polymère d'ADP-ribose et ses branchements.

L'enzyme de dégradation poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) a une activité endo- et exoglycolytique, et clive les ponts entre les unités ADP-ribose. Les stimuli qui activent les PARPs 3 à 16 ne sont pas connus. P, phosphate; Rib, ribose (Schreiber V, 2006).

PARP-1 et PARP-2 sont les plus impliquées dans le mécanisme de réparation SSBR décrit précédemment. Elles sont toutes les deux activées par les interruptions sucre-phosphate de la double hélice d'ADN. PARP-1 et PARP-2 interagissent entre elles et sont exprimées dans le nucléole par un signal de localisation spécifique (Meder, Boeglin et al. 2005). Les souris knock-out pour l'une ou l'autre de ces protéines sont plus sensibles aux radiations ionisantes et aux agents alkylants. Le double KO est létal lors du développement embryonnaire.

Outre la réparation des cassures simple brin de l'ADN, le rôle des protéines PARP, et notamment de PARP-1, dans les autres mécanismes cellulaires commence à émerger :

Lorsque le nombre de cassures de l'ADN est trop important, PARP-1 est suractivée ce qui entraîne une baisse critique des taux de NAD⁺ et d'ATP dans la cellule. Ceci conduit au relâchement de la flavoprotéine AIF de la mitochondrie dans le noyau, et induit l'apoptose par une voie indépendante des caspases. De plus, le polymère PAR est considéré comme un « signal de mort » : il est directement toxique sur des cellules neuronales, et la surexpression de PARG limite cette apoptose (Andrabi, Kim et al. 2006). PARP-1 est donc un facteur de survie et de protection du génome, à l'instar de P53. Son clivage par les caspases est d'ailleurs considéré comme un marqueur classique de l'apoptose.

Lors d'un stress cellulaire, les enzymes PARPs ADP-ribosylent la kinase Aurora B, ce qui inhibe son activité et permettrait un arrêt mitotique le temps de la réparation (Monaco, Kolthur-Seetharam et al. 2005). Au cours de la mitose, les tankyrases, par la modification du fuseau mitotique, seraient requises pour une bonne distribution des chromosomes (Chang, Coughlin et al. 2005).

PARP-1 interagit avec la voie de signalisation ERK, déterminante pour la croissance et la différenciation : PARP-1 est directement activé par ERK2 phosphorylé, et ceci accroît la phosphorylation du facteur de transcription Elk1, l'acétylation des histones et la transcription du gène c-fos induite par Elk1 dans des neurones corticaux. Cette activation de PARP-1 ne nécessite pas sa fixation à l'ADN, ou la présence de dommages (Cohen-Armon, Visochek et al. 2007).

Assez récemment, PARP-1 est apparue comme un régulateur de transcription, en se liant soit directement aux séquences promotrices ou activatrices, soit aux facteurs de transcription. PARP-1 participe ainsi à la régulation de l'expression des gènes, en particulier ceux de l'inflammation et de la survie cellulaire régulés par NF-kB (Hassa, Buerki et al. 2003). PARP-1 interagit directement avec NF-kB et son co-activateur P300 (Hassa, Haenni et al. 2005). Par exemple, PARP-1 stimule l'expression des HAT dépendante de NF-kB comme

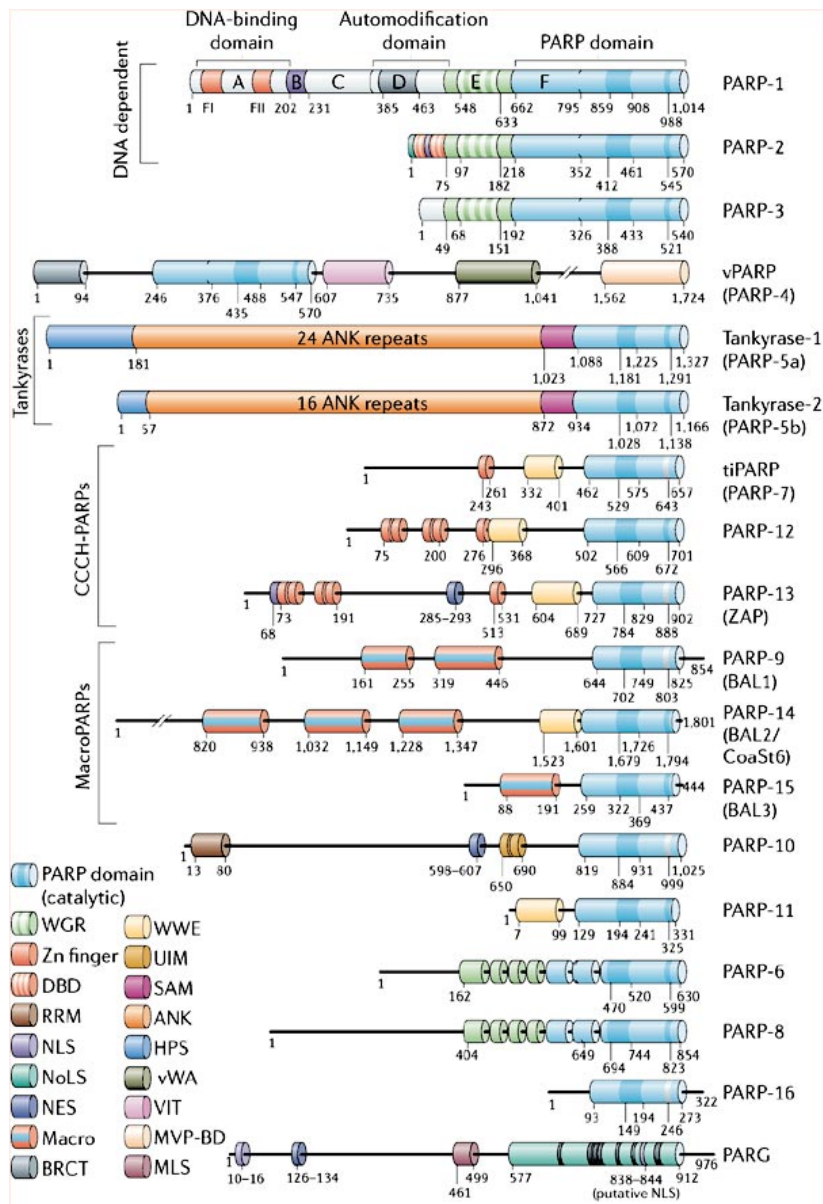


Figure 18 : Les 17 membres de la superfamille des poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), et la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)

Les différents domaines protéiques identifiés sont représentés par des boîtes de couleurs. Le domaine conservé WGR (Trp-Gly-Arg) a une fonction inconnue. Les doigts de zinc permettent la fixation à l'ADN. RRM est un motif de fixation à l'ARN. Le domaine BRCT (BRCA1 C-terminus) est un domaine d'interaction protéine-protéine, comme c'est le cas des domaines WWE, Sam et ANK. Certaines PARPs possèdent des variants d'épissage (PARP-3, PARP-9/BAL1, PARP-14/BAL2/CoaSt6 et PARP-15/BAL3) mais un seul est indiqué par simplification. MLS, mitochondrial localization signal; NES, nuclear export signal; NoLS, nucleolar localization signal; NLS, nuclear localization signal (Schreiber V, 2006).

CBP ou P300 (Ota, Kameoka et al. 2003). Elle est également un co-activateur de l'expression des gènes sous contrôle de l'acide rétinoïque, par son interaction avec le récepteur RAR (Pavri, Lewis et al. 2005). Le rôle de PARP sur la fonction promotrice semble plutôt relié à l'activation, mais on la trouve aussi impliquée dans la répression de la transcription : chez la drosophile, PARP est nécessaire à la répression d'un rétrotransposon et semble avoir un rôle fondamental dans l'organisation et le maintien de domaines hétérochromatiques (Tulin and Spradling 2003). Cette fonction plus générale de régulateur de transcription n'est pas encore clairement comprise : certaines études soutiennent que la fonction enzymatique de PARP n'est pas nécessaire à son rôle de co-activateur de NF- κ B (Hassa, Covic et al. 2001), alors que d'autres démontrent que c'est son auto-ADP-ribosylation qui libérerait le facteur de transcription lors d'un stress cellulaire (Nakajima, Nagaso et al. 2004).

c) La réparation des cassures double brin de l'ADN (DSBR)

Les cassures double brin ont des causes multiples et sont la plus dangereuse éventualité qu'une cellule puisse rencontrer, car elles peuvent provoquer la perte d'un morceau de chromosome ou une translocation chromosomique.

Les DSB peuvent être reconnues et réparées par deux mécanismes : la recombinaison homologue (HR) et la jonction non homologue (NHEJ) (pour revue : (van Attikum and Gasser 2005)).

La recombinaison homologue (HR) est le principal mécanisme utilisé chez la levure et les bactéries, et permet la conservation intégrale de l'information génétique. Les kinases ATM/ATR ainsi que le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1/Xrs2) sont recrutés au site de la cassure, et forment une extrémité simple brin en 3'. Cette extrémité est reconnue par la protéine RPA, puis Rad52 est recrutée. RPA et Rad52 aident au dépôt de Rad51 sur le simple brin pour former un filament nucléoprotéique, qui va chercher sa séquence homologue sur la chromatide intacte. L'ADN polymérase peut alors travailler sur une extrémité, créant une boucle qui s'agrandit. Des protéines hélicases de la famille RUVB-like assureraient la migration de cette boucle. Chez les mammifères cette étape est facilitée par les protéines BRCA1, BRCA2 et Rad51-like (XRCC2 et 3, Rad51B, C et D) (Figure 19).

La réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) est la principale voie de réparation des cassures double brin chez les mammifères. Elle permet de rejoindre directement deux extrémités d'ADN, d'où une perte fréquente de matériel génétique. La cassure double brin est liée par le dimère Ku (Ku70 et Ku80) qui forme un complexe avec la

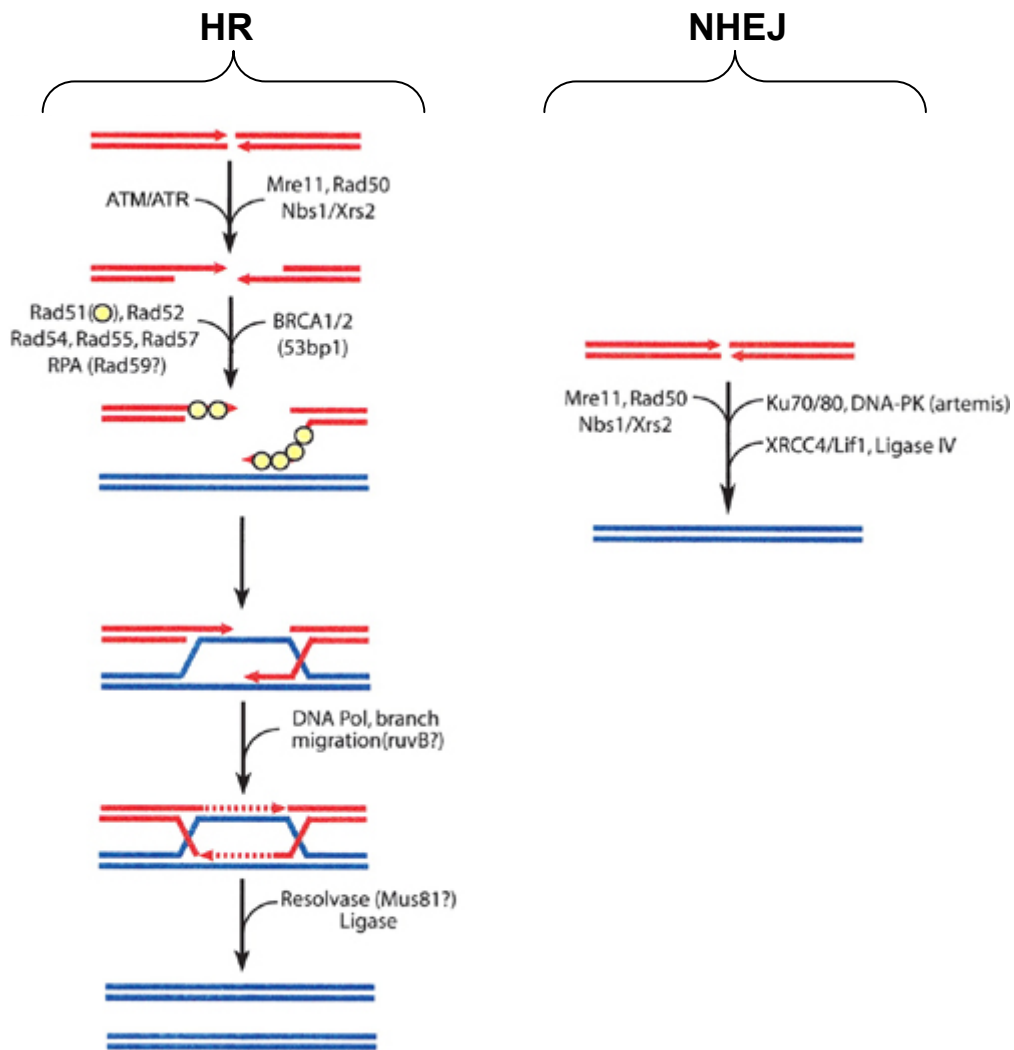


Figure 19 : La réparation des cassures double brin de l'ADN (DSBR)

La première voie est la recombinaison homologue (HR) : après détection du dommage, les extrémités 5' sont coupées, générant une queue libre d'ADN en 3' servant de substrat à l'assemblage d'un filament nucléoprotéique par Rad51. Ce complexe recherche sa séquence homologue, qui sert ensuite pour l'invasion du brin.

L'autre voie de réparation est la jonction non homologue (NHEJ) : les deux extrémités cassées sont liées directement, par l'action du complexe Ku/DNA-PK (Peterson and Cote, 2004).

kinase DNA-PK. Ce complexe est rapidement phosphorylé (notamment sur T2609 et T2056) et permet la ligation des deux extrémités par la DNA Ligase 4 et XRCC4 en les maintenant l'une près de l'autre. Parfois, la fixation de Ku peut être suivie d'une re-coupeure par le complexe MRN (Figure 19).

Le rôle de la protéine ATM est central : c'est une kinase de la famille des PIKK (« PhosphoInositol-3 Kinase related Kinase »), au même titre que ATR et DNA-PK (Abraham and Tibbetts 2005). Des mutations du gène ATM sont responsables de l'ataxie-télangiectasie, maladie qui associe une ataxie cérébelleuse, une immunodéficiência, une hypersensibilité aux rayonnements et une forte probabilité de développement d'hémopathies. Dans les cellules normales, ATM est un dimère catalytiquement inactif. Les lésions DSB induisent une acétylation rapide de ATM par Tip60, qui forment un complexe stable (Sun, Jiang et al. 2005). Cette acétylation active ATM, qui s'autophosphoryle sur les sérines 1981, 367 et 1893 très rapidement (Kozlov, Graham et al. 2006). Le dimère ATM se dissocie, et les monomères vont induire la phosphorylation de nombreux substrats impliqués dans la réparation de l'ADN : P53, BRCA1, chk2, le variant d'histone H2A.X, le complexe MRN... Ce dernier a une fonction essentielle dans les processus HR et NHEJ : c'est à la fois un substrat de ATM, et aussi un de ses activateurs (Falck, Coates et al. 2005).

La phosphorylation du variant d'histone H2A.X est majoritairement catalysée par la kinase ATM, mais peut aussi l'être par ATR dans le cas d'une exposition aux UV ou un blocage de la réplication (Ward and Chen 2001). Le complexe de remodelage SWI/SNF promouvoir cette phosphorylation : son inhibition conduit à une absence de γ H2A.X et à des défauts de réparation, mais n'affecte pas l'expression de la kinase ATM. Son rôle est vraisemblablement direct, par un contrôle de l'accessibilité de la chromatine aux mécanismes de réparation (Park, Park et al. 2006). La modification γ H2A.X apparaît sous forme de foyers dans la première minute suivant l'exposition à des radiations ionisantes (Rogakou, Boon et al. 1999). Il a même été établi qu'elle précède le recrutement du complexe MRN et de Rad51 (Paull, Rogakou et al. 2000). Cependant, il a été montré récemment que γ H2A.X n'est pas requise pour le recrutement des protéines de réparation, mais qu'elle participerait au maintien de ces facteurs au niveau des régions endommagées (Celeste, Fernandez-Capetillo et al. 2003). Chez la drosophile, il est actuellement proposé que γ H2A.X recrute la HAT NuA4 et des cohésines. La combinaison de l'acétylation de H4 par NuA4 et de γ H2A.X conduirait à l'arrivée du complexe de remodelage Ino80, permettant la formation d'un fragment simple brin. Le

complexe HAT Tip60 serait ensuite recruté et catalyserait l'acétylation puis le remplacement de H2A.X par une H2A conventionnelle (Kusch, Florens et al. 2004; Thiriet and Hayes 2005).

d) La frontière entre SSB et DSB : pas si claire

Ces mécanismes sont théoriquement deux voies indépendantes : la perte de PARP-1 n'affecte pas la réparation des cassures double brin. De plus, un double KO pour PARP et ATM a des effets plus sévères que l'inactivation d'une seule de ces protéines clés.

Cependant, de nombreux dommages génèrent à la fois des cassures simple brin et double brin, et les SSB non réparés donnent des DSB. De manière indirecte, les mécanismes BER et NER peuvent entraîner respectivement des SSB et des DSB. Les différents processus de réparation de l'ADN se chevauchent donc le plus souvent et sont en constante interaction au sein de la cellule. Ainsi, des cellules BRCA1-/-, qui ne réparent pas les DSB, sont très sensibles aux inhibiteurs de PARP (Bryant, Schultz et al. 2005).

Récemment, de nouvelles interactions émergent entre les différents acteurs de la réparation, créant des voies de signalisation insoupçonnées:

- La kinase DNA-PK lie XRCC1 et le phosphoryle sur S371 après exposition à des radiations ionisantes. Cette interaction permettrait peut être de réparer des DSB dues à des fourches de réplication consécutives à un SSB (Levy, Martz et al. 2006).
- Le complexe Ku/DNA-PK est un substrat de PARP1, avec qui il interagit. PARP-1 peut lier les DSB, en compétition directe avec Ku, et constituerait une voie alternative au NHEJ, capable de réparer les DSB (Wang, Wu et al. 2006). Les cellules PARP-1/- utilisent moins la voie HR, comme si PARP protégeait cette voie de l'effet répressif du complexe Ku (Hochegger, Dejsuphong et al. 2006).
- Après traitement aux UV, induisant majoritairement des SSB, un marquage diffus de γ H2A.X apparaît dans toutes les phases du cycle. Ce marquage est différent des foyers que l'on observe après cassures double brin. L'inhibition du mécanisme NER abolit cette phosphorylation. Ceci suggère un nouveau rôle pour γ H2A.X, qui pourrait maintenir les points de contrôle du cycle cellulaire (Marti, Hefner et al. 2006).

Les différents mécanismes de réparation des dommages de l'ADN sont des processus complexes, dont l'étude ne cesse de mettre en évidence de nouveaux acteurs et des interactions subtiles. La dynamique de la chromatine, par la barrière physique qu'elle forme autour de l'ADN, s'avère essentielle pour l'accès des machineries de réparation.

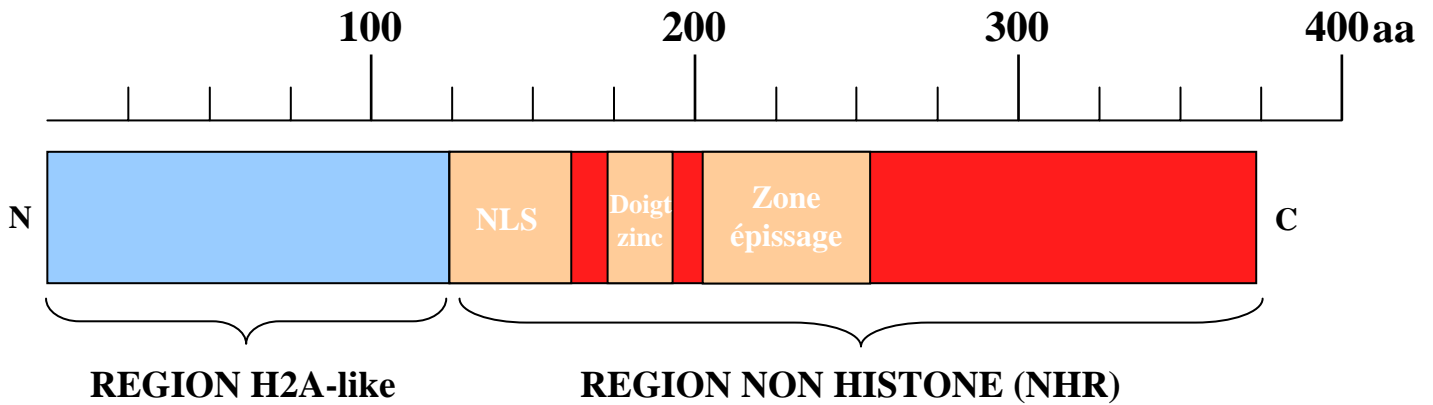


Figure 20 : Représentation schématique du variant d'histone macroH2A

Une échelle représentant les acides aminés permet d'évaluer la position des différents domaines du variant. Au sein de la région non histone se trouve la séquence de localisation nucléaire (NLS), le motif doigt de zinc ainsi que la zone d'épissage alternatif conduisant aux isoformes de macroH2A1, dans l'exon VI.

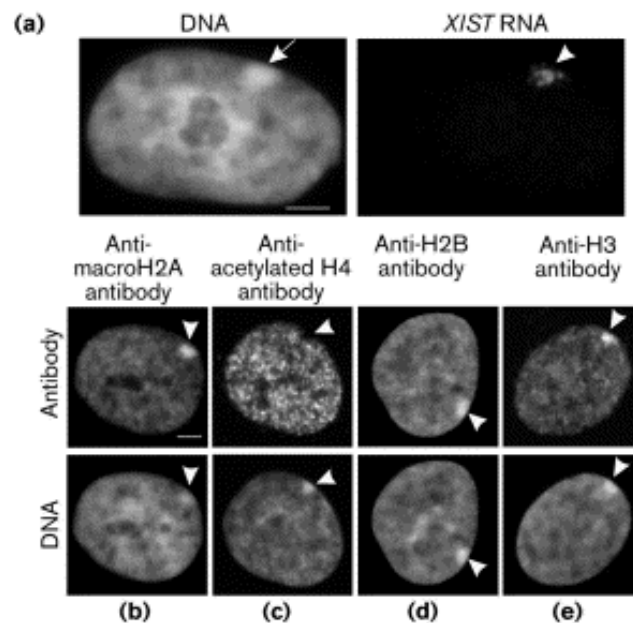


Figure 21 : Le corpuscule de Barr et sa co-localisation avec les histones

Les cellules représentées sont des fibroblastes humains normaux. a) Le chromosome X inactif est identifié à l'aide d'une sonde ARN par FISH, et le marquage du noyau au DAPI permet de visualiser le corpuscule de Barr (flèches blanches). b-e) A l'aide d'anticorps dirigés contre macroH2A, H4 acétylée, H2B et H3, on constate que chacune de ces histones est concentrée dans le territoire du corpuscule de Barr (Perche, 2000).

D. MACROH2A, UN VARIANT D'HISTONE SINGULIER

1) Généralités

Le variant d'histone macroH2A a été découvert en 1992. Il doit son nom à sa taille inhabituelle de 372 acides aminés, qui représente environ trois fois celle de son homologue conventionnel H2A (Pehrson and Fried 1992). Il peut être divisé en deux domaines : la partie « H2A-like » (acides aminés 1 à 122) possède 64% d'homologie avec H2A, alors que la grande région C-terminale (acides aminés 161 à 372) ne présente aucune homologie avec l'histone canonique (Figure 10B). Cette zone est appelée la « région non histone » ou NHR. Elle contient un motif de liaison à l'ADN de type doigt de zinc ainsi qu'une séquence NLS (nuclear localization signal), vraisemblablement non fonctionnelle (Figure 20).

MacroH2A est présent chez les mammifères et les oiseaux, et représente environ 5 % des histones H2A du génome. Deux sous types ont été identifiés, constitués de huit exons codants : macroH2A1 et macroH2A2. Chacune est codée par un gène propre, porté respectivement par les chromosomes 5 et 10 chez l'homme. Elles présentent 84% d'homologie dans la séquence « histone fold », et 68% dans la région non histone (Figure 10B) (Chadwick and Willard 2001).

MacroH2A1 est le sous type le plus étudié. Son gène code pour deux isoformes, 1.1 et 1.2, issues d'un épissage alternatif. Ces deux isoformes ne diffèrent l'une de l'autre que par une vingtaine d'acides aminés dans la région non histone (Figure 22a). L'analyse de leur taux d'expression tissulaire indique des profils d'expression différents, suggérant une fonctionnalité distincte. La forme 1.1 est retrouvée à des taux variables dans les tissus adultes riches en cellules quiescentes. La forme 1.2 est retrouvée principalement dans les tissus à forte prolifération cellulaire (foie foetal, thymus adulte, testicule) (Pehrson, Costanzi et al. 1997).

Selon les tissus, la proportion de macroH2A1 est variable, et peut atteindre 30 % de l'ensemble des histones H2A dans le foie des mammifères (Costanzi and Pehrson 1998).

Les premières études ont montré que macroH2A se localise au niveau de la région nucléaire occupée par le chromosome X inactif dans les cellules femelles. En effet par

immunofluorescence, macroH2A forme un foyer dense qui co-localise avec le corpuscule de Barr (Figure 21). Ces observations ont fait de ce variant un candidat tout trouvé pour les mécanismes moléculaires liés à l'inactivation du X, dont l'étude était alors en plein essor (Costanzi and Pehrson 1998; Csankovszki, Panning et al. 1999; Mermoud, Costanzi et al. 1999). Ce marquage préférentiel conduit à l'appellation du « MacroH2A Chromatin Body » (MCB), en référence au « Barr Body ».

MacroH2A est présente aussi dans le reste du noyau, et les régions denses en chromatine non liées au Xi apparaissent également préférentiellement marquées.

Une étude rapporte une accumulation de macroH2A dans une zone extranucléaire qui ne coïncide pas avec la chromatine, le centrosome : cette association existe dans les cellules ES mâles et femelles et perdurerait dans les cellules somatiques (Mermoud, Tassin et al. 2001). Enfin, dans les lymphocytes T quiescents de souris, macroH2A serait associée à l'hétérochromatine des centromères. Lors de la réactivation de ces lymphocytes, ce marquage serait perdu et macroH2A se localiserait massivement dans les centrosomes (Grigoryev, Nikitina et al. 2004). Le rôle de macroH2A au sein des centrosomes et des centromères reste néanmoins à découvrir.

2) MacroH2A et le chromosome X inactif

MacroH2A1 et macroH2A2 sont retrouvées accumulées sur le territoire du chromosome X inactif (Costanzi and Pehrson 2001). Dans les cellules ES non différenciées, macroH2A1 est présente à la fois dans les noyaux XX et XY. Cependant, elle ne co-localise pas avec le *Xist* durant les étapes d'initiation et d'établissement de l'inactivation. Un corps dense de macroH2A au niveau du Xi n'est distinguable qu'après sept jours de différenciation (Mermoud, Costanzi et al. 1999; Rasmussen, Mastrangelo et al. 2000). Ce variant d'histone ne participe donc pas aux étapes précoces du mécanisme. Par contre, macroH2A pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'inactivation du chromosome X : en effet, macroH2A1.2 co-immunoprécipite avec l'ARN *Xist*, ce qui stabiliserait son association avec la chromatine (Gilbert, Pehrson et al. 2000).

Cependant, l'implication des formes de macroH2A dans le maintien de l'inactivation du chromosome X reste aujourd'hui particulièrement controversée.

Tout d'abord, la localisation préférentielle de macroH2A au niveau du Xi a été remise en question : il semble que les autres histones aient également un marquage plus intense sur le chromosome X inactif en raison de son fort degré de compaction (Figure 21). Le chromosome est intensément marqué non seulement par l'histone macroH2A1.2, mais aussi par les histones canoniques H2A, H2B et H3 (Perche, Vourc'h et al. 2000). De plus, la partie H2A-like de macroH2A est à elle seule capable de former un MCB au niveau du Xi (Chadwick, Valley et al. 2001). L'impression d'enrichissement de macroH2A serait donc due à une plus forte densité des nucléosomes. Ce variant n'aurait peut-être pas plus d'influence sur l'inactivation du chromosome X qu'une autre histone.

De plus, un certain nombre d'arguments mettent à mal l'hypothèse d'une fonction de macroH2A dans ce processus : des cellules tumorales ont été caractérisées comme ayant une absence de macroH2A au niveau du Xi (Mermoud, Costanzi et al. 1999). Une délétion du gène *Xist* abolit l'enrichissement de macroH2A dans cette zone, et pourtant le statut inactif des gènes est maintenu : ceci suggère que macroH2A n'est pas indispensable au maintien de l'inactivation (Chadwick and Willard 2003). La quantité de transcrits macroH2A est la même dans les cellules mâles et femelles (Costanzi and Pehrson 1998). Enfin, les souris knock-out pour macroH2A1 se développent bien et semblent ne présenter aucun problème particulier. Une cinquantaine de gènes sont néanmoins retrouvés suractivés, mais seulement trois d'entre eux sont localisés sur le chromosome X (Changolkar, Costanzi et al. 2007). Des expériences de siRNA contre macroH2A aboutissent sensiblement à la même conclusion, avec une réactivation de 5 % des gènes du Xi seulement (Hernandez-Munoz, Lund et al. 2005).

Néanmoins, des résultats contradictoires montrent que, contrairement à macroH2A, les histones H2A et H2B n'ont pas un marquage plus intense sur le chromosome X inactif (Chadwick and Willard 2001). De plus, ce marquage préférentiel de macroH2A existerait aussi en mitose, malgré l'absence de corpuscule de Barr (Costanzi, Stein et al. 2000; Chadwick and Willard 2002).

Afin de s'affranchir des données d'immunofluorescence portant à confusion, plusieurs études récentes ont utilisé d'autres approches pour tenter de découvrir la localisation exacte de macroH2A : une purification biochimique des nucléosomes macroH2A suivie de RT-PCR pour les uns, une immunoprécipitation de chromatine et amplification de SNP (Small Nucleotides Polymorphism) pour les autres, ont permis de montrer un enrichissement de macroH2A sur les gènes inactifs du Xi chez la souris, à la fois sur le promoteur et la région

transcrite. Cet enrichissement n'est pas retrouvé dans les zones échappant à l'inactivation, ou sur les gènes actifs du chromosome X mâle ou des autosomes (Changolkar and Pehrson 2006; Valley, Pertz et al. 2006). Une autre étude semblable démontre une localisation préférentielle de macroH2A sur deux gènes, spécifiquement chez la souris femelle (*Hcfc1* et *AK122447*). Trois zones du transcrit *Xist* sont également retrouvées enrichies en macroH2A et correspondent à des îlots CpG méthylés, ce qui suggère que la déposition de ce variant et la méthylation de l'ADN seraient deux mécanismes coopératifs pour la maintenance de l'hétérochromatine du X inactif (Choo, Kim et al. 2006).

Toutefois, les résultats obtenus lors de ces travaux soit ne concernent qu'un nombre restreint de gènes, soit révèlent un enrichissement en macroH2A de faible importance. La question de l'implication de ce variant dans le mécanisme d'inactivation du chromosome X reste donc ouverte.

3) MacroH2A et la répression de la transcription

La présence de la région non histone de macroH2A à proximité du promoteur d'un gène rapporteur conduit à une répression de son expression (Perche, Vourc'h et al. 2000). Cette première donnée, associée à la localisation préférentielle de macroH2A sur le chromosome X inactif, suggère que ce variant serait associé à un état répressif de la transcription.

a) Le nucléosome macroH2A reconstitué *in vitro*

Plusieurs expériences de reconstitution de nucléosomes *in vitro* ont permis d'étudier le nucléosome variant contenant macroH2A.

Vraisemblablement, macroH2A forme préférentiellement des nucléosomes hybrides contenant une protéine H2A et une macroH2A (Chakravarthy and Luger 2006).

L'incorporation de macroH2A dans un octamère d'histone conduit à la formation d'un nucléosome présentant des altérations structurales à la proximité de l'axe de la dyade : ces altérations interfèrent avec la liaison de facteurs de transcription tel que NF- κ B sur sa séquence cible. De plus, la présence de macroH2A dans le nucléosome empêche le glissement de l'octamère sur l'ADN par les facteurs de remodelage SWI/SNF et ACF. Elle inhibe également le remodelage par ces mêmes facteurs, bien que ni leur liaison au nucléosome ni leur activité ATPase ne soient modifiées (Angelov, Molla et al. 2003).

Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à deux études supplémentaires concernant le nucléosome macroH2A : des essais de transcription et d'acétylation *in vitro* nous ont permis de démontrer que la présence de macroH2A dans la particule nucléosomale réprime la transcription par l'ARN polymérase II dépendante de p300 et Gal4-VP16. Cet effet répressif est observable lors de l'étape d'initiation mais pas lors de l'élongation de la transcription. De plus, le variant macroH2A inhibe l'acétylation des histones par p300. C'est la région non histone qui est responsable à la fois de la répression de la transcription et de l'acétylation des histones.

Grâce à la protéine de fusion H2A-NHR, nous avons montré que le domaine macro peut bloquer le remodelage de nucléosomes et le glissement d'octamères d'histones par les facteurs de remodelage ACF et SWI/SNF (Doyen, An et al. 2006)/ annexe 1.

L'autre étude porte sur la nucléoline, qui est une protéine majeure du nucléole impliquée dans plusieurs aspects de la biosynthèse des ribosomes et dans la régulation de l'expression des gènes. Nous avons pu montrer que la nucléoline est capable d'augmenter considérablement l'efficacité du remodelage par ACF et SWISNF. Les nucléosomes macroH2A peuvent, en présence de nucléoline, être remodelés par ACF et SWISNF, alors que ce n'est pas le cas des nucléosomes contenant le variant H2ABbd. Enfin, cette protéine peut être considérée comme un nouveau chaperon d'histone, puisqu'elle est capable de réaliser le transfert d'un dimère H2A/H2B sur un tétramère H3/H4 (Angelov, Bondarenko et al. 2006)/ annexe 2.

Toutes ces données réunies montrent que le variant macroH2A est un répresseur transcriptionnel *in vitro*. Il agit sur deux phénomènes d'activation de la transcription : l'acétylation des histones et le remodelage des nucléosomes.

b) Les données obtenues *in vivo*

Un certain nombre d'études récentes confirment que macroH2A joue également un rôle répressif sur la transcription *in vivo*.

Tout d'abord, la région non histone de macroH2A interagit avec HDAC1 et HDAC2. De plus, une immunoprécipitation de chromatine met en évidence que la présence du variant coïncide avec un état hypoacétylé de H3. La partie non histone de macroH2A pourrait jouer un rôle vital dans la formation d'hétérochromatine par le recrutement des HDAC de classe I (Chakravarthy, Gundimella et al. 2005).

En hiver, environ 3400 gènes sont affectés par le froid chez la carpe *Cyprinus carpio*, principalement les gènes ribosomiques. Notre équipe a participé à une étude concernant ce processus d'acclimatation dans l'habitat naturel de ces animaux : nous avons pu montrer qu'en hiver, le taux d'ARN messager et de protéines macroH2A sont significativement augmentés, et associés à une hyperméthylation des îlots CpG. MacroH2A pourrait jouer un rôle majeur dans la réorganisation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes pendant le processus physiologique d'adaptation climatique (Pinto, Ivaldi et al. 2005)/ annexe 3.

Un petit nombre de gènes directement régulés par macroH2A commencent à être identifiés : le gène de l'interleukine 8 (*IL8*) est normalement activé en réponse à un virus ou à un stress, de façon restreinte à certains types cellulaires. Cette transcription cellule-spécifique dépend de l'architecture chromatinienne de l'« enhancer » du gène : dans les cellules épithéliales, cette zone ne contient pas de nucléosomes et il y a expression de IL8 en réponse au signal. Par contre, dans les cellules B, un nucléosome porteur de macroH2A et positionné au niveau de l'« enhancer », empêche la transcription de IL8. Les facteurs de transcription ne peuvent se fixer, et le remodelage par SWI/SNF de ce nucléosome est impossible (Agelopoulos and Thanos 2006).

Les expériences sur le foie des souris knock-out ont permis d'identifier cinq gènes significativement activés par l'absence de macroH2A. Quatre d'entre eux sont directement impliqués dans le métabolisme des acides gras (*Lpl*, *Scd2*, *Thrsp*, et *CD36*). Cette activation n'apparaît que chez les jeunes adultes. Or, on retrouve moins de macroH2A dans le foie des nouveaux-nés que par la suite, ce qui semble indiquer que l'augmentation de macroH2A chez les jeunes adultes permet la répression transcriptionnelle de ces gènes cibles (Changolkar, Costanzi et al. 2007).

Enfin, on peut noter que macroH2A semble impliquée dans le mécanisme de sénescence : l'état sénescence est un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule (pour revue : (Gire 2005)). Elle est causée par le raccourcissement des télomères (sénescence répliquative) ou par l'exposition aiguë ou chronique à d'autres signaux de stress (stasis). Dans les cellules sénescences, la chromatine change et forme des foyers d'hétérochromatine facultative, les SAHF (Senescence-Associated Heterochromatin Foci). Ces SAHF contiennent des gènes requis pour la prolifération et permettent la sortie du cycle cellulaire. MacroH2A serait un composant de ces foyers, et sa

présence serait initiée par le complexe de chaperonnes HIRA/ASF1 (Zhang, Poustovoitov et al. 2005; Zhang, Liu et al. 2007). Son rôle précis reste néanmoins à définir.

4) MacroH2A et ADP-ribosylation

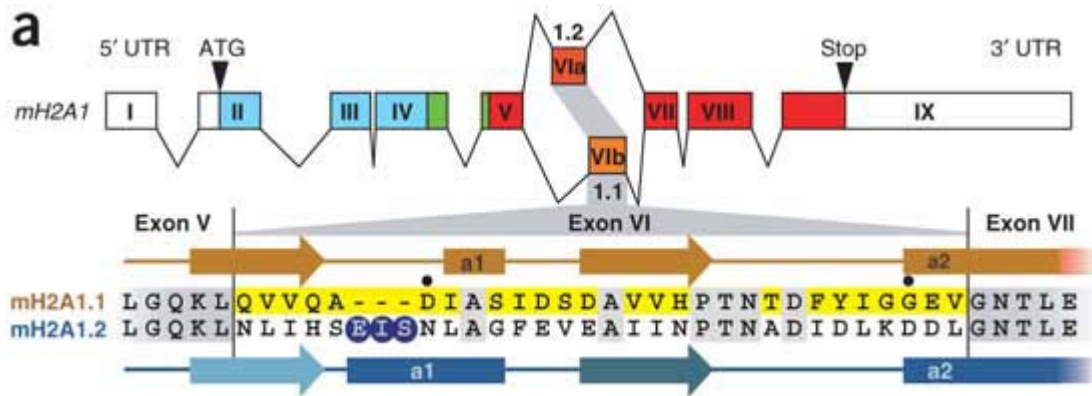
Le domaine macro est retrouvé dans de nombreuses protéines et existe chez tous les organismes. Il est constitué de 135 résidus principaux et peut être répété jusqu'à trois fois dans une même protéine (Ladurner 2003). En 2003, des études structurales montrent une forte similarité entre le domaine macro de la famille AF1521 et la superfamille des hydrolases triphosphate. De plus, un membre de cette famille AF1521 est une ADP-ribose phosphoestérase (Allen, Buckle et al. 2003). Ceci suggère un lien entre le domaine macro et la régulation du métabolisme de l'ADP-ribose.

En 2005, les recherches se poursuivent et permettent de démontrer que le domaine macro de AF1521 se lie avec une forte affinité à des ADP-riboses. Des mutagenèses dirigées révèlent l'existence d'une « poche » dans le domaine macro. Cette cavité permettrait de lier un ligand et de réaliser des contacts avec l'ADP-ribose (Karras, Kustatscher et al. 2005).

C'est au niveau de cette poche que réside des différences spécifiques entre les deux isoformes de macroH2A1. Dans la forme 1.1, une phénylalanine induit une courbure, et deux glycines (223 et 224) sont remplacées par des résidus plus volumineux dans la forme 1.2 (Lys226 and Asp227). De plus, macroH2A1.2 présente une insertion de trois résidus (E-I-S). Ces faibles divergences induisent une perte de reconnaissance du monomère d'ADP-ribose par le domaine macro de macroH2A1.2 (Figure 22) (Kustatscher, Hothorn et al. 2005).

Un petit nombre de virus à ARN animaux codent pour des domaines macro. Leur analyse structurale révèle que ces domaines lient efficacement l'ADP-ribose libre, ou lié à PARP-1 (Egloff, Malet et al. 2006).

Les protéines de la famille BAL (B-aggressive lymphoma) portent une combinaison inédite, avec en N-terminal un domaine macro capable de réprimer la transcription, et en C-terminal un domaine PARP actif (Aguilar, Takeyama et al. 2005).



b

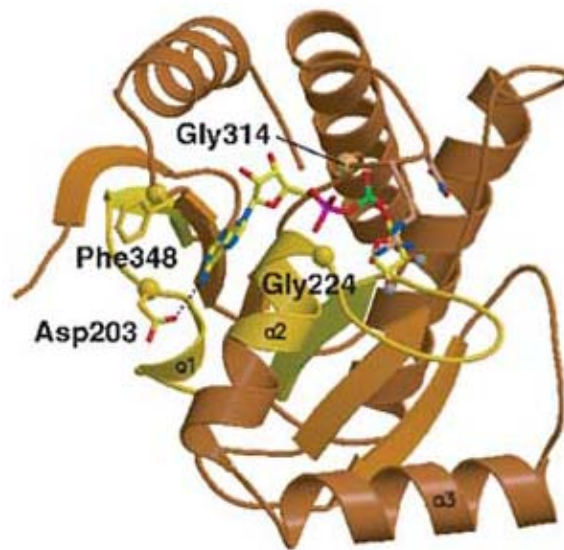


Figure 22 : L'épissage alternatif du variant d'histone macroH2A1 régule la fixation des métabolites NAD

- a) Schéma représentant l'épissage alternatif de l'histone humaine macroH2A1 : en gris sont indiqués les résidus inchangés, et en bleu les insertions présentes dans la forme macroH2A1.2
- b) Structure du domaine macro de macroH2A1.1, représenté en brun. En jaune est indiqué l'exon épissé alternativement dans la forme macroH2A1.2. Les résidus critiques pour la fixation de l'ADP-ribose sont mentionnés (d'après Kustatscher G, 2005).

Quelle est la signification fonctionnelle de cette interaction entre le domaine macro et l'ADP-ribose ? Le variant d'histone macroH2A a-t-il un lien avec les protéines responsables de la synthèse du poly(ADP-ribose), les PARPs ?

En utilisant une lignée stable de HeLa exprimant une macroH2A1.1 étiquetée (e-mH2A1), nous avons montré récemment que les nucléosomes contenant e-mH2A1 sont spécifiquement associés avec PARP-1, via la région non histone. Cette association conduit à l'immobilisation de PARP-1, et à une inhibition de son activité enzymatique. Plusieurs promoteurs enrichis en macroH2A1 ont été identifiés, notamment celui du gène de *HSP70.1*. Une élimination de PARP-1 ou de macroH2A par siRNA ralentit la transcription du gène *Hsp70.1*.

L'interaction macroH2A-PARP serait cruciale pour maintenir l'inactivation de ce gène : en s'associant avec le variant, PARP-1 prendrait place dans un complexe de répression transcriptionnelle. Suite au choc thermique, un changement conformationnel de macroH2A libérerait l'enzyme, ce qui la rendrait active (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006)/annexe 4.

Ces résultats ont été étoffés par une autre étude, montrant que macroH2A1.2 et PARP-1 peuvent également interagir. La région non histone de chacune des isoformes de macroH2A est capable d'inhiber l'activité enzymatique de PARP-1 *in vitro* (Nusinow, Hernandez-Munoz et al. 2007).

OBJECTIFS

Les variants d'histone sont une nouvelle voie de modification épigénétique que la cellule utilise pour moduler la structure chromatinienne et l'expression des gènes. MacroH2A est l'un de ces variants et se singularise par sa grande taille. Contrairement à H2A.X et H2AZ, il n'existe que peu de données génétiques ou biochimiques concernant macroH2A. Mon travail de thèse s'est axé sur l'étude de ce variant.

Par immunofluorescence, macroH2A est retrouvé accumulé sur le territoire du chromosome X inactif chez les mammifères femelles. Il pourrait jouer un rôle dans le maintien de son état répressif. Néanmoins, cette hypothèse reste encore aujourd'hui controversée. La spécificité même de l'association entre macroH2A et le Xi est remise en cause, étant donné la forte concentration en nucléosomes de cette région.

Certaines expériences biochimiques ont permis cependant d'identifier quelques gènes du Xi où macroH2A se localiserait de façon préférentielle. Cet enrichissement étant de faible importance, la question de l'implication réelle de cette protéine dans le mécanisme d'inactivation du chromosome X reste ouverte.

Existe-t-il vraiment une surexpression de macroH2A au niveau du chromosome X inactif ? Ce variant d'histone est-il impliqué fonctionnellement dans le maintien de la répression transcriptionnelle du Xi ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des immunoprécipitations de chromatine combinées avec diverses hybridations sur puces à ADN («ChIP-on-CHIP»). Par cette approche, l'enrichissement en macroH2A ne dépend pas du degré de condensation de la chromatine. Nous avons également développé une approche d'ARN interférence, permettant une élimination conséquente de macroH2A, qui nous a permis d'étudier l'impact du variant sur la maintenance de l'état inactif du Xi.

La description de ces travaux constituera la première partie du chapitre « Résultats ».

De nombreuses données suggèrent que macroH2A pourrait participer à l'inactivation de la transcription. Au cours de ma thèse, j'ai participé à plusieurs études qui ont permis de préciser cet effet de répresseur transcriptionnel, *in vitro*, mais également *in vivo*. Cette partie de mon travail a été présentée dans la section « Introduction » de ce manuscrit, et les trois publications correspondantes figurent en annexe 1, 2 et 3.

Nous avons souhaité nous intéresser plus particulièrement au rôle potentiel de macroH2A dans le mécanisme de réparation de l'ADN. En effet, il a été montré que le domaine macro est capable de lier l'ADP-ribose, un nucléotide déterminant dans de nombreux processus biologiques tels que la transcription ou la réparation de l'ADN. De plus, nous avons démontré récemment une association entre macroH2A et PARP-1 *in vitro*, conduisant à une inhibition de son activité enzymatique. Ces données ont été publiées dans Genes and Development et sont présentées en annexe 4.

Plusieurs types d'expériences ont donc été conduites pour évaluer l'impact de macroH2A sur la réparation des cassures simple brin de l'ADN assurée par PARP-1. L'ensemble des résultats obtenus seront détaillés dans la seconde partie du chapitre « Résultats ».

MATERIEL ET METHODES

A. Biologie cellulaire

B. Techniques d'analyses in situ

C. Approches de « ChIP-on-CHIP »

D. Techniques d'analyses des protéines

E. Clonage

A. BIOLOGIE CELLULAIRE

1) Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées sur des boîtes de Petri « traitées culture » dans une étuve humide à 37°C et en présence de 5 % de CO₂. La récupération des cellules se fait par traitement avec une solution de trypsine (trypsine 0,5 g/l, EDTA 0,2 g/l) qui dégrade la matrice extracellulaire, permettant de décoller les cellules de leur substrat et de les individualiser.

Pour leur conservation, les cellules sont soumises à l'action de la trypsine, puis centrifugées 5 min à 1500 rpm. Le culot est rincé, repris dans du SVF en présence de 10 % de DMSO et transféré immédiatement sur glace. Les cellules sont conservées à -80°C ou dans de l'azote liquide.

Les cellules HeLa sont issues d'un cancer du col de l'utérus. Les cellules HEK 293 proviennent de rein embryonnaire. Ces deux lignées humaines sont cultivées dans du milieu DMEM 1 g/l de glucose (INVITROGEN), additionné de L-Glutamine 2 mM, Penicilline-Streptomycine 100 IU/ml, 10 % (v/v) SVF décomplémenté par la chaleur (30 min à 56°C).

Les cellules hybrides de hamster CHO sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO BRL), additionné de L-Glutamine 2 mM, Penicilline- Streptomycine 100 IU/ml, 10 % (v/v) SVF décomplémenté par la chaleur (30 min à 56°C).

La lignée CHO-X86T2 possède un chromosome X humain inactif, alors que la lignée CHO-Y162 présente un chromosome X humain actif, sélectionné par du HAT comme décrit dans (Ellis, Morgan et al. 1987).

2) Transfections

Transfection plasmidique

Les cellules à 90 % de confluence sont transfectées à l'aide de Lipofectamine (INVITROGEN), selon les instructions suivantes : pour une surface cellulaire correspondant à un puits d'une plaque «6 puits», 3 µl de réactif et 4 µg d'ADN sont respectivement dilués dans 250 µl d'une solution pauvre en sérum (OptiMEM, INVITROGEN). Après 5 min

d'incubation à température ambiante, la solution d'ADN est mélangée à la solution de Lipofectamine. Cette solution est maintenue 30 min à température ambiante avant d'être transférée dans le puits qui contient 2 ml de milieu de culture sans antibiotiques. Quatre à six heures après, le milieu est changé et supplémenté en antibiotiques.

Transfection de duplexes de siRNA

Le réactif utilisé est l'Oligofectamine (INVITROGEN). La procédure est la suivante :

- Jour 0 : Ensemencer un puits de plaque « 6 puits » avec 10^5 cellules HeLa / 2.10^5 cellules HEK 293 dans leur milieu de culture.
- Jour 1 : Remplacer le milieu de culture par 1 ml de milieu sans SVF ni antibiotiques. Dans un premier tube, mélanger 15 μ l d'OptiMEM et 5 μ l de réactif, puis dans un deuxième tube 175 μ l d'OptiMEM et 0,6 nmol de duplexes siRNA. Après une incubation de 5 min, ajouter la solution de siRNA au réactif dilué, laisser 25 min à température ambiante et transférer le mélange sur les cellules. Après 4 à 6 heures d'incubation, le milieu de culture est additionné de 1 ml de milieu contenant 20 % de SVF.
- Jour 2 : Une deuxième transfection est réalisée, dans les mêmes conditions qu'au jour 1.
- Jour 4 ou 5 : Les cellules peuvent être analysées.

La séquence cible utilisée contre macroH2A1 a été choisie dans la région NHR, et est la suivante : 5' AAGCAGGGUGAAGUCAGUAAG 3'.

La séquence contrôle est dirigée contre la luciférase : 5'CAUGUCAUGUUCACAUCUCTT 3'.

Etablissement de lignées stables

Les cellules HEK 293 sont transfectées par le vecteur GFP-macroH2A ou GFP-H2A. 24 heures après transfection, l'antibiotique Généticine est ajouté au milieu de culture, à la concentration de 750 μ g/ml. Les cellules sont cultivées sous sélection pendant environ 15 jours, puis ensemencées dans des boîtes de culture 96 puits à la concentration de 0.5 à 2 cellules/ puits. Les clones résistants à la Généticine sont conservés et analysés en microscopie de fluorescence.

3) Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité a été étudiée sur des populations de cellules HeLa, transfectées ou non par le siRNA contre macroH2A.

Les cellules sont traitées par différentes concentrations de H₂O₂ pendant 5 min à 4°C, ou de Doxorubicine pendant 1h30 à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS et mises à récupérer à l'étuve dans leur milieu de culture. Pour certaines expériences, 4 mM de 3-AB (SIGMA), un inhibiteur de PARP-1 sont ajoutés 1h30 avant le traitement H₂O₂ et pendant la récupération.

La viabilité des cellules est estimée 24h après par comptage au bleu trypan, qui colore en bleu uniquement les cellules mortes. Au moins 100 cellules ont été analysées pour chaque condition.

B. TECHNIQUES D'ANALYSE IN SITU

1) Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des lames ou des lamelles de verre et sont maintenues en culture au moins une nuit. Après lavage au PBS les cellules sont fixées dans une solution de PFA 4 % (Accustain Formalin Solution - SIGMA), 15 min à 37°C. Pour la détection du polymère ADP-ribose, les cellules sont fixées par 10 % TCA pendant 15 min à 4°C.

Après deux lavages de 5 min au PBS, les cellules sont perméabilisées avec 0,1 % Triton X-100/PBS pendant 5 min à température ambiante. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par incubation dans une solution 4 % lait écrémé/PBS, 20 min à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules sont alors mises en présence de l'anticorps primaire dilué dans 10 % SVF/PBS pendant 45 min à température ambiante. Après trois lavages de 5 min avec 0,2 % Tween 20/PBS, les cellules sont incubées 45 min à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dilué dans 10 % SVF/PBS. L'excès d'anticorps est éliminé par trois lavages au PBS contenant 0,2 % de Tween 20. Le marquage de l'ADN s'effectue en incubant les cellules 10 min dans une solution de Hoechst 33258 (1 µg/ml) /PBS, puis du liquide de montage pour microscopie de fluorescence (DakoCytomation) est ajouté.

Les différents anticorps, ainsi que les dilutions appropriées pour chaque expérimentation sont indiqués dans la figure 23.

2) Imagerie

Les acquisitions sont réalisées sur un microscope confocal ZEISS 510 à l'aide du logiciel LSM510. Les paramètres d'acquisition avec l'objectif Plan Neofluar 40x/1.30 Ph3 sont une ouverture du diaphragme confocal (pinhole) de 200 µm et une puissance de laser variant entre 5 et 40 % de la puissance maximale. Les lasers utilisés sont l'Argon pour une excitation à 488

nm, l'Hélium-Néon pour une excitation à 543 nm et le biphoton Titanium (Tsunami) pour une excitation biphotonique à 720 nm (Hoechst ou DAPI).

Les corpuscules de Barr sont identifiés par le marquage de l'ADN au Hoechst 33258. Le pourcentage de cellules présentant un ou plusieurs corpuscules de Barr, en présence ou non de l'histone variant macroH2A, est estimé par comptage en analysant au moins 100 cellules.

Pour l'étude des cellules stables HEK-GFP-macroH2A et HEK-GFP-H2A, une série d'images confocales sont réalisées en prenant soin d'éviter toute saturation du signal GFP et DAPI. Le rapport d'intensité entre la zone du corpuscule de Barr et le reste du noyau est calculé grâce au logiciel Métamorph, qui permet de définir pour chaque image une région d'analyse précise. Environ 80 cellules ont été analysées pour chaque construction.

3) Essai Comète

Les cellules HeLa, transfectées ou non par le siRNA contre macroH2A, sont traitées par 10 mM H₂O₂ pendant 5 min à 4°C, rincées au PBS froid et mises à récupérer à l'étuve pendant 0, 4, 8, 16, 20 ou 60 minutes. Les cellules sont ensuite immédiatement collectées et resuspendues dans du PBS froid.

La concentration de H₂O₂ utilisée a été choisie comme n'affectant pas de façon dramatique la viabilité des cellules 24h après traitement.

30 µl de suspension cellulaire sont mélangés avec 270 µl de 0,6 % d'agarose à faible point de fusion dans du PBS à 37°C. 100 µl de cette mixture sont déposés sur une lame recouverte préalablement d'une fine couche d'agarose 1 %.

Les lames sont maintenues 10 min sur support glacé puis rapidement immergées dans une solution de lyse (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % sodium lauryl sarcosinate, 1 % Triton X-100 et 10 % DMSO, pH 10). Après une heure d'incubation à 4°C dans l'obscurité, les lames sont immergées 30 min dans un tampon d'électrophorèse alcalin (1,2 % NaOH, 1 mM EDTA) avant de démarrer l'électrophorèse (25 V/300 mA, 40 min). Les lames sont ensuite rincées trois fois 5 min par 0.4 M Tris pH 7.5, puis du bromure d'ethidium est ajouté sous lamelle.

L'analyse est réalisée grâce à un microscope à fluorescence Zeiss, connecté à une caméra CCD. Le logiciel «Comet Analysis Software» version 3.1, permet de déterminer le

pourcentage d'ADN dans la queue des comètes (% Tail DNA). Deux lames par condition sont réalisées, et sur chaque lame au moins 50 cellules sont analysées.

C. APPROCHES DE « CHIP-on-CHIP »

1) Préparation des nucléosomes

Isolation des noyaux

Les noyaux sont préparés à partir de cellules en culture ou de foie de souris.

Les cellules sont récupérées par grattage et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Le culot est lavé deux fois par du PBS, puis resuspendu dans dix volumes de tampon A (15 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, 4,4 % KCl, 11,6 % sucrose, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,2 mM spermine, 0,65 mM spermidine, 0,5 mM PMSF, pH 7,5) . La même quantité de tampon B (tampon A + 0,4 % NP40) est ajouté, et les cellules sont placées 5 min sur glace après homogénéisation douce. Après centrifugation, le culot est lavé par dix volumes de tampon C (tampon A sans EDTA ni EGTA), repris dans un volume de tampon de stockage (50 % tampon C/50 % glycérol) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Les foies de souris mâles ou femelles sont prélevés et immédiatement lavés au PBS avant d'être hachés grossièrement à l'aide de ciseaux. Ils sont ensuite broyés mécaniquement dans un potter en présence de 10 volumes d'une solution de 2.3 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM AEBSF, pH 7. La suspension est filtrée sur un morceau de gaze puis centrifugée 1h30 à 25.000 rpm. Le culot obtenu est resuspendu dans 10 volumes de solution de lyse (0.5 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM AEBSF, 0.2 % Triton X100, pH 7), puis 10 volumes de solution de lavages sont ajoutés (1 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM AEBSF, pH 7). Après homogénéisation douce, la suspension est centrifugée 10 min à 2.700 rpm. Le culot est lavé par 15 volumes de tampon de lavage, repris dans 1 volume de tampon de stockage (50 % tampon de lavage/50 % glycérol) et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Digestion des noyaux

Un test de digestion est réalisé sur une petite quantité de noyaux (20 à 100 µl) : les noyaux sont centrifugés pour éliminer le glycérol, et repris dans 150 µl de tampon de digestion (20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,5). 10 unités de nucléase micrococcale (Roche) sont

ajoutées, et la suspension est incubée à 37°C. Aux temps 5 min, 10 min, 15 min, 22 min, 30 min et 40 min, 15 µl de suspension sont prélevés et placés dans 100 µl de 10 mM EDTA, 1 mg/mL protéinase K afin de stopper la réaction de digestion. Une extraction phénol-chloroforme est réalisée, et l'ADN est analysé sur un gel d'agarose 1 %.

Ce test permet de définir les conditions de digestion conduisant soit à l'obtention de mononucléosomes, soit de polynucléosomes (de 1 à 6 nucléosomes).

Une quantité plus importante de noyaux peut alors être soumise à l'action de la nucléase micrococciale, et digérés le temps défini précédemment. Les noyaux sont ensuite centrifugés 1 min à 2.500 rpm. Le culot est resuspendu dans 150 µl de 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,5 et centrifugé 2 min à 13.000 rpm. Le surnageant que l'on obtient contient les nucléosomes. Deux autres extractions successives peuvent ainsi être réalisées, par ajout de 150 µl de tampon riche en sel sur le culot.

Purification des nucléosomes

Les nucléosomes obtenus après digestion sont déposés sur des gradients de sucrose 5-25 % contenant 0,6 M NaCl, et centrifugés 20 heures à 35.000 rpm. Une trentaine de fractions sont récoltées à partir de chaque gradient, et la mesure de leur densité optique permet d'isoler le pic de nucléosomes. Cette étape permet de se débarrasser des histones de liaisons ainsi que des fragments d'ADN générés par la digestion, qui se retrouvent dans le sommet du gradient (Mutskov, Gerber et al. 1998).

Les nucléosomes purifiés sont dialysés contre une solution de 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Si nécessaire, la suspension peut être concentrée après dialyse pour obtenir une concentration élevée de nucléosomes (DO_{260} de 2 à 6 pour les expériences d'immunoprécipitation).

Préparation de chromatine hyperacétylée

Les mononucléosomes hyperacétylés ont été préparés à partir de cellules HEK 293 en suivant le protocole décrit par Ausio et Van Holde (Ausio and van Holde 1986).

2) Immunoprécipitation (ChIP)

Les immunoprécipitations de macroH2A dans divers types cellulaires ont été réalisées en utilisant des billes de protéine A sépharose. Ces billes sont lavées au PBS puis saturées toute une nuit à 4°C avec des nucléosomes de poulet.

40 µg de nucléosomes sont incubées 8 heures à 4°C avec 20 µg d'anticorps anti-macroH2A immunopurifié. 30 µl de billes de protéine A sépharose préalablement saturées sont ajoutées et l'échantillon est incubé une heure à température ambiante sous agitation douce. Les billes sont ensuite lavées cinq fois par 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Les nucléosomes représentent la fraction « Input », le premier surnageant de lavage après immunoprécipitation correspond à la fraction « Unbound » tandis que les billes contiennent la fraction « Bound ». Une petite quantité de chacune de ces fractions peut être déposée sur un gel SDS- PAGE et analysée par Western Blot.

L'ADN nucléosomal de chaque fraction doit être extrait avant d'être analysé sur puces ou par PCR : 1 mg/ml de protéinase K et 0.2 % SDS sont ajoutés dans les échantillons, que l'on incube 4 heures à 37°C. Un volume de phénol-chloroforme (phénol 50 %, chloroforme 48 %, isoamylalcool 2 %) est ajouté, puis une centrifugation de 5 min à 5.000 rpm permet de récupérer l'ADN contenu dans la phase aqueuse. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,0) et de 2,5 volumes d'éthanol froid, et par refroidissement 30 min à -70°C. L'ADN est récupéré par centrifugation à 4°C pendant 25 min et à 10.000 rpm. Le précipité est lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans de l'eau stérile.

3) Description des puces utilisées

Puces « genome-wide » du Sanger Institute (Cambridge)

L'équipe de Nigel Carter dispose d'un jeu de puces représentant la totalité du génome humain et murin à une résolution de 1 Mégabase. La construction de ces puces est détaillée dans (Fiegler, Carr et al. 2003) : de larges inserts ont été choisis dans les banques Golden Path et sont espacés d'environ 1 Mb le long du génome. Le détail des clones peut être obtenu sur

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/cytoview/. Chacun de ces inserts, sous forme de BACs et de PACs, a été isolé, amplifié par DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR) et déposé en duplicats sur des lames 3D-link (Amersham) par un robot MicroGridII arrayer (BioRobotics).

Au final, la puce « genome wide » humaine comprend 3523 clones et la puce murine 2803. Les fragments PCR s'échelonnent entre 200 pb et 2 Kb.

Puce « chromosome X » de l'Institut de Pathologie Moléculaire (Vienne)

L'équipe d'Anton Wutz a choisi 335514 clones uniques qui recouvrent la totalité du chromosome X de la souris, selon une liste fournie par Nimblegen (NCBI build36). En moyenne, la résolution est de 306 pb. La taille des sondes est variable mais avoisine les 50 nucléotides.

Une puce représentant une partie du chromosome 17 de la souris a également été réalisée en guise de contrôle (Chr17:4657287-19251247). Elle réunit 52486 clones uniques, avec une résolution moyenne de 227 pb.

4) Protocoles d'utilisation des puces

Puces « genome-wide » du Sanger Institute (Cambridge)

Le marquage de l'ADN et l'hybridation sont réalisés comme décrit dans (Fiegler, Carr et al. 2003; Fiegler and Carter 2004), avec quelques modifications.

L'ADN à analyser (fraction « Bound » ou « Unbound ») et le contrôle (fraction « Input ») sont marqués respectivement au Cy3 et Cy5, et précipités ensemble avec 135 µg d'ADN humain Cot1 (Roche) et 600 µg de ARNt de levure (Invitrogen). Le culot est resuspendu dans 35 µl de tampon d'hybridation. Après dénaturation, l'ADN est incubé à 37°C pendant une heure.

Les puces sont préhybridées avec 800 µg d'ADN de sperme de saumon (Sigma) et 135 µg d'ADN humain Cot1 (Roche) dans 45 µl de tampon d'hybridation. Après une heure d'incubation à 37°C, les lames sont lavées au PBS et séchées. L'hybridation a lieu dans une chambre humide pendant 24 heures à 37°C, dans 20 % formamide et 2X SSC.

Les puces sont analysées avec un scanner Agilent (Agilent Technologies). Les intensités de fluorescence sont calculées après soustraction du bruit de fond par un GenePix (Axon

Instruments), et normalisées en divisant le ratio de chaque point par le ratio médian de tous les clones autosomaux. Les ratios ainsi obtenus pour chaque clone (fraction « Bound » versus « Input » et fraction « Unbound » versus « Input ») sont ensuite positionnés le long des chromosomes.

Puce « chromosome X » de l'Institut de Pathologie Moléculaire (Vienne)

Comme pour la puce précédente, aucune étape d'amplification de l'ADN immunoprécipité n'a été réalisée.

Le marquage, l'hybridation et la collection des données sont réalisés directement par la société Nimblegen.

Pour chaque point, le ratio « Bound/Input » est calculé. La normalisation des données se fait à partir de la moyenne des ratios obtenue pour le chromosome 17.

D. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES

1) Western Blot

Les culots cellulaires sont dénaturés dans de l'urée 9M et du tampon de charge (contenant du SDS et du DTT). Les protéines extraites sont séparées sur gel SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose hybond C (Amersham) pendant une heure à 100 volts constants.

La membrane est mise en présence de 4 % lait écrémé/PBS pendant 30 min afin de saturer les sites aspécifiques. Lors de l'immunodétection, les incubations et les lavages sont réalisés à température ambiante et sous agitation. La membrane est incubée 45 min dans l'anticorps primaire dilué dans 10 % SVF/PBS. Trois lavages de 5 min dans 0,5 % Triton/ 0,4 M NaCl/PBS sont réalisés, suivis d'un lavage de 5 min dans 0,4 M NaCl/PBS puis d'un rinçage au PBS. La membrane est alors mise en présence pendant 30 min de l'anticorps secondaire dilué dans 1 % lait écrémé/PBS. Les mêmes étapes de lavages sont effectuées. La révélation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) est réalisée par chemiluminescence avec le kit ECL+ (Amersham).

Les différents anticorps, ainsi que les dilutions appropriées pour chaque expérimentation sont indiqués dans la figure 23.

2) Détection du Poly(ADP-ribose)

Les cellules HeLa, transfectées ou non par le siRNA anti-macroH2A et un vecteur pcDNA, sont traitées par 10 mM H₂O₂ pendant 5 min à 4°C, rincées au PBS froid et mises à récupérer à l'étuve pendant 4, 8, 15, 20, 25, 30 ou 35 minutes. Les cellules sont ensuite immédiatement collectées pour une analyse par Western blot, ou fixées pour une immunofluorescence.

Les foyers PAR sont visualisés à l'aide d'un anticorps spécifique, et le nombre de noyaux positifs pour ces foyers est estimé. Au moins 100 cellules sont analysées par condition.

Pour les expériences de restauration («rescue»), seules les cellules HA-positives exprimant la protéine résistante au siRNA sont prises en compte pour le comptage.

Anticorps	Dilution IF	Dilution WB	Espèce	Provenance
Primaire				
anti-macroH2A1	1/100	1/5000	L	Equipe Dimitrov
anti-H2A		1/1000	L	Upstate
anti-H2B		1/10.000	L	Upstate
anti-H4		1/5000	L	Upstate
anti-tubuline		1/5000	S	Sigma
anti-phosphoH2A.X		1/1000	L	Upstate
anti-acetylated H4	1/100		S	Upstate
anti-H3K9me2	1/100		S	Upstate
anti-poly(ADP-ribose)		1/1500	L	BD PharMingen
anti-poly(ADP-ribose)	1/400		L	Alexis
anti-PARP-1		1/2000	S	Alexis
anti-HA	1/100		R	Roche
Secondaire				
couplés HRP		1/5000	S, L	Roche
couplés Alexa 488	1/500		S, L, R	Molecular Probes
couplés Alexa 546	1/500		S, L, R	Molecular Probes

Figure 23 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot et Immunofluorescence

Pour chaque anticorps, les dilutions appropriées ainsi que l'espèce de provenance sont indiquées (L : lapin, S : souris, R : rat).

3) « GST pull down »

Les quatre protéines de fusion GST (GST, GST-macroH2A1.2, GST-H2A-Like et GST-NHR) sont exprimées dans la souche bactérienne C41 à 37°C, et purifiées sur des billes de glutathion sépharose 4B (Amersham) selon les instructions du fournisseur.

Un mélange contenant un ratio identique de PARP1 humaine recombinante (Alexis) et de chacune des protéines GST est incubé 1h30 à 4°C dans 20 mM Tris-HCl, 0,2 mM EDTA, 0,1

M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF et 0,2 % NP-40, pH 7,9. Les billes sont ensuite lavées cinq fois dans le même tampon, et les protéines sont éluées dans du tampon de charge. Le matériel est déposé sur un gel SDS-PAGE 10 %, et un Western Blot est réalisé en utilisant l'anticorps anti-PARP-1.

4) Analyse des complexes e-macroH2A1.1

Purification des complexes

Les noyaux issus des cellules HeLa exprimant stablement la protéine macroH2A1.1 fusionnée aux étiquettes HA en N-terminal et Flag en C-terminal (e-mH2A1.1) sont digérés par la nucléase micrococcalle pour obtenir majoritairement des mononucléosomes.

Ces mononucléosomes sont purifiés par immunoprécipitation avec un anticorps anti-Flag couplé à des billes d'agarose. Après élution à l'aide du peptide Flag, les nucléosomes sont purifiés sur une résine par affinité à l'aide d'un anticorps anti-HA, puis élués avec le peptide HA.

Pour étudier l'effet des drogues, les cellules HeLa sont traitées soit par 10 mM H₂O₂ 15 min à 4°C, soit par 0,4 µM MMS 2 heures à 37°C, soit par 20 mM Doxorubicine 2 heures à 37°C. Les complexes e-macroH2A1.1 sont ensuite isolés par une seule étape de purification (colonne couplée à l'anticorps anti-Flag).

Traitement *in vitro* des complexes

Après digestion par la nucléase micrococcalle, les nucléosomes e-macroH2A1.1 sont immobilisés sur une colonne couplée à l'anticorps anti-Flag et traités soit par 10 mM H₂O₂ 15 min à 4°C, soit par 0,4 µM MMS 2 heures à 37°C, soit par 20 mM Doxorubicine 2 heures à 37°C. La résine est lavée trois fois par 10 volumes de 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glycérol, pH 7,8 puis analysée sur un gel SDS-PAGE 4-12 %.

E. CLONAGE

1) Réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction de PCR se fait en présence d'une polymérase (Taq polymérase, Roche) dans un volume final de 50 µl contenant le tampon de l'enzyme, 0,2 mM de dNTP ; 5 ng de chaque amorce et 100 à 300 ng d'ADN. Le programme de PCR est le suivant:

étape de dénaturation (94°C, 3 min), trente cycles de dénaturation (95°C, 30 s), hybridation (65°C, 30 s) et élongation (72°C, 1 minute/kb à amplifier).

Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose (1 % agarose, TAE) puis élué en utilisant un kit d'extraction (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen). Un volume de phénol-chloroforme (phénol 50 %, chloroforme 48 %, isoamylalcool 2 %) est ajouté à la solution, puis une centrifugation de 5 min à 5.000 rpm permet de récupérer l'ADN contenu dans la phase aqueuse.

L'ADN est ensuite précipité après ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,0) et de 2,5 volumes d'éthanol froid, et par refroidissement 30 min à -70°C. L'ADN est alors récupéré par centrifugation à 4°C pendant 25 min à 10.000 rpm. Le précipité est lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans de l'eau stérile.

2) Clonage

Digestion enzymatique et ligation

La solution de digestion (20 µl) contient 1 à 4 µg d'ADN (plasmide ou produit de PCR), un tampon convenant aux enzymes choisies et 5 à 10 UI d'enzyme. La réaction de digestion s'effectue le plus souvent 2 heures à 37°C, mais est ajustée en fonction des enzymes choisies et du type d'ADN. La totalité de la solution de digestion est déposée sur gel d'agarose et l'ADN d'intérêt (insert ou vecteur) est purifié en utilisant un kit d'extraction sur gel, puis élué dans 30 µl d'eau stérile.

Les quantités d'insert et de vecteur sont évaluées sur gel d'agarose par comparaison avec un marqueur de taille étalonné.

La réaction de ligation se fait avec un rapport insert/vecteur (mole/mole) compris entre 3/1 et 5/1, et s'effectue dans 20 µl d'une solution comprenant une ligase (T4 DNA Ligase, BIOLABS), le tampon de l'enzyme, 50 à 100 ng de vecteur et l'insert. La ligation peut s'effectuer 3h à température ambiante ou sur la nuit à 16°C.

Transformation

La réaction de transformation s'effectue par choc thermique, 10 min sur la glace puis 5 min à 37°C. Après l'ajout de 1 ml de LB préchauffé à 37°C, les bactéries compétentes sont maintenues à 37°C pendant 30 min. Après centrifugation 2 minutes à 2.000 rpm, les bactéries en culot sont reprises dans 100 µl de LB et étalées sur boîte de LB agar avec sélection et cultivées à 37°C.

Extraction d'ADN plasmidique

Minipréparation d'ADN : Une pré-culture de 10 ml de LB avec antibiotique estensemencée à partir d'une colonie et incubée à 37°C toute la nuit. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées et le culot est traité selon le kit de miniprep Stratagène. L'ADN est ensuite élué dans 30 µl d'eau stérile. Une digestion de contrôle est réalisée pour sélectionner les clones positifs.

Maxipréparation d'ADN : En vue d'utiliser les plasmides d'intérêt pour transférer des cellules en culture, une culture bactérienne de 300 ml est réalisée à partir d'une pré-culture de 10 ml. Après incubation toute la nuit à 37°C et sous agitation, la solution bactérienne est centrifugée. L'extraction d'ADN plasmidique se réalise à l'aide d'un kit « maxiprep » (Nucleobond AX, MACHERY-NAGEL) et selon les instructions du fournisseur. L'ADN est précipité après ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,0) et de 2,5 volumes d'éthanol froid, et par refroidissement 30 min à -70°C. L'ADN est alors récupéré par centrifugation à 4°C pendant 25 min à 10.000 rpm. Le précipité est lavé à l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans de l'eau stérile.

3) Mutagenèse dirigée

La mutagenèse se fait à l'aide du kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagène). Des amorces couvrant la mutation ponctuelle sont dessinés suivant les instructions du

fournisseur. Une PCR est réalisée avec ces amorces en présence de l'enzyme Pfu Turbo, de manière à synthétiser la totalité du plasmide. La solution de PCR est ensuite incubée avec 1 µl d'enzyme DpnI de façon à digérer le brin d'ADN parental. La transformation des bactéries s'effectue avec 1 µl de la solution traitée par DpnI.

4) Plasmides

Les plasmides GFP-macroH2A1.2, GFP-H2ALike, GFP-NHR et GFP-H2A ont été réalisés dans l'équipe (Perche, Vourc'h et al. 2000). Les séquences correspondantes ont été amplifiées à partir d'une banque humaine (cDNA Marathon Clontech). Les constructions ont été réalisées par clonage en insérant les séquences dans le vecteur pEGFP-N1 (BD Clontech).

Les constructions GST-macroH2A1.2, GST-H2ALike et GST-NHR ont été sous-clonés dans le vecteur pGEX-6p3 à partir des constructions GFP décrites ci-dessus.

La construction e-macroH2A1.1 a été obtenue par sous-clonage dans les sites XhoI–NotI du vecteur pGEX-5X.1 (Amersham). Ce plasmide a été réalisé dans l'équipe d'Ali Hamiche.

La construction des vecteurs « silent resistant » a été réalisée par Fabienne Hans dans le laboratoire.

- pcDNA-HA-macroH2A1.2 : la séquence complète de macroH2A1.2 a été sous-clonée dans les sites EcoRI-XhoI du vecteur pcDNA-HA (BD Clontech).

- pcDNA-HA-H2ALike : la séquence du domaine H2ALike de macroH2A1.2 (nucleotides 1 à 360) a été amplifiée par PCR à partir de la matrice macroH2A1.2 complète, et sous-clonée dans les sites EcoRI-XhoI du vecteur pcDNA-HA.

- Silent resistant (sr) pcDNA-HA macroH2A1.2 : quatre mutations ponctuelles silencieuses au niveau des régions reconnues par le siRNA sont introduites dans la construction pcDNA-HA-macroH2A1.2 par mutagenèse dirigée. Les nucléotides substitués sont indiqués en lettres capitales. Les primers suivants ont été utilisés :

mH2A1.2 (+) 5'- ccaagaagaaAcagggCgaGgtGagtaaggcagccagc-3'

mH2A1.2 (-) 5'gctggctgccttactCacCtcGccttgTttcttcttg-3'

- Silent resistant (sr) pcDNA-HA-H2A-NHR : un fragment codant pour l'histone H2A humaine a été amplifiée par PCR en utilisant les primers suivants :

H2A (+) 5'-cgggatccatgtctggacgtggcaagcaggg-3'

Chimère H2A-NHR (-) 5'-gatggctccaacttcctttcttgccttagctttgtggtg-3'

Un autre fragment correspondant à la région NHR a été amplifié par PCR en utilisant les primers suivants :

Chimère H2A-NHR (+) 5'-caccacaaagctaagggaagaaaggaaagttggaagccatc-3'

NHR (-) 5'-ccgccgctcgagttagttggcgtccagcttgcc-3'

Un produit de chevauchement est obtenu en utilisant les deux fragments PCR et les primers H2A (+) et NHR (-), et cloné dans les sites BamHI –XhoI du vecteur pcDNA-HA.

RESULTATS

A. Implication de macroH2A dans le processus d'inactivation du chromosome X

B. Rôle de macroH2A dans la réparation des cassures de l'ADN dépendante de PARP

A. IMPLICATION DE MACROH2A DANS LE PROCESSUS D'INACTIVATION DU CHROMOSOME X

Nous avons abordé le rôle de macroH2A dans le phénomène de l'inactivation du chromosome X. Notre principale approche a consisté en des expériences de « ChIP-on-CHIP » sur de la chromatine native. Des techniques de fluorescence et d'ARN interférence ont également permis d'apporter des éléments de réponse sur la controverse de la localisation et de l'implication du variant dans ce mécanisme.

1) L'immunoprécipitation des nucléosomes macroH2A

L'immunoprécipitation de chromatine a été réalisée à partir de diverses sources biologiques :

- cellules humaines HEK 293, qui contiennent de 1 à 4 chromosomes X inactifs
- cellules hybrides CHO X86T2, qui possèdent un chromosome X humain inactif
- cellules hybrides CHO-Y162, qui possèdent un chromosome X humain actif
- foie de souris mâle, dont les cellules n'ont pas de chromosome X inactif
- foie de souris femelle, dont les cellules contiennent un chromosome X inactif

Les noyaux issus de ces échantillons sont digérés pour obtenir des mononucléosomes ou des polynucléosomes, qui sont purifiés sur gradient de sucrose. Ces nucléosomes natifs, obtenus sans étape de pontage au formaldéhyde, sont précipités avec l'anticorps immunopurifié anti-macroH2A produit au sein de l'équipe.

Travailler avec des nucléosomes natifs préserve les épitopes macroH2A et permet d'obtenir une immunoprécipitation très efficace (Figure 24). L'enrichissement en macroH2A dans la fraction précipitée (Bound) par rapport au matériel de départ (Input) peut être estimé directement par Western Blot : une première détection avec l'anticorps anti-macroH2A permet d'évaluer l'abondance relative du variant dans les différentes fractions. Sur la même membrane, l'anticorps anti-H2A est ensuite incubé.

En déposant des nucléosomes de foie de souris femelle en quantités décroissantes, nous constatons que l'histone macroH2A est en proportion faible par rapport à l'histone conventionnelle H2A (Figure 24, puits 1-4). Par contre, lorsque les nucléosomes sont incubés

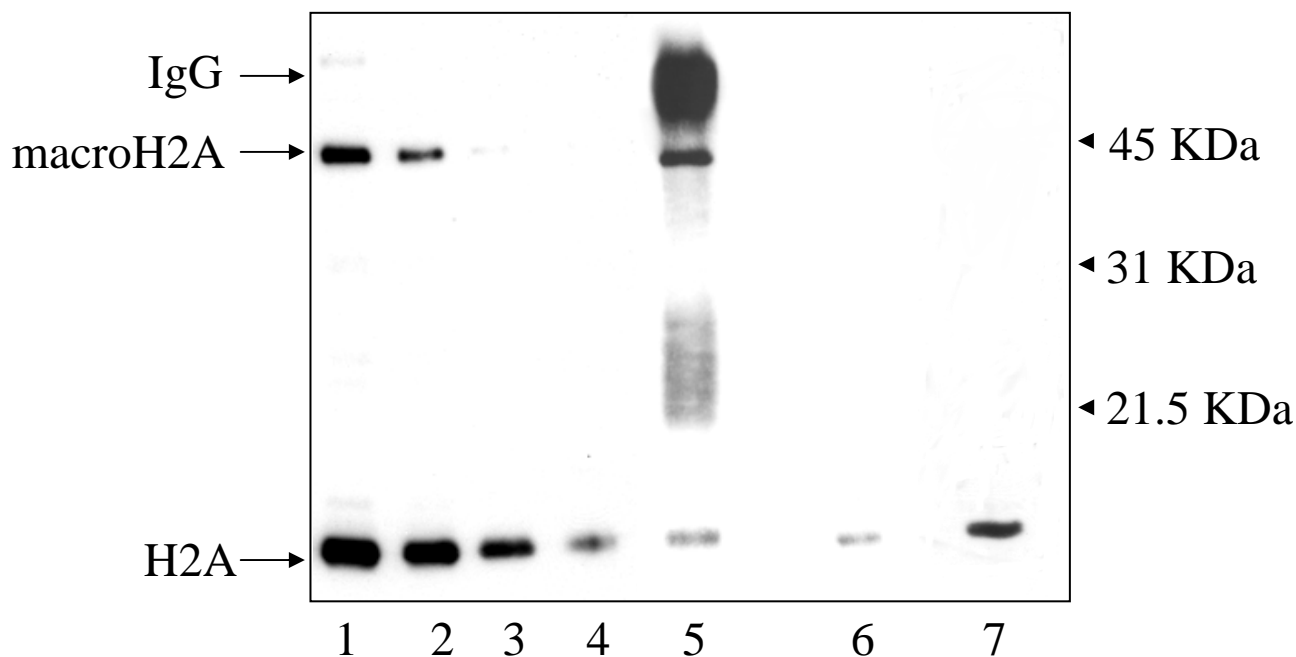


Figure 24 : Immunoprécipitation des nucléosomes macroH2A

Cette figure montre l'exemple d'une immunoprécipitation de mononucléosomes issus de foie de souris femelle. Une fois purifiés, les nucléosomes natifs sont incubés avec un anticorps anti-macroH2A en présence de billes de protéine A sépharose. Des quantités décroissantes de fraction Input (puits 1-4), ainsi qu'un échantillon de fraction Bound (puits 5) et Unbound (puits 6) sont déposées sur un gel SDS-PAGE. Des billes contrôles, ne contenant pas d'anticorps anti-macroH2A mais incubées avec les nucléosomes, sont également chargées (puits 7).

Un Western Blot est réalisé avec les anticorps anti-macroH2A et H2A successivement, et permet d'évaluer l'enrichissement en macroH2A dans la fraction Bound. Selon les échantillons, il varie entre 8 et 15 fois.

avec l'anticorps anti-macroH2A, le variant est immunoprécipité et devient l'histone majoritaire, tandis que l'histone canonique est faiblement représentée (Figure 24, puits 5). L'intensité des bandes macroH2A et H2A révélées sur le film d'autoradiographie, impressionné en condition non saturante, a été analysée par un logiciel de quantification (NIH Image). Le ratio entre le signal macroH2A et le signal H2A est une mesure de l'enrichissement en macroH2A dans la fraction Bound : selon les différentes sources utilisées, il varie entre 8 et 15 fois.

Le surnageant après précipitation (fraction Unbound) est totalement dépourvu d'histone macroH2A, témoignant d'une immunoprécipitation efficace (Figure 24, puits 6). Enfin, on peut noter que cette immunoprécipitation est spécifique, car aucun enrichissement n'est observable dans le témoin négatif : en absence d'anticorps, on détecte uniquement la protéine canonique H2A en faible quantité (Figure 24, puits 7). Il faut noter que les billes de protéine-A sépharose sont préalablement saturées par des nucléosomes d'érythrocytes de poulet, non reconnus par l'anticorps anti-macroH2A. L'anticorps anti-H2A utilisé peut reconnaître l'histone aviaire et donc être responsable du signal observé sur les Western Blots.

2) La distribution génomique de macroH2A

Les cinq sources de chromatine citées ci-dessus ont été utilisées pour préparer des mononucléosomes et réaliser des immunoprécipitations avec l'anticorps anti-macroH2A.

L'ADN des fractions Input, Bound et Unbound est ensuite isolé. Aucune étape d'amplification par PCR de ces ADN n'est effectuée, dans le but de s'affranchir d'éventuels problèmes liés à la linéarité de ce type d'amplification.

Pour chaque expérience, l'ADN des fractions Bound et Unbound est hybridé en même temps que l'ADN de la fraction Input sur une puce comprenant de larges inserts espacés d'environ 1 Mb le long du génome. Nous disposons en effet d'une puce « genome-wide » représentant la totalité du génome humain, où ont été hybridés les ADN des cellules HEK et CHO, et une représentant la totalité du génome de la souris, utilisée pour les échantillons issus des foies mâle et femelle.

Pour chaque point, représentant une grande région de 1 Mb, le ratio de signal entre la fraction Bound/Unbound et la fraction Input est calculé. Ces ratios normalisés sont ensuite positionnés le long des différents chromosomes. Par souci de simplification, seuls les graphiques

A

	Ratio moyen autosomes	Ratio moyen chromosome X
HEK 293	1.00	1.00
CHO-X	0.96	0.97
CHO-Y	0.93	0.92
Souris male	1.02	1.05
Souris femelle	1.00	1.02

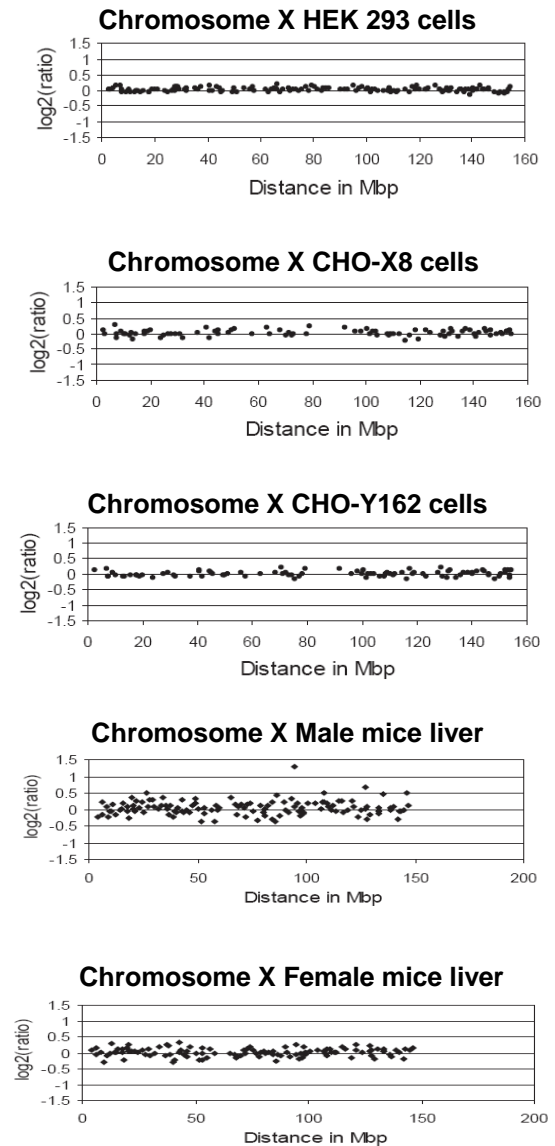
B

Figure 25 : MacroH2A présente une distribution uniforme le long du génome humain et murin

De l'ADN isolé de mononucléosomes immunoprécipités par un anticorps anti-macroH2A est analysé sur une puce représentant intégralement le génome humain (échantillons issus de cellules en culture HEK 293 et d'hybrides CHO) ou murin (préparation de foie de souris mâle et femelle). Pour chaque point, représentant une séquence de 1 Mb, le ratio d'intensité de fluorescence Bound/Input est calculé.

A) Le tableau indique le ratio moyen obtenu pour l'ensemble des autosomes ainsi que pour le chromosome X. MacroH2A n'est retrouvé enrichi ou appauvri sur aucun chromosome en particulier.

B) Le ratio de chaque point est positionné le long du chromosome X et exprimé sur une échelle logarithmique. Il n'est pas possible de distinguer une association préférentielle de macroH2A sur ce chromosome.

représentant les chromosomes X des différents échantillons sont mentionnés (Figure 25B). Nous pouvons observer que macroH2A n'est enrichi ou appauvri sur aucun chromosome en particulier, et que sa distribution est homogène. En effet, le ratio moyen Bound/Input de chaque chromosome est sensiblement identique et avoisine la valeur de 1, quel que soit le type cellulaire étudié (Figure 25A). De plus, une analyse de chaque chromosome, point par point, ne révèle pas d'enrichissement ou d'appauvrissement régional majeur en macroH2A. Logiquement, les ratios calculés à partir de la fraction Unbound sont également similaires pour chaque chromosome (données non montrées).

Nous ne distinguons pas d'enrichissement en macroH2A sur le chromosome X par rapport aux autosomes (Figure 25A). Sur les graphiques représentant les ratios obtenus pour les chromosomes X, exprimés sur une échelle logarithmique, la majorité des points restent concentrés autour d'une valeur de 0, ce qui confirme que macroH2A ne semble pas associé préférentiellement au chromosome X inactif (Figure 25B). Ces résultats sont similaires que l'ADN soit issu de cellules en culture ou bien de foies de souris.

Nous avons voulu nous assurer que l'absence d'enrichissement détecté n'était pas due à un problème technique. Pour cela, nous avons inclus une expérience de contrôle positif en utilisant de l'ADN enrichi en histones hyperacétylées, préparé à partir de cellules HEK 293.

L'hyperacétylation des histones est connue comme étant associée à la transcription des gènes. Par exemple, le chromosome 19 est riche en gènes, se réplique tôt et est donc susceptible d'être particulièrement hyperacétylé. A l'inverse, le chromosome 18, pauvre en gènes, se réplique tardivement : on peut s'attendre à ce qu'il soit plutôt hypoacétylé.

En analysant l'ADN hyperacétylé issu des cellules HEK 293 sur la puce, nous trouvons comme prévu un enrichissement en histones hyperacétylées sur le chromosome 19, alors que les chromosomes 18 et X apparaissent comme appauvris (Figure 26). De plus, la distribution de l'acétylation corrèle globalement avec des données de temps de réplication, obtenues précédemment dans l'équipe de Nigel Carter à partir d'une lignée lymphoblastoïde mâle (Woodfine, Fiegler et al. 2004).

Ces données démontrent la capacité de ces puces à détecter des différences de distribution au sein du génome à partir de matériel natif.

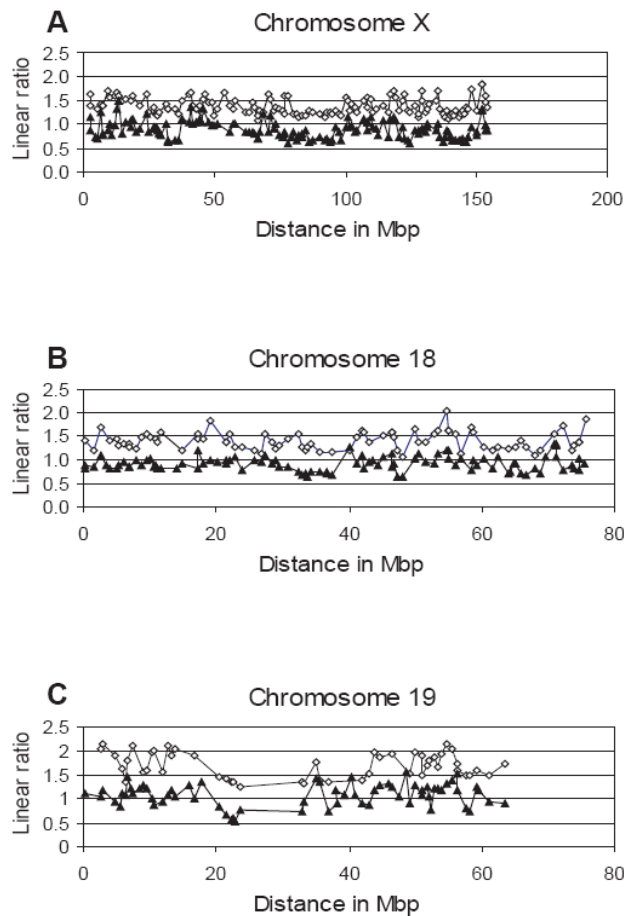


Figure 26 : Hyperacétylation et temps de réplication

L'ADN hyperacétylé est isolé à partir de cellules HEK 293 et analysé sur une puce représentant l'intégralité du génome humain avec une résolution de 1 Mb. Pour chaque clone, le ratio d'intensité de fluorescence Bound/Input est calculé et positionné le long des chromosomes, sous forme de triangles noirs. Uniquement les chromosomes X (A), 18 (B) et 19 (C) sont représentés.

Des données de temps de réplication obtenues précédemment sur une lignée lymphoblastoïde mâle sont indiquées, pour comparaison, sous forme de cercles blancs (Woodfine, 2004).

Ces deux types de données montrent une corrélation importante, démontrant la capacité de la puce à détecter des différences de distribution sur du matériel natif.

3) Etude du marquage de protéines de fusion GFP

Plusieurs équipes ont affirmé que macroH2A se localisait préférentiellement sur le chromosome X inactif au vu des données d'immunofluorescence. Cependant, le fort degré de compaction du Xi pourrait expliquer ce marquage plus intense. Les premières données de « CHIP-on-CHIP » détaillées ci-dessus vont dans ce sens, puisqu'elles suggèrent que macroH2A n'est pas ou peu enrichi sur le chromosome X inactif à une résolution de 1 Mb.

Nous avons souhaité étudier le marquage de deux protéines de fusion, GFP-macroH2A et GFP-H2A, afin de déterminer si la localisation préférentielle de macroH2A sur le Xi est uniquement due à une plus forte densité des nucléosomes.

Les protéines macroH2A et H2A fusionnées à la GFP sont toutes les deux concentrées dans la région dense en ADN du corpuscule de Barr (Figure 27A). Néanmoins, le marquage GFP-macroH2A semble légèrement moins intense dans le reste du noyau que dans le cas de l'histone conventionnelle. Un signal semblable est retrouvé lors d'une détection de la protéine endogène par immunofluorescence (Figure 27A).

A l'aide du logiciel Métamorph, nous avons calculé le ratio d'intensité de fluorescence entre la zone du corpuscule de Barr et le reste du noyau cellulaire. Dans les cellules GFP-H2A, ce ratio est de 1,4 pour les marquages GFP et DAPI (Figure 27B). Par contre, dans les cellules GFP-macroH2A, le ratio de fluorescence GFP se distingue et atteint 1,9. Le ratio obtenu avec l'anticorps anti-macroH2A est également plus élevé que celui de l'ADN dans les cellules HEK 293 non transfectées (Figure 27B).

Nous observons donc que le marquage préférentiel de macroH2A au niveau du corpuscule de Barr reflète à la fois une densité nucléosomale élevée et un enrichissement spécifique modéré. Le rapport des ratios macroH2A (GFP et endogène) et DAPI nous donne un ordre d'idée de cet enrichissement, qui se situe entre 35 et 45 %.

4) La distribution de macroH2A sur le chromosome X

Les résultats obtenus avec les protéines de fusion GFP, ainsi que les dernières données biochimiques de la littérature, laissent sous-entendre qu'il existerait un enrichissement de macroH2A de faible importance ou localisé sur des zones particulières du chromosome X.

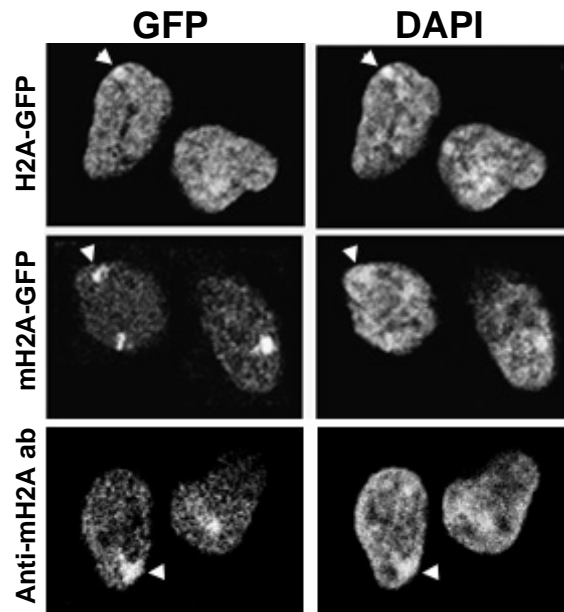
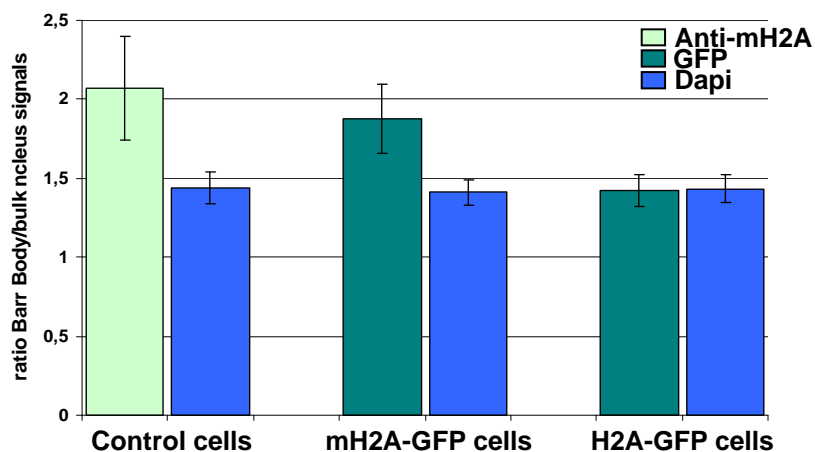
A**B**

Figure 27 : Le marquage préférentiel de macroH2A au niveau du Xi

Des cellules HEK 293 stables exprimant les protéines de fusion GFP-macroH2A et GFP-H2A sont étudiées par microscopie de fluorescence.

A) Les protéines de fusion sont retrouvées, comme la protéine macroH2A endogène, concentrées dans le territoire du chromosome X inactif. La zone du corpuscule de Barr est identifiée grâce au marquage de l'ADN par le DAPI.

B) Une analyse des images avec le logiciel Métamorph permet de calculer le ratio d'intensité de fluorescence entre la zone du corpuscule de Barr et le reste du noyau cellulaire, et ce pour le marquage macroH2A (GFP ou endogène) et celui de l'ADN. Un enrichissement de 35-45 % dans la région du Xi est observé pour macroH2A, mais pas pour l'histone canonique.

Nous avons alors poursuivi les études de « ChIP-on-CHIP », en utilisant cette fois une puce représentant le chromosome X murin avec une résolution de 306 pb. Les données présentées ci-après ont été obtenues en collaboration avec l'équipe d'Anton Wutz (Vienne).

Des immunoprécipitations de macroH2A sont réalisées à partir de polynucléosomes issus de foies de souris mâle et femelle. L'ADN isolé des fractions Input et Bound est hybridé sur la puce, sans étape préalable d'amplification. Pour chaque point, le ratio de signal Bound/Input est calculé et exprimé sur une échelle logarithmique : on obtient donc une valeur M, où $M = \log_2(\text{Bound/Input})$, positionnée ensuite le long du chromosome X.

Les valeurs de M obtenues à partir des échantillons mâles et femelles sur la puce contrôle (représentant une partie du chromosome 17) sont ajustées entre elles, ce qui induit une superposition des deux courbes (Figure 28A). Elles permettent ensuite de normaliser l'ensemble des données obtenues sur la puce « chromosome X ».

La distribution des valeurs de M obtenues sur le chromosome X montre un décalage entre les courbes mâle et femelle après normalisation (Figure 28A). En calculant la différence entre ces deux courbes, il apparaît qu'il existe un enrichissement d'environ 30 % en macroH2A dans les échantillons de souris femelle.

La figure 28B représente la totalité des signaux de la puce. Afin de rendre le résultat plus clair, une « différence » entre les données mâles et femelles est calculée : les valeurs de M sont considérées sur des fenêtres de 5 Kb et un test statistique est réalisé pour évaluer la pertinence des différences entre mâle et femelle, exprimées par la suite en échelle \log_{10} . Une différence négative indique un enrichissement sur le chromosome femelle, alors qu'une différence positive suggère une localisation préférentielle de macroH2A sur le chromosome mâle.

Avec cette représentation, il apparaît clairement que macroH2A est enrichie tout le long du chromosome X dans le foie de souris femelle par rapport au mâle (Figure 28B).

Cette localisation préférentielle de macroH2A chez la femelle se retrouve dans les régions riches en gènes, mais également dans les zones intergéniques du chromosome X (Figure 29).

Qu'en est-il des gènes échappants ? Chez la souris, six gènes sont connus pour échapper à l'inactivation du chromosome X : *Eif2s3x*, *Utx*, *Xist*, *Smcx*, *Fxy/Midl1* et *Sts*. Dans le cas de *Utx* et *Fxy/Midl1*, la distribution de macroH2A est similaire au reste du chromosome et présente un net enrichissement (données non montrées).

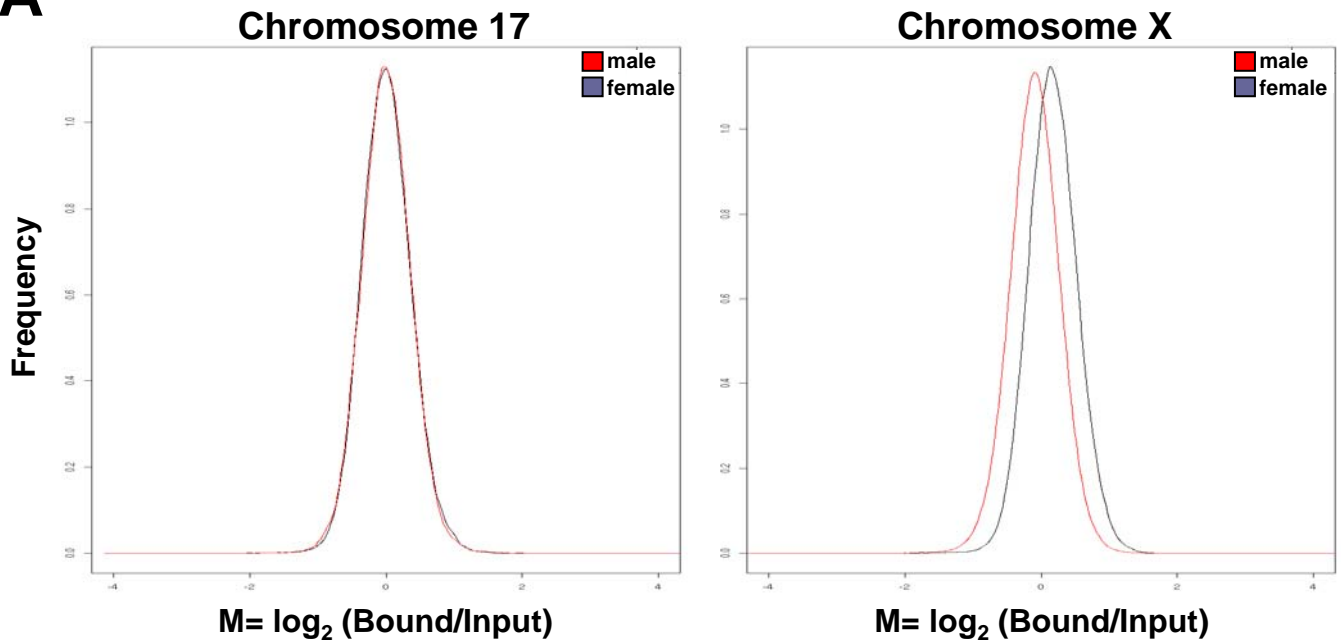
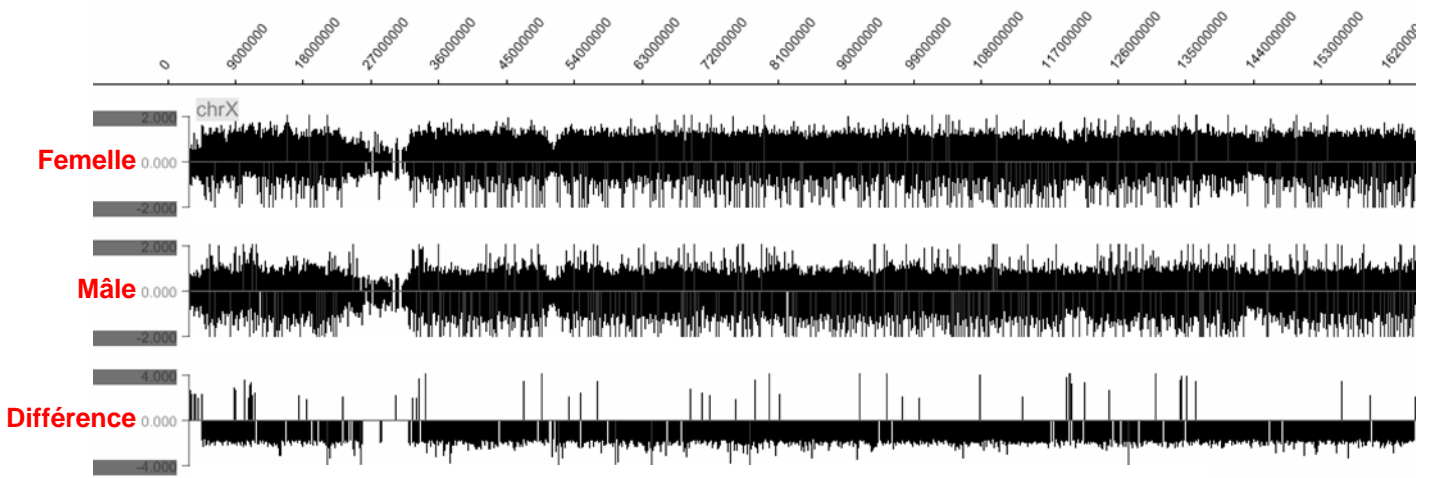
A**B**

Figure 28 : MacroH2A est enrichie sur le chromosome X dans le foie de souris femelle

L'ADN isolé de polynucléosomes macroH2A issus de foies de souris mâle ou femelle est analysé sur une puce représentant la totalité du chromosome X. Pour chaque point, correspondant à une séquence de 306 pb en moyenne, la valeur M, où $M = \log_2(\text{Bound}/\text{Input})$ est calculée.

A) Distribution des valeurs M. Les signaux obtenus sur une puce contrôle représentant une partie du chromosome 17 permettent de normaliser l'ensemble des données. Sur le chromosome X, il existe un décalage positif dans la distribution des valeurs M entre les échantillons, qui indique un enrichissement en macroH2A de 30 % chez la femelle par rapport au mâle.

B) Représentation de l'ensemble des valeurs M le long du chromosome X. Un calcul de la différence entre les données mâles et femelles est réalisé sur des fenêtres de 5 Kb, et permet d'identifier un enrichissement global de macroH2A sur l'ensemble du chromosome de la femelle.

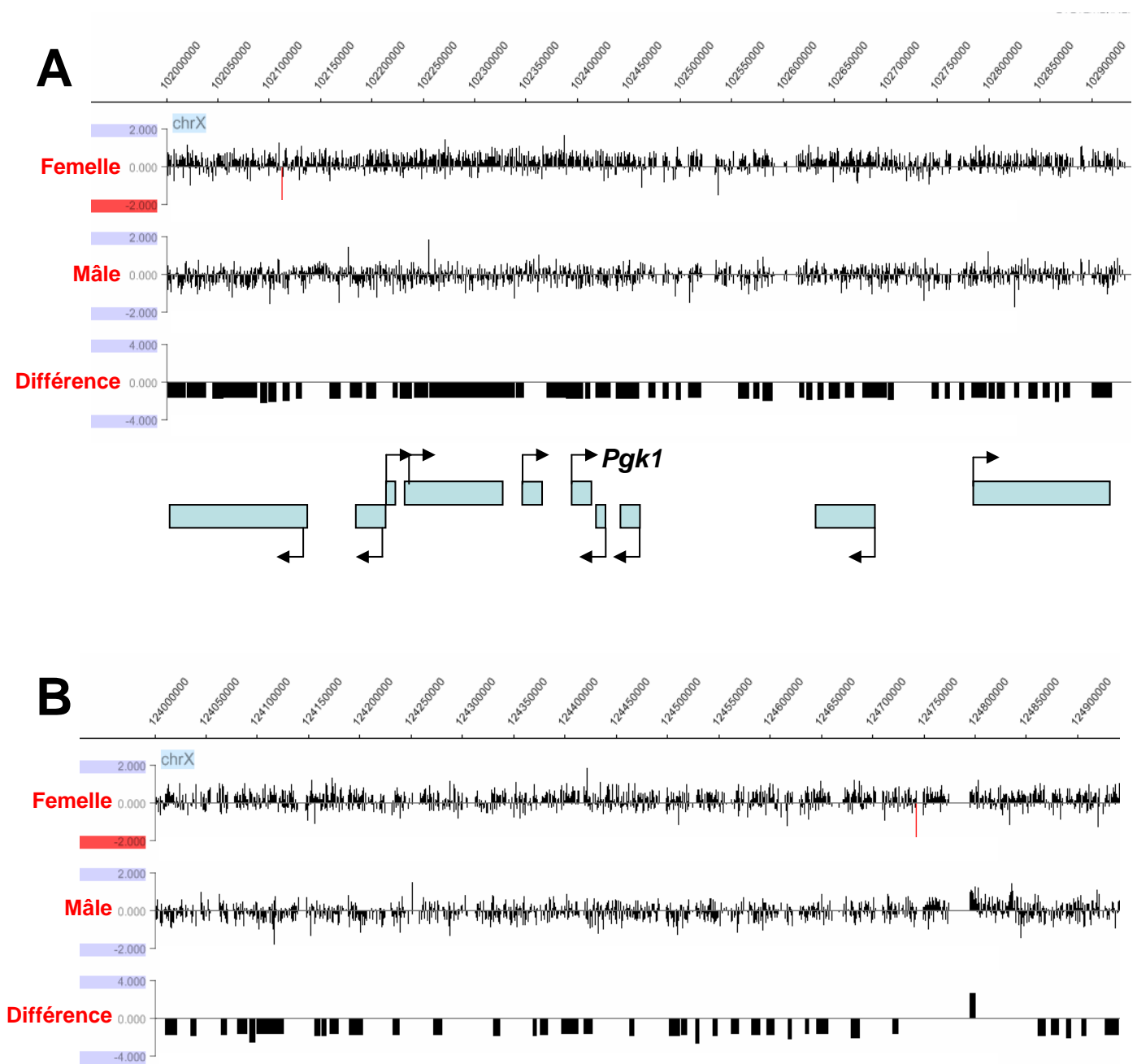


Figure 29 : L'enrichissement en macroH2A existe dans les régions riches en gènes et dans les zones intergéniques

Représentation des valeurs M , où $M = \log_2(\text{Bound}/\text{Input})$ dans une région riche en gènes, notamment *Pgk1*, (A : entre 102 et 102,9 Mbp), et dans une région pauvre en gènes du chromosome X (B : entre 124 et 124,9 Mbp). Les régions codantes des gènes sont indiquées sous forme de rectangles bleus, et le sens de transcription à l'aide d'une flèche.

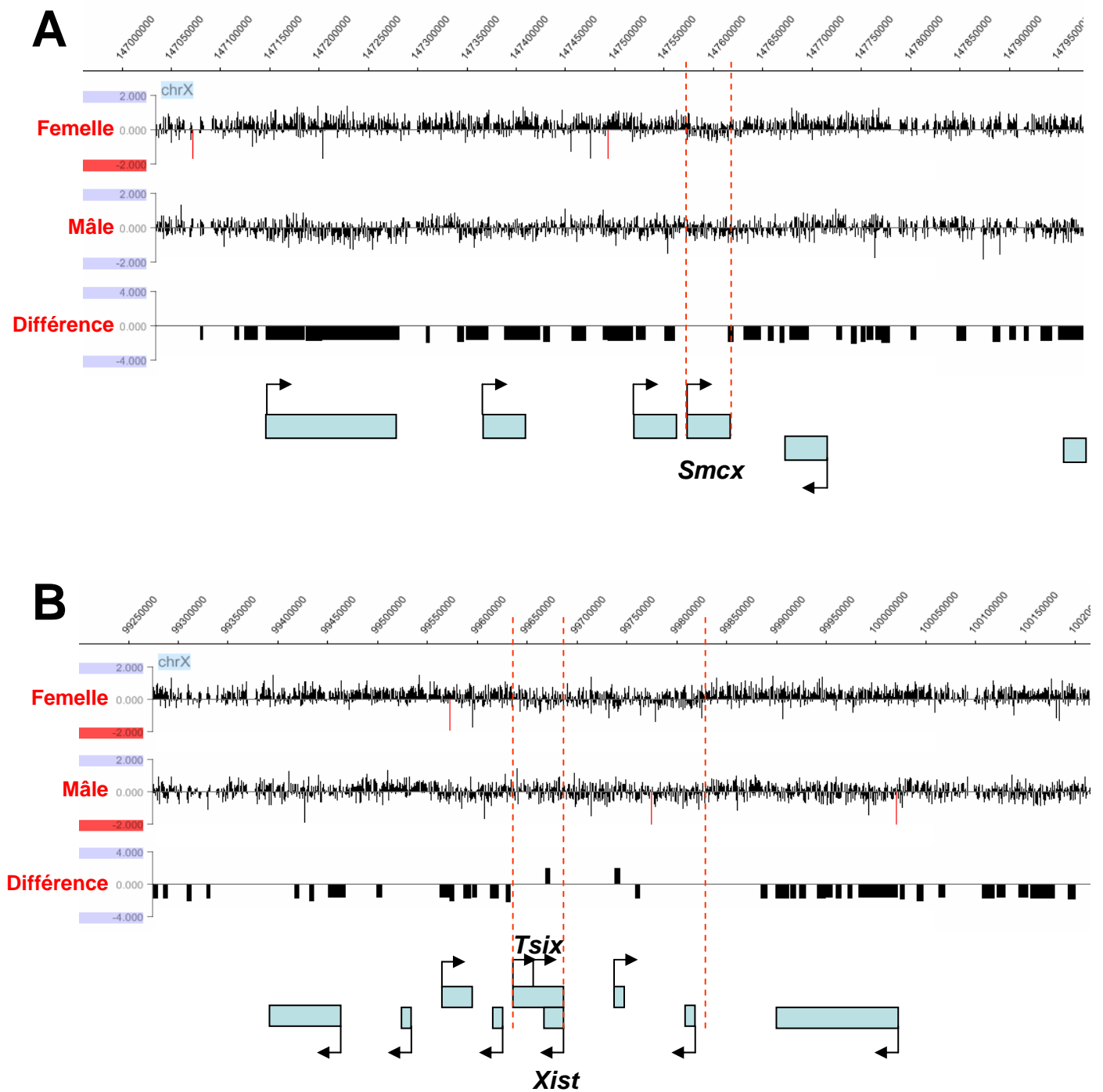


Figure 30 : Les gènes échappants sont appauvris en macroH2A

Au niveau de la séquence des gènes *Smcx* (A) et *Xist* (B), on observe une déplétion importante de macroH2A chez la femelle. Elle se poursuit en 3' sur environ 150 Kb dans le cas de *Xist*. Les régions codantes des gènes sont représentées sous forme de rectangles bleus, et le sens de transcription à l'aide d'une flèche. Leur emplacement sur le graphique est indiqué par l'intermédiaire de pointillés rouges.

Par contre, une déplétion importante en macroH2A est observable dans le cas du gène *Smcx*, comme on peut le voir en examinant les valeurs de M (Figure 30A). Le test statistique ne permet pas de mettre en évidence cette différence, car le gène est aussi sous-représenté en macroH2A chez le mâle. Le gène *Xist* est également retrouvé appauvri en macroH2A, bien que de façon moins prononcée que pour *Smcx*. Cette déplétion se poursuit en 3' du gène, sur une distance d'environ 150 Kb (Figure 30B).

Ces deux gènes qui échappent à l'inactivation sont donc retrouvés appauvris en macroH2A, ce qui contraste avec le reste du chromosome X.

5) MacroH2A et la maintenance du chromosome X inactif

L'absence de macroH2A affecte-t-elle la présence de marques spécifiques du chromosome X inactif? Pour répondre à cette question, nous avons développé une approche d'ARN interférence sur cellules HEK 293.

Après transfection par le duplexe siRNA, nous obtenons une élimination efficace de la protéine macroH2A par Western blot (Figure 31A). Par immunofluorescence, la détection d'un corpuscule de Barr est toujours possible, même en l'absence de macroH2A (Figure 31C). Le pourcentage de cellules présentant un ou plusieurs corpuscules de Barr est identique dans les cellules contrôles et traitées par le siRNA (Figure 31B).

De plus, dans les cellules où macroH2A est éliminée, le chromosome X inactif présente toujours certaines marques caractéristiques, telles que l'absence de l'ARN Polymérase II et de l'histone H4 acétylée, ou un enrichissement en H3K9me2 (Figure 31C). Ceci suggère que la suppression de macroH2A à elle seule n'est pas suffisante pour entraîner la décondensation et la réactivation du chromosome X inactif.

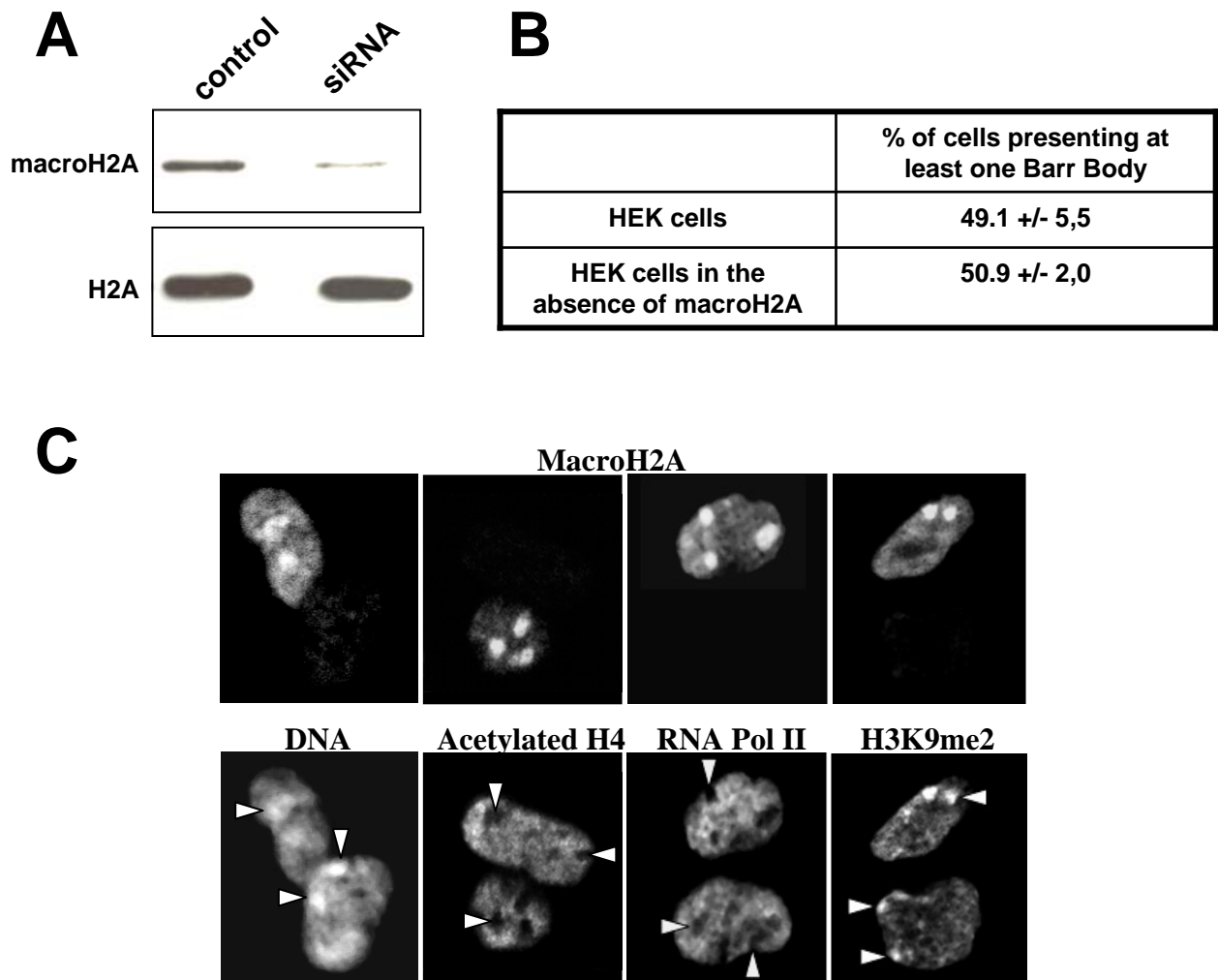


Figure 31 : L'élimination de macroH2A n'affecte pas la présence de marques spécifiques du chromosome X inactif

A) Le traitement d'ARN interférence induit une élimination efficace du taux de protéines macroH2A. Les cellules HEK 293 sont transfectées par le duplexe siRNA contrôle ou dirigé contre macroH2A, et un extrait cellulaire total est analysé par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'un Western Blot à l'aide des anticorps anti-mH2A et H2A.

B) Pourcentage de cellules HEK 293 contrôles ou traitées par siRNA présentant un ou plusieurs corpuscules de Barr. L'ADN est marqué au Hoechst et macroH2A est détecté par immunofluorescence. Les corpuscules de Barr sont comptés dans au moins 100 cellules contrôles (choisies au hasard) et 100 cellules montrant une élimination drastique de macroH2A.

C) Détection de marqueurs spécifiques du chromosome X inactif dans les cellules HEK 293 contrôles et traitées par siRNA contre macroH2A. La présence de l'histone H4 acétylée, de l'ARN Polymérase II et de la diméthylation de la lysine 9 de H3 est analysée par immunofluorescence et représentée en dessous du signal macroH2A dans les mêmes cellules. L'ADN est visualisé par le Hoechst. Chaque image représente deux cellules, dont une exprimant macroH2A et l'autre non. Les flèches blanches indiquent la localisation des corpuscules de Barr (pour simplifier, seulement certains d'entre eux sont mentionnés).

B. ROLE DE MACROH2A DANS LA REPARATION DES CASSURES DE L'ADN DEPENDANTE DE PARP

1) Présentation et résultats principaux

Nous avons souhaité étudier plus directement le rôle potentiel de macroH2A dans la réparation de l'ADN. J'ai donc conduit plusieurs expériences qui nous ont permis de démontrer que les nucléosomes macroH2A sont associés *in vivo* à l'enzyme PARP-1, via la région non histone.

L'élimination de macroH2A par une approche d'ARN interférence affecte la survie cellulaire après traitement par un agent oxydant. Un traitement simultané avec un inhibiteur spécifique de PARP-1 (3-AB) n'a pas de conséquence additionnelle sur la viabilité, ce qui suggère que macroH2A et PARP-1 sont impliquées dans la même voie de signalisation.

La PARP-1 associée au nucléosome variant est inactive, et le traitement par H₂O₂ va induire son relâchement et son activation. L'absence de macroH2A conduit à une sur-activation de PARP-1, ce qui compromet sévèrement la réparation de l'ADN suite aux dommages.

Enfin, des expériences de restauration avec des mutants de macroH2A résistants au siRNA, montrent que c'est la région non histone, et pas le domaine « H2A-like » du variant, qui est requis pour une réparation efficace de l'ADN.

2) Article en révision

L'ensemble de ce travail a été soumis pour publication. Il sera présenté page suivante.

“The histone variant macroH2A1 is involved in DNA oxidative damage repair through a PARP-1 mediated pathway”

The histone variant macroH2A1 is involved in DNA oxidative damage repair through a PARP-1 mediated pathway

Flore Mietton¹, Annie Molla¹, Khalid Ouararhni², Fabienne Hans¹, Françoise Dantzer³, Gilbert de Murcia³, Ali Hamiche^{2*} and Stefan Dimitrov^{1*}

¹CRI INSERM U823 Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble cedex 9, France

²Laboratoire Epigénétique et Cancer. CNRS FRE 2944, 07 rue Guy Moquet 94801 Villejuif, France.

³Département Intégrité du Génome de l'UMR 71175, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard S. Brant, BP 10413, F-67412, Illkirch Cedex, France

Corresponding authors: *Stefan Dimitrov; E-mail: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr

*Ali Hamiche; E-mail: hamiche@vjf.cnrs.fr

Key words: histone variant; mH2A1; DNA repair; PARP-1; siRNA rescue

Summary

In this work we describe a novel function of mH2A, namely its involvement in DNA oxidative damage repair. PARP-1 forms a complex with mH2A1 nucleosomes through interactions with its Non-Histone Region (NHR). The ablation of mH2A1 affects cell survival after oxidative damage, and this effect is abolished upon inhibition of PARP-1 enzymatic activity. The mH2A1 nucleosome associated PARP-1 is inactive and upon oxidative damage the enzyme is released from the mH2A1 nucleosome complex and activated. The knock down of mH2A1 results in PARP-1 over-activation, which, in turn, compromises DNA repair after oxidative damage. Rescue experiments with silent resistant mutants of mH2A1 provide evidence that the NHR, but not the H2A-like domain of mH2A1, is required for the efficient repair of DNA. These data show that the involvement of mH2A1 in the repair of DNA oxidative lesions is accomplished through a PARP-1 repair pathway.

Introduction

The repeating unit of chromatin, the nucleosome, consists of an octamer of conventional core histones (two each of H2A, H2B, H3 and H4) around which ~165 bp of DNA is wrapped as two superhelical turns (van Holde 1988). In addition to conventional core histones, eukaryotic cells express histone variants (van Holde 1988). Histone variants are non-allelic histone isoforms, which are found in very limited amounts in the cell compared to their conventional counterparts (van Holde 1988). Histone variants can substitute for the respective conventional histones and their incorporation into the nucleosome can affect both its structural and functional properties (Angelov, Molla et al. 2003; Gautier, Abbott et al. 2004). The available data suggest that histone variants are involved in numerous vital processes in the cell including regulation of gene expression, cell division, DNA repair, spermatogenesis, chromosome X inactivation and disease, but their specific role and their mechanism of function remain elusive (for review see (Sarma and Reinberg 2005)).

All conventional histones, except H4, possess histone variants. Histone H2A has the largest number of histone variants (Sarma and Reinberg 2005). The H2A histones, in contrast to the other core histones, have a non-structured C-terminus, which is distinct in both size and amino-acid composition (Sarma and Reinberg 2005).

Histone macroH2A (mH2A) is the most deviant histone variant identified to date. mH2A is about three times larger than the conventional H2A, and consists of a histone H2A-like domain (which shows ~ 65 % identity with conventional H2A) fused to a large Non-Histone Region (NHR) (Pehrson and Fried 1992). *In vitro* studies with reconstituted mH2A nucleosomes and nucleosomal arrays have suggested that mH2A is involved in the control of gene expression (Angelov, Molla et al. 2003; Doyen, An et al. 2006). These *in vitro* data were supported by recent *in vivo* experiments (Agelopoulos and Thanos 2006; Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). The repression of transcriptional activation of the interleukin-8 gene in B lymphocytes was associated with the presence of a precisely positioned mH2A nucleosome on its promoter, which blocked access of NF- κ B to its binding sequence (Agelopoulos and Thanos 2006). A crucial role of mH2A in the control of transcription of the inducible *Hsp70.1* and *Hsp70.2* genes was also described (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006).

Several reports have indicated that mH2A was associated with the assembly and maintenance of heterochromatin (Grigoryev, Nikitina et al. 2004; Ma, Jacobs et al. 2005). Immuno-fluorescence data suggested that the inactive X chromosome (Xi) was enriched in

mH2A (Costanzi and Pehrson 1998). Recently, by using a novel method for purification of mH2A chromatin, Pehrson and colleagues have demonstrated that mH2A was depleted from the transcribed regions of active genes in mouse liver (Changolkar and Pehrson 2006). Taken collectively, the literature suggests that mH2A was essential for inactive chromatin. No data suggesting other functional roles for this histone variant have been reported.

By using stable HeLa cell lines expressing epitope-tagged mH2A1.1 (e-mH2A1.1), we have recently demonstrated that nucleosomes containing e-mH2A1.1 were specifically associated with poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) in the cell nucleus (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). This association lead to immobilization of PARP-1, and *in vitro* experiments have shown that this resulted in down-regulation of its enzymatic activity (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006).

PARP-1 is a molecular sensor of DNA breaks and is intimately related to their repair (for recent review see (Schreiber, Dantzer et al. 2006)). PARP-1 uses NAD⁺ for the synthesis and attachment of poly(ADP-ribose) polymer (PAR) to its substrates, including histones, SSB repair proteins and PARP-1 itself. The poly(ADP)-ribosylation of histone H1 was shown to perturb the interaction of the linker histone with chromatin, which resulted in decondensation of the 30 nm chromatin fiber, and allowed repair complexes to assemble at the sites of damage (Poirier, de Murcia et al. 1982; Schreiber, Dantzer et al. 2006). The poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) hydrolyzes the glycosidic bond between the ADP-ribose units, and thus generates free ADP-ribose (Schreiber, Dantzer et al. 2006). The elimination of PAR creates conditions for condensation of the repaired chromatin fiber.

In cells oxidative stress can be induced by an increased level of hydrogen peroxide (H₂O₂), which could lead to cellular damage. The increased level of H₂O₂ generates single strand breaks (SSB) in DNA, either directly or indirectly (mainly by the cleavage of the oxidized guanine lesion, 8-oxoguanine (Cadet, Ravanat et al. 2006)).

In this work we present direct evidence that mH2A1 is required for DNA oxidative damage repair through a PARP-1 mediated pathway. mH2A1 knock down and rescue experiments with deletion and swapped-domain mH2A1-conventional H2A mutants show that the Non-Histone Region of mH2A is essential for the repair process.

Results

mH2A1 is involved in DNA oxidative damage repair

To study the potential involvement of mH2A1 in DNA repair, we used HeLa cells with mH2A1 levels ablated by siRNA. The suppression of the expression of mH2A1 was confirmed by a specially generated anti-mH2A1 antibody. It is noteworthy that the immunopurified antibody recognized a single band in HeLa cell extract with 42 kD molecular mass, corresponding to mH2A1 (Figure 1A). The transfection of HeLa cells with siRNA (the target sequence of which is within the NHR of mH2A1) resulted in a very efficient suppression of the expression of mH2A1. More than 80% of the endogenous mH2A1 protein was eliminated in the transfected cells compared to the control cells transfected with scrambled siRNA (Figures 1B&C and results not shown). The knocked down and control cells were then subjected to oxidative damage by treatment with 10 mM H₂O₂ for 5 minutes, and the cells allowed to recovering for the noted times ranging from 4 minutes to 1 hour (Figure 2A&B). The presence of SSB in the H₂O₂ treated cells was studied by a Comet assay under alkaline conditions. The cells subjected to the Comet assay showed the presence of a higher amount of residual SSB in the mH2A1 siRNA transfected cells relative to that of the control cells at corresponding time points (Figure 2A; compare, for example, the 4 and 16 minute time points for control and siRNA treated cells, respectively). The quantification of the Comet assay data exhibited a slower SSB repair kinetic in mH2A1 depleted cells. Indeed, the velocity of the disappearance of the tail DNA (the initial slope of the curve, Figure 2B) was about five-seven-fold slower in the mH2A1 depleted cells compared to the control cells. This shows that suppression of mH2A1 expression affected the SSB repair, providing evidence that mH2A1 was required for this process.

If mH2A1 was indeed required for DNA repair, one would expect the suppression of mH2A1 expression to also affect the viability of H₂O₂ treated cells. To test this idea, we treated both control and mH2A1 depleted cells with different concentrations of H₂O₂, and measured cell viability 24 hours post treatment. It is clear from the data (Figure 3) that the absence of mH2A1 interfered with cell survival. Indeed, upon H₂O₂ treatment the viability of the cells transfected with the mH2A1 siRNA was decreased compared to the control cells. For example, the treatment with 40 mM H₂O₂ reduced the survival of the mH2A1 depleted cells more than twice i.e. from about 50% in control cells to about 20% in the mH2A1-knocked down cells (Figure 3). These data are in agreement with the Comet assay results (Figure 2), and suggest a role for mH2A1 in DNA oxidative damage repair.

PARP-1 is associated *in vivo* with mH2A1 nucleosomes and in its absence, the inhibition of the activity of PARP-1 does not affect cell viability after oxidative damage

We provided evidence above for a positive regulation of DNA oxidative damage repair by mH2A1. How does mH2A1 perform this role? Our recent finding on the specific association of the exogenously expressed epitope-tagged mH2A1.1 with PARP-1 (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006) suggested that mH2A1 was involved in DNA repair through PARP-1. One should therefore also find association between endogenous, native mH2A1 and PARP-1. To test this we digested mouse liver nuclei with micrococcal nuclease for times appropriate to generate mostly mononucleosomes (Figure 4A). The nuclei were then lysed and the nucleosomes purified on sucrose gradients that contained 0.6 M NaCl (the presence of 0.6 M NaCl removes histone H1 and the other weakly bound proteins). This was followed by ChIP using the mH2A1 immunopurified antibody (Figure 4B). The input and the bound fractions were run on a 7.5-15% SDS page, transferred, and the blot cut into regions perpendicular to the direction of electrophoresis corresponding to different protein mass ranges of more than ~ 90 kD (first part of the blot), between ~60 and ~30 kD (second part of the blot) and below ~30 kD (third part of the blot). The first part of the blot was incubated with a monoclonal anti-PARP-1 antibody, while the second and the third parts were incubated with immunopurified polyclonal anti-mH2A1 and either with anti-histone H2A, or anti-histone H2B or anti-histone H4 antibodies, respectively (Figure 4B). This allowed the determination of the ratio between the intensities of the mH2A1 and the individual conventional histone H2A, H2B or H4 bands in the two fractions (which is a measure for the amount of mH2A1 present in these fractions) and the amount of PARP-1 associated with each fraction. As seen (Figure 4B), the intensities of the input and the bound mH2A1 bands from the nucleosome fractions were very similar, demonstrating an equivalent amount of mH2A1 in both samples. The picture is, however, completely different for the conventional histone bands. The intensity of H2A, H2B, and H4 bands were significantly less in the bound fraction compared to the input fraction (between 10 and 15 fold in the different experiments, Figure 4B and results not shown). Since the intensity of the conventional histone bands reflected the total amount of nucleosomes present in the different samples, this showed that the total amount of nucleosomes in the bound fraction was very small relative to that of the input (not exceeding 10% of the total amount of nucleosomes in the input fraction). Therefore, an impressive enrichment of mH2A1 nucleosomes was achieved by using our native ChIP procedure. Remarkably, the intensities of the PARP-1

bands for each one of the two samples were comparable, and proportional to the amount of mH2A1, but not to the amount of either H2A, H2B, or H4 present in the sample (Figure 4B). We conclude that PARP-1 was associated with the endogenous mH2A1 nucleosomes.

The siRNA knock down of mH2A1 significantly affected the repair efficiency of SSB (Figure 2). The finding that, *in vivo*, PARP-1 was bound to the mH2A1 nucleosomes, pointed to a PARP-1 associated function of mH2A1 in DNA repair. Consequently, one would expect that the ablation of mH2A1 and the simultaneous inhibition of the PARP-1 enzymatic activity would not additively affect the DNA repair, and, thus, the viability of the cells. We addressed this question by studying the survival of control and mH2A1 siRNA transfected cells in the presence or absence of 3-AB (a specific inhibitor of PARP-1 enzymatic activity) after treatment with H₂O₂. The presence of 3-AB decreases the efficiency of cell survival of the control (scramble siRNA) transfected cells at all H₂O₂ concentrations studied (Figure 4C). In contrast, the treatment of mH2A1 siRNA transfected cells with 3-AB has no additional effect on cell survival (Figure 4C), indicating that mH2A1 and PARP-1 were involved in the same repair pathway.

In the absence of mH2A1, the generation of DNA oxidative damage leads to an overactivation of PARP-1

Upon induction of DNA breaks, the recruitment of PARP-1 to the site of DNA damage is very rapid (within seconds, see (Okano, Lan et al. 2003)), and its catalytic activity is stimulated several hundred fold upon binding to DNA breaks (Schreiber, Dantzer et al. 2006). In addition to the poly(ADP-ribosylation) of the histones H1, H2B and other proteins at the site of damage, PARP-1 auto-ribosylates itself, and the presence of auto-ribosylated PARP-1 is a strong indication for activated PARP-1 (D'Amours, Desnoyers et al. 1999; Kraus and Lis 2003; Kim, Zhang et al. 2005). The data presented above on the survival of cells depleted of mH2A1 and simultaneously treated with 3-AB, showed that the lack of mH2A1 affected cell survival in a manner similar to the inhibition of the enzymatic activity of PARP-1 (Figure 4C). This suggested that not only *in vitro* (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), but also *in vivo* mH2A1 could regulate the activity of PARP-1. To test this idea we resolved identical aliquots of whole cell extracts, isolated from control and mH2A1 siRNA transfected cells (treated with 10mM H₂O₂ and allowed to recover for 4 minutes), on SDS-PAGE, transferred the protein, and probed with either anti-PARP-1 antibody (to detect the amount of bulk PARP-1 in the extract) or with anti-ADP-ribose antibody (this antibody detects the activated ADP-ribosylated forms of PARP-1 (Nakajima, Nagaso et al. 2004). The data (Figure 5A)

showed that the amount of activated PARP-1 in the mH2A1 siRNA transfected cells was much higher relative to control cells (compare the intensity of the ADP-ribosylated PARP-1 bands (upper panel) with the respective intensities of the bands corresponding to the bulk PARP-1 (lower panel)). These results were supported by the kinetics of auto-ADP-ribosylation of PARP-1, since at all recovery times following damage, the amount of auto-modified enzyme in the control cells was always much smaller than that of the mH2A1 siRNA transfected cells (Figure 5B upper panel, compare the intensities of the bands in the siRNA treated and control cells at the different time points). Interestingly, the bands corresponding to the auto-modified PARP-1 in the mH2A1 ablated cells were not only higher in intensity, but were also present for longer times (Figure 5B, see 35 minutes recovery and results not shown). Therefore, the siRNA knock down of mH2A1 led to a large increase in the amount of activated PARP-1 following oxidative damage, a finding that suggested that *in vivo* mH2A1 could be a negative regulator of the enzymatic activity of PARP-1.

Upon oxidative DNA damage, the recruitment of the activated PARP-1 to the sites of damage could be visualized in cultured cells by indirect immunofluorescence (IF) with anti-PAR antibodies. Well defined foci containing PAR were observed, which disappeared after DNA damage (Okano, Lan et al. 2003). The PAR foci were present after DNA damage in both control and mH2A1 depleted cells (Figure 5C), but the number of cells presenting such foci decreased more slowly in the mH2A1 knocked down cells (Figures 5C&D). We attributed this effect to the presence of higher amounts of activated PARP-1 at the sites of DNA oxidative damage in these cells.

Treatment of cells with H₂O₂ resulted in the release of PARP-1 from mH2A1 chromatin

How was PARP-1 activated during H₂O₂ induced oxidative damage? Our earlier data (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006) as well as the data presented in Figure 4B clearly showed that PARP-1 was associated with mH2A1 nucleosomes within the nucleus. This downregulated the enzymatic activity of PARP-1, since an activation of the enzyme was observed upon release of PARP-1 from the mH2A1 nucleosomes (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). Taken together, these data suggested that upon H₂O₂ treatment, PARP-1 could dissociate from the mH2A1 chromatin, which in turn could lead to its activation. We have studied this possibility by using a HeLa cell line stably expressing epitope-tagged mH2A1.1 (double HA and FLAG peptides were fused to the N-terminus of mH2A1.1, (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006)). These cells were treated with H₂O₂, and epitope-tagged mH2A1.1 (e-mH2A1.1) nucleosome complexes were purified from treated and control cells by a double

immunoaffinity procedure (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). In agreement with our earlier observations (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), we identified numerous polypeptides by mass spectrometry, including H3, H4, H2A, H2B, mH2A1.1, Ku 80, Ku 70, Hsp70, HDAC1, the two subtypes of H1 (H1.1 and H1.2), Hp1 α , Hp1 β and poly(ADP-ribose) polymerase I (PARP-1) within the e-mH2A1.1 nucleosome complex. Remarkably, the amount of the different proteins associated with the e-mH2A1.1 nucleosome complexes from the treated and control cells were very similar, with the exception of PARP-1 (Figure 6 A&B). No PARP-1 was found associated (both by mass spectrometric analysis and Western blot) with e-mH2A1.1 nucleosomes isolated from H₂O₂ treated cells (Figure 6 A&B; the band in the protein pattern of the e-mH2A1.1 complex of the H₂O₂ treated cells that exhibited a mobility close to that of PARP-1, was identified by mass spectroscopy to be importin, and not PARP-1; see Figure 6A). We conclude that the treatment of cells with H₂O₂ released PARP-1 from mH2A1 chromatin. The release of PARP-1 from mH2A1 chromatin was induced specifically by the treatment of the cells with H₂O₂, since cell treatment with the DNA alkylating agent MMS or doxorubicin did not lead to such an effect (Figure 6C&D). Indeed, as judged by SDS PAGE and Western blotting of the mH2A1.1 nucleosome complexes isolated from either the MMS or the doxorubicin treated cells, no dissociation of PARP-1 was observed, in contrast to H₂O₂ treated cells (Figure 6C&D). The H₂O₂ induced dissociation of PARP-1 did not reflect a direct effect of H₂O₂ on the mH2A1.1 nucleosome complexes, since treatment of isolated mH2A.1 nucleosome complexes with any of the damaging agents did not result in detectable perturbations in the interactions between the partners of the complexes and subsequent release of PARP-1 (Figure 6 E&F).

The NHR, but not the H2A-like domain of mH2A1, is required for DNA oxidative damage repair

PARP-1 was found to be specifically associated with mH2A1 nucleosomes (Figure 4B and (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006)). Since the most striking difference between the conventional and the mH2A1 nucleosomes is the presence of NHR (which appeared to be localized outside of the nucleosome in the vicinity of the dyad (Angelov, Molla et al. 2003)), it seems reasonable to suggest that the specific association of PARP-1 with mH2A is achieved via the NHR. To test this idea we carried out GST pull down experiments (Figure 7). Briefly, we produced and purified to homogeneity recombinant GST-mH2A1.2, GST-H2A-like and GST-NHR fusions. The glutathione-Sepharose immobilized GST-fusions and GST alone were incubated in a solution of PARP-1, pelleted and the amount of associated PARP-1 was

determined by Western blotting using anti-PARP-1 antibody. PARP-1 was found to be associated with GST-mH2A1.2 and GST-NHR, but not with either GST or GST-H2A-like (figure 7C). We conclude that PARP-1 interacted with the NHR domain of mH2A1, in agreement with our earlier studies (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). This suggested that the NHR of mH2A1 was required for DNA repair. To explore this possibility, we performed a series of DNA repair rescue experiments by using the “pseudogenetics” approach recently developed in our laboratory, and through distinct deletion and swapped-domain mutants of mH2A1 and conventional H2A (Scrittore, Skoufias et al. 2005). This approach consisted of suppression of the expression of the endogenous protein of interest by siRNA and its replacement by an ectopically expressed intact or mutant one, where ectopic expression was not ablated by the siRNA treatment (silent resistant (sr) mutant). This is achieved by taking advantage of the degenerate genetic code, and making point mutations in the nucleotide sequence in the exogenous protein, which do not affect its amino acid sequence (Scrittore, Skoufias et al. 2005). Briefly, we made expression vectors containing the siRNA silenced resistant HA-tagged versions of either mH2A1.2 or H2A-NHR (a fusion of conventional H2A and the NHR of mH2A1.2) (Figure 7A). Each of these vectors as well as a HA-H2A-like expression vector were co-transfected in HeLa cells with mH2A1 siRNA. This allowed the knock down of the endogenous mH2A1 and expression of the respective mutant, allowing the study of the role of each mutant in DNA repair in cells containing negligible amount of the endogenous protein. After treatment with H₂O₂, cells were allowed to recover for the times indicated and immediately fixed. Cells were stained with both anti-PAR (for detection of the PAR foci) and anti-HA antibodies (for detection of the cells expressing the silent resistant protein). The number of cells at each time point, simultaneously positive for both HA- and PAR-foci, were counted, normalized to all HA-positive cells, and presented into the form of histograms (Figure 7B). As is clear from the figure, the percentage of the mH2A1 knocked down cells expressing the silent resistant srmH2A1.2 and exhibiting PAR-foci, is comparable to that of the control cells (transfected with scrambled siRNA), and markedly different from the mH2A1 knocked down cells (transfected with mH2A1 siRNA) at all time points studied (see the upper panel of Figure 7B). Remarkably, the same effect was observed in cells expressing the fusion srH2A-NHR (bottom panel of Figure 7B). Since the presence of PAR-foci was associated with continued DNA oxidative damage repair, this suggested that the ectopic expression of either mH2A1.2 or H2A-NHR was sufficient to rescue the repair of the damage generated by H₂O₂ treatment. A very different picture was, however, observed in the case of transfection with the H2A-like mutant protein (the expression of this mutant is not

affected by siRNA transfection since the siRNA target is localized in the NHR sequence of mH2A1, see Experimental Procedures section). In this case no rescue was evident (Figure 7B). We conclude that the NHR of mH2A1 is required for efficient DNA oxidative repair.

Discussion

The histone variant mH2A was found to be enriched in the inactive X chromosome (Costanzi and Pehrson 1998; Mermoud, Costanzi et al. 1999; Chadwick and Willard 2001; Costanzi and Pehrson 2001). This finding, as well as the *in vitro* data using reconstituted nucleosomes with mH2A1 (Angelov, Molla et al. 2003; Doyen, An et al. 2006), suggested that this histone variant was linked to transcriptional regulation. In this work we demonstrated a novel function of mH2A1, namely its direct involvement in DNA oxidative damage repair. The repair of oxidative DNA damage was compromised in cells with siRNA suppressed expression of mH2A1, and the survival of these cells after the damage was also affected. Rescue experiments with siRNA silenced resistant full length mH2A1.2, H2A-NHR (the fusion of conventional H2A with the NHR of mH2A1.2) and H2A-like, showed that the NHR of mH2A1 was required for efficient DNA repair. To decipher the mechanism of involvement of mH2A1 in DNA repair we have analyzed the partners associated with mH2A1 nucleosomes *in vivo* by CHIP. In agreement with our earlier data (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), we found that PARP-1 is associated with mH2A.1 nucleosomes, and *in vitro* experiments showed that the mH2A1 NHR specifically interacted with PARP-1. The knock down of mH2A1 by siRNA resulted in the release of the mH2A1 associated PARP-1, and in its over-activation in cells treated with the DNA oxidative damaging agent H₂O₂. Importantly, no release of PARP-1 was detected when the cells were treated with either of the DNA alkylating agents MMS or doxorubicin. These data showed that mH2A1 was involved in DNA oxidative damage repair and that this involvement was realized through the PARP-1 mediated pathway.

It should be noted that when mH2A1-knocked down cells were treated with doxorubicin, their survival was more severely affected than that of doxorubicin treated control cells (Supplemental figure 1A). Under the conditions used, doxorubicin induced damage in the DNA of both control and mH2A1-knocked down cells (as shown by the phosphorylation of H2A.X, Supplemental figure 1C). This is accompanied, however, by a very weak

activation of PARP-1 (Supplemental figure 1B). This is not surprising since doxorubicin is inducing mainly double strand breaks in DNA, which appeared not to be “sensed” by PARP-1 (Schreiber, Dantzer et al. 2006). These data suggested that the effect of doxorubicin on the survival of the mH2A1-knocked down cells was not linked to PARP-1, but may instead reflect an involvement of mH2A1 in some PARP-1-independent apoptotic events.

Since mH2A is associated with the control of transcription, a possibility exists that the involvement of mH2A1 in DNA oxidative damage repair described here could be an indirect effect related to the function of mH2A1 in transcriptional regulation. However, we note that the transcription of genes related to DNA repair were not found to be affected in mH2A1 knockout mice (McKeown, Changolkar et al. 2006) and no mH2A1 was found localized on the regulatory regions of DNA repair genes (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), which rule out the above mentioned possibility.

How does mH2A1 function in DNA oxidative damage repair? We propose the following model: we have shown that the interaction of PARP-1 with mH2A1 nucleosomes through the NHR of mH2A1 resulted in immobilization of the enzyme and downregulation of its catalytic activity (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006) and this manuscript). Upon induction of oxidative damage, perturbations in the mH2A1-PARP-1 interactions are induced and the release of PARP-1 from the mH2A1 nucleosome complex takes place. The released PARP-1 is then recruited to the sites of damage, where it is activated. The recruited PARP-1 organizes the repair of the damage by signaling the damage through poly(ADP-ribosylation) of some of the proteins involved in the repair, and also local decondensation of the 30 nm chromatin fiber. Once the repair is completed, the PAR, which is synthesized and attached to the proteins, is degraded by PARG. PARP-1 is then recruited to the mH2A1 nucleosomes, and its enzymatic activity is again down regulated. In the absence of mH2A1, no efficient down regulation of the PARP-1 activity can be achieved, and active PARP-1 would remain present, which, in turn, would allow the persistence of a high levels of poly(ADP-ribosylation) at the site of damage. The presence of PAR at levels above that required for proper repair, could interfere with its removal by the available PARG. This could result in the accumulation of long lived PAR foci in the damaged cells, exactly as we observed. In other words, the lack of mH2A1 in the cell would deregulate the very sophisticated mechanism of repair achieved by the concerted action of PARP-1 and PARG. Therefore, the role of mH2A1 as a negative regulator of the PARP-1 enzymatic activity is suggested to be crucial for repair efficiency.

In order for PARP-1 to be released from the mH2A1 nucleosomes, their interaction must be perturbed in the oxidative damaged cell. How does the cell achieve this? This is not

currently clear. Our earlier data, however, showed that a conformational change in the NHR of mH2A1 was sufficient to release PARP-1 from the mH2A1 nucleosomes and to activate it (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). In addition, neither the amount nor the integrity of mH2A1 was affected in the damaged cells (this manuscript and unpublished data). Moreover, H₂O₂ treatment of isolated mH2A1.1 nucleosome complexes did not result in detectable alterations in the interactions between the partners of the complexes and subsequent release of PARP-1, suggesting that H₂O₂ by itself does not affect the stability of the mH2A1.1 nucleosome complex. With all this in mind, we hypothesize that upon oxidative damage of cells in culture the NHR of mH2A1 could be rapidly enzymatically modified, which in turn would result in conformational changes and subsequent release of PARP-1 from mH2A1 chromatin. Alternatively, a subtle H₂O₂-induced change in DNA/chromatin topology could be “sensed” by mH2A1 in the nucleosomes, which could lead to a conformational change that disrupted the complex. Currently we are not able to find modifications in the NHR of mH2A1 upon oxidative stress, and suggest that such modifications may be transient and thus very difficult to be detected.

This work demonstrated a direct link between mH2A1 and PARP-1 *in vivo*. PARP-1 is a multifunctional enzyme, which in addition to DNA repair and transcriptional regulation, is involved in several physiological processes, including cell division, DNA integrity, the balance between cell life versus death under physiopathological conditions, etc. (Kim, Zhang et al. 2005; Schreiber, Dantzer et al. 2006). The direct link between mH2A1 and PARP-1 is also suggestive of an involvement of mH2A1 in these vital cellular processes. These open questions remain a challenge for future studies.

Acknowledgements

We thank Sylvie Sauvaigo for help and advices in the Comet assay experiments and Dimitar Angelov for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from INSERM, CNRS, La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée La Ligue, S.D.), Association pour la Recherche sur le Cancer (to A.H.), Agence Nationale de la Recherche (Project #NT05-1_41978) and ACI Interface Physique-Chimie-Biologie (DRAB, Project #04 2 136). F.M. and K.O. acknowledge the Association pour la Recherche sur le Cancer for financial support.

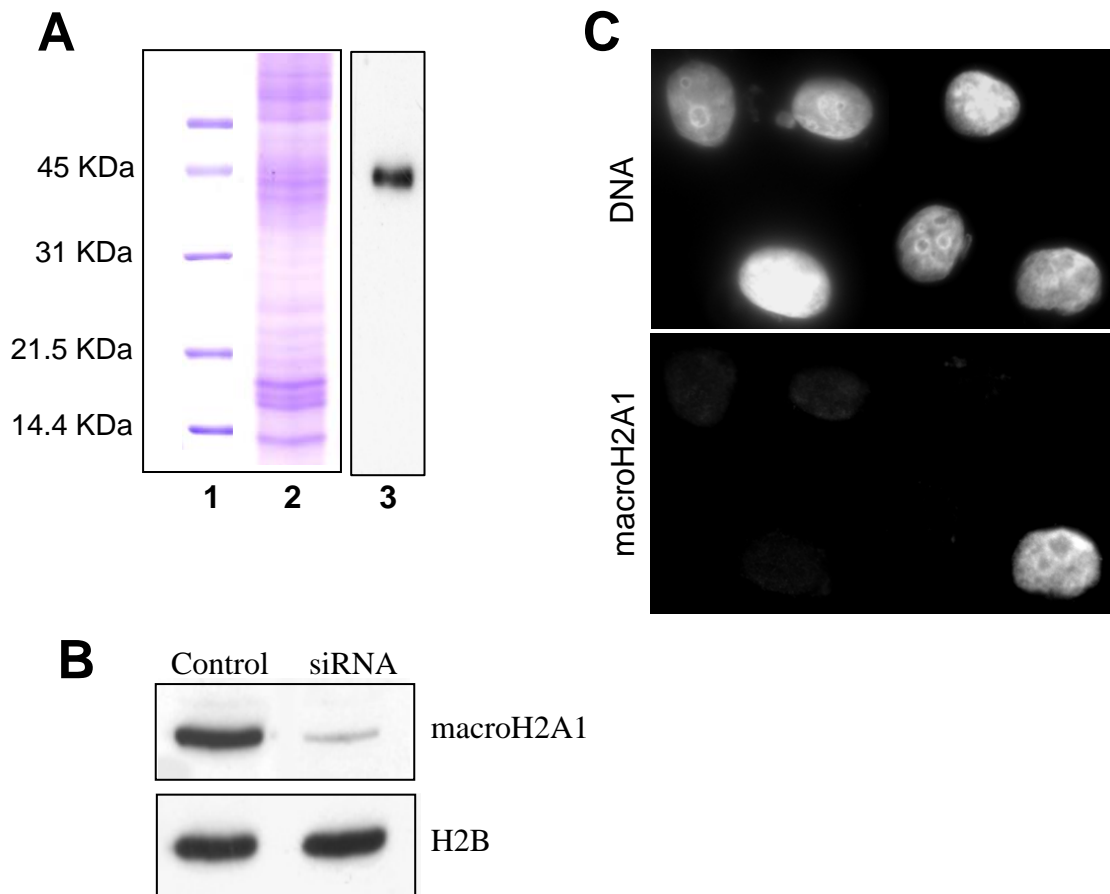


Figure 1. Efficient suppression of the expression of mH2A1 by RNA interference.

(A) The immunopurified anti-mH2A1 antibody recognizes a single band with a molecular mass of ~42 kD. Identical amounts of total HeLa cell extract were loaded on two different wells and the proteins separated on a 12% SDS polyacrylamide gel. Once the electrophoresis was completed, the gel was cut in two. The first part was used for Coomassie staining (lane 2), while the other one was used for Western blotting (lane 3). The blot was visualised with the immunopurified anti-mH2A1 anti-body. Lane 1, protein molecular weight markers. (B) Expression of mH2A1 is efficiently suppressed by treatment of HeLa cells with siRNA against mH2A1. Total cell extracts prepared from both control and siRNA transfected cells were separated on 12% SDS-PAGE and blotted. The blot was first probed with anti-mH2A1 and then with an anti-H2A antibody as a control for equal protein loading. Note the strong decrease of the mH2A1 amount in the siRNA treated cells. (C) Immunofluorescence detection of the ablation of mH2A1 expression by siRNA. siRNA treated HeLa cells were fixed and immunostained with immunopurified anti-mH2A1 antibody (lower panel). The upper panel shows the DAPI stained cells.

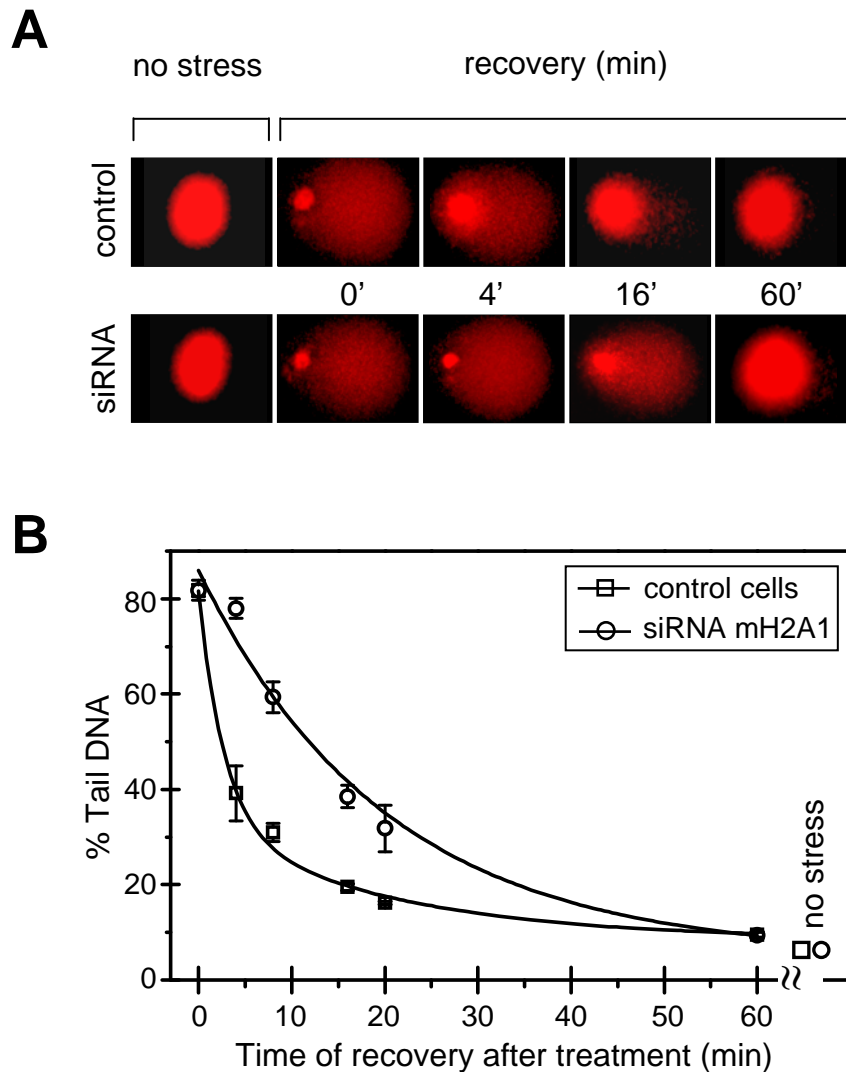


Figure 2. Presence of mH2A1 is essential for the repair of DNA damage induced by H₂O₂ treatment.

(A) Visualization of the recovery of DNA damage by alkaline Comet assay in control and siRNA treated HeLa cells. Control (transfected with scrambled siRNA) cells and cells transfected with siRNA against mH2A1 were treated with 10 mM H₂O₂ for 5 minutes at 4°C (under these conditions, the cell viability was not significantly affected, see figure 3). The cells were then allowed to recover for the indicated times, and subjected to alkaline Comet assay. The photomicrographs show representative images of the nuclei after completion of the Comet assay. (D) Quantification of the Comet assay data. Values represent means and standard deviations for 300 cells from 3 independent experiments.

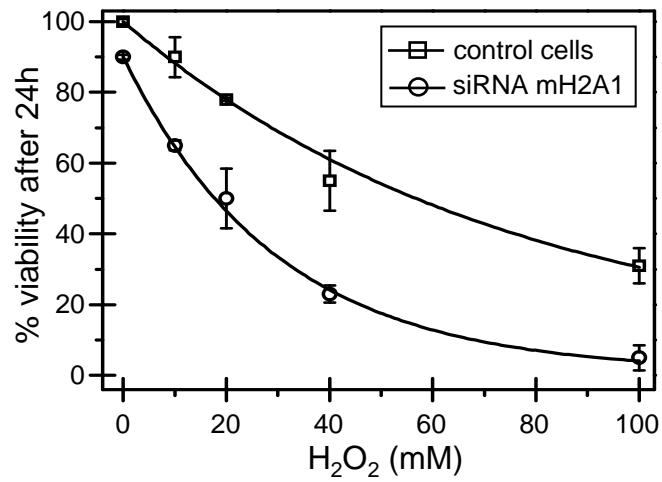


Figure 3. Involvement of mH2A1 in cell survival after oxidative stress.

Control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells were treated for 5 minutes with H₂O₂ at the indicated concentrations. The percentage cell survival was measured 24 hours after the H₂O₂ treatment. The means of 3 different experiments are shown.

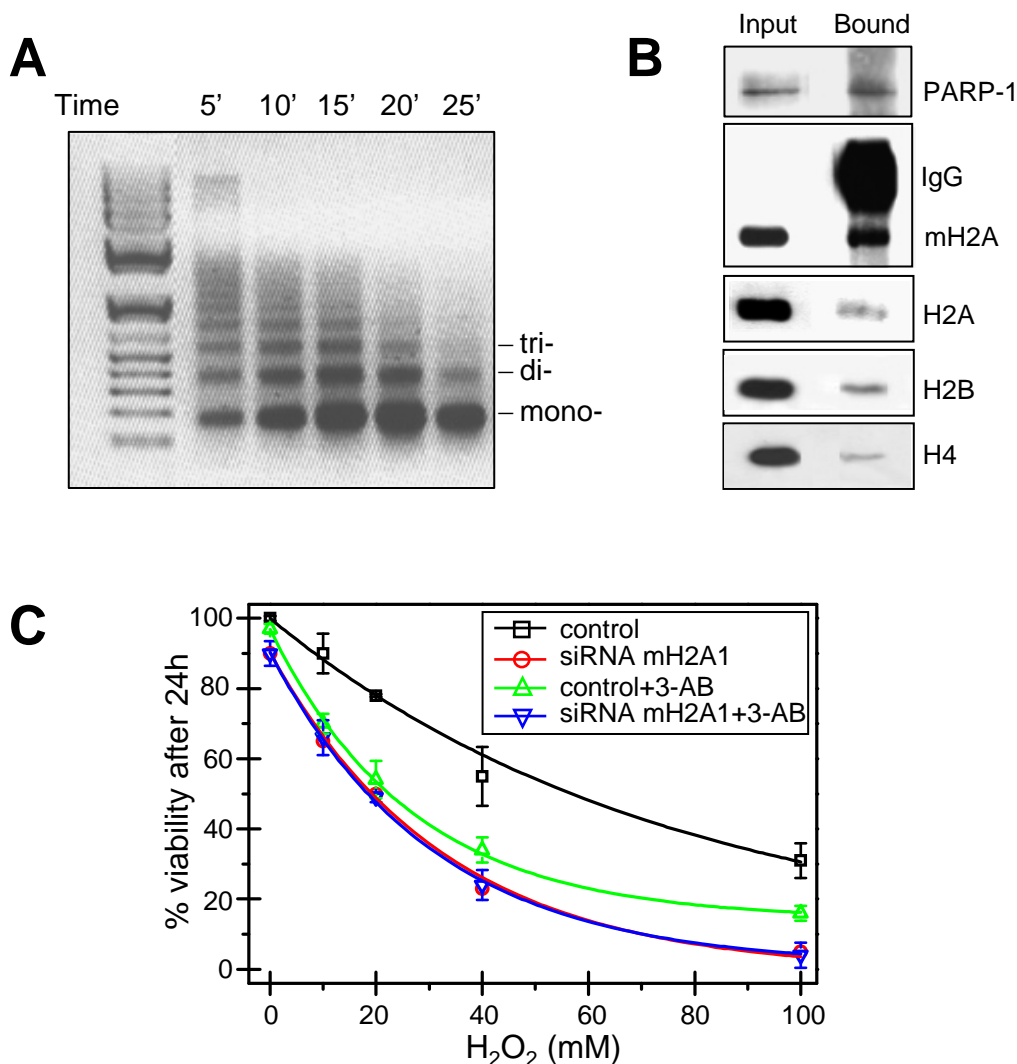


Figure 4. mH2A1 participates in cell survival through PARP-1.

(A) Kinetics of micrococcal nuclease digestion. HeLa cell nuclei were digested with micrococcal nuclease at the times indicated, DNA was isolated and run on a 1% agarose gel. The positions of mono, di- and tri-nucleosomal DNA are indicated. The DNA ladder is "1 Kb Plus" from InVitrogen. The nuclei digested 25 minutes with micrococcal nuclease were used for nucleosome preparation. (B) PARP-1 is preferentially associated with mH2A1 nucleosomes. Mononucleosomes were purified on a sucrose gradient and subjected to ChIP by using anti-mH2A1 antibody. Proteins from the input and immunoprecipitated mononucleosomes were separated on 7-15% gradient PAGE containing SDS and blotted. The blots were probed with either anti-PARP-1 antibody (first row) or with anti-mH2A1 antibody (second row) or with antibodies against conventional histones H2A, H2B and H4 (third-fifth row, respectively). (C) Inhibition of PARP-1 activity abolished the effect of mH2A1 on cell survival. Control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells were treated with H₂O₂ at the indicated concentrations in the presence or absence of the PARP-1 inhibitor 3-AB. Cell survival was measured 24 hours after the treatment with H₂O₂. The means of two different experiments are shown.

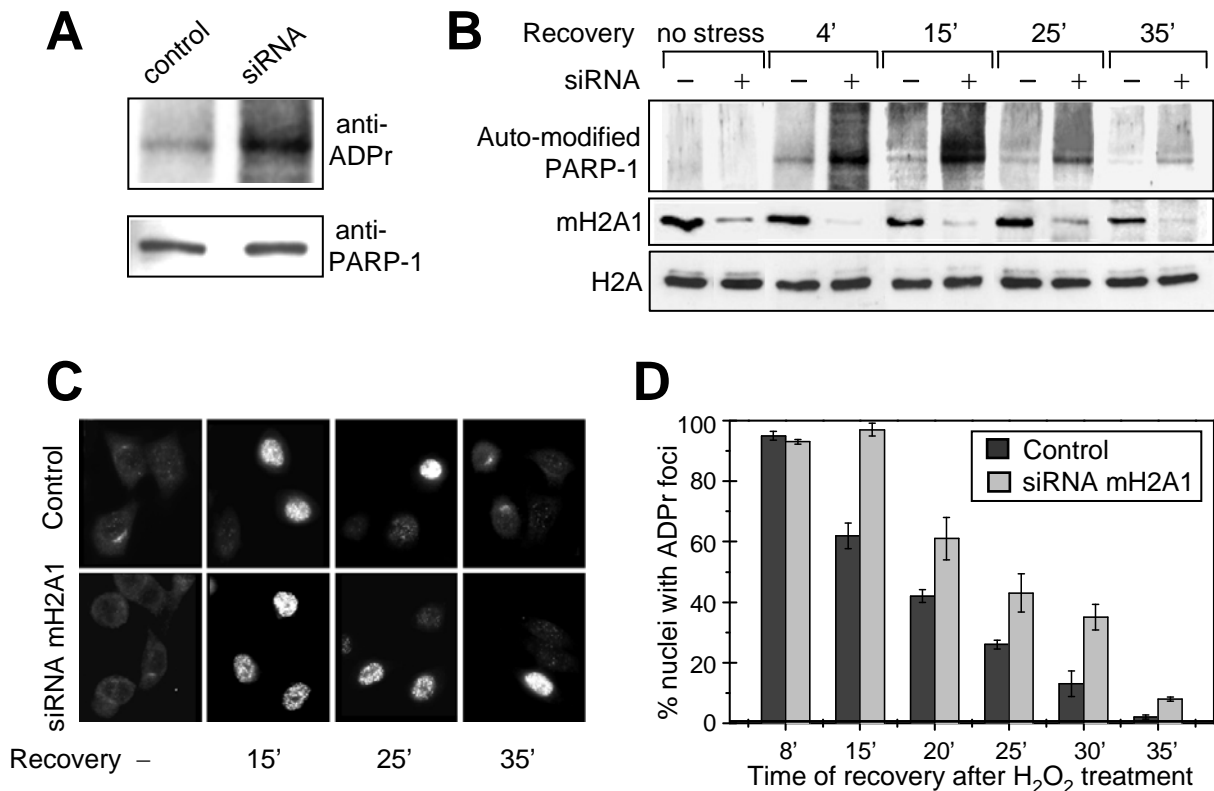


Figure 5. The removal of nuclear poly-ADP ribose foci induced after oxidative DNA damage is dependent on the presence of mH2A1.

(A) The absence of mH2A1 after oxidative DNA damage affects the auto-ribosylation status of PARP-1, but not its expression. Identical amounts (in duplicate) of HeLa cell extracts from control and mH2A1 siRNA transfected cells (treated for 5 minutes with 10 mM of H₂O₂ and allowed to recover for 4 minutes) were run on 10% SDS-PAGE and, after completion of the electrophoresis, were transferred to nitrocellulose membrane. The blot was cut in two, and one half probed with anti-PARP-1 antibody, and the other half probed with anti-poly(ADP-ribose) antibody. Note the equal intensity of the bands detected with the anti-PARP1 antibody in both types of cells and the higher intensity of the band revealed with the anti-poly(ADP-ribose) antibody in the mH2A1 transfected cells compared to the respective band in the control cells. (B) Kinetics of PARP-1 auto-ADP-ribosylation after oxidative DNA damage in control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells. Cells were treated with H₂O₂ as in (A) and after recovery for the indicated times, were lysed and the same amounts of cell extract were run on 7-15% gradient SDS polyacrylamide gels. The upper part of the blot (containing the high molecular mass proteins) was probed with anti-poly(ADP-ribose) antibody, and the middle and the lower part were probed with anti-macroH2A1 and anti-H2A antibodies, respectively. Note that for all time points the anti-poly(ADP-ribose) antibody showed a more intense band in the mH2A1 siRNA treated cells. (C) Control and mH2A1 siRNA transfected cells were treated with 10 mM H₂O₂, allowed to recover for the indicated times and then fixed and immunostained with anti-poly(ADP-ribose) antibody for analysis by indirect immunofluorescence. (D) Quantification of the data presented in (C). The means of two independent experiments are presented. For each time point no less than 100 cells were analyzed.

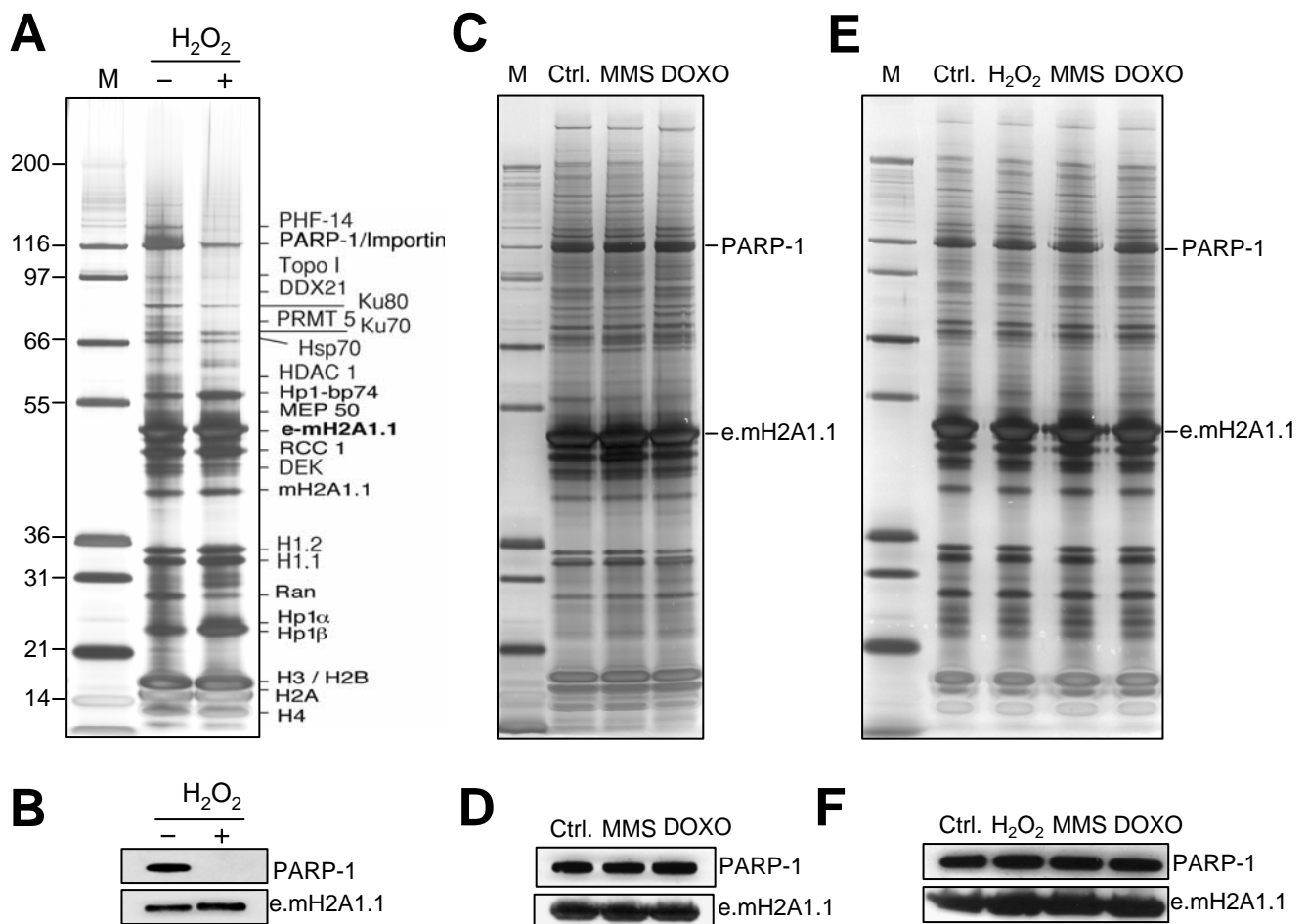


Figure 6. PARP-1 is released from the e-mH2A1.1 nucleosome complex in stable HeLa cell line upon H₂O₂, but not upon MMS or doxorubicin treatment.

(A) Silver staining of e-mH2A1.1 nucleosome complex isolated from either control (-) or H₂O₂ (+) treated HeLa cells stably expressing e-mH2A1.1. The proteins identified by mass spectrometry are indicated. Lane M, molecular weight markers. (B) Western blot of e-mH2A1.1 nucleosome complexes isolated from control (-) and H₂O₂ (+) treated e-mH2A1.1 stable HeLa cell lines. The blot was first probed with anti-PARP-1 antibody and then, to visualize e-mH2A1.1, it was probed with anti-HA antibody. Note that no PARP-1 was found in the e-mH2A1.1 nucleosome complexes isolated from the H₂O₂ treated cells. (C) MMS or doxorubicin treatment of stable HeLa cell lines expressing e-mH2A1.1 did not result in a release of PARP-1 from the e-mH2A1.1 nucleosome complex. e-mH2A1.1 nucleosome complexes were purified from either control (-), or MMS or doxorubicin treated stable HeLa cell lines expressing e-mH2A1.1. Note that the complex is only partially purified by the one step immunopurification procedure, which is the reason for the presence of numerous protein bands. (D) Western blot of e-mH2A1.1 nucleosome complexes isolated from either control (-) or MMS or doxorubicin treated e-mH2A1.1 stable HeLa cell lines. The experiments were carried out as described in (B). (E) H₂O₂ treatment of isolated e-mH2A1.1 nucleosome complexes did not lead to dissociation of PARP-1 from the nucleosome complexes. e-mH2A1.1 nucleosome complexes (isolated by a single immunopurification step as described in (C) from stable HeLa cell lines expressing e-mH2A1.1) were either non-treated (-) or treated with either H₂O₂, MMS or doxorubicin and were separated on SDS PAGE. The gel was silver stained. (F) Western blot analysis of e-mH2A1.1 nucleosome complexes treated with H₂O₂, MMS and doxorubicin. e-mH2A1.1 nucleosome complexes were isolated from HeLa cells and then treated with either H₂O₂ or MMS or doxorubicin as in (E). The experiments were carried out as described in (B).

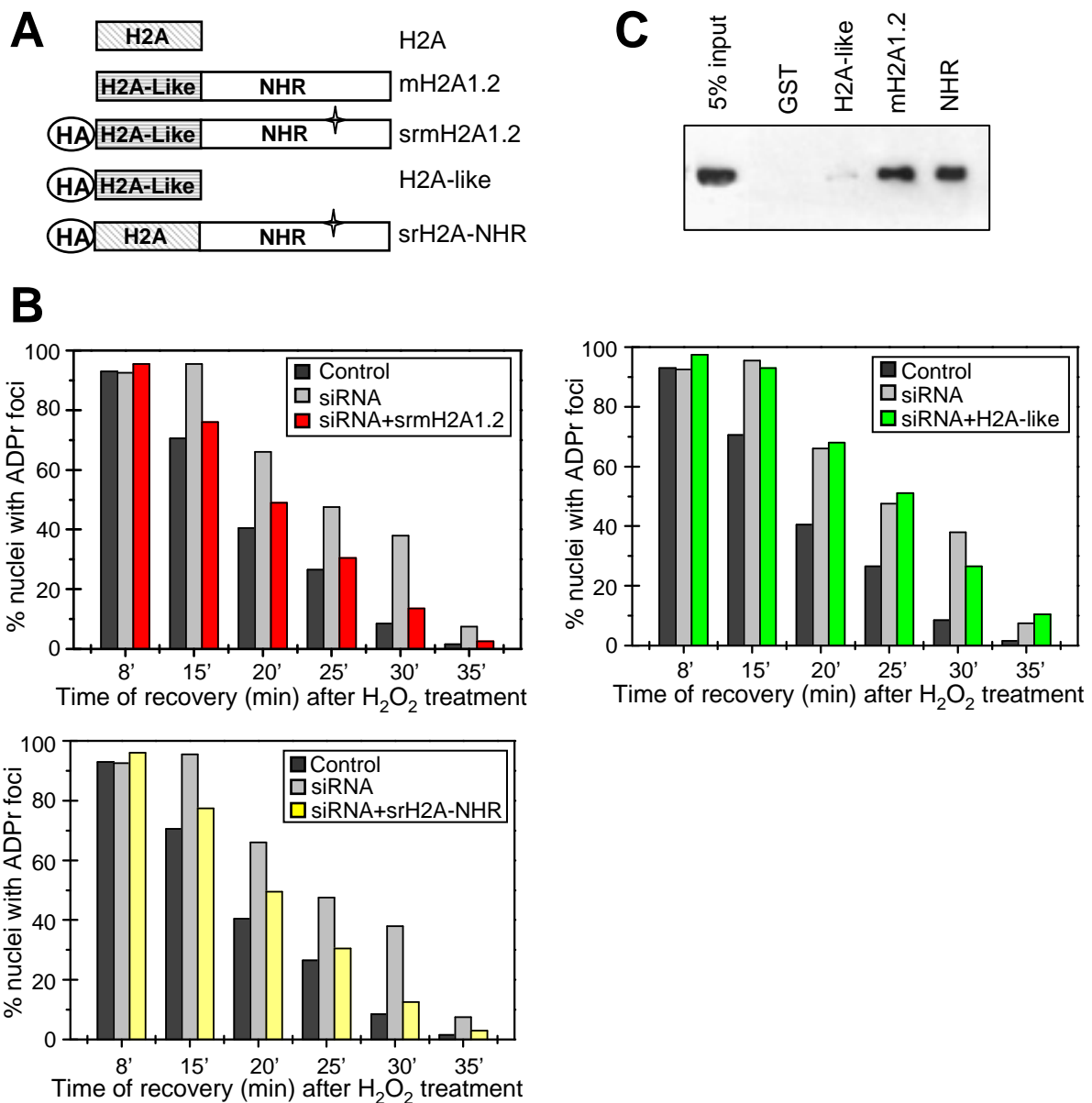
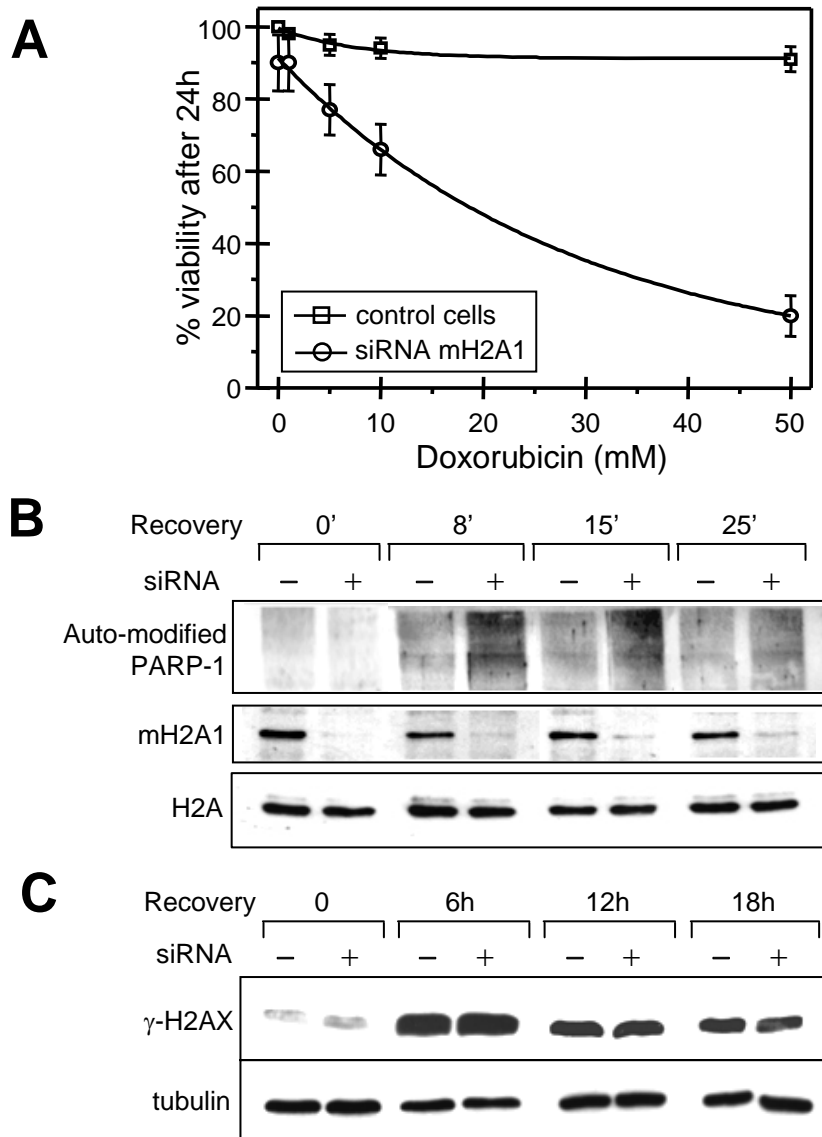


Figure 7. The NHR, but not the H2A-like domain of mH2A, is required for DNA repair.

(A) Schematics of the siRNA mH2A1 silent resistant constructs used for transfection; srmH2A1.2, siRNA silent resistant full length mH2A1.2; H2A-like, siRNA silent resistant HA-tagged H2A-like domain of mH2A1.2; srH2A-NHR, siRNA silent resistant HA-tagged fusion of conventional H2A and the NHR of mH2A1.2. The asterisks indicate that mutations in the respective mRNA introduced to make them resistant to the mH2A1 siRNA. (B) siRNA treated HeLa cells were transfected with either srmH2A1.2 or H2A-like or srH2A-NHR. The cells were subjected to H₂O₂ treatment as described in figure 4 and allowed to recover for the indicated times. Then they were immediately fixed and stained with both monoclonal anti-poly(ADP-ribose) and anti-HA antibody. Cells stained with both antibodies (containing ADP-ribose foci and expressing the respective fusion protein) were counted and the ratio of these cells relative to the total amount of cells positive for HA-antibody (expressing the respective fusion) presented in the form of histograms. The means of two different experiments are shown. (C) PARP-1 interacts specifically with the NHR of mH2A1. Human PARP-1 was incubated with glutathione agarose immobilized GST alone, or with GST-fusions with either mH2A1.2 (mH2A1.2) or H2A-like or the NHR of mH2A1.2 (GST-NHR). Then the beads were washed and the PARP-1 bound to the beads was run on a SDS-PAGE and blotted. The blot was probed with anti-PARP-1 antibody.



Supplemental figure 1. In the absence of mH2A1, doxorubicin affects cell survival, but does not overactivate PARP-1.

(A) Control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells were treated for 90 minutes with doxorubicin at the indicated concentrations. The percentage of cell survival was measured 24 hours after treatment. The means of 3 different experiments are shown. (B) Kinetics of PARP-1 auto-ADP-ribosylation after doxorubicin treatment in control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells. Cells were treated for 90 minutes with doxorubicin and, after recovery for the indicated times, were lysed. The same amounts of cell extract were run on 7-15% gradient SDS polyacrylamide gels. The proteins were transferred and the blot cut in three parts perpendicular to the electrophoresis direction of the proteins. The upper part of the blot (containing the high molecular mass proteins) was probed with anti-poly (ADP-ribose) antibody, and the middle and the lower part were probed with anti-macroH2A1 and anti-H2A antibodies, respectively. Note that for all time points the anti-poly (ADP-ribose) antibody revealed a slightly more intense band in the mH2A1 siRNA treated cells. (C) Kinetics of H2A.X phosphorylation (γ -H2A.X appearance) after doxorubicin treatment in control and mH2A1 siRNA transfected HeLa cells. Cells were treated with doxorubicin as described in (B), lysed and the proteins separated by SDS-PAGE. After transfer, the blot was first probed with antibody against γ -H2A.X and then probed with an anti-tubulin antibody for visualization of equal protein loading.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. MacroH2A et le chromosome X inactif

B. MacroH2A, un nouveau variant impliqué dans la réparation de l'ADN

C. En conclusion : quel rôle fonctionnel pour macroH2A ?

A. MACROH2A ET LE CHROMOSOME X INACTIF

L'inactivation du chromosome X est un processus qui prend place lors de l'embryogenèse précoce des mammifères femelles, et qui conduit à l'extinction transcriptionnelle d'un des deux chromosomes X (Heard and Distèche 2006). Une fois achevée, cette inactivation demeure stable au cours des divisions. Un certain nombre de marques telles que l'accumulation de l'ARN *Xist*, la méthylation des îlots CpG, l'hypoacétylation des histones H3 et H4, la di- et tri-méthylation spécifiques de l'histone H3 et la présence des protéines du groupe Polycomb, sont associées au chromosome X inactif ou Xi.

L'enrichissement de macroH2A sur le chromosome X inactif a également été observé par différentes équipes (Costanzi and Pehrson 1998; Csankovszki, Panning et al. 1999; Mermoud, Costanzi et al. 1999). Bien que l'association de ce variant d'histone soit un événement relativement tardif au sein de ce mécanisme, il a été suggéré que macroH2A serait nécessaire pour la maintenance de l'inactivation irréversible du chromosome X par la stabilisation de son interaction avec le transcrit *Xist* (Gilbert, Pehrson et al. 2000).

1) Comment étudier l'enrichissement en macroH2A?

Les approches de microscopie de fluorescence

Les affirmations concernant la localisation préférentielle de macroH2A sur le chromosome X inactif sont uniquement basées sur des données d'immunofluorescence (Costanzi and Pehrson 1998; Csankovszki, Panning et al. 1999; Mermoud, Costanzi et al. 1999). Cependant, en utilisant la même approche à l'aide de cellules GFP-macroH2A, il a été montré que l'enrichissement en macroH2A pouvait simplement refléter la forte densité nucléosomale de cette région compactée (Perche, Vourc'h et al. 2000). Ainsi, dans des fibroblastes humains femelles, tous les anticorps dirigés contre les histones conventionnelles marquent préférentiellement le chromosome X inactif. De plus, les protéines de fusion GFP-macroH2A et GFP-H2A sont toutes les deux retrouvées concentrées sur le territoire du corpuscule de Barr (Perche, Vourc'h et al. 2000). Ces données soulèvent le problème de la pertinence de l'observation microscopique pour évaluer l'enrichissement en macroH2A sur le chromosome

X inactif, et suggèrent que ce marquage pourrait seulement refléter le fort degré de compaction de cette zone.

Lors de ce travail de thèse, nous avons étudié quantitativement le marquage des protéines de fusion GFP-macroH2A et GFP-H2A. En réalisant des acquisitions d'images en microscopie confocale dans des conditions non saturantes, nous observons que le marquage préférentiel de macroH2A au niveau du corpuscule de Barr est en partie dû à la forte concentration des nucléosomes : la région est dense en ADN et donc en toutes les protéines chromatinienne, comme H2A. Néanmoins, un enrichissement spécifique semble exister puisque le ratio du signal GFP entre la zone du corpuscule de Barr et le reste du noyau est plus élevé dans le cas de macroH2A que pour l'histone conventionnelle. Le rapport de ces deux ratios nous donne une indication de cet enrichissement, qui serait modeste et de l'ordre de 35 à 45 %.

Une autre approche, plus biochimique et non influencée par la densité en nucléosomes, est nécessaire pour étudier plus en détail l'association de macroH2A avec le chromosome X inactif, et nous avons privilégié les expériences de « ChIP-on-CHIP ».

Les approches de « ChIP-on-CHIP »

Notre protocole de « ChIP-on-CHIP » pour déterminer l'association de macroH2A avec le chromosome X inactif présente un certain nombre d'avantages : tout d'abord, très peu de matériel est perdu lors de l'isolation des nucléosomes à l'aide du tampon riche en sel, ce qui permet une représentation optimale de la chromatine macroH2A. Nous ne réalisons pas de pontage à l'aide de formaldéhyde. L'immunoprécipitation est ainsi réalisée sur du matériel natif, ce qui permet le maintien de tous les épitopes. L'anticorps anti-macroH2A utilisé est très spécifique et permet une excellente immunoprécipitation. Enfin, quelle que soit la puce utilisée, aucune étape d'amplification de l'ADN n'est réalisée, ce qui évite les biais générés par la PCR. Ces quatre points permettent de s'affranchir au maximum des problèmes techniques liés aux expériences de « ChIP-on-CHIP ».

Nos premières données ont été obtenues sur des puces couvrant la totalité des génomes humain et murin. Les immunoprécipitations ont été réalisées à partir de nucléosomes de cellules en culture, ou de noyaux de foie de souris mâle ou femelle. Les hybridations montrent une distribution uniforme de macroH2A au sein du génome, à la fois *ex vivo* et *in vivo*, sans enrichissement particulier sur le chromosome X. Cependant, il est important de noter que ces puces présentent une résolution de 1 Mb. Avec des inserts aussi grands, la présence inévitable

de séquences répétées peut causer du bruit de fond qui risque d'écraser les résultats et de masquer un enrichissement modeste. Enfin, il est possible que la distribution de macroH2A au sein des ces intervalles de 1 Mb ne soit pas uniforme et que le variant soit enrichi ou exclu de certaines régions particulières, ce qu'il n'est pas possible d'appréhender avec ce type de puces.

C'est pourquoi nous avons poursuivi nos investigations, en utilisant cette fois une puce représentant le chromosome X murin avec une résolution très grande, de l'ordre de 300 pb. Les séquences représentées sont toutes uniques et ne contiennent pas d'éléments répétés.

Sur cette puce, il apparaît qu'il existe un enrichissement en macroH2A sur la globalité du chromosome X dans le foie de souris femelle. Le ratio femelle sur mâle donne un enrichissement de 30 %, mais ce chiffre ne fait pas la distinction entre le chromosome X actif (Xa) et inactif (Xi). Comme le Xa est également présent chez le mâle, nous pouvons supposer que l'enrichissement retrouvé chez la femelle est uniquement dû au Xi. On pourrait déduire ainsi le facteur **E** d'enrichissement sur le Xi : $(N+EN)/2=1.3N$, où N est la valeur représentant la quantité de macroH2A sur le Xa. Nous obtenons donc un enrichissement spécifique pour le Xi de 1,6 fois soit 60 %.

Il apparaît difficile dans l'état actuel des choses de donner une estimation précise de l'enrichissement en macroH2A sur le chromosome X inactif. Néanmoins, deux approches très différentes (Immunofluorescence et « ChIP-on-CHIP ») donnent un résultat similaire, et prouvent l'existence d'un enrichissement spécifique, inférieur à deux fois quelle que soit la méthode. Cet enrichissement est donc modéré, en corrélation avec les données récentes qu'ont obtenues d'autres équipes par des expériences biochimiques (Changolkar and Pehrson 2006; Choo, Kim et al. 2006).

2) La localisation de macroH2A sur le chromosome X

A l'aide de la puce représentant le chromosome X de la souris, nous avons pu observer qu'il y a environ 30 % de plus de macroH2A dans les échantillons de souris femelle que mâle. Cette localisation préférentielle de macroH2A chez la femelle se retrouve aussi bien dans les régions riches en gènes, que dans les zones intergéniques du chromosome X. On la remarque aussi au niveau de deux gènes, pourtant répertoriés comme échappant à l'inactivation : *Utx* et

Fxy/Midl. Nous ignorons toutefois si le gène *Utx* est bien exprimé dans le foie. Des expériences sont actuellement en cours pour vérifier ce point.

Les seules zones où macroH2A est appauvrie sont celles des gènes échappants *Smcx* et *Xist*. La déplétion touche également le gène *Eif2s3x* (donnée préliminaire). L'effet est moins important dans le cas de *Xist*, mais il faut rappeler que l'état transcriptionnel de ce gène est différent sur le chromosome X inactif (où il est exprimé) et sur le X actif (où il est silencieux), et que les données d'hybridations ne permettent pas de séparer les deux informations. De plus, la déplétion semble s'étendre en 3' dans le cas de ce gène. Des analyses complémentaires doivent être menées pour découvrir la signification biologique de cette observation.

Il n'a pas été possible de tester le cinquième gène échappant connu de la souris, *Sts*, car celui-ci est situé sur une région pseudo-autosomale dont les informations de séquence ne sont pas encore disponibles. Cette zone n'est donc pas représentée sur la puce.

L'ensemble de ces données corrélient complètement avec celles obtenues par Changolkar et al : cette équipe a également montré que macroH2A était associé préférentiellement sur le chromosome X inactif, mais que ce variant n'était pas retrouvé au niveau de quatre régions échappant à l'inactivation : *Xist*, *Eif2s3x*, *Jarid1c* (*Smcx*), et la région pseudo-autosomale autour de *Midl*. En effet, l'extrémité 5' du gène *Midl* est présente uniquement sur le chromosome X, alors que sa partie 3' fait partie d'une zone pseudo-autosomale (à la fois sur le chromosome X et Y). La transition entre ces deux parties de *Midl* réside au sein du troisième exon. L'étude des deux premiers exons montre un enrichissement dans les échantillons femelles, comme nous avons pu l'observer. Par contre, la région la plus distale de *Midl*, qui n'est pas représentée sur la puce que nous avons utilisée, est appauvrie en macroH2A chez le mâle et la femelle dans leurs expériences (Changolkar and Pehrson 2006).

Nos résultats montrent donc un enrichissement global et modeste de macroH2A sur le chromosome X femelle, excepté sur la plupart des gènes échappant à l'inactivation. Ceci est cohérent avec l'hypothèse que le variant macroH2A est un répresseur transcriptionnel. Sa localisation préférentielle et non aléatoire sur le chromosome X inactif suggère une implication réelle dans le mécanisme de compensation de doses entre les sexes.

3) Quel rôle pour macroH2A dans le mécanisme de l'inactivation du X ?

Il a déjà été montré que macroH2A ne jouait pas de rôle dans les étapes précoces de l'inactivation. L'hypothèse d'une fonction dans le maintien de l'état inactif reste la plus vraisemblable. Néanmoins, les souris knock-out pour macroH2A1 présentent la réactivation d'une cinquantaine de gènes dont seulement 3 sont localisés sur le chromosome X (Changolkar, Costanzi et al. 2007).

Au cours de mon travail de thèse, nous avons montré par une approche d'ARN interférence que macroH2A n'est pas impliqué dans la maintenance de marques spécifiques du Xi telles que l'absence de l'ARN Polymérase II et de l'acétylation de l'histone H4, ainsi que la présence de H3K9me2. Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que l'élimination de macroH2A n'affecte pas l'association de *Xist* avec le chromosome X (Hernandez-Munoz, Lund et al. 2005).

L'équipe de van Lohuizen a également observé la réactivation modérée d'un gène rapporteur intégré au chromosome X inactif en présence d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones. Cette réactivation mineure (de 1,2 % dans les cellules contrôles à 5,6 % dans les cellules traitées par le siRNA) requiert toutefois l'absence de macroH2A sur le Xi.

Les mécanismes qui assurent la maintenance de l'état inactif du Xi sont de toute évidence multiples et complexes : la suppression d'une seule marque telle que la méthylation de l'ADN ou la présence du variant macroH2A ne permet pas d'observer une réactivation massive des gènes du chromosome X. MacroH2A est peut-être une nouvelle marque épigénétique redondante permettant d'assurer au cours des divisions cellulaires le silence du Xi.

Il faut aussi noter que dans toutes nos expériences, seule l'histone macroH2A1 a été étudiée. La forme macroH2A2 est également décrite comme enrichie sur le chromosome X inactif par immunofluorescence. Il semble néanmoins peu probable qu'un effet de compensation fonctionnelle existe entre ces deux histones très similaires, puisque aucune modification de la quantité de macroH2A2 n'a été observée dans les cellules après élimination de macroH2A1 (données non montrées).

Comment expliquer que macroH2A soit enrichi sur l'ensemble du chromosome X afin de remplir sa fonction de « silencer », et appauvrie au niveau de certaines régions comme les gènes échappants ?

Si l'on se base sur l'étude des autres variants d'histones, il semble raisonnable de penser qu'il existe un complexe de remodelage de la chromatine permettant l'assemblage ou l'échange préférentiels de macroH2A sur la chromatine. Le ciblage d'un tel complexe par des interactions avec des protéines chromatiniennes ou des ribonucléoprotéines pourrait conduire à l'assemblage de macroH2A au niveau de régions particulières. Une stabilité différente de macroH2A selon les zones pourrait aussi être un facteur influençant sa distribution.

Existe-t-il des éléments locaux au sein de l'ADN qui conduisent à la localisation de macroH2A sur des régions particulières ? Dans le cas du chromosome X inactif, *Xist* apparaît comme un bon candidat. Il pourrait toutefois y avoir d'autres séquences qui aideraient au recrutement de macroH2A : des séquences répétées, comme les LTR ou les LINEs, ont été proposées comme étant des activateurs de la propagation de l'inactivation (Tsuchiya, Grealley et al. 2004; Lyon 2006). Or, les données obtenues par l'équipe de Pehrson montrent une corrélation entre la distribution de macroH2A et certains éléments LTR (Changolkar and Pehrson 2006).

Pour aller plus loin dans cette étude, des expériences sont actuellement en cours.

Nous souhaitons tester si la localisation de macroH2A dépend des séquences répétées, et quelle est sa distribution sur ces séquences. Pour cela, un séquençage de pointe à très haut débit de la totalité de l'ADN immunoprécipité par l'anticorps anti-macroH2A va être réalisé sur une plate-forme Solexa.

Nous voulons également étudier les changements d'expression des gènes après élimination de macroH2A : des ARN de cellules humaines, traitées ou non par le siRNA anti-macroH2A, ont été isolés et seront utilisés pour analyse sur des puces « transcriptome » de la société Agilent.

Enfin, nous cherchons à comprendre quels sont les facteurs responsables de l'incorporation spécifique de nucléosomes macroH2A : existe-t-il une chaperonne spécifique ? Une isolation biochimique du complexe macroH2A soluble est nécessaire, afin de découvrir la ou les protéines impliquées.

B. MACROH2A, UN NOUVEAU VARIANT IMPLIQUE DANS LA REPARATION DE L'ADN

Les résultats de la littérature suggèrent dans leur ensemble que macroH2A joue un rôle essentiel dans la répression transcriptionnelle. Aucune donnée concernant une fonctionnalité autre n'a été décrite pour ce variant.

La cristallisation récente de AF1521, une protéine de *Archaeoglobus fulgidus* constituée d'un unique domaine « macro », suggère que les domaines macro pourraient posséder une activité catalytique vis-à-vis des substrats ADP-ribosylés. La présence de ces domaines dans certaines poly(ADP-ribose) polymérases comme PARP-9 et PARP-14 supporte cette idée (Allen, Buckle et al. 2003).

L'ADP-ribosylation est reliée à un nombre important de processus biologiques allant de l'activation transcriptionnelle à la réparation de l'ADN. PARP-1, la protéine la plus importante de cette famille, est un senseur moléculaire de l'ADN et est directement impliquée dans sa réparation.

En utilisant une lignée stable de cellules HeLa exprimant une macroH2A1.1 étiquetée (e-mH2A1), nous avons montré récemment que les nucléosomes contenant e-mH2A1 sont spécifiquement associés avec PARP-1. Cette association conduit à l'immobilisation de PARP-1, et des expériences *in vitro* montrent que cela induit une inhibition de son activité enzymatique (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006)/annexe 4.

1) Une nouvelle fonction pour macroH2A

Au cours de ma thèse, nous avons découvert une nouvelle fonction pour le variant macroH2A : son implication dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. En effet, cette réparation est compromise dans les cellules où macroH2A est éliminé par ARN interférence, et la survie de ces cellules est également affectée. Des expériences de restauration avec les protéines macroH2A1.2, H2A-NHR et H2A-like résistantes au siRNA montrent que c'est la région non histone qui est requise pour une réparation efficace de l'ADN.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de l'implication de macroH2A dans ce processus, nous avons analysé les partenaires associés *in vivo* à macroH2A par immunoprécipitation : en

corrélation avec nos récents résultats (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), nous observons que PARP-1 est associée avec le nucléosome macroH2A, et des expériences *in vitro* montrent que la région NHR interagit spécifiquement avec PARP-1. L'élimination de macroH2A par ARN interférence conduit au relâchement de PARP-1 associée au variant et à sa sur-activation dans les cellules traitées par l'agent oxydatif H₂O₂. A l'inverse, aucun relâchement de PARP-1 n'est détecté lorsque les cellules sont traitées par l'agent alkylant MMS (Méthyl méthane-sulfonate) ou la Doxorubicine.

Ces résultats démontrent que macroH2A est impliqué dans la réparation des dommages oxydatifs par l'intermédiaire de la voie PARP.

2) Le rôle de macroH2A dans la réparation de l'ADN dépendante de PARP1 est il direct?

L'enzyme PARP-1 est la protéine clé de la réparation des cassures simple brin de l'ADN (SSBR). L'agent oxydatif H₂O₂ induit très majoritairement ce type de dommages, ce qui explique que ce soit le traitement couramment utilisé lors des études concernant la voie PARP-1.

Lorsque nous traitons les cellules dépourvues en macroH2A par la Doxorubicine, leur survie est plus gravement affectée que dans les cas des cellules contrôles (Supplemental figure 1A). La Doxorubicine induit des lésions de l'ADN dans les deux types de cellules, comme en témoigne la phosphorylation de l'histone H2A.X (Supplemental figure 1C). Toutefois, ceci s'accompagne d'une activation très modérée de PARP1, difficile à mettre en évidence par Western Blot (Supplemental figure 1B). Cela n'est pas surprenant, car la Doxorubicine induit majoritairement la formation de cassures double brin au sein de l'ADN : leur réparation ne sollicite pas directement la voie PARP-1 (Schreiber, Dantzer et al. 2006). Ces données suggèrent que l'effet de la Doxorubicine sur la survie des cellules en l'absence de macroH2A n'est pas lié à la voie SSBR, mais à la probable implication du variant dans d'autres phénomènes de protection contre les stress extérieurs.

La dissociation de PARP-1 observée après traitement par H₂O₂ ne reflète pas un effet direct de cet agent oxydatif sur le complexe nucléosomal macroH2A. Nous avons isolé des complexes e-macroH2A1 à partir de cellules HeLa stables, que nous avons ensuite traités par H₂O₂. Ce traitement ne conduit pas à la déstabilisation du complexe et au relâchement de PARP-1. L'

H₂O₂ par elle-même n'affecte donc pas la stabilité des interactions au sein du nucléosome macroH2A.

Enfin, puisque macroH2A est impliquée dans le contrôle de la transcription, il est envisageable que les effets que nous observons sur la réparation de l'ADN puissent être dus indirectement à la régulation de certains gènes. Cependant, nous notons que la transcription des gènes reliés à la réparation de l'ADN n'est pas affectée dans les souris KO pour macroH2A (McKeown, Changolkar et al. 2006), et que ce variant n'a pas été retrouvé sur les régions régulatrices de ces gènes (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006), ce qui invalide cette possibilité.

3) Comment macroH2A interfère t'il dans la réparation des dommages oxydatifs ?

Nous proposons le modèle suivant : nous avons démontré que l'interaction entre PARP-1 et le nucléosome macroH2A, via la région non histone, résultait en l'immobilisation de PARP-1 et en une inhibition de son activité enzymatique. Lors du dommage oxydatif, une perturbation de l'interaction PARP-1-macroH2A a lieu et conduit au relâchement de PARP-1 de la chromatine. Cette protéine PARP-1 libérée peut ensuite être recrutée au niveau du site endommagé et s'activer. Elle induit alors la réparation de la cassure simple brin par la poly(ADP-ribosylation) de substrats impliqués dans le processus et par la décondensation de la fibre chromatinienne de 30 nm. Une fois la réparation achevée, le polymère PAR est dégradé par l'enzyme PARG. La PARP-1 est ensuite de nouveau séquestrée par les nucléosomes macroH2A et maintenue sous forme inactive.

En l'absence de macroH2A, il n'y a pas de re-capture de l'enzyme PARP-1 qui reste au niveau du site lésé, ce qui conduit à la persistance d'un niveau important de poly(ADP-ribosylation). Une accumulation de foyers PAR dans les cellules traitées est alors observée, ce qui peut interférer avec leur élimination par l'enzyme PARG et induire un délai dans le processus de réparation. En d'autres termes l'absence de macroH2A, qui joue le rôle de régulateur négatif de PARP-1, va déréguler le mécanisme sophistiqué de réparation basé sur l'action concertée de PARP-1 et de PARG.

Pour relarguer PARP-1 des nucléosomes macroH2A lors des dommages, leur interaction doit être perturbée. Comment cela se produit-il?

Nos résultats précédents ont montré qu'un changement conformationnel dans le NHR de macroH2A était suffisant pour induire le relâchement de PARP-1 et son activation (Ouararhni, Hadj-Slimane et al. 2006). De plus, ni la quantité, ni la stabilité de macroH2A n'est affectée dans les cellules endommagées. Enfin, l' H_2O_2 n'induit pas directement une altération de l'interaction PARP-1-macroH2A.

Nous émettons donc l'hypothèse que lors d'un dommage oxydatif, la région NHR de macroH2A pourrait être rapidement modifiée, ce qui induirait un changement conformationnel et le relargage de PARP-1 des nucléosomes macroH2A. Toutefois à l'heure actuelle, nous n'avons pas encore pu mettre en évidence de modification enzymatique touchant le NHR en conditions de stress. Cette modification, que nous continuons de rechercher par des approches biochimiques, pourrait être transitoire et/ou particulièrement difficile à détecter, comme une phosphorylation.

C. EN CONCLUSION : QUEL ROLE FONCTIONNEL POUR MACROH2A ?

Les études du nucléosome macroH2A *in vitro* et *in vivo*, auxquelles j'ai pu participer au cours de ce travail de thèse, ont permis de montrer que ce variant d'histone pourrait agir comme un répresseur de la transcription. Certains promoteurs ont été identifiés comme enrichis en macroH2A, ce qui permettrait de maintenir un état transcriptionnellement inactif : c'est le cas par exemple des gènes de l'*IL8* ou de *Hsp70*.

Le mécanisme d'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles se produit au cours des premiers stades de l'embryogenèse et permet d'équilibrer le produit des gènes liés à ce chromosome. Par immunofluorescence, macroH2A se retrouve accumulé sur le territoire du chromosome X inactif, mais il n'avait pas été clairement démontré que cette association préférentielle était réelle.

Lors de cette thèse, nous avons pu montrer par deux différentes approches qu'il existait un enrichissement spécifique de macroH2A sur le Xi, quoique de faible importance. La protéine se retrouve enrichie tout le long du chromosome X dans le foie de souris femelle par rapport au mâle, à la fois dans les régions riches et pauvres en gènes. Néanmoins, cette distribution n'est pas aléatoire puisque plusieurs gènes échappant à l'inactivation sont retrouvés appauvris en macroH2A.

Nous ignorons encore à l'heure actuelle comment macroH2A peut être déposée spécifiquement sur certaines régions et pas sur d'autres. De plus, son rôle exact au sein du processus d'inactivation reste mystérieux : vraisemblablement, macroH2A est un des facteurs multiples et redondants qui assure le maintien de l'état réprimé du Xi.

Lors d'une étude récente, nous avons montré que les nucléosomes contenant une macroH2A1 étiquetée sont spécifiquement associés avec PARP-1. Cette association conduit à l'immobilisation de PARP-1 et à une inhibition de son activité enzymatique. Cette protéine PARP-1, ainsi que le PAR qu'elle synthétise, sont connus pour leur implication dans de grands mécanismes cellulaires tels que la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription.

En nous focalisant plus particulièrement sur le mécanisme de réparation de l'ADN, nous avons pu mettre en évidence un nouveau rôle pour le variant d'histone macroH2A : son élimination par une approche d'ARN interférence affecte la survie cellulaire après traitement par un agent oxydant. L'absence de macroH2A conduit à un détachement de PARP-1 des nucléosomes et à sa sur-activation, ce qui compromet sévèrement la réparation de l'ADN endommagé.

La protéine PARP-1 participe également à la régulation de l'expression des gènes, notamment ceux de l'inflammation et de la survie cellulaire régulés par NF- κ B. Elle peut interagir avec les facteurs de transcription, ou se lier directement aux séquences régulatrices.

Est-il possible que macroH2A et PARP-1 agissent de concert lors de la réparation de l'ADN, mais également lors d'autres mécanismes cellulaires tels que la transcription ?

Le modèle que nous proposons est que lors d'un stress oxydatif, une modification conformationnelle de macroH2A conduit au détachement de PARP-1 de la chromatine. PARP-1 ainsi re-larguée est recrutée sur le site du dommage et permet la réparation. Un mécanisme similaire semble être impliqué pour la régulation de l'expression du gène *Hsp70*, où macroH2A et PARP-1 forment un complexe de répression.

Enfin, par ses nombreuses fonctions, la protéine PARP-1 apparaît comme déterminante pour le maintien de la stabilité génomique. Des expériences de transgénèse chez la souris ont montré que les embryons femelles PARP-1 \pm PARP-2 \pm ne survivaient pas et que cette létalité était associée à une instabilité accrue du chromosome X (Menissier de Murcia, Ricoul et al. 2003). De plus, Nusinow et al. ont montré récemment que PARP-1 serait impliquée, comme macroH2A, dans le mécanisme d'inactivation du chromosome X. En effet, son élimination par ARN interférence conduit à la réactivation de 6,7% d'un transgène GFP lié au X. MacroH2A recruterait sur le Xi la protéine PARP-1, qui serait une nouvelle marque permettant le maintien de son état réprimé (Figure 32).

Au vu de tous ces résultats, l'immobilisation de PARP-1 par macroH2A apparaît comme le mécanisme par lequel le variant induirait la répression de la transcription.

Nous pouvons donc imaginer que macroH2A permettrait de séquestrer une fraction de protéines PARPs inactives, capables d'être relarguées rapidement et localement dans le cadre de la réparation des dommages. Au niveau du chromosome X, ces complexes macroH2A-

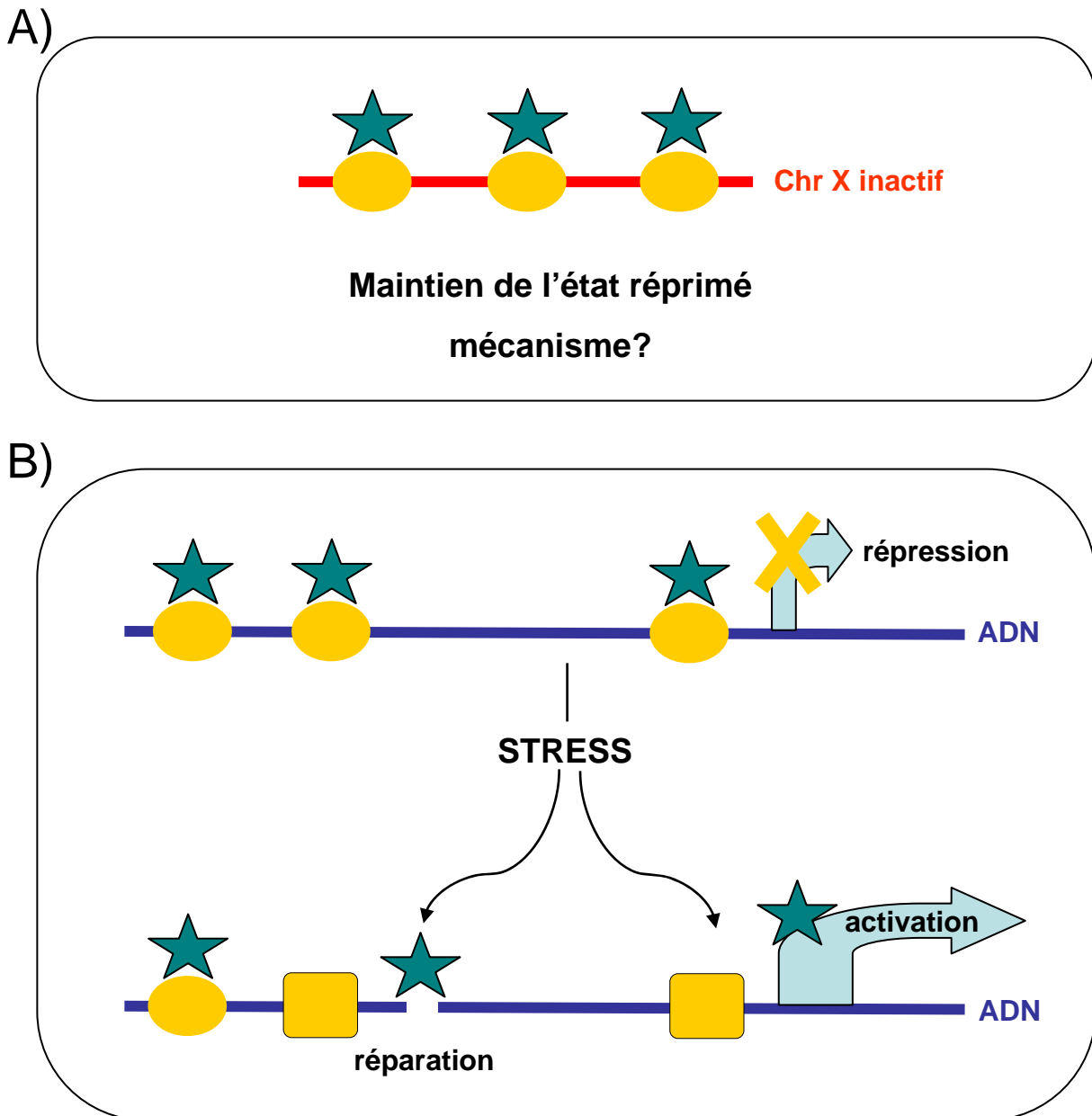


Figure 32 : Modèle d'action du complexe macroH2A-PARP-1

A) Le complexe macroH2A-PARP-1 est un répresseur transcriptionnel, réparti le long du chromosome X inactif, et qui apparaît comme une nouvelle marque capable de maintenir l'état silencieux du Xi. Le mécanisme d'inactivation est encore inconnu, et vraisemblablement redondant avec les autres marques épigénétiques impliquées dans ce maintien.

B) Le variant macroH2A séquestre PARP-1 sous forme inactive. En cas de stress, un changement conformationnel de macroH2A induit le relargage local de PARP-1, qui assure alors la réparation des cassures simple brin causées par les agents oxydants, ou l'activation transcriptionnelle de gènes inducibles (exemple de *Hsp70.1*).

● macroH2A ★ PARP-1

PARP-1-, repartis le long du chromosome, participeraient au maintien de la répression transcriptionnelle du Xi. Enfin, en se localisant sur des promoteurs ou des régions régulatrices précises, le complexe macroH2A-PARP-1 pourrait également jouer un rôle déterminant dans l'expression de gènes inductibles (Figure 32).

Comme nous l'avons vu, la protéine PARP-1 est une enzyme multifonctionnelle impliquée dans la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription, mais également dans d'autres processus physiologiques dont la liste n'est pas définitive. Le lien direct entre macroH2A et PARP-1 que nous avons mis en évidence suggère également une implication de macroH2A dans d'autres mécanismes cellulaires. Ces questions ouvertes demeurent un challenge pour les études à venir.

ANNEXES

Annexe 1: Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A.

Annexe 2: Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes.

Annexe 3: Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish.

Annexe 4: The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity.

Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant macroH2A

Cécile-Marie Doyen,^{1,2,6‡} Woojin An,^{3†‡} Dimitar Angelov,^{2,6} Vladimir Bondarenko,⁴
Flore Mietton,¹ Vassily M. Studitsky,⁴ Ali Hamiche,⁵ Robert G. Roeder,³
Philippe Bouvet,^{2,6*} and Stefan Dimitrov^{1,2*}

Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche cedex, France¹; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France²; Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, New York 10021³; Department of Pharmacology, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 675 Hoes Lane, Piscataway, New Jersey 08854⁴; Institut Andre Lwoff, CNRS UPR 9079, 7 rue Guy Moquet, 94800 Villejuif, France⁵; and Ecole Normale Supérieure de Lyon, LBMC, CNRS-UMR 5161, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France⁶

Received 29 July 2005/Returned for modification 24 August 2005/Accepted 3 November 2005

macroH2A (mH2A) is an unusual histone variant consisting of a histone H2A-like domain fused to a large nonhistone region. In this work, we show that histone mH2A represses p300- and Gal4-VP16-dependent polymerase II transcription, and we have dissected the mechanism by which this repression is realized. The repressive effect of mH2A is observed at the level of initiation but not at elongation of transcription, and mH2A interferes with p300-dependent histone acetylation. The nonhistone region of mH2A is responsible for both the repression of initiation of transcription and the inhibition of histone acetylation. In addition, the presence of this domain of mH2A within the nucleosome is able to block nucleosome remodeling and sliding of the histone octamer to neighboring DNA segments by the remodelers SWI/SNF and ACF. These data unambiguously identify mH2A as a strong transcriptional repressor and show that the repressive effect of mH2A is realized on at least two different transcription activation chromatin-dependent pathways: histone acetylation and nucleosome remodeling.

DNA is organized into chromatin in the cell nucleus. Chromatin exhibits a repeating structure, and its basic unit, the nucleosome, is composed of an octamer of the four core histones (two each of H2A, H2B, H3, and H4), around which two superhelical turns of DNA are wrapped. The structure of the histone octamer (6) and the nucleosome (25) was solved by X-ray crystallography. In addition to the conventional core histones, the cells express a very small amount of their nonallelic isoforms, the so-called histone variants. The small amount of the histone variants present in the cell suggests that these proteins may play regulatory roles. Indeed, the incorporation of the histone variants into the histone octamer brings new structural properties to the nucleosome, which in turn might be essential for the regulation of several vital processes of the cell. For example, the histone variant H2A.Z is implicated in both gene activation (32) and gene silencing (15). Recently, a role of H2A.Z in chromosome segregation was also suggested (31). Another histone variant, H2AX, is essential for repair and the maintenance of genomic stability (7, 8). Incorporation of the

histone variant H2ABbd into the histone octamer confers lower stability of the H2ABbd nucleosomes (16). Since the residues of conventional H2A, which are targets for posttranslational modifications, are mutated in H2ABbd, one could expect the function of this histone to be regulated in a distinct way (10, 5).

macroH2A (mH2A) is an unusual histone variant with a size approximately threefold the size of the conventional H2A (29). The N-terminal domain of mH2A (H2A-like), which shows a high degree of homology with the conventional H2A, is fused to a large nonhistone region (NHR) known as the macro domain (1, 24, 29). The immunofluorescence studies indicate that mH2A is preferentially located on the inactive X chromosome (9, 12, 13, 27). The mH2A nucleosomes exhibit structural alterations in the vicinity of the dyad axis, abrogating the binding of transcription factors to their recognition sequences when the sequences are inserted close to the dyad (4). In addition, the presence of mH2A interferes with SWI/SNF nucleosome remodeling and movement to neighboring DNA segments (4). All these data suggest that mH2A could be involved in transcriptional repression, but the mechanism by which mH2A operates is unknown. Indirect data indicated that the NHR of mH2A could be responsible for the repression of transcription (30). It was also recently suggested that macro domains could possess enzymatic activities [poly(ADP-ribose) formation] and could bind monomeric ADP-ribose and polymers of poly(ADP-ribose) (1, 20). Furthermore, it was recently demonstrated that the macro domain of macroH2A1.1 but not macroH2A1.2 was able to bind the SirT1 metabolite *O*-acetyl-ADP-ribose (23); however, the consequences of this property

* Corresponding author. Mailing address for Stefan Dimitrov: Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche cedex, France. Phone: (33) 4 76 54 94 73. Fax: (33) 4 76 54 95 95. E-mail: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr. Mailing address for Philippe Bouvet: Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Phone: (33) 4 72 72 80 16. Fax: (33) 4 72 72 80 16. E-mail: pbouvet@ens-lyon.fr.

† Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, USC/Norris Comprehensive Cancer Center, 1501 San Pablo Street, ZNI 241, MC 2821, Los Angeles, CA 90089-2821.

‡ These authors contributed equally to this work.

on the function of macroH2A and on chromatin structure are not known.

This work summarizes our studies on the effect of mH2A1.2 on transcription. We show that the presence of mH2A inhibits the Gal4-VP16- and p300-dependent histone acetylation and transcription from mH2A nucleosomal arrays. Importantly, this effect was determined only by the NHR of mH2A, since arrays reconstituted with conventional H2A fused to the mH2A NHR (H2A-NHR arrays), but not the H2A-like arrays, exhibited the same behavior. In addition, the chromatin remodeling machines SWI/SNF and ACF were unable to both remodel and mobilize nucleosomes reconstituted with the H2A-NHR fusion protein. These data suggest that the property of mH2A to affect transcriptional regulation resides mainly in its nonhistone region.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of DNA probes and reconstitution of nucleosomes. The 152-bp EcoRI-RsaI DNA fragments containing the *Xenopus borealis* 5S RNA gene were derived from plasmid pXP-10 (17) by PCR amplification. DNA was 3' radiolabeled at the EcoRI side by [α -³²P]ATP and Klenow enzyme. The 255-bp and 241-bp DNA probes, containing the strongly positioning sequence 601 (33) at the middle or at 8 bp from the 3' end, respectively, were prepared by PCR amplification of plasmids pGEM3Z-601 and p199-1 (a kind gift from J. Widom and B. Bartholomew) using [γ -³²P]ATP-labeled 5' primer. The 154-bp fragment containing the five Gal4-VP16 binding sites was derived from plasmid pG5ML by PCR amplification using the following primers: 5'-CGA ATC TTT AAA CTC GAG TGC ATG CCT GCA and 5'-AAA GGG CCA AAT CGA TAG CGA GTA TAT ATA GGA CTG GGG ATC. All DNA probes were purified on 6% native polyacrylamide gel electrophoresis.

Nucleosome reconstitutions were performed by salt gradient dialysis as described previously (17). Briefly, ~100 ng of radiolabeled DNA (5×10^5 cpm), was mixed with 2 μ g of nonlabeled ~180-bp average sequence chicken erythrocytes DNA in 100- μ l volume, together with 0.8% (wt/wt) of preassembled histone octamers in high-salt buffer: 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, and 2 M NaCl. Then, the solution was stepwise dialyzed at 4°C for 2 h/step against decreasing concentrations (1.2 M, 1.0 M, 0.8 M, 0.6 M, and 0.1 M) of NaCl in the same buffer, followed by dialysis overnight against 10 mM Tris (pH 7.4), 0.25 mM EDTA, and 10 mM NaCl. Nucleosome formation was assessed by a 5% polyacrylamide electrophoretic mobility shift assay (EMSA) run in 0.3 \times Tris-borate-EDTA buffer.

Protein expression and purification. The recombinant *Xenopus laevis* full-length histone protein was produced and purified as previously described (26). For the production of the recombinant H2A-NHR protein, the coding sequences for the H2A protein (from M1 to P118) and for the NHR domain of human macroH2A1.2 (from R118 to N371) were individually amplified by PCR and fused in the pET30a vector to form the coding sequence of the chimera H2A-NHR protein.

After expression in *Escherichia coli*, the recombinant chimera NHR-H2A was purified to homogeneity as described for the conventional histones.

Nucleosome mobilization experiments. Nucleosomes (final concentration, 30 to 50 nM) were mixed with SWI/SNF or ACF, as indicated, in buffer containing 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol, 100 μ g/ml bovine serum albumin, 5% glycerol, 0.02% (vol/vol) Nonidet P-40, 2.5 mM MgCl₂, and 1 mM ATP. After incubation for 45 min, or the time indicated, the reaction was stopped by 0.05 units of apyrase, 10 mM EDTA (final concentration), and 1 μ g of plasmid DNA. Nucleosome sliding was analyzed by a 5% polyacrylamide-bisacrylamide (29:1) EMSA. Nucleosome borders were mapped by limit digestion with exonuclease III (3 to 5 U/ml) for 15 min, and DNA fragments were analyzed by denaturing acrylamide-urea gel electrophoresis. The remodeling of the 152-bp 5S nucleosomal particles was assessed by DNase I footprinting. Briefly, 0.5 units of DNase I (Invitrogen) were added to the arrested reaction mixture for 2 min. DNA digestion was stopped by the addition of 20 mM EDTA (final concentration), 1 μ g of proteinase K, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (final concentration). DNA partial digests were recovered by phenol extraction and ethanol precipitation and analyzed by 8% polyacrylamide-8 M urea sequencing gel electrophoresis in 1 \times Tris-borate-EDTA buffer at a constant power of 65 W.

Transcription experiments. Chromatin arrays containing either conventional H2A or H2A-like, H2A-NHR histones were assembled using the pG5ML array

template and recombinant Acf1, ISWI, and NAP-1 as previously described (2, 18). The p300 and Gal4-VP16 transcriptions and the histone acetyltransferase (HAT) assays were performed according to previously described protocols (2). The chromatin arrays reconstituted with the conventional H2A or the variant histones were soluble under the conditions used for transcription (data not shown). For the analysis of the transcription elongation through nucleosomes, polymerase II (Pol II) elongation complex assembly was ligated to either the DNA or the conventional or variant nucleosomes, and transcriptions were carried out as described previously (21).

RESULTS

mH2A represses Gal4-VP16- and p300-dependent histone acetylation and transcription. To analyze the effect of mH2A1.2 on transcription, we assembled mH2A nucleosomal arrays according to previously described protocols (18) using recombinant assembly factors and histone proteins (Fig. 1 and see Fig. 3). The assembly was carried out on a pG₅ML array plasmid, which contains a promoter sequence flanked by five 208-bp repeats of the 5S RNA sea urchin gene. The reconstituted chromatin containing conventional H2A or histone variant mH2A were analyzed by both supercoiling assay (Fig. 1A) and digestion with micrococcal nuclease (MNase) (Fig. 1B). The supercoiling assay shows a very efficient assembly of the chromatin samples (Fig. 1A, lanes 3 and 4). The clear 200-bp repeats observed upon digestion of both samples with micrococcal nuclease indicate a proper structural organization of the nucleosomal arrays (Fig. 1B, lanes 2 to 4). Then, the conventional and mH2A nucleosomal arrays were used for transcription. The two templates, however, exhibited completely different behaviors in the transcription assay (Fig. 1C). In both cases, the presence of histones abolished the basal transcription (results not shown), and the addition of Gal4-VP16 resulted in a detectable transcription (Fig. 1C, lanes 1 and 3). The presence of p300 in the reaction mixture leads to a dramatic increase of the transcription from the conventional nucleosomal arrays but to a very small increase of the transcription from the mH2A arrays (Fig. 1C, compare lane 1 with lane 2 and lane 3 with lane 4). In the different experiments, the increase of the transcription from conventional arrays was found to be 10 to 12 times higher than that from mH2A arrays. These results clearly show that mH2A is a very efficient repressor of transcription. How does mH2A affect transcription? Since the efficiency of transcription from the chromatin templates was strongly dependent on the HAT p300 and thus on histone acetylation (Fig. 1) (2, 3), one obvious reason for the transcription repression could be the inability of p300 to acetylate histones within the mH2A nucleosomal arrays. This was tested by HAT assays, and we indeed found that the acetylation of histones by p300 was considerably reduced within the mH2A reconstituted chromatin (Fig. 1D, compare lane 2 with lane 4), thus confirming our hypothesis.

It is well documented that p300 is recruited to the promoter through Gal4-VP16 (2, 3, 22). In addition, the presence of mH2A interferes with the binding of the transcription factor NF- κ B when its recognition sequence is inserted in the vicinity of the nucleosome dyad axis (4). This suggests that part of the inhibition of both transcription and histone acetylation could be associated with some possible impairment of Gal4-VP16 binding to its recognition sequence within the mH2A nucleosomes. To check this, we have reconstituted conventional and

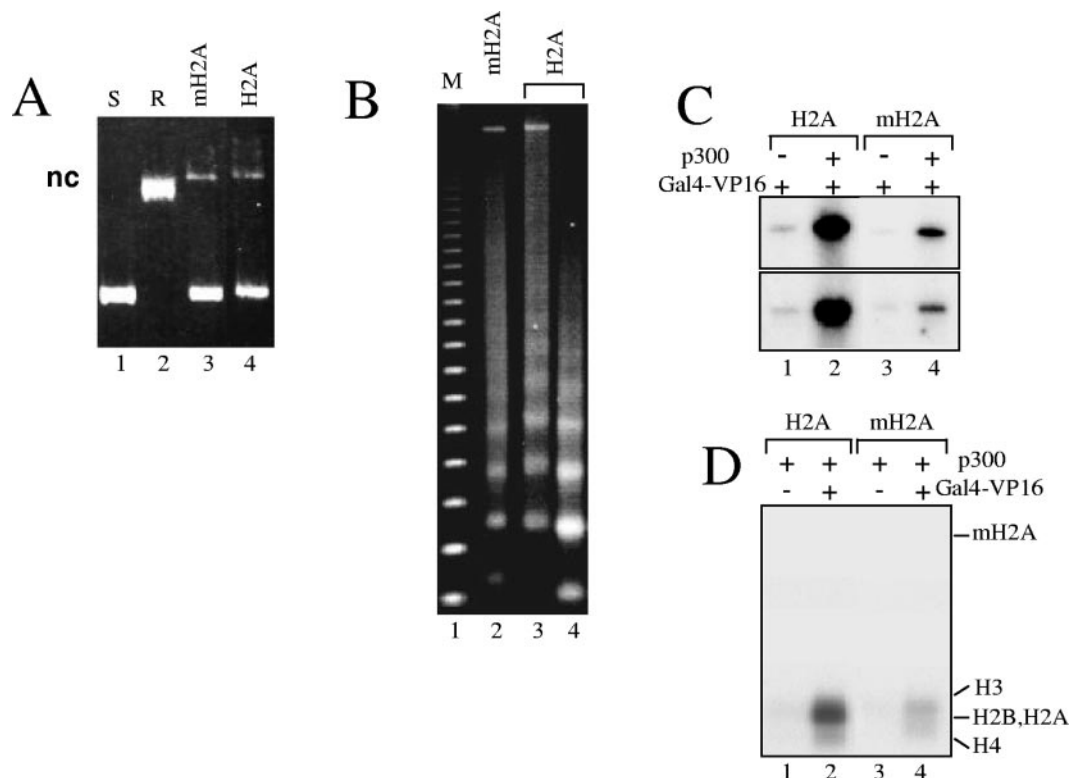


FIG. 1. macroH2A interferes with both p300- and Gal4-VP16-dependent transcription and histone acetylation. Chromatin was assembled on the pG₅ML array DNA by using recombinant *Drosophila* Acf1, ISWI, and the nucleosome assembly protein 1, an equimolar mixture of either conventional H2A or variant histone macroH2A, and the three remaining core histones H2B, H3, and H4. (A) DNA supercoiling assay for the assembly of chromatin. The DNA samples were run on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. Lane 1, supercoiled pG₅ML DNA (S); lane 2, topoisomerase I-relaxed pG₅ML DNA (R); lanes 3 and 4 show the plasmid DNA isolated from the chromatin samples assembled with macroH2A or conventional H2A, respectively. "nc" designates nick DNA. (B) Micrococcal nuclease digestion of the assembled macroH2A (lane 2) and conventional H2A (lanes 3 and 4) chromatin samples. The chromatin samples were digested with either 0.2 mU MNase (lanes 2 and 3) or 0.5 mU MNase (lane 4) for 10 min at 22°C, and the DNA was analyzed on 1.2% agarose gels. Lane 1, a 123-bp DNA ladder marker (M). (C) p300- and Gal4-VP16-dependent transcription of conventional H2A (lanes 1 and 2) and histone variant mH2A (lanes 3 and 4) nucleosomal arrays. The arrays were incubated with GAL4-VP16 alone or with both Gal4-VP16 and p300. The results from two independent experiments are shown. (D) HAT assays with nucleosomal arrays assembled with either conventional H2A (lanes 1 and 2) or macroH2A (lanes 3 and 4) nucleosomal arrays. All reaction mixtures contained p300 while Gal4-VP16 was present in mixtures for reactions 2 and 4 only. The positions of the histones are indicated.

mH2A nucleosomes using a 154-bp DNA fragment derived from the pG₅ML vector (used for reconstitution of the 5S nucleosome array transcription template) and containing the five Gal4-VP16 binding sites. Then, the binding of Gal4-VP16 to both nucleosomal templates and naked DNA was studied by EMSA (Fig. 2 and unpublished data). In agreement with the reports in the literature (14), we found that compared to naked DNA, a much larger amount of Gal4-VP16 was necessary for its binding to the nucleosomes (results not shown). The efficiencies of the binding of Gal4-VP16 to both conventional and mH2A nucleosomes were, however, not significantly different (Fig. 2B to D). Indeed, the quantification of the EMSA results demonstrated only a relatively small preference of Gal4-VP16 binding to conventional nucleosomes compared to mH2A nucleosomes (Fig. 2D). This could reflect the interference of the binding of Gal4-VP16 with two of the five binding sites. This suggests that the strong inhibition of both transcription and histone acetylation of mH2A nucleosomal arrays could not be explained by a lack of binding of Gal4-VP16 to the arrays. In agreement with this, we found that p300 was able to acetylate

only very poorly the histones of the GAL4-VP16-bound mH2A nucleosomes (Fig. 2E).

The NHR of mH2A is responsible for the repression of transcription and the inhibition of histone acetylation. A major feature of mH2A is the presence of a long C-terminal extremity (NHR domain) fused to the histone-like domain (H2A-like) which is highly homologous to H2A (Fig. 3A). To determine whether the inhibition of transcription and of p300-dependent histone acetylation observed with mH2A chromatin templates could be attributed to one specific domain of mH2A, recombinant histone proteins corresponding to H2A-like, H2A-NHR (fusion of the NHR domain of mH2A to the conventional H2A) proteins were purified (Fig. 3B) and used for the reconstitution of chromatin on the pG₅ML plasmid. Supercoiling (Fig. 3C) and micrococcal nuclease (Fig. 3D) assays showed an efficient reconstitution and proper structural organization of the reconstituted H2A-like and H2A-NHR chromatin templates. These chromatin templates were then used in a transcription assay (Fig. 3E). p300-mediated and Gal4-VP16-dependent transcription from the H2A-like chromatin tem-

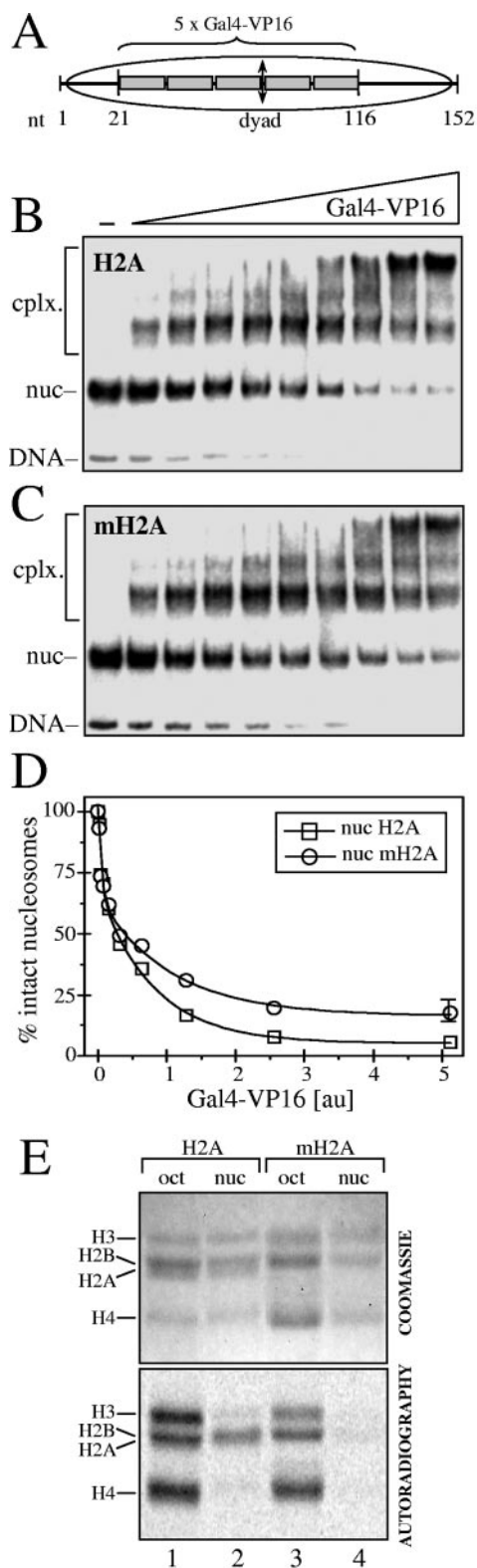


FIG. 2. The presence of mH2A does not affect the binding of Gal4-VP16 to the nucleosome. (A) Schematic of the nucleosomes used in Gal4-VP16 binding studies. A 152-bp DNA fragment, derived from the pG₅ML vector and containing the five Gal4-VP16 sites inserted in the E4 promoter, was PCR amplified and used to reconstitute both conventional and mH2A nucleosomes. The positions of the five Gal4-

plates (Fig. 3E, lanes 1 to 2) showed a transcription level similar to the transcription level from conventional nucleosomal arrays. In contrast, the transcription level from the H2A-NHR chromatin templates was repressed about 10-fold (Fig. 3E, lanes 3 to 4) compared to the transcription level from wild-type or H2A-like chromatin templates. This level of repression was similar to what was obtained with the mH2A chromatin template (Fig. 1C), suggesting that the repression of the p300-mediated and Gal4-VP16-dependent transcription observed in the presence of mH2A could be attributed to the NHR domain of mH2A. Since the repression of transcription in the presence of mH2A is associated with a reduced level of p300-dependent acetylation of histones of the chromatin templates, we next tested whether this effect is associated with the presence of NHR (Fig. 3F). Indeed, the level of p300-mediated histone acetylation within the H2A-like chromatin template was very similar to the level of acetylation of conventional nucleosomes (Fig. 3F, lanes 1 to 2), whereas the acetylation level of histones within the H2A-NHR chromatin template (Fig. 3F, lanes 3 to 4) was very low, suggesting that the repression of p300 HAT activity within the mH2A chromatin template is the consequence of the presence of the NHR domain of mH2A.

The repression of transcription observed in the presence of mH2A or of the fusion H2A-NHR could be the consequence of a lower initiation level or because of an inhibition of the elongation of Pol II transcription through the nucleosome. To differentiate between these two possibilities, we carried out transcription elongation experiments by using conventional H2A-like, H2A-NHR, and mH2A nucleosomes (Fig. 4). Briefly, the four types of nucleosomes were reconstituted and ligated to Pol II elongation complexes immobilized on beads as described previously (21). The transcription elongation reaction was carried out in the presence of 40 mM, 300 mM, or 1 M KCl, and the nascent RNA was pulse-labeled (21). At 40 mM KCl, the nucleosomal templates efficiently blocked the elongation reaction (Fig. 4, lanes 2, 6, 10, and 14). The 10 to 25% of transcripts observed at this KCl concentration roughly reflect the presence of free DNA in the different template solutions (results not shown) (21). The nucleosome-specific pausing patterns were similar for the four different templates (Fig. 4, lanes 2, 6, 10, and 14). An increase of the ionic strength to 300 mM KCl destabilizes the nucleosomes, and a further increase of the KCl concentration to 1 M results also in a partial removal of H2A-H2B and mH2A-H2B dimers. This, in turn, results in much more efficient transcript elongation on

VP16 binding sites and the nucleosome dyad are designated. nt, nucleotide. (B) Binding of Gal4-VP16 to conventional H2A nucleosomes. Increasing amounts of Gal4-VP16 were added to the solution containing conventional nucleosomes, and Gal4-VP16 binding was assessed by EMSA. The positions of free DNA, nucleosomes (nuc), and Gal4-VP16 nucleosome complexes (cplx.) are designated on the left part of the figures. (C) Data are presented as described for panel B but for macroH2A nucleosomes. (D) Quantification of the data presented in panels B and C. (E) HAT assays with either conventional H2A (lane 2) or macroH2A (lane 4) mononucleosomes. Acetylation of the histone mixtures consisting of conventional histones or containing mH2A is shown in lanes 1 and 3, respectively. All reaction mixtures contained p300 and Gal4-VP16. The positions of the histones are indicated.

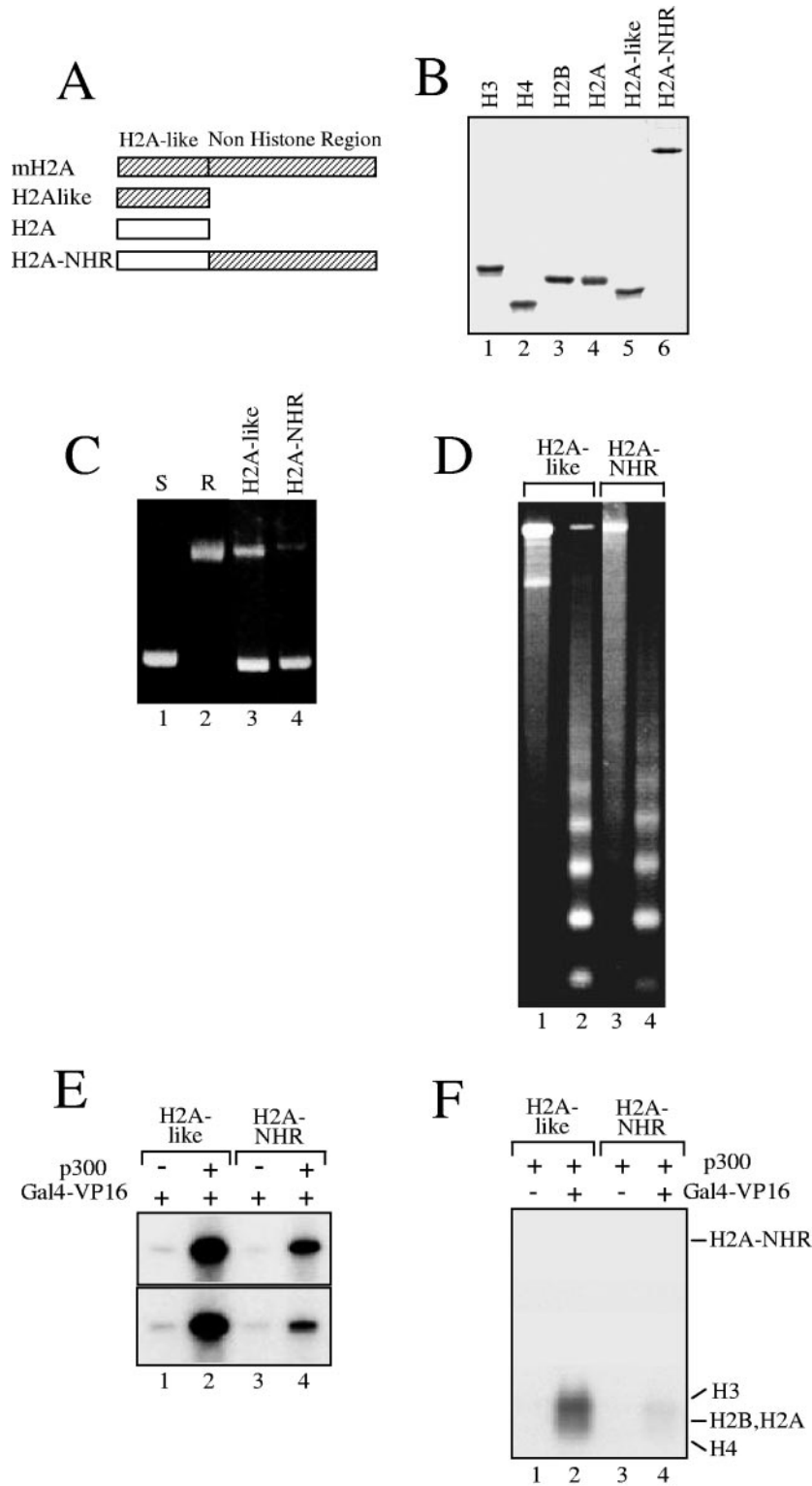


FIG. 3. The NHR of the histone variant macroH2A is involved in both the repression of p300- and Gal4-VP16-dependent transcription and the inhibition of histone acetylation. Chromatin was assembled on the pG₅ML array DNA as described in the legend for Fig. 1 but with the histone-like domain of mH2A (H2A-like) or with the fusion (H2A-NHR) of conventional H2A with the NHR of mH2A. (A) Schematic of the proteins used in the chromatin assembly experiments. (B) 18% SDS electrophoresis of the recombinant conventional core histones, the fusion H2A-NHR, and the H2A-like nucleosomal template. (C) Supercoiling assay for DNA isolated from chromatin assembled with the H2A-like (lane 3) or H2A-NHR (lane 4) nucleosomal template. (D) Micrococcal nuclease analysis of chromatin assembled with either the H2A-like (lanes 1 and 2) or H2A-NHR (lanes 3 and 4) nucleosomal template. The digestion was performed with 0.1 mU MNase (lanes 1 and 3) or with 0.5 mU MNase (lanes 2 and 4) for 10 min at 22°C. DNA was then extracted from the digested samples and analyzed on 1.2% agarose gels. (E) p300- and Gal4-VP16-dependent transcription of H2A-like (lanes 1 and 2) and H2A-NHR (lanes 3 and 4) nucleosomal templates. The results from two independent experiments are shown. (F) HAT assays of H2A-like (lanes 1 and 2) and H2A-NHR (lanes 3 and 4) nucleosomal arrays. Note the complete inhibition of histone acetylation in the H2A-NHR templates.

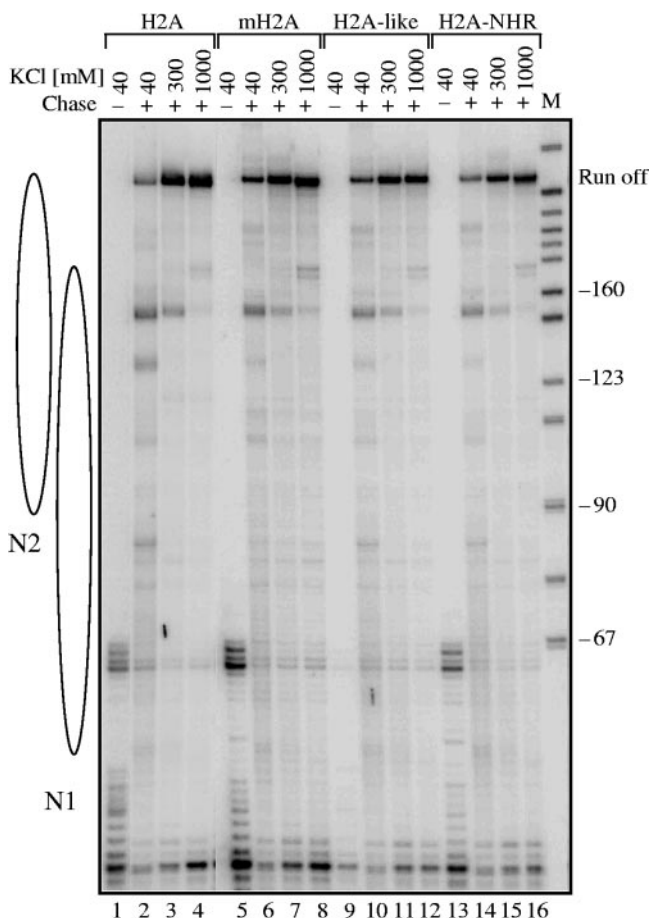


FIG. 4. The NHR of mH2A does not affect polymerase II elongation through nucleosomal templates. A 245-bp DNA fragment was used to reconstitute nucleosomes with either conventional H2A or the fusion H2A-NHR. The templates, a mixed population of two positioned nucleosomes, N1 and N2, were then ligated to the elongation Pol II complex immobilized on beads as described previously (21). The Pol II elongation complex was allowed to transcribe the nucleosomal DNA, and the nascent RNA was pulse labeled. The transcription was performed in the presence of either 40 mM, 300 mM, or 1 M KCl, and the labeled RNA was extracted and analyzed. The RNA isolated from the transcription reactions of conventional H2A (lanes 1 to 4), mH2A (lanes 5 to 8), H2A-like (lanes 9 to 12), and H2A-NHR (lanes 13 to 16) nucleosomal templates was analyzed on an 8% denaturing polyacrylamide gel. The transcriptions from preformed stalled elongation complexes are also shown (lanes 1, 5, 9, and 13). M, a marker for the molecular mass of the transcripts.

the nucleosomal templates (Fig. 4, lanes 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, and 16). The elongation efficiencies of polymerase II were, however, very similar for the four different types of chromatin templates (Fig. 4, lanes 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16). This demonstrates that the observed inhibition of transcription from mH2A and H2A-NHR templates is associated with the initiation but not with the elongation of transcription. Therefore, the NHR domain of mH2A is responsible for the inhibition of the initiation of the Pol II transcription reaction.

The NHR of mH2A induces structural alterations within the nucleosome. To further examine how the NHR of mH2A could affect transcription initiation, we first determined the consequences of the presence of the NHR on the structure of the

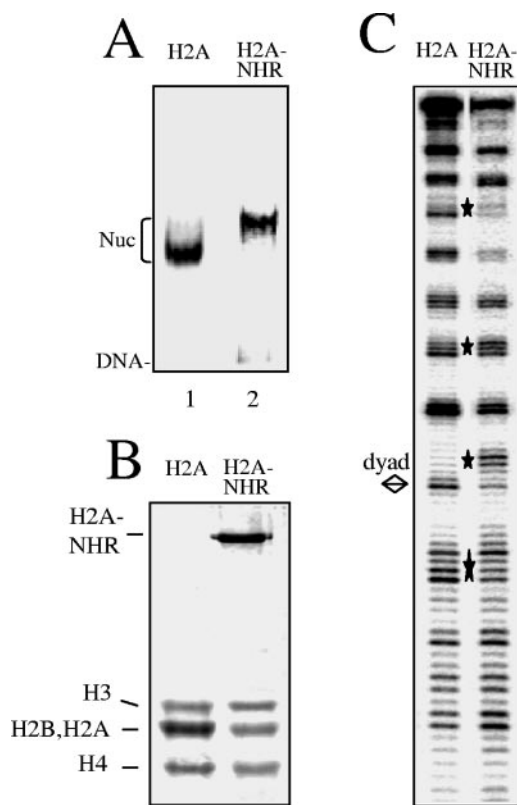


FIG. 5. The presence of NHR of mH2A results in alterations in the structure of the H2A-NHR nucleosomes. (A) EMSA of the reconstituted H2A and H2A-NHR nucleosomes (Nuc). (B) 18% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the histones isolated from H2A (lane 1) and H2A-NHR (lane 2) nucleosomes. The positions of the histones are shown on the left part of the figure. Note that the H2A and H2B *Xenopus laevis* histones comigrate under the electrophoresis conditions. (C) DNase I footprinting of conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes reconstituted on a 152-bp fragment comprising the 5S DNA *Xenopus borealis* gene. The digestion products were analyzed on an 8% denaturing polyacrylamide gel. The bottom strand of the nucleosomal DNA was P³² labeled. The diamond designates the dyad axis of the nucleosome. Stars indicate the alterations of the H2A-NHR nucleosome DNase I digestion pattern.

nucleosomes. Conventional H2A and H2A-NHR fusion proteins were produced, purified, and used for the reconstitution of nucleosomes on a radioactively end-labeled 152-bp 5S DNA gene (Fig. 5A and B). In order to study the structural consequences of the incorporation of the NHR into the reconstituted particles, we performed DNase I footprinting (Fig. 5C). The DNase I cleavage patterns of the control and H2A-NHR nucleosomes show the 10-bp repeat characteristic of the nucleosome particle. Some pronounced alterations were, however, detected in the DNase I cleavage of the H2A-NHR essentially around the dyad axis. The DNase I cleavage pattern of particles reconstituted with the H2A-like domain of mH2A was essentially the same as that for conventional H2A (for detail, see Fig. 7 of reference 4). We attribute the observed alterations in the DNase I cleavage pattern of the H2A-NHR particle to the presence of the NHR domain. These alterations would reflect some changes in the DNA structure in proximity to the nucleosome dyad and/or some inaccessibility of the

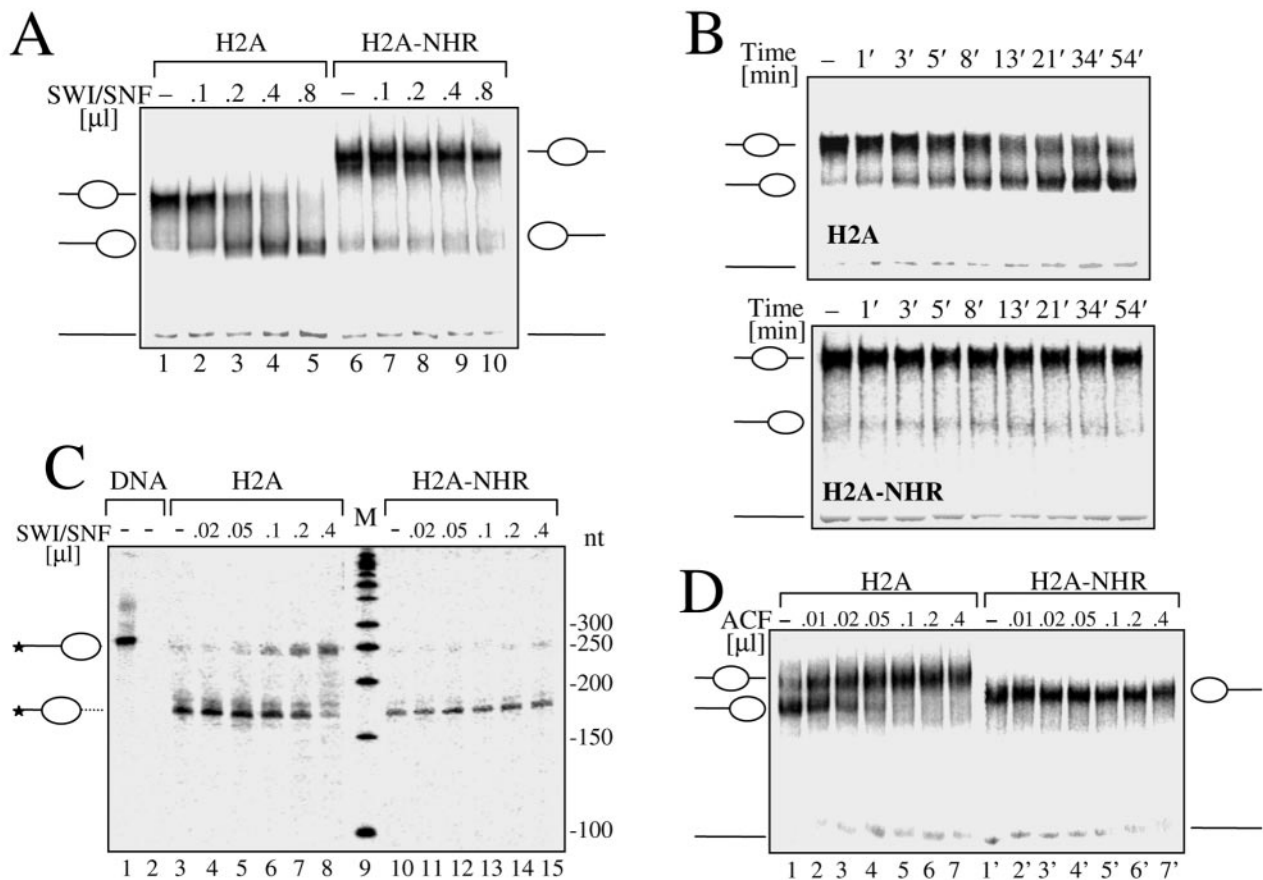


FIG. 6. The NHR of mH2A interferes with SWI/SNF and ACF nucleosome mobilization. Conventional H2A and NHR-H2A nucleosomes were reconstituted by using a 255-bp fragment containing the centrally positioned sequence 601 (19). (A) SWI/SNF mobilization of H2A and NHR-H2A nucleosomes. Both types of nucleosomes were incubated for 45 min at 30°C in the presence of increasing amounts of SWI/SNF and ATP. Mobilization of the histone octamer was revealed by EMSA on 5.5% native polyacrylamide gels. The center- and end-positioned nucleosomes and free DNA are indicated on the left part of the figure. (B) Time course of the SWI/SNF-induced mobilization of conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes. The nucleosome solutions were supplemented with ATP and 0.5 μl of SWI/SNF and incubated for the indicated time. The nucleosome mobilization was arrested by apyrase treatment, and the reaction mixtures were stored on ice until they were loaded on the gel. The center- and end-positioned nucleosomes and free DNA are indicated. (C) Mapping of H2A and H2A-NHR nucleosome positions after treatment with SWI/SNF. Both types of particles were incubated for 45 min at 30°C in the presence of increasing amounts of SWI/SNF as indicated. Then, the mobilization reaction was arrested by apyrase treatment, the samples were digested with exonuclease III, and the digestion products were run on an 8% denaturing gel. Stars indicate the radioactively labeled end of the DNA used for the reconstitution. (D) ACF is unable to mobilize H2A-NHR nucleosomes. Conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes were reconstituted by using a 241-bp fragment containing the end-positioned sequence 601. Reconstituted conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes were incubated for 45 min at 30°C with increasing amounts of ACF in the presence of ATP and run on a 5.5% native acrylamide gel. The center- and end-positioned nucleosomes and free DNA are indicated. nt, nucleotide; M, a marker for the molecular mass of the transcripts.

enzyme to the nucleosomal DNA. Similar perturbations in the DNase I footprinting were reported for mH2A (4) and H2ABbd (5) nucleosomes, and these perturbations were associated with the inability of the remodeling factors to remodel these variant particles, suggesting that the presence of H2A-NHR within the nucleosome could affect its remodeling.

The NHR domain of mH2A inhibits the remodeling of nucleosomes by SWI/SNF and ACF. In a recent study, we have demonstrated that the H2A-like domain was able to interfere with SWI/SNF-induced nucleosome mobilization (4). To test whether the NHR domain of mH2A is also able to affect nucleosome remodeling, nucleosomes containing the conventional H2A or the H2A-NHR histone were reconstituted on a 255-bp 5'-end-labeled 601 sequence, which, according to the reported data, should give rise mostly to centrally positioned

nucleosomes if conventional histones are used for reconstitution (19). Since both particles show different migration properties, it was important to map precisely the position of the variant H2A-NHR nucleosomal particle on this DNA fragment. Exonuclease III digestion of conventional (Fig. 6C, lane 3) and H2A-NHR (Fig. 6C, lane 10) nucleosomes clearly indicates that both nucleosomal particles are on the same starting central position on the 601 DNA fragment. The incubation of these centrally positioned nucleosomes with increasing amounts of SWI/SNF in the presence of ATP results in a very clear SWI/SNF-dependent sliding of conventional nucleosomes (Fig. 6A, lanes 2 to 5), whereas no mobilization of the H2A-NHR nucleosomes could be observed (Fig. 6, lanes 7 to 10). The kinetics of SWI/SNF-induced sliding of conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes (Fig. 6B) confirm this re-

sult. No mobilization of the H2A-NHR nucleosomes could be observed after a 54-min incubation period in the presence of 0.5 μ l of SWI/SNF (Fig. 6B; H2A-NHR), whereas most of the conventional H2A nucleosomes moved to the DNA ends (Fig. 6B; H2A). Exonuclease III digestion of nucleosomal templates after incubation with different amounts of SWI/SNF (Fig. 6C) confirms that the H2A-NHR nucleosomes are not mobilized by SWI/SNF (lanes 11 to 15), whereas the conventional H2A nucleosomes move to the DNA ends as expected (lanes 4 to 8). To further characterize the mobility properties of H2A-NHR nucleosomes, we used the ACF remodeling factor, which promotes histone octamer sliding from the end to the center of DNA. End-positioned conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes reconstituted on the end-positioned sequence 601 241-bp DNA fragment (19) were incubated with increasing amounts of ACF (Fig. 6D). Conventional nucleosomes were efficiently mobilized (Fig. 6C, lanes 1 to 7), whereas no sliding of the H2A-NHR nucleosomes could be detected (lanes 8 to 14).

We then tested whether H2A-NHR nucleosomes could be remodeled by SWI/SNF. Conventional H2A and H2A-NHR nucleosomes were formed using a radioactively end-labeled 152-bp DNA fragment containing the *Xenopus borealis* 5S RNA gene. The samples were incubated with increasing amounts of SWI/SNF and digested with DNase I (Fig. 7). The perturbation of the 10-bp cleavage pattern of the conventional H2A nucleosomes in the presence of SWI/SNF shows that these nucleosomes are efficiently remodeled (Fig. 7, lanes 1 to 6). In contrast, no perturbation of the cleavage pattern could be detected in the presence of SWI/SNF for the H2A-NHR nucleosome (Fig. 7, lanes 1 to 7), demonstrating that this particle cannot be remodeled by this complex. Therefore, the NHR domain of macroH2A interferes with nucleosome remodeling by SWI/SNF.

DISCUSSION

The data reported in this work demonstrate that *in vitro* mH2A is an efficient repressor of p300- and Gal4-VP16-dependent Pol II-activated transcription. We found that this property of mH2A resides mainly in its NHR domain. Indeed, our experiments show that mH2A and the fusion H2A-NHR were able to impede both Gal4-VP16-dependent Pol II-activated transcription and histone acetylation as well as nucleosome remodeling by SWI/SNF and ACF. Since the presence of mH2A was found to affect weakly the efficiency of Gal4-VP16 binding to the mH2A nucleosomes, the contribution of this effect to the repression of transcription is expected to be small. Bearing in mind that Gal4-VP16 is responsible for the recruitment of p300 to the promoter (2, 3, 22) and that Gal4-VP16 is able to invade mH2A nucleosomes, one could hypothesize that the NHR domain of mH2A is involved in the impediment of histone tail acetylation by p300. The mechanism of this impediment is presently unknown. NHR does not exhibit histone deacetylase activity (1), suggesting that the involvement of NHR in the impediment of histone acetylation is rather steric.

Interestingly, the H2A-like domain of mH2A does not affect p300- and Gal4-VP16-dependent Pol II-activated transcription (this work) but interferes with SWI/SNF nucleosome mobilization (4). Thus, mH2A exhibits some redundancy in function

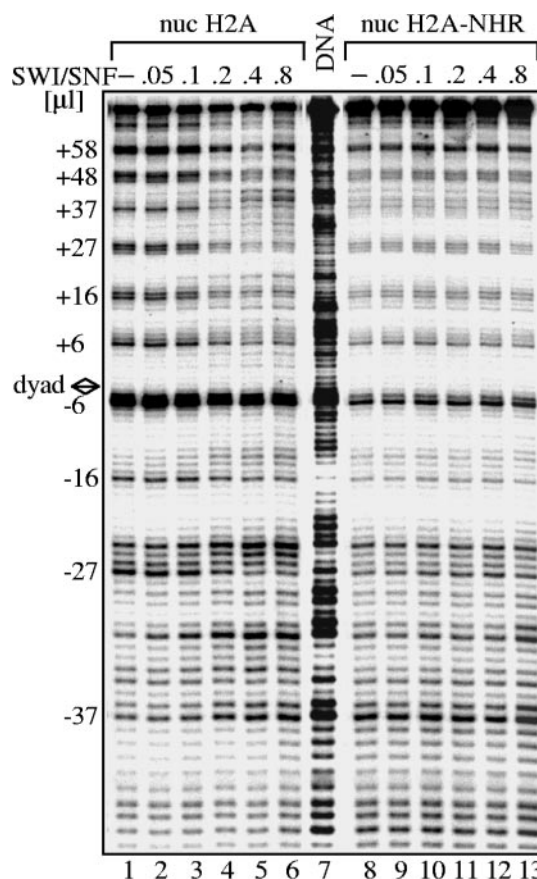


FIG. 7. The NHR of mH2A interferes with SWI/SNF nucleosome remodeling. Conventional H2A and H2A-NHR were reconstituted on a radioactively end-labeled 152-bp DNA fragment containing the *Xenopus borealis* 5S RNA gene. Increasing amounts of SWI/SNF were added to the nucleosome (nuc) solutions, and the remodeling reaction was carried out for 40 min at 30°C. After digestion with DNase I, DNA was extracted and subjected to an 8% sequencing gel. The position of the DNase I cleavage repeat is indicated on the left part of the figure. The DNase I digestion pattern of free DNA is shown in lane 7. The diamond designates the dyad axis of the nucleosome.

with respect to nucleosome remodeling since each individual domain of mH2A (either H2A-like or NHR, when fused to H2A) was able to impede nucleosome remodeling.

We speculate that *in vivo* mH2A could contribute to the repression of transcription by affecting at least two different pathways: histone acetylation and chromatin remodeling. Since these two events, i.e., histone acetylation and nucleosome remodeling, are essential for the activation of transcription, it appears that mH2A could be viewed as a major stopper of transcriptional activation. Interestingly, the efficiencies of Pol II passage through conventional H2A, mH2A, and fusion H2A-NHR nucleosomes were essentially the same for the three types of particles. This suggests that the presence of a positioned single mH2A nucleosome on the promoter of specific genes could be sufficient to impede transcription activation by repressing the initiation of transcription.

Our data suggest that the interference of the NHR domain with histone acetylation through steric hindrance would be one of the reasons for this repression. In addition, as shown in a

recent report, NHR specifically interacts with HDAC1,2 (11). Consequently, the NHR domain could interfere with the ability of HAT to acetylate the histones of the promoter associated with the macroH2A nucleosome, and in addition, it could recruit histone deacetylase, which further abrogates the possibility of histone acetylation.

One cannot exclude, however, that the presence of several mH2A nucleosomes, some of which reside on the gene coding region, would affect transcription more efficiently. Indeed, the structure of chromatin domains which contain mH2A could be distinct from the 30-nm fiber canonical structure, which in turn might be more refractive to transcription.

Our finding that mH2A behaves as a major stopper of Pol II activation of transcription in vitro raises several questions, since to fulfill such function in vivo, mH2A should be localized specifically on the promoter of transcriptionally inactive genes. The presence of mH2A on such genes would repress transcription. For the transcriptional activation of these genes, the repressive function of mH2A should be eliminated. This could be achieved by the specific removal of mH2A from the promoter and its replacement by conventional H2A by an mH2A-specific histone chaperone as recently described for the histone variant H2A.Z (28). The identification of genes for which expression is controlled by mH2A as well as the understanding of the mechanism of specific deposition and removal of mH2A from these genes remains a challenge for future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, INSERM, Région Rhône-Alpes, and grants from the Ministère de la Recherche (ACI Biologie cellulaire Moléculaire et Structurale, BCM0070, and ACI Interface Physique-Chimie-Biologie: Dynamique et réactivité des Assemblages Biologiques [DRAB], 2004, no. 04 2 136, ANR Projet no. NT05-1_41978).

D.A. is on leave from the Institute of Solid State Physics, BAS, Sofia, Bulgaria.

REFERENCES

- Allen, M. D., A. M. Buckle, S. C. Cordell, J. Lowe, and M. Bycroft. 2003. The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J. Mol. Biol.* **330**:503–511.
- An, W., V. B. Palhan, M. A. Karymov, S. H. Leuba, and R. G. Roeder. 2002. Selective requirements for histone H3 and H4 N termini in p300-dependent transcriptional activation from chromatin. *Mol. Cell* **9**:811–821.
- An, W., and R. G. Roeder. 2003. Direct association of p300 with unmodified H3 and H4 N termini modulates p300-dependent acetylation and transcription of nucleosomal templates. *J. Biol. Chem.* **278**:1504–1510.
- Angelov, D., A. Molla, P. Y. Perche, F. Hans, J. Cote, S. Khochbin, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* **11**:1033–1041.
- Angelov, D., A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C. M. Doyen, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2004. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J.* **23**:3815–3824.
- Arents, G., R. W. Burlingame, B. C. Wang, W. E. Love, and E. N. Moudrianakis. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10148–10152.
- Bassing, C. H., H. Suh, D. O. Ferguson, K. F. Chua, J. Manis, M. Eckersdorff, M. Gleason, R. Bronson, C. Lee, and F. W. Alt. 2003. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**:359–370.
- Celeste, A., S. Difilippantonio, M. J. Difilippantonio, O. Fernandez-Capello, D. R. Pilch, O. A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W. M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**:371–383.
- Chadwick, B. P., C. M. Valley, and H. F. Willard. 2001. Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res.* **29**:2699–2705.
- Chadwick, B. P., and H. F. Willard. 2001. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* **152**:375–384.
- Chakravarthy, S., S. K. Gundimella, C. Caron, P. Y. Perche, J. R. Pehrson, S. Khochbin, and K. Luger. 2005. Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* **25**:7616–7624.
- Costanzi, C., and J. R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**:599–601.
- Costanzi, C., and J. R. Pehrson. 2001. MACROH2A2, a new member of the MACROH2A core histone family. *J. Biol. Chem.* **276**:21776–21784.
- Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman, and C. L. Peterson. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**:53–60.
- Dhillon, N., and R. T. Kamakaka. 2000. A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell* **6**:769–780.
- Gautier, T., D. W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio, and S. Dimitrov. 2004. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* **5**:715–720.
- Hayes, J. J., and K. M. Lee. 1997. In vitro reconstitution and analysis of mononucleosomes containing defined DNAs and proteins. *Methods* **12**:2–9.
- Ito, T., M. E. Levenstein, D. V. Fyodorov, A. K. Kutach, R. Kobayashi, and J. T. Kadonaga. 1999. ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev.* **13**:1529–1539.
- Kagalwala, M. N., B. J. Glaus, W. Dang, M. Zofall, and B. Bartholomew. 2004. Topography of the ISW2-nucleosome complex: insights into nucleosome spacing and chromatin remodeling. *EMBO J.* **23**:2092–2104.
- Karras, G. I., G. Kustatscher, H. R. Buhecha, M. D. Allen, C. Pugieux, F. Sait, M. Bycroft, and A. G. Ladurner. 2005. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* **24**:1911–1920.
- Kireeva, M. L., W. Walter, V. Tchernajenko, V. Bondarenko, M. Kashlev, and V. M. Studitsky. 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* **9**:541–552.
- Kundu, T. K., V. B. Palhan, Z. Wang, W. An, P. A. Cole, and R. G. Roeder. 2000. Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Mol. Cell* **6**:551–561.
- Kustatscher, G., M. Hothorn, C. Pugieux, K. Scheffzek, and A. G. Ladurner. 2005. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:624–625.
- Ladurner, A. G. 2003. Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* **12**:1–3.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**:251–260.
- Luger, K., T. J. Rechsteiner, and T. J. Richmond. 1999. Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* **119**:1–16.
- Mermoud, J. E., C. Costanzi, J. R. Pehrson, and N. Brockdorff. 1999. Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J. Cell Biol.* **147**:1399–1408.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W. H. Wu, S. Sen, and C. Wu. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**:343–348.
- Pehrson, J. R., and V. A. Fried. 1992. macroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**:1398–1400.
- Perche, P. Y., C. Vourc'h, L. Konecny, C. Souchier, M. Robert-Nicoud, S. Dimitrov, and S. Khochbin. 2000. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr. Biol.* **10**:1531–1534.
- Rangasamy, D., I. Greaves, and D. J. Tremethick. 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:650–655.
- Santisteban, M. S., T. Kalashnikova, and M. M. Smith. 2000. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* **103**:411–422.
- Thastrom, A., P. T. Lowary, H. R. Widlund, H. Cao, M. Kubista, and J. Widom. 1999. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.* **288**:213–229.

Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes

Dimitar Angelov^{1,2}, Vladimir A Bondarenko³, Sébastien Almagro^{1,2}, Hervé Menoni^{1,2}, Fabien Mongéard^{1,2}, Fabienne Hans⁴, Flore Mietton⁴, Vasily M Studitsky³, Ali Hamiche⁵, Stefan Dimitrov^{2,4,*} and Philippe Bouvet^{1,2,*}

¹Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS-UMR 5161/INRA 1237/IFR128 Biosciences, Lyon-Gerland, France, ²Laboratoire Joliot-Curie, Lyon, France, ³Department of Pharmacology, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Piscataway, NJ, USA, ⁴Institut Albert Bonniot, INSERM U309, La Tronche Cedex, France and ⁵Institut André Lwoff, CNRS UPR 9079, Villejuif, France

Remodeling machines play an essential role in the control of gene expression, but how their activity is regulated is not known. Here we report that the nuclear protein nucleolin possesses a histone chaperone activity and that this factor greatly enhances the activity of the chromatin remodeling machineries SWI/SNF and ACF. Interestingly, nucleolin is able to induce the remodeling by SWI/SNF of macroH2A, but not of H2ABbd nucleosomes, which are otherwise resistant to remodeling. This new histone chaperone promotes the destabilization of the histone octamer, helping the dissociation of a H2A–H2B dimer, and stimulates the SWI/SNF-mediated transfer of H2A–H2B dimers. Furthermore, nucleolin facilitates transcription through the nucleosome, which is reminiscent of the activity of the FACT complex. This work defines new functions for histone chaperones in chromatin remodeling and regulation of transcription and explains how nucleolin could act on transcription.

The EMBO Journal advance online publication, 6 April 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7601046

Subject Categories: chromatin & transcription

Keywords: macroH2A and H2ABbd histone variants; nucleolin; nucleosome; remodeling; transcription

Introduction

Packaging of DNA into nucleosomes strongly affects the interaction of nuclear factors with DNA (Beato and Eisfeld, 1997). The cell uses histone modifications, ATP-dependant chromatin remodeling complexes and incorporation of histone variants to overcome the nucleosome barrier (Strahl

and Allis, 2000; Becker and Horz, 2002; Henikoff and Ahmad, 2005).

Histone variants can affect gene expression in many ways. For example, H2A.Z appears to mark the end of both active and inactive genes (Raisner *et al*, 2005). H2A.Z localizes to the promoters of inactive genes and is subsequently lost from these promoters upon induction, indicating that histone deposition and removal is likely to play an important role in transcriptional activation or repression (Larochelle and Gaudreau, 2003; Vicent *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2005). H2AX, another histone variant belonging to the H2A family, participates in the maintenance and stability of the genome and is involved in the development of tumours (Bassing and Alt, 2004). MacroH2A (Pehrson and Fried, 1992) and H2ABbd (Chadwick and Willard, 2001) are unusual histone variants. They differ from conventional histones mainly in their C-terminal tails that diverge in both length and sequence. The preferential localization of macroH2A on the inactive X chromosome (Costanzi *et al*, 2000) suggests that this variant histone might be involved in some aspect of the X-inactivation process. The presence of macroH2A interfered with SWI/SNF and ACF nucleosome remodeling (Angelov *et al*, 2003; Doyen *et al*, 2006). *In-vitro* and *ex-vivo* experiments showed that macroH2A inhibited transcription initiation and histone acetylation (Perche *et al*, 2000; Doyen *et al*, 2006). Interestingly, the Non-Histone Region (NHR) of macroH2A appeared to be essential for the inhibition of both processes (Doyen *et al*, 2006). In contrast, H2ABbd, which seemed to be associated with transcriptionally active chromatin (Chadwick and Willard, 2001; Angelov *et al*, 2004b), is less tightly bound to the nucleosomal structure compared to conventional H2A (Gautier *et al*, 2004). A major goal is to understand how the histone variants are assembled into chromatin.

In contrast to the assembly of bulk chromatin that is coupled to replication, histone variants are generally assembled into nucleosomes in a replication-independent manner, and factors involved in this mechanism of deposition begin to be unravelled. These factors point to mechanisms related to chromatin remodeling machineries and histone chaperones (Henikoff and Ahmad, 2005). In *Drosophila*, Swr1, a Swi2/Snf2-related adenosine triphosphatase of the SWI/SNF family of ATP-dependant chromatin remodelers, efficiently replaces conventional histone H2A with histone H2A.Z in nucleosome arrays (Mizuguchi *et al*, 2004). The replication-coupled assembly complex CAF-1 copurifies with H3, whereas the histone chaperone HIRA appears to be involved in the replication-independent deposition of H3.3 in active chromatin domains (Tagami *et al*, 2004). These data raise the possibility that specific histone chaperones participate in histone variant deposition.

Apart from their role in histone deposition, histone chaperones are emerging as a class of proteins involved in many aspects of chromatin dynamics (Loyola and Almouzni, 2004). TAF-1, a histone chaperone related to the NAP-1 protein, was recently shown to stimulate transcription from chromatin

*Corresponding authors. S Dimitrov, Institut Albert Bonniot, INSERM U309, La Tronche, France. Tel.: +33 4 76 54 94 73; Fax: +33 4 76 54 95 95; E-mail: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr or P Bouvet, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS-UMR 5161/INRA 1237/IFR128, Biosciences Lyon-Gerland, France. Tel./Fax: +33 4 72 72 80 16; E-mail: pbouvet@ens-lyon.fr

Received: 8 December 2005; accepted: 21 February 2006

templates (Gamble *et al*, 2005). The antisilencing function 1 protein Asf1 was required for activation of the *PHO5* and *PHO8* genes through chromatin disassembly (Adkins *et al*, 2004). It also synergizes with CAF-1 in histone deposition during replication (Tyler *et al*, 1999). Altogether, these results indicate that histone chaperones play more active roles in chromatin dynamics and gene regulation than previously thought.

Here we address the function of nucleolin, a major protein of the nucleolus that is however also found in other compartments of the nucleus. Nucleolin has been involved in several aspects of ribosome biogenesis (Tuteja and Tuteja, 1998; Ginisty *et al*, 1999; Srivastava and Pollard, 1999) and in the regulation of transcription of many genes, but the suggested mechanisms of action of nucleolin remained speculative (Bouche *et al*, 1984; Egyhazi *et al*, 1988; Hanakahi *et al*, 1997; Ying *et al*, 2000; Gabellini *et al*, 2002; Grinstein *et al*, 2002; Roger *et al*, 2002). We show here that nucleolin is a histone chaperone that is able to drastically increase the remodeling efficiency of the chromatin remodelers SWI/SNF and ACF. Interestingly, nucleolin has the capacity to promote the remodeling of nucleosomes containing macroH2A, but not H2ABbd histone variant, which are otherwise resistant to remodeling. Furthermore, nucleolin was able to remove H2A–H2B dimers from assembled nucleosomes. Finally, nucleolin is acting as a FACT-like protein helping the passage of the RNA polymerase II through the nucleosomal particles. This work defines new functions for histone chaperones in chromatin remodeling and regulation of transcription.

Results

Nucleolin increases SWI/SNF and ACF activities

Nucleolin, which possesses an HMG-like domain and an acidic tail, associates with chromatin (Olson and Thompson, 1983) and is involved in the regulation of transcription (Ginisty *et al*, 1999). The recent report that the chromatin-associated protein HMGB1 was able to facilitate ACF/CHRAC-dependent nucleosome mobilization (Bonaldi *et al*, 2002) prompted us to test if nucleolin was able to affect the activities of remodeling machineries on nucleosomes. Nucleosomes were reconstituted on a radioactively end-labelled 601 positioning sequence (Lowary and Widom, 1998) using recombinant histone proteins. Centrally positioned nucleosomes were used in nucleosome mobilization assay. The nucleosomes were incubated with increasing amount of SWI/SNF in the absence or presence of nucleolin and then analysed by EMSA (Figure 1A). In the absence of nucleolin, increasing amount of SWI/SNF resulted in an efficient mobilization of the nucleosomes and the formation of end-positioned nucleosomes (Figure 1A, lanes 1–5). This was also confirmed by Exo III mapping (data not shown). Importantly, nucleolin (Figure 1A, lanes 7–10) significantly increased the amount of SWI/SNF-mobilized nucleosomes. To determine if the facilitated sliding was dependent on the amount of nucleolin, we then added increasing amounts of nucleolin to reacting mixtures containing a limited amount of SWI/SNF (Figure 1B). In the presence of a low amount of SWI/SNF and in the absence of nucleolin (lane 2), only a low level of nucleosome sliding was observed. The addition of increasing amount of nucleolin (lanes 3–7) gradually

increases the sliding of nucleosome to an end position, indicating that in these conditions nucleolin is limiting. We next studied whether nucleolin would also affect the kinetics of nucleosome sliding induced by SWI/SNF. Nucleosomes were incubated with a low level of SWI/SNF, and the reaction was stopped at the indicated times (Figure 1C). The low level of SWI/SNF used in this experiment produces only a weak sliding of the nucleosomes after an incubation time of 16 min (Figure 1C, lanes 1–5). In the presence of 1 pmol of nucleolin, we found that the amount of slid (end-positioned) nucleosomes measured after 16 min of incubation in the control experiment was already observed after 2 min in the presence of nucleolin (compare lane 7 with lane 5). This suggests that nucleolin may induce a high-velocity nucleosome mobilization by SWI/SNF.

To test if the effect of nucleolin depends on the nature of the remodeler, we have also investigated how the presence of nucleolin affects the nucleosome remodeling by ACF. In contrast to SWI/SNF, ACF generates movement of nucleosomes from DNA fragment ends to more central positions (Eberharter *et al*, 2001). Nucleosomes were reconstituted on an end-positioned 601 DNA sequence and then a fixed amount of nucleolin was added to an increasing amount of ACF (Figure 1D). In the presence of limiting amount of ACF, only a relatively weak mobilization to central position is observed (Figure 1D, lanes 2–5). Addition of nucleolin significantly increases the mobilization of the nucleosomes (Figure 1D, lanes 7–10), and this is the consequence of ACF action, since in the absence of ATP, no sliding was observed (data not shown). Altogether, these experiments show that nucleolin increases not only the kinetics of nucleosome sliding but also the amount of slid nucleosomes in the presence of limiting amount of remodeling machineries and this, independent of the remodeler used.

To further characterize the activity of nucleolin on the remodeling factor SWI/SNF, the nucleosome remodeling was analysed by DNase I footprinting (Figure 2A). Conventional nucleosomes reconstituted on a 152 bp 5S DNA fragment were incubated with increasing amount of SWI/SNF in the absence (lanes 1–6) or presence of 1 pmol of nucleolin (lanes 8–12). The DNase I specific nucleosomal cleavage pattern is progressively perturbed in the presence of increasing amount of SWI/SNF (lanes 1–6). In the presence of nucleolin (lanes 8–12), the perturbed DNase I cleavage pattern is observed at a very low level of SWI/SNF. With this low level of SWI/SNF, no remodeling was observed in the control experiment (compare lane 12 with lane 2), indicating that nucleolin increases SWI/SNF activity by a factor of 8–10, in agreement with the mobilization assay shown previously (Figure 1A). The presence of nucleolin alone (Figure 2A, lane 8) or nucleolin in the presence of SWI/SNF but without ATP (Figure 2B, lane 2) has no detectable effect on the DNase I footprinting pattern of nucleosomal DNA, suggesting that the binding of nucleolin to nucleosome is very weak or transient.

Previous experiments have shown that the incorporation of the histone variants macroH2A and H2ABbd within the nucleosomal particle prevents the efficient remodeling of these variant nucleosomes by SWI/SNF and ACF (Angelov *et al*, 2003, 2004b). To see if nucleolin was able to overcome the repressive effect of these variant histones on nucleosome remodeling, nucleosomes were reconstituted on a 248-bp DNA fragment from the mouse ribosomal promoter (Langst

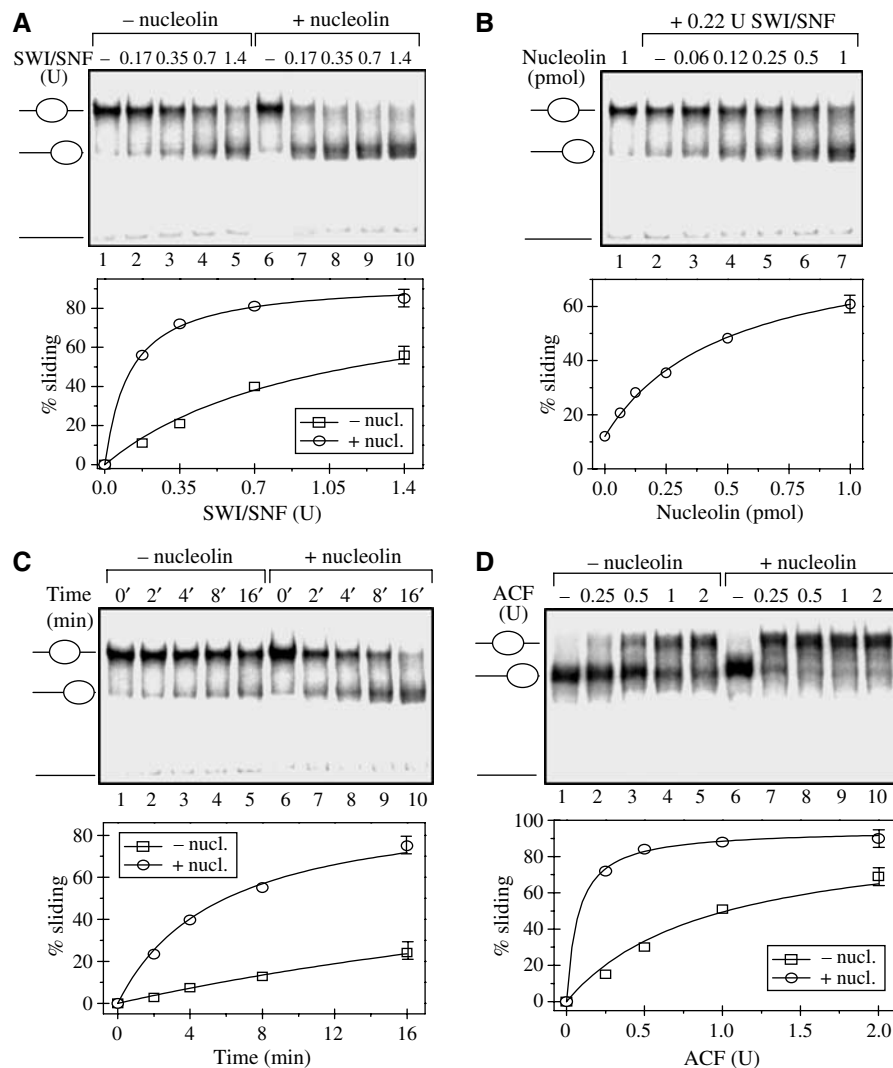


Figure 1 Nucleolin stimulates SWI/SNF and ACF-mediated nucleosome sliding. **(A)** Centrally positioned nucleosomes at the 601 sequence were incubated for 45 min at 30°C with an increasing amount of SWI/SNF in the absence (lanes 1–5) or presence of 1 pmol of nucleolin (lanes 6–10). SWI/SNF (1 U) was defined as the amount of SWI/SNF required to mobilize 50% of input nucleosomes (50 ng; about 0.2 pmol) at 30°C during 45 min. Reactions were stopped by the addition of competitor DNA and apyrase. Nucleosome positions were then analysed by electrophoresis. The lower part of each panel shows the quantification of the results. **(B)** Nucleosomes positioned at the central position on the 601 sequence were incubated with 0.22 U of SWI/SNF and increasing amounts of nucleolin. **(C)** Time course of nucleosome sliding in the absence (lanes 1–5) or presence of nucleolin (lanes 6–10). Nucleosomes positioned at the central position on the 601 sequence were incubated with 0.22 U of SWI/SNF and 1 pmol of nucleolin. **(D)** Nucleosomes positioned at an end-position of the 601 sequence were incubated with increasing amount of ACF in the absence (lanes 1–5) or presence (lanes 6–10) of 1 pmol of nucleolin. After incubation for 45 min at 30°C, the reaction was stopped by adding competitor DNA and apyrase and positions were analysed by electrophoresis.

et al, 1999) with the variant histones macroH2A and H2ABbd in place of the conventional H2A protein. These particles were used in mobilization assay (Figure 2C and D). As described previously (Angelov *et al*, 2003, 2004b), the presence of the macroH2A or H2ABbd histone variants strongly blocks the SWI/SNF mobilization of these variant nucleosomes (Figure 2C and D, lanes 1–5). However, in the presence of nucleolin, an efficient sliding of the macroH2A variant nucleosome is observed (Figure 2C, lanes 7–10), whereas no mobilization of the H2ABbd nucleosomes was detected (Figure 2D, lanes 7–10). Interestingly, the mobilization of macroH2A nucleosomes was nearly the same as for conventional particles in the absence of nucleolin (compare Figure 2C, lanes 7–10, with Figure 1A, lanes 1–5). DNase I footprinting, performed on nucleosomes after incubation

with SWI/SNF only or in the presence of nucleolin, indicated also that the macroH2A nucleosomes become fully competent for remodeling by SWI/SNF in the presence of nucleolin, whereas H2ABbd nucleosomes remain unchanged (data not shown). Nucleolin is therefore able to induce sliding and remodeling of macroH2A, but not H2ABbd nucleosomes.

Nucleolin promotes the binding of SWI/SNF to the nucleosome

The stimulatory effect of nucleolin could be the consequence of interactions of nucleolin with the remodeling machinery, with the nucleosomal particle, or both. The DNase I cleavage patterns of nucleosomes performed in the presence or absence of nucleolin are identical (compare lane 8 with lane 1 of Figure 2A). This does not, however, exclude that

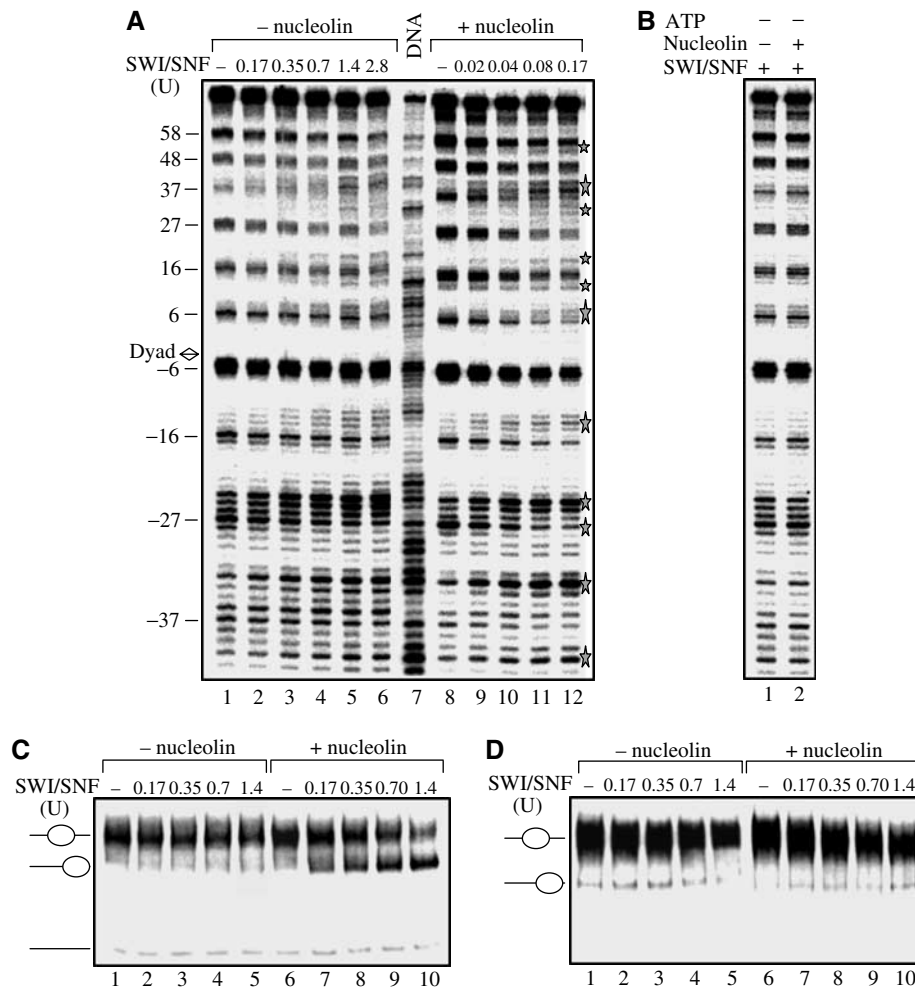


Figure 2 Nucleolin stimulates nucleosome remodeling. **(A)** Nucleosomes reconstituted on a ^{32}P -end labelled 152 bp 5S DNA fragment were incubated with increasing amount of SWI/SNF in the absence (lanes 1–6) or presence (lanes 8–12) of 1 pmol of nucleolin for 45 min at 30°C. The reaction was stopped by addition of 1 μg of competitor DNA and apyrase and the remodeling was visualized by DNase I footprinting. Lane 7 shows the pattern of DNase I digestion of free DNA. The stars indicate the major changes within the nucleosome structure. **(B)** The stimulatory effect of nucleolin on nucleosome remodeling is dependant on the presence of ATP. DNase I footprinting (in the absence of ATP) in the presence of either 0.7 U of SWI/SNF alone (lane 1) or of 0.7 U of SWI/SNF and 1 pmol of nucleolin (lane 2). No competitor DNA was added prior to DNase I digestion. Note that nucleolin alone (panel A, lane 8) or in the presence of inactive SWI/SNF (without ATP) has no effect on the DNase I footprinting pattern of 5S DNA. Panels C, D: Nucleolin stimulates sliding of macroH2A nucleosomes, but not H2ABbd nucleosomes. **(C)** Nucleosomes were reconstituted on the 248 bp DNA fragment from ribosomal promoter (Langst *et al*, 1999) with conventional H2B, H3, H4, and macro-H2A histones. Centrally positioned nucleosomes were gel purified and incubated with increasing amount of SWI/SNF in the absence (lanes 1–5) or presence (lanes 6–10) of 1 pmol of nucleolin. **(D)**. Same as in panel C, except that H2ABbd was used for nucleosome reconstitution.

nucleolin interacts with nucleosomal DNA. Although nucleolin binds efficiently to free DNA fragment (data not shown), only a very weak interaction is observed when this DNA is reconstituted in nucleosomal particles (Figure 3A, lanes 1–5). In the presence of SWI/SNF, nucleosomes are retained in the wells because of the large size of the SWI/SNF complex (Cote *et al*, 1998). Interestingly, the level of shifted nucleosome by binding to SWI/SNF increases with the amount of nucleolin (Figure 3A, lanes 6–10). Nucleolin was not detected within these shifted complexes (data not shown), indicating that this shift is the consequence of SWI/SNF binding to the nucleosome particles. In addition, the presence of nucleolin did not affect the ATPase activity of the SWI/SNF (Figure 3B). We conclude that the increase of nucleosome remodeling by SWI/SNF is not the consequence of an increase in ATPase activity, but rather that of an increased accessibility of the nucleosomal particles to the remodeling machinery.

Nucleolin increases the SWI/SNF-dependent transfer of H2A–H2B dimers and possesses histone chaperone activity

SWI/SNF is also able to induce the transfer of H2A–H2B dimers to H3–H4 tetramers (Bruno *et al*, 2003). Since nucleolin was able to increase the efficiency of SWI/SNF on the mobilization and remodeling of nucleosomal particles, it was interesting to determine if nucleolin was also able to promote the transfer of H2A–H2B dimers by SWI-SNF (Figure 4A). We have reconstituted nucleosomes onto a nonlabelled 601 DNA fragment using ^{32}P -radiolabelled H2B (H2B*) or H2A (H2A*) and the remaining nonlabelled histones. In addition, we have reconstituted (H3–H4)₂ tetramer particles on a nonlabelled 147 bp 5S DNA fragment using nonlabelled histones. Centrally positioned H2B* (Figure 4A, lanes 1–5) or H2A* (Figure 4A, lanes 6–10) nucleosomes were used in the transfer experiments. These nucleosomes, in the presence

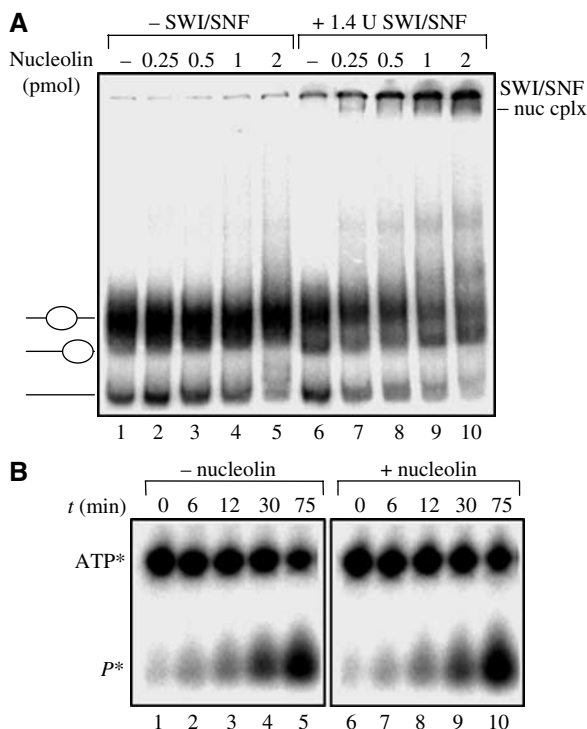


Figure 3 Nucleolin promotes the binding of SWI/SNF to the nucleosome. **(A)** Nucleosomes were reconstituted on 248 bp ribosomal DNA fragment and incubated with increasing amount of nucleolin in the absence (lanes 1–5) or presence (lanes 6–10) of 1.4 U of SWI/SNF. In these experiments no DNA competitor was added after the sliding reaction in order to detect the interaction of nucleolin and SWI/SNF with the nucleosomal template. **(B)** Nucleolin does not interfere with the ATPase activity of SWI/SNF. The kinetics of the SWI/SNF ATP hydrolysis were analysed on 15% denaturing polyacrylamide gels in the presence (lanes 6–10) or absence (lanes 1–5) of nucleolin.

or absence of nucleolin, were mixed with the nonlabelled tetrameric (H3–H4)₂ particles in solution containing ATP and SWI/SNF and the transfer reaction was carried out at 23°C. Under these conditions, the incubation of particles containing radioactively labelled H3 in the presence of nonlabelled (H3–H4)₂ tetrameric particles shows no SWI–SNF-dependent transfer of label in the absence or presence of nucleolin demonstrating a lack of transfer of the (H3–H4)₂ tetramer (data not shown). In contrast, upon incubation of the centrally positioned H2A*–H2B- or H2A–H2B*-labelled nucleosomes with SWI/SNF in the presence of unlabelled (H3–H4)₂ tetramer particle, the histone octamer is efficiently mobilized towards the ends of the nucleosomal DNA and an efficient transfer of the labelled H2A–H2B dimer is observed (Figure 4A, lanes 4 and 9). Interestingly, an efficient transfer is also observed in the presence of nucleolin only (Figure 4A, lanes 3 and 8) and this transfer is clearly dependent on the amount of nucleolin present in the reaction mixture (Figure 4B).

The presence of long acidic stretches within the N-terminal domain of nucleolin is reminiscent of the acidic domain found in histone chaperones like nucleoplasmin and nucleophosmin (Loyola and Almouzni, 2004). These acidic domains could bind basic proteins like histones and mediate nucleosome assembly. We next tested whether nucleolin was able to assist the deposition of histones on DNA and to assemble

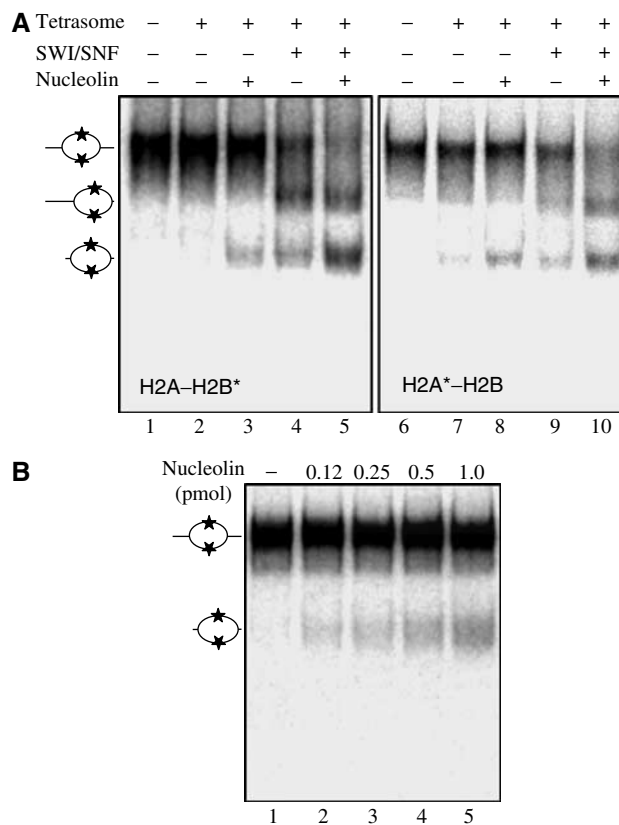


Figure 4 Nucleolin stimulates the SWI/SNF-mediated transfer of H2A–H2B dimers. **(A)** H2B or H2A was radioactively labelled (H2B* and H2A*, indicated by the star on the sketch of the nucleosome) and used to reconstitute centrally positioned nucleosomes on the unlabelled 601 DNA fragment. H3–H4 tetrameric particles were reconstituted using the 147 bp fragment containing the *X. borealis* 5S gene. H2B* (lanes 1–5) and H2A* (lanes 6–10) nucleosomes were incubated for 60 min at 23°C in the presence of two-fold of tetrameric particles. In the presence of tetramer but without SWI/SNF and nucleolin (lanes 2 and 7), no visible transfer of H2A–H2B* and H2A*–H2B dimers is detectable. In the presence of nucleolin (lanes 3 and 8) or SWI/SNF (0.7 U, lane 4 and 0.35 U, lane 9), a significant amount of H2A–H2B* and H2A*–H2B dimers is transferred to the tetrameric particle. This transfer is higher in the presence of nucleolin and SWI/SNF (lanes 5 and 10); lane 1, control nucleosomes. **(B)** H2A–H2B* transfer efficiency depends on the amount of nucleolin. H2B*-labelled 601 nucleosomes were incubated with tetrasomes and increasing amount of nucleolin (lanes 2–5); no SWI/SNF was present in the reaction.

nucleosomes. Labelled 5S DNA was incubated with an increasing amount of equimolar mixture of core histones for 1 h, then the deposition of histone onto DNA was analysed by EMSA (Figure 5A). Under these conditions (in the absence of nucleolin), very low amount of histone deposition was observed (lanes 1–3). However, in the presence of nucleolin, a significant deposition of histones was visualized by EMSA (lanes 4–6). This shifted complex comigrates with nucleosomal particles reconstituted by dialysis (lane 13), and DNase I cleavage pattern of this complex shows a clear 10 bp pattern characteristic for nucleosomal particles (Figure 5C). The nucleolin-mediated deposition of histones on DNA is similar to what could be obtained with the well-characterized histone chaperone nucleoplasmin (lanes 7–9) and NAP-1 (lanes 10–12). To determine if the amount of nucleolin was the limiting factor for the deposition of histones on DNA, we first

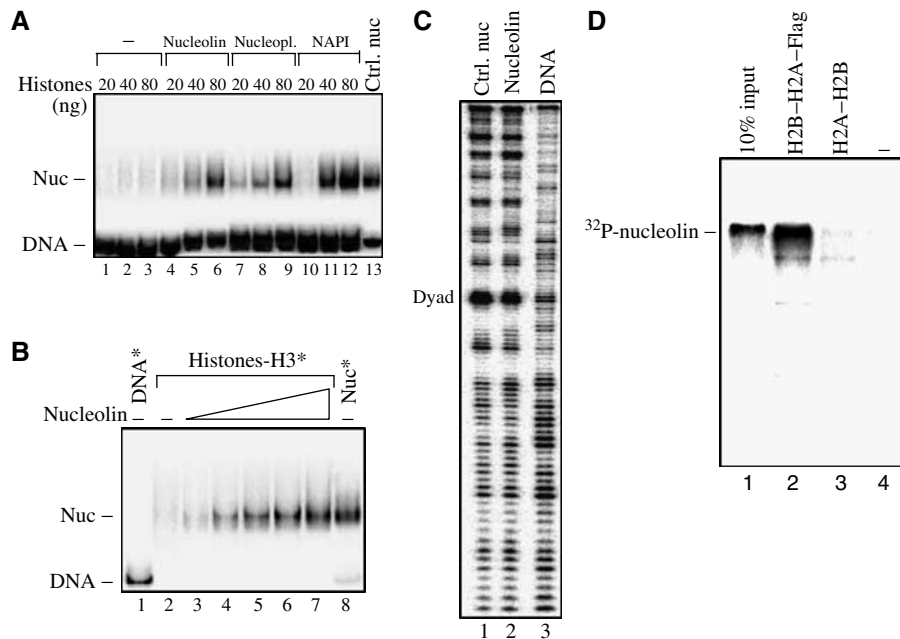


Figure 5 Nucleolin is a histone chaperone. **(A)** Increasing amount of histones pre-incubated with equimolar amounts of proteins as indicated were incubated with 20 ng of labelled 5S DNA fragment for 1 h at 30°C. In lane 13, nucleosomes reconstituted by dialysis were loaded on the gel to show the migrating position of nucleosome. In lanes 1–3, no exogenous protein was added and low amounts of histones are deposited onto DNA. **(B)** Nucleosome formation is dependent on the amount of nucleolin. Increasing amounts of nucleolin (lanes 4–7) were pre-incubated with 80 ng of H2A, H2B, H4, and labelled H3, and then unlabelled 5S DNA was added to the reaction mixture. Lane 8, nucleosome reconstituted by salt dialysis. **(C)** DNase I footprinting shows that the particles formed in the presence of nucleolin are *bona fide* nucleosomes. Particles formed on the 5S DNA sequence in the presence of nucleolin were digested with DNase I and separated on a native gel. The bands were excised and the histone–DNA complexes were eluted and analysed by sequencing gel electrophoresis (lane 2). Lanes 1 and 3 show the DNase I cleavage pattern of nucleosomes reconstituted by salt dialysis and that of naked DNA, respectively. **(D)** Interaction of nucleolin with the H2A–H2B dimer. Anti-Flag beads were pre-incubated without (lane 4) or with H2A–H2B dimer (lane 3) or with Flag-H2A–H2B dimer (lane 2), then ³²P-labelled nucleolin was added to the beads. After three washes, the beads were heated to 95°C, then loaded on a 12% SDS-PAGE. Lane 1 contains 10% of input ³²P-labelled nucleolin.

incubated a fixed amount of histones (containing labelled H3) with an increasing amount of nucleolin and then added unlabelled 5S DNA to the reaction (Figure 5B). We found that the amount of nucleosomal particles formed is dependant on the amount of nucleolin present in the assay (lanes 3–7). Histone chaperones must interact directly with histone proteins to fulfill their chromatin function. With this in mind, we next tested if nucleolin was able to interact directly with core histones H2A–H2B (Figure 5D). Flag-H2A was used to assemble H2A–H2B dimers, which were then incubated with ³²P-labelled full-length nucleolin. Indeed, full-length nucleolin could be pulled down efficiently with Flag-H2A–H2B dimer, while the beads alone did not pull down any protein (Figure 5D, compare lane 2 with lanes 3 and 4). All these data demonstrate that nucleolin exhibits a histone chaperone activity.

The N-terminal acidic domain of nucleolin is necessary but not sufficient, for the chaperone activity

Analysis of the amino-acid sequence of nucleolin reveals the presence of three different structural domains (Figure 6A). The N-terminal domain is made up of highly acidic regions interspersed with basic sequences and contains an HMG-like domain. The central domain contains four RNA-binding domains (RBD), and the C-terminal domain called GAR or RGG domain is rich in glycine, arginine and phenylalanine residues. To determine whether the chaperone activity and the activation of the remodeling machineries could be attrib-

uted to a single domain of nucleolin, recombinant proteins corresponding to either the N-terminal domain (N-ter) or the RBD domain (p50) were produced and purified to homogeneity (Figure 6B). The data show that none of the nucleolin domains possess chaperone activity (Figure 6C), indicating that this activity, as for the NAP-1 protein (Fujii-Nakata *et al*, 1992), is not the mere consequence of the presence of acidic region. In addition, none of the domains was able to activate SWI/SNF-dependant sliding to a level comparable to wild-type nucleolin (compare Figures 1 and 6D). However, a weak, but reproducible 1.5–2-fold activation of SWI/SNF was observed with the N-ter domain (compare lanes 7–8 to lanes 2–3 of Figure 6D), which is very similar to the level of activation observed with the HMGB1 protein (Bonaldi *et al*, 2002). Furthermore, the p50 domain interacts strongly with both free DNA and nucleosomal particles (Figure 6E, lanes 6–9), whereas the N-ter domain (lanes 10–13), like the full-length protein (lanes 2–4), does not bind significantly. These data demonstrate that the function of nucleolin as histone chaperone and in SWI/SNF activation needs the integrity of the full-length protein.

Nucleolin facilitates passage of the polymerase through nucleosomes

The dual properties of nucleolin to transfer H2A–H2B dimers from nucleosomes to (H3–H4)₂ tetramer particles and to assist deposition of histones on DNA is evocative of the properties of the larger subunit of FACT, Spt16, which carries

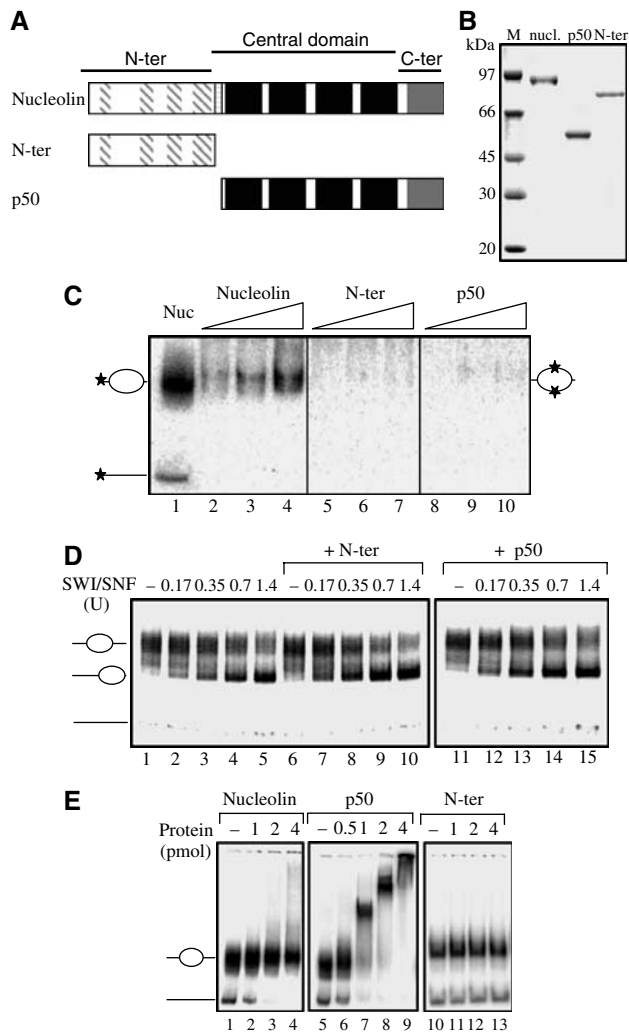


Figure 6 The N-terminal acidic domain of nucleolin is necessary but not sufficient for the histone chaperone activity. **(A)** Schematic representation of nucleolin domains. Dashed boxes indicate highly acidic regions; black boxes represent each of the four RNA-binding domains, and the C-terminal grey box shows the RGG domain. **(B)** 12% SDS-PAGE of the purified recombinant proteins. **(C)** Histone chaperone activity. Same as Figure 5, except that increasing amounts of N-ter (lanes 5–7) and p50 (lanes 8–10) proteins were used. Lane 1, nucleosomes reconstituted onto labelled 5S DNA sequence. **(D)** Effect of the N-ter and p50 nucleolin domains on nucleosome mobilization. Nucleosomes were reconstituted on the 248 bp DNA fragment from a ribosomal promoter (Langst *et al*, 1999) with conventional H2A, H2B, H3, H4 histones and incubated with increasing amounts of SWI/SNF in the presence of 1 pmol of N-ter (lanes 6–10) and 1 pmol of p50 (lanes 11–15). **(E)** Interaction of nucleolin, p50 and N-ter domains with nucleosomes. Nucleosomes were reconstituted onto the 248 bp ribosomal DNA fragment and incubated with increasing amounts of nucleolin (lanes 1–4), p50 (lanes 6–9) or N-ter domain (lanes 11–13). Note the strong binding of p50, but not of nucleolin and N-ter, with the nucleosomes.

a histone chaperone activity and which is required for nucleosome destabilization during Pol II transcription (Belotserkovskaya *et al*, 2003). This suggests that nucleolin might possess FACT-like activity and facilitate elongation of Polymerase II through the nucleosome.

The effects of nucleolin and FACT (Belotserkovskaya *et al*, 2003) on the passage of the polymerase (Pol II) through mononucleosomes were compared. Briefly, templates were transcribed using Pol II elongation complexes immobilized on

beads and ligated to mononucleosomes (Kireeva *et al*, 2002). The transcription reactions were carried out at different concentrations of KCl, that is, 40, 100, 300 and 1000 mM KCl. The nascent RNA was visualized after pulse labelling. As expected, only small fractions of the templates were transcribed to completion at low ionic strength (40 and 100 mM KCl, Figure 7A, lanes 2 and 5); strong nucleosome-specific pausing was observed. Increasing the ionic strength to 300 and 1000 mM resulted in the destabilization of the nucleosome, decrease of the pausing and efficient transcription to completion (Kireeva *et al*, 2002). The efficiency of transcription of the templates at 300 mM KCl was 76% (Figure 7A, lane 3). In the presence of nucleolin, the nucleosomal barrier was partially relieved even at 100 mM KCl: the amount of complete transcript was increased from 30 to 40% (compare lanes 5 and 7). This level of facilitation of transcription through nucleosomal template is similar to the one obtained with FACT (compare lanes 6 and 7) (Belotserkovskaya *et al*, 2003). Interestingly, nucleolin and FACT do not seem to affect the transcription through the nucleosome in exactly the same way. Nucleolin affects only the promoter-proximal regions of transcriptional arrest (Figure 7A, regions 2 and 3), while FACT affects the more extended area of the pausing (regions 1–3).

It was described previously that the FACT-dependent Pol II progression through the nucleosome is accompanied by a loss of an H2A–H2B dimer from the nucleosome, leading to the formation of a hexasome particle (Belotserkovskaya *et al*, 2003). To determine if this was also the case with nucleolin, the nucleosomal templates were transcribed in the presence or in the absence of nucleolin at various concentrations of KCl. Labelled templates released into the solution were analysed by native gel electrophoresis (Figure 7B). Transcription in the presence of 300 mM KCl resulted in the appearance of a new, faster-migrating band in the gel that was previously identified as the hexasome (Figure 7B, lane 4). As expected, hexasomes were formed with much lower efficiency during transcription at 40 and 100 mM KCl (Figure 7B, lanes 3 and 5). Interestingly, the presence of either FACT or nucleolin resulted in the same increase of the yield of the hexasomes formed during transcription at 100 mM KCl (Figure 7B, compare lane 5 with lanes 6 and 7, see also Figure 7C). Altogether, these data indicate that nucleolin stimulates transcription through the nucleosome and that it can assist the displacement of one H2A–H2B dimer from the nucleosome during transcription.

Discussion

Here we report the unusual properties of nucleolin, a major protein of the nucleolus. We found that nucleolin is able to considerably increase the efficiency of ACF and SWI/SNF to remodel nucleosomes. Variant nucleosomes containing the macroH2A histone that could not be remodelled by SWI/SNF and ACF alone become competent for remodeling in the presence of nucleolin. This activation shows some specificity, since H2ABbd nucleosomes remain insensitive to the remodeling machineries in the presence of nucleolin. Nucleolin is also able to assist the deposition of histone on DNA and to transfer H2A–H2B dimer from a nucleosomal particle to a (H3–H4)₂ tetramer. In addition, nucleolin possesses FACT-like properties. Chromatin remodeling is an important process for

the activation or repression of gene expression. However, the recent discovery that histone variants such as macroH2A and H2ABbd could render the chromatin refractory to the remodeling machineries (SWI/SNF, ACF) (Angelov *et al*, 2003, 2004b) raises several questions about the mechanisms of deposition of these histone variants in chromatin and of the remodeling of this variant chromatin. Our results showing that a protein like nucleolin is able to selectively activate the SWI/SNF- and ACF-dependant remodeling of conventional and macroH2A nucleosome, but not of H2ABbd nucleosome, particles indicate the existence of a new class of proteins assisting the activation or repression of chromatin containing variant histones.

Although the exact nature of the mechanism of action of nucleolin in the remodeling reactions is not known, we can

speculate that the transient interaction of nucleolin with the nucleosomal particles might destabilize the histone–histone and histone–DNA interactions, in particular those of the H2A–H2B dimer. These transiently perturbed particles would be better targets for the remodeling machineries, which, in turn, would facilitate their remodeling. The nucleolin-induced H2A–H2B transfer (Figure 4) may reflect either a nucleolin-dependent destabilization of the nucleosomes and release of the H2A–H2B dimers, which could then be re-deposited onto the tetramer particles, or an efficient deposition of the dimers that are spontaneously released from the nucleosomes, or both. Interestingly, the N-terminal domain of nucleolin possesses an HMG-like organization (Lapeyre *et al*, 1987; Erard *et al*, 1988) and deletion of the N-terminal end of nucleolin abolished its properties on the activation of SWI/SNF on conventional and macroH2A nucleosomes (Figure 6D and data not shown). A recent report indicated that HMGB1 was able to improve the mobilization efficiency at limiting concentrations of remodeling factor (Bonaldi *et al*, 2002), a result similar to what we have obtained with the N-ter domain of nucleolin (Figure 6D). Similarly to nucleolin, HMGB1 promotes the interaction of the remodeling machine with the nucleosomal substrate. However, the activation level observed with HMGB1 is considerably small compared to the activation obtained with full-length nucleolin, and we used a very low amount of nucleolin protein (20–30 times less) compared to that of HMGB1.

Nucleolin has been involved in many steps of gene regulation, including the regulation of polymerase I transcription (Bouche *et al*, 1984; Egyhazi *et al*, 1988; Roger *et al*, 2002) and polymerase II transcription (Yang *et al*, 1994; Hanakahi *et al*, 1997; Xie *et al*, 1998; Ying *et al*, 2000; Schulz *et al*, 2001; Gabellini *et al*, 2002; Grinstein *et al*, 2002). According to some of these studies nucleolin exerts a repressive effect on transcription, while according to others it affects positively transcription. Such seemingly contradictory results could be explain if one takes into account that nucleolin assists

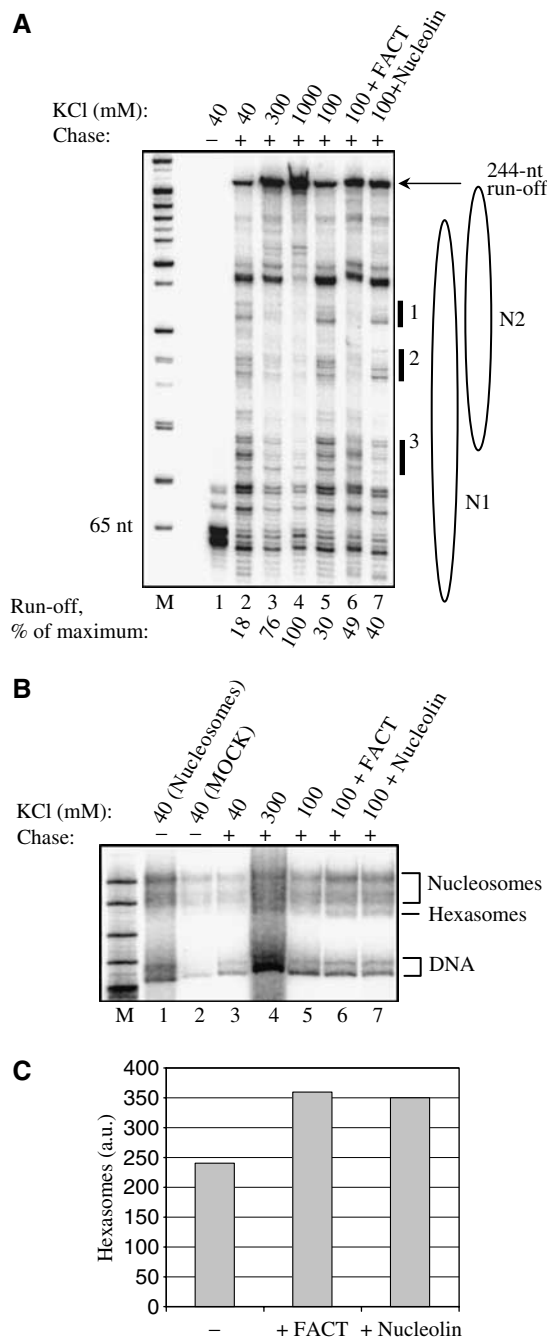


Figure 7 Nucleolin facilitates transcription through the nucleosome and accompanying displacement of one H2A/2B dimer. **(A)** Analysis of labelled RNA by denaturing PAGE. Preformed stalled elongation complexes containing pulse-labelled RNA (lane 1) were incubated with NTPs at the indicated concentrations of KCl in the presence of FACT (lane 6) or nucleolin (lane 7). Black rectangles indicate the areas of the pausing that are partially relieved in the presence of 300 mM KCl (lane 3) or the protein factors. The positions of the nucleosomes (N1 and N2) are indicated. The efficiencies of formation of the run-off transcripts under the different conditions are indicated below the lanes. M—pBR322-*MspI* end-labelled markers. **(B)** Nucleolin facilitates transcription-dependent conversion of the nucleosomes into the hexasomes. Analysis of DNA-labelled nucleosomal templates by native PAGE. The nucleosomal templates were transcribed in the presence of indicated concentrations of KCl and in the presence of FACT (lane 6) or nucleolin (lane 7). Nontranscribed (lane 1) or MOCK-transcribed (with one NTP omitted from the reaction, lane 2) nucleosomes are loaded as controls. The positions of the nucleosomes, hexasomes and DNA are indicated. A higher background of nontranscribed templates is observed at 300 mM KCl (lane 4) because of disruption of the elongation complexes at higher salt (Belotserkovskaya *et al*, 2003). **(C)** Quantitative analysis of the hexasomes formed after transcription through the nucleosomes at 100 mM KCl in the presence of FACT or nucleolin (lanes 5–7, Figure 7B). The amount of ³²P in each hexasome band (arbitrary units) was normalized to the total amount of radioactivity in the sample.

remodellers like SWI/SNF in their functions, and these remodellers are involved in both activation and repression of transcription (Martens and Winston, 2003). Regulation of chromatin accessibility and dynamics play a major role in the regulation of polymerase I transcription (Grummt and Pikaard, 2003). The recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC by the transcription terminator factor TTF-I bound to the promoter-proximal terminator T_0 participate in the silencing of rDNA (Grummt and Pikaard, 2003). Binding of TTF-I to T_0 is also able to induce an ATP-dependant nucleosome remodeling that is required to transcribe *in vitro* rDNA templates assembled into chromatin (Langst *et al*, 1997, 1998), suggesting that TTF-I should be selectively targeted for the activation of the silencing of rDNA genes. Bearing in mind the numerous reports involving nucleolin in polymerase I transcription and this report showing that nucleolin, like TTF-I, is able to regulate nucleosome dynamics, it is reasonable to think that this co-remodeling activity of nucleolin will participate in the regulation of transcription of the rDNA genes. Indeed nucleolin depletion in HeLa cells through RNAi leads to an inhibition of RNA polymerase I transcription (Bouvet *et al*, unpublished data). How exactly nucleolin participates in the regulation of transcription remains to be determined. The chromatin co-remodeling activity of nucleolin and its ability to promote H2A–H2B dimer displacement and histone deposition described in this report might be parts of this mechanism. The ability of nucleolin to destabilize the histone octamer, which helps the dissociation of a H2A–H2B dimer, is probably required for the facilitated transcription of Pol II through the nucleosome in the presence of nucleolin. FACT complexes comprise two proteins: SPT16 and SSRP1 (Orphanides *et al*, 1999). SSRP1 protein is a HMG1-domain-containing protein. HMG-box proteins possess non-sequence-specific DNA-binding and -bending activity. Nucleolin also binds nonspecifically to any free DNA sequences (Barrijal *et al*, 1992; Hanakahi *et al*, 1999, 2000; Pollice *et al*, 2000; Gabellini *et al*, 2002). Spt16 is the largest subunit of FACT. One major characteristic of this subunit is its C-terminal end, which is highly acidic (Rowley *et al*, 1991). The presence of an acidic region is found in many proteins with histone chaperone activity (Philpott *et al*, 2000), and it is also a characteristic of nucleolin. However, the presence of the acidic region is not sufficient to support the chaperone activity (Figure 6C). The dual properties of nucleolin to bind nonspecifically to DNA sequences and the possibility to interact with histones through its highly acidic domain recapitulate the characteristics of Spt16 and SSRP1 in a single polypeptide. From these data we can speculate that other proteins involved in transcription regulation will also possess FACT-like activity. However, bearing in mind that nucleoplasmin had no FACT activity (Orphanides *et al*, 1998) but enhances acetylation-dependant chromatin transcription (Swaminathan *et al*, 2005), we expect that all histone chaperones will not behave the same way. Indeed, recent reports have highlighted the role of histone chaperone in transcriptional regulation (Adkins and Tyler, 2006; Gamble *et al*, 2005; Swaminathan *et al*, 2005) through different mechanisms. Since nucleolin is also able to assist the remodeling of macroH2A nucleosomal particles, we suggest that other distinct histone chaperones could be used to selectively modulate the dynamics of specific chromatin domains containing variant histones and to regulate gene expression.

Materials and methods

Preparation of DNA probes

The 147, 152 and 207 bp fragments comprising the sequence of the *Xenopus borealis* 5S RNA gene and the 248 bp mouse rDNA fragment were prepared by PCR amplification and 32 P-labelled as described previously (Angelov *et al*, 2003, 2004b; Langst *et al*, 1999). The 255 and 241 bp DNA fragments containing the nucleosome positioning sequence 601 (Lowary and Widom, 1998) at the middle or at the end of the sequence were prepared by PCR from pGEM3Z-601 and p199-1 (kindly provided by B Bartholomiew and J Widom).

Protein expression, purification nucleosome reconstitution and remodeling

Recombinant *Xenopus laevis* full-length histone proteins were produced in bacteria and purified as described (Luger *et al*, 1999). Yeast SWI/SNF complex was purified as described previously (Cote *et al*, 1994) and its activity was normalized by measuring its effect on the sliding of conventional nucleosomes: 1 unit being defined as the amount of SWI/SNF required to mobilize 50% of input nucleosomes (50 ng, about 0.2 pmol) at 30°C during 45 min. Native nucleolin was purified from HeLa cells as described previously (Caizergues-Ferrer *et al*, 1987). Recombinant nucleolin, p50 and N-ter proteins were produced in baculovirus (nucleolin and N-ter) or bacteria (p50) as described previously (Caizergues-Ferrer *et al*, 1987).

Nucleosome reconstitution was performed by the salt dialysis procedure (Mutskov *et al*, 1998). Carrier DNA (150–200 bp, 2 µg) and 50 ng of 32 P-labelled DNA were mixed with equimolar amount of histone octamer in nucleosome reconstitution buffer (NRB) 2 M NaCl (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM β -MeEtOH). Tetrasomes were reconstituted by salt dialysis using 5 µg of 147 bp 5S DNA and equimolar amount of H3–H4 tetramers.

Nucleosomes (50 ng; 0.2 pmol) were incubated with SWI/SNF or ACF as indicated in remodeling buffer (RB) containing Tris, pH 7.4, 10 mM, glycerol 5%, BSA 100 µg/ml, DTT 1 mM, NP40 0.02%, NaCl 40 mM, MgCl₂ 2.5 mM, and 1 mM ATP for 45 min. The reaction was stopped by adding 1 µg of plasmid DNA, 0.02 U of apyrase, and 10 mM EDTA. DNase I footprinting and ATPase activity assay were performed as described previously (Angelov *et al*, 2003). *Drosophila* ACF complex was reconstituted from baculovirus vectors expressing ACF1 and ISWI. ACF1 baculovirus vector is a kind gift of J Kadonaga (La Jolla, CA). Expression and purification of ACF was performed as described previously (Duband-Goulet *et al*, 2004). Human native FACT complex is a kind gift of D Reinberg.

Interaction of nucleolin with the H2A–H2B dimer was performed using recombinant Flag-H2A protein which was used to reconstitute Flag-H2A–H2B dimer. Equimolar mixtures of Flag-H2A and H2B protein in 8 M urea were dialysed overnight against histone folding buffer (TE 1 ×, 5 mM 2- β mercaptoethanol, 2 M NaCl) and then 3 h in the same buffer, but containing 100 mM NaCl. Nucleolin (2 µg) was labelled using aurora A kinase and 20 µci of 32 P- γ -ATP. Incorporated labelled nucleotides were removed by filtration through a Sephadex G50 column.

Histone transfer and deposition experiments and transcription experiments

Assay of histone deposition in the presence of histone chaperone was performed using histone octamers (100 ng/µl) assembled in 2 M NaCl, which were stepwise dialysed to the final buffer concentration at 100 mM NaCl. Histones were mixed or not (control) with equimolar amount (in respect to octamers) of nucleolin and incubated for 30' at room temperature. The histone–nucleolin mix was added to 15 ng of labelled 152 bp 5S DNA fragments as indicated, incubated for 45' at room temperature and analysed on 5% native gel 0.25 × TBE, run at 4°C.

For the histone transfer experiment, a wild-type H3 and swapped tail H3–H2B or H3–H2A mutant histones were used. The 15 first amino acids of H2A were replaced by the first 27 amino acids of histone H3 (H2A*) or the entire N-terminal tail of H2B was replaced by that of H3 (H2B*). This allows either the mutant H2B or H2A to be radioactively labelled by the Aurora A kinase (Scrittore *et al*, 2001) as described previously (Angelov *et al*, 2004a). An equimolar mix of the four histones, containing H2A, H2B, or H3 radioactively labelled, was dialysed against NRB 2 M NaCl overnight.

Acceptor tetramers were reconstituted on the 147bp 5S DNA fragment with an equimolar mixture of the H3–H4 tetramers. For the transfer experiments, 20 ng of histone-labelled nucleosomes (reconstituted on the 601 sequence at the central position) was mixed in RB together with a two-fold molar excess of tetrameric H3–H4 particles and SWI/SNF and/or nucleolin in a final volume of 10 μ l. Reactions were stopped with 1 μ g of plasmid DNA, 0.1 U of apyrase and 7.5 mM EDTA and stored on ice until loading on the gel.

Nucleosome reconstitution, Pol II elongation complex assembly and its ligation to either the DNA or the nucleosome and the Pol II transcription analysis were carried out as described previously (Kireeva *et al*, 2002). Transcription was conducted in the presence of 3 pmol of FACT or 1 pmol of nucleolin as described previously (Belotserkovskaya *et al*, 2003).

References

- Adkins MW, Howar SR, Tyler JK (2004) Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell* **14**: 657–666
- Adkins MW, Tyler JK (2006) Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol Cell* **21**: 405–416
- Angelov D, Lenouvel F, Hans F, Muller CW, Bouvet P, Bednar J, Moudrianakis EN, Cadet J, Dimitrov S (2004a) The histone octamer is invisible when NF-kappaB binds to the nucleosome. *J Biol Chem* **279**: 42374–42382
- Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Cote J, Khochbin S, Bouvet P, Dimitrov S (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* **11**: 1033–1041
- Angelov D, Verdel A, An W, Bondarenko V, Hans F, Doyen CM, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S (2004b) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J* **23**: 3815–3824
- Barrijal S, Perros M, Gu Z, Avalosse BL, Belenguer P, Amalric F, Rommelaere J (1992) Nucleolin forms a specific complex with a fragment of the viral (minus) strand of minute virus of mice DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 5053–5060
- Bassing CH, Alt FW (2004) H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* **3**: 149–153
- Beato M, Eisfeld K (1997) Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res* **25**: 3559–3563
- Becker PB, Horz W (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**: 247–273
- Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**: 1090–1093
- Bonaldi T, Langst G, Strohhner R, Becker PB, Bianchi ME (2002) The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* **21**: 6865–6873
- Bouche G, Caizergues-Ferrer M, Bugler B, Amalric F (1984) Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res* **12**: 3025–3035
- Bruno M, Flaus A, Stockdale C, Rencurel C, Ferreira H, Owen-Hughes T (2003) Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol Cell* **12**: 1599–1606
- Caizergues-Ferrer M, Belenguer P, Lapeyre B, Amalric F, Wallace MO, Olson MO (1987) Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry* **26**: 7876–7883
- Chadwick BP, Willard HF (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**: 375–384
- Costanzi C, Stein P, Worrada DM, Schultz RM, Pehrson JR (2000) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* **127**: 2283–2289
- Cote J, Peterson CL, Workman JL (1998) Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4947–4952
- Cote J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**: 53–60
- Doyen CM, An W, Angelov D, Bondarenko V, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S (2006) Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **26**: 1156–1164
- Duband-Goulet I, Ouararhni K, Hamiche A (2004) Methods for chromatin assembly and remodeling. *Methods* **33**: 12–17
- Eberharter A, Ferrari S, Langst G, Straub T, Imhof A, Varga-Weisz P, Wilm M, Becker PB (2001) Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodeling. *EMBO J* **20**: 3781–3788
- Egyhazi E, Pigon A, Chang JH, Ghaffari SH, Dreesen TD, Wellman SE, Case ST, Olson MO (1988) Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus* salivary gland cells. *Exp Cell Res* **178**: 264–272
- Erard MS, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A, Amalric F (1988) A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* **175**: 525–530
- Fujii-Nakata T, Ishimi Y, Okuda A, Kikuchi A (1992) Functional analysis of nucleosome assembly protein, NAP-1. The negatively charged COOH-terminal region is not necessary for the intrinsic assembly activity. *J Biol Chem* **267**: 20980–20986
- Gabellini D, Green MR, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* **110**: 339–348
- Gamble MJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP, Fisher RP (2005) The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription *in vitro* of chromatin templates. *Mol Cell Biol* **25**: 797–807
- Gautier T, Abbott DW, Molla A, Verdel A, Ausio J, Dimitrov S (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep* **5**: 715–720
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112**: 761–772
- Grinstein E, Wernet P, Snijders PJ, Rosl F, Weinert I, Jia W, Kraft R, Schewe C, Schwabe M, Hauptmann S, Dietel M, Meijer CJ, Royer HD (2002) Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer. *J Exp Med* **196**: 1067–1078
- Grummt I, Pikaard CS (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 641–649
- Hanakahi LA, Bu Z, Maizels N (2000) The C-terminal domain of nucleolin accelerates nucleic acid annealing. *Biochemistry* **39**: 15493–15499
- Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ, Maizels N (1997) Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3605–3610
- Hanakahi LA, Sun H, Maizels N (1999) High affinity interactions of nucleolin with G–G-paired rDNA. *J Biol Chem* **274**: 15908–15912
- Henikoff S, Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 133–153

Acknowledgements

We thank Danny Reinberg for kindly providing FACT complex. This work was supported by CNRS (ATIP to PB), INSERM, Région Rhône-Alpes and grants from the Ministère de la Recherche: ACI Biologie cellulaire Moléculaire et Structurale, BCM0070; ACI Interface Physique-Chimie-Biologie: Dynamique et réactivité des Assemblages Biologiques (DRAB), 2004, # 04 2 136; ANR Project no. NT05-1_41978. The work of VMS laboratory is supported by the NIH GM58650 and NSF 0353032 grants. DA was on leave from the Institute of Solid State Physics, Bulgarian Academy of Sciences. DA and HM were supported by EU Commission Network Grant MCRTN-CT-2003-505086 CLUSTOXDNA and by NFS-BG grant 1402-2004.

- Kireeva ML, Walter W, Tchernajenko V, Bondarenko V, Kashlev M, Studitsky VM (2002) Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol Cell* **9**: 541–552
- Langst G, Becker PB, Grummt I (1998) TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J* **17**: 3135–3145
- Langst G, Blank TA, Becker PB, Grummt I (1997) RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J* **16**: 760–768
- Langst G, Bonte EJ, Corona DF, Becker PB (1999) Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* **97**: 843–852
- Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F (1987) Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1472–1476
- Larochelle M, Gaudreau L (2003) H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* **22**: 4512–4522
- Lowary PT, Widom J (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol* **276**: 19–42
- Loyola A, Almouzni G (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* **1677**: 3–11
- Luger K, Rechsteiner TJ, Richmond TJ (1999) Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol Biol* **119**: 1–16
- Martens JA, Winston F (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 136–142
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**: 343–348
- Mutskov V, Gerber D, Angelov D, Ausio J, Workman J, Dimitrov S (1998) Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol Cell Biol* **18**: 6293–6304
- Olson MO, Thompson BA (1983) Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* **22**: 3187–3193
- Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* **92**: 105–116
- Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D (1999) The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**: 284–288
- Pehrson JR, Fried VA (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**: 1398–1400
- Perche PY, Vourc'h C, Konecny L, Souchier C, Robert-Nicoud M, Dimitrov S, Khochbin S (2000) Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol* **10**: 1531–1534
- Philpott A, Krude T, Laskey RA (2000) Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **11**: 7–14
- Pollice A, Zibella MP, Bilaud T, Laroche T, Pulitzer JF, Gilson E (2000) *In vitro* binding of nucleolin to double-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 909–915
- Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL, Schreiber SL, Rando OJ, Madhani HD (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**: 233–248
- Roger B, Moisan A, Amalric F, Bouvet P (2002) Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* **277**: 10209–10219
- Rowley A, Singer RA, Johnston GC (1991) CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus. *Mol Cell Biol* **11**: 5718–5726
- Schulz M, Schneider S, Lottspeich F, Renkawitz R, Eggert M (2001) Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 476–480
- Scrittore L, Hans F, Angelov D, Charra M, Prigent C, Dimitrov S (2001) pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem* **276**: 30002–30010
- Srivastava M, Pollard HB (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* **13**: 1911–1922
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK (2005) Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* **25**: 7534–7545
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**: 51–61
- Tuteja R, Tuteja N (1998) Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**: 407–436
- Tyler JK, Adams CR, Chen SR, Kobayashi R, Kamakaka RT, Kadonaga JT (1999) The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* **402**: 555–560
- Vicent GP, Nacht AS, Smith CL, Peterson CL, Dimitrov S, Beato M (2004) DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* **16**: 439–452
- Xie J, Briggs JA, Briggs RC (1998) Human hematopoietic cell specific nuclear protein MNDA interacts with the multifunctional transcription factor YY1 and stimulates YY1 DNA binding. *J Cell Biochem* **70**: 489–506
- Yang TH, Tsai WH, Lee YM, Lei HY, Lai MY, Chen DS, Yeh NH, Lee SC (1994) Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Mol Cell Biol* **14**: 6068–6074
- Ying GG, Proost P, van Damme J, Bruschi M, Introna M, Golay J (2000) Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity. *J Biol Chem* **275**: 4152–4158
- Zhang H, Roberts DN, Cairns BR (2005) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**: 219–231

Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish

Rodrigo Pinto^a, Corinne Ivaldi^b, Mauricio Reyes^a, Cécile Doyen^{b,c}, Flore Mietton^c, Fabien Mongelard^b, Marco Alvarez^a, Alfredo Molina^a, Stefan Dimitrov^c, Manuel Krauskopf^a, Maria Ines Vera^a, Philippe Bouvet^{b,*}

^a Millennium Institute for Fundamental and Applied Biology and Biological Sciences Department, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile

^b Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS-UMR 5161 and Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France

^c Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche cedex, France

Received 1 September 2005; accepted 13 September 2005

Available online 28 September 2005

Edited by Frances Shannon

Abstract Adaptation to cold and warm conditions requires dramatic change in gene expression. The acclimatization process of the common carp *Cyprinus carpio* L. in its natural habitat has been used to study how organisms respond to natural environmental changes. At the cellular level, adaptation to cold condition is accompanied by a dramatic alteration in nucleolar structure and a down regulation of the expression of ribosomal genes. We show that the enrichment of condensed chromatin in winter adapted cells is not correlated with an increase of the heterochromatin marker trimethyl and monomethyl K20H4. However, the expression of the tri methyl K4 H3 and of the variant histone macroH2A is significantly increased during the winter season together with a hypermethylation of CpG residues. Taking into account the properties of macroH2A toward chromatin structure and dynamics and its role in gene repression our data suggest that the increased expression of macroH2A and the hypermethylation of DNA which occurs upon winter-acclimatization plays a major role for the reorganization of chromatin structure and the regulation of gene expression during the physiological adaptation to a colder environment.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Histone variant; MacroH2A; Chromatin; Acclimatization; Nucleolus

1. Introduction

Eurythermal fish acclimatization occurring during seasonal changes requires gene expression adjustments to provide the homeostatic condition for survival [1–3]. *Cyprinus carpio* L. lives in a natural environment submitted to a wide range of temperature conditions during winter and summer representing a good experimental system to study adaptation to cold condition on poikilothermic vertebrates [4–6]. Transcriptomes studies of different tissues issue from cold adapted carps indicate that a large number of cDNA (over 3400) were affected by cold [6]. At the cellular level, the most dramatic change that occurs during the acclimatization process is observed in the

nucleolus (Fig. 1). In summer, the nucleoli have a reticulated aspect containing numerous intranucleolar clumps of condensed chromatin. In contrast, in winter, the nucleoli appear as compact masses surrounded by a thick layer of condensed chromatin. These nucleolar rearrangements reveal profound changes in ribosomal biogenesis, like transcription of ribosomal DNA genes that is strongly down regulated, as a consequence of seasonal environmental variations [1]. The molecular mechanisms responsible for the nucleolar rearrangements and the down regulation of ribosomal gene expression are still not known.

Rearrangement of chromatin structure and the regulation of gene expression could be achieved through different mechanisms. Post-translational histone modification and the chromatin remodeling process could be two ways to activate or inactivate specifically gene expression [7–11]. The expression of specific proteins like HMGB1 during the temperature cycle may also regulate global transcription rate [12]. Recently, it was also suggested that the incorporation of histone variant within chromatin could be an other way to regulate transcription [13,14]. For example, the histone variant H2A.Z is implicated in both gene activation [15] and gene silencing [16]. The incorporation of the histone variant H2ABbd into the histone octamer confers lower stability to the H2ABbd nucleosomes and affects nucleosomal DNA organization [17,18]. Since the residues of conventional H2A, which are targets for post-translational modifications, are mutated in H2ABbd, one could expect the function of this histone to be regulated in a distinct way [19]. In vitro transcription experiments have reported that the incorporation of this histone variant in chromatin was associated with an increase in histone acetylation and in transcription [17,20].

MacroH2A is another histone variant whose incorporation into chromatin has been associated with repression of transcription. MacroH2A possesses a C-terminal extremity called the non-histone region (NHR) which is nearly three times the size of H2A [21–23]. Immunofluorescence data suggested that mH2A is enriched in different regions including the inactive X chromosome [21,24–26] and recent proteomic studies indicated that macroH2A was also present in nucleoli [27–29]. In vitro studies have clearly demonstrated that the incorporation of macroH2A within nucleosomes impeded chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF [30] and the Gal4-VP16/p300 dependant transcription initiation (Doyen

*Corresponding author. Fax: +33 4 72 72 80 16.
E-mail address: pbouvet@ens-lyon.fr (P. Bouvet).

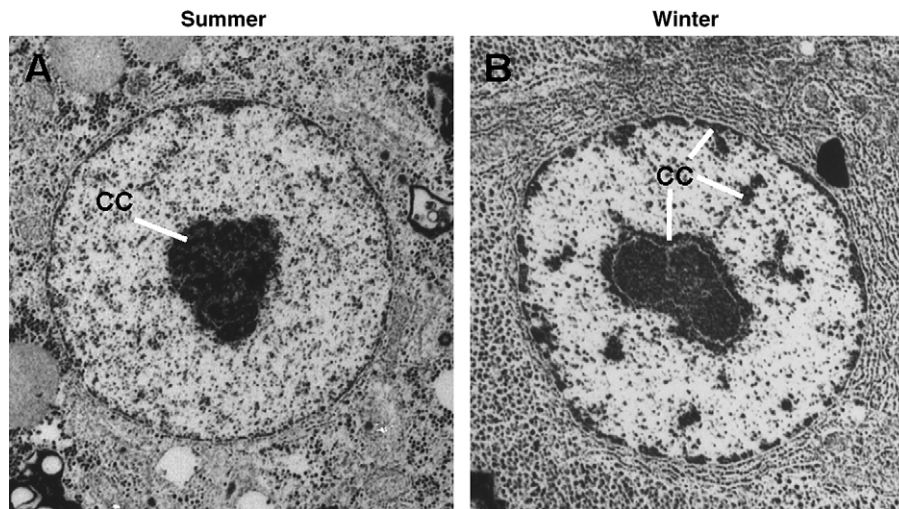


Fig. 1. The nucleolar structure is drastically modified upon acclimatization. Ultrastructural analysis of liver cells from summer (A) and winter (B) adapted carps. During the cold season the nucleolar compartment undergoes a profound rearrangement with the formation of perinucleolar condensed chromatin (CC).

et al., submitted). Interestingly, this repression of transcription is solely determined by the NHR of macroH2A (Doyen et al., submitted). The presence of macroH2A within the nucleoli suggest that macroH2A could be involved in the regulation of expression of ribosomal DNA genes, however, macroH2A has not been yet found associated with rDNA.

In this report, we describe that under the physiological condition of the acclimatization process, the expression of macroH2A and the methylation state of DNA are drastically affected. These data suggest that macroH2A could be an important factor for the global reorganization of chromatin domain and the regulation of gene expression during the acclimatization process.

2. Material and methods

2.1. Cell fractionation, protein purification and analysis

Male carp (*C. carpio*) were captured and maintained at the seasonal summer-(20–22 °C) and winter-(8–10 °C) environmental conditions [1]. Nuclear extracts were performed essentially as described previously [29]. Tissue lysates were prepared in HB buffer (250 mM Sucrose, 3 mM CaCl₂, 1 mM PMSF in 20 mM Tris pH 7.4) and centrifugated at 1500 rpm per 10 min at 4 °C in a Sorvall rotor HB6. The pellet was collect and washed with PBS at least for three times. Then, the nuclear fraction was applied on a cushion of 0.8 M Sucrose and centrifugated for 10 min at 2400 rpm on the HB6 rotor. Following quantification of the nuclear proteins, they were electrophoretically separated by SDS-PAGE and subsequently transferred to nitrocellulose. Immunoblots were probed using antibodies against either macroH₂A (1/3000), H₂A (1/250), trimethyl K20H₄ (1/1000, Abcam), Monomethyl K20H₄ (1/1000, Abcam), MeK36H₃ (1/1000, Abcam), Me3K4H₃ (1/1000, Abcam) and developed using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

2.2. RT-PCR and macroH2A cloning

A 900 pb fragment from the macroH2A2 gene was amplified using primers oligonucleotides (CmacroR) (ATCTTGGCCATCTCCTG-CAGGTA) and CmacroF (GTCTACATGGCAGCTGTCATTGA) derived from a macroH2A sequence obtained from *Danio rerio* [31], using 4 µg of total RNA extracted from liver of winter-acclimatized carp. RT-PCR product was cloned into vector pGEM-T (Promega) and sequenced. Gene Bank Accession No. DQ173494.

2.3. Immunofluorescence

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min at room temperature) and permeabilized for 15 min with 0.1% Triton-X 100 in PBS. After three washes with PBS/Tween 20 (0.1%), slides were pre-incubated in TNB blocking buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% Blocking Reagent (w/v)) for 30 min at room temperature, then incubated overnight with a 1/100 dilution of macroH₂A antibody in TNB buffer. Slides were washed three times in TNT buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) and then incubated for 2 h at room temperature with FITC conjugated anti rabbit antibody (Biosource). Slides were washed three times again with TNT and incubated 5 min with DAPI (KPL). After DAPI incubation, slides were washed three times for 10 min on PBS and mounted on glycerol (Merck). Images were obtained using an Olympus BX41 microscope with fluorescence source coupled to an Olympus digital camera.

2.4. Methylation at the promoter of rDNA

1 µg of DNA extracted from liver tissues from each season was digested with 20 U of *Hpa*II enzyme before PCR amplification using four different primers in three combinations, in order to evaluate the CCGG site at positions –30 and +45. For quantification, PCR was performed with LightCycler (Roche). The relative resistance to *Hpa*II digestion was calculated by normalizing the amount of DNA amplified with a pair of primers (–28/–10; +24/+45) located between the two studied CpG residues.

3. Results and discussion

3.1. Reorganization of nucleolar structure upon acclimatization

As a natural process, acclimatization involves a seasonal reprogramming of molecular and cellular functions [5,6,12] for the adaptation of the cells to opposed seasonal conditions. A striking cellular change can be visualized by electron microscopy of hepatocyte cells of winter (W) and summer (S) carps (Fig. 1). The nucleolar organization is clearly different in these two physiological conditions. In winter-adapted carp, the fibrillar component appears as a unique mass surrounded by several granular caps whereas in summer-adapted carp the fibrillar component reach the surrounding granular masses by forming few granular cordons. In the hepatocyte nucleolus of summer-adapted carp, the condensed chromatin appears as structures formed by filaments that are found inside the

nucleolar body. In contrast, in winter-adapted carp the condensed chromatin associated with the nucleolus appears as densely-contrasted masses that are mainly located around the nucleolus, within the nucleoplasm and attached to the nuclear membrane. A recent analysis using acetylation method with the TdT-immunogold labelling procedure has clearly detected an enrichment of condensed chromatin around the nucleolus in winter-adapted cells (Thiry et al., submitted). These changes in nucleolar ultrastructure reflect variations in the expression of rRNA gene which is higher in summer-adapted carp than in winter-adapted carp [1].

3.2. Detection of heterochromatin markers and of macroH2A histone variant

The dramatic change of chromatin organization during acclimatization, and the accumulation of condensed chromatin in winter adapted carp must be accompanied by modification of chromatin composition. It has been shown that heterochromatin formation is intimately linked to histone methylation, in particular of Lys4, Lys9, Lys27, Lys36, Lys79 on H3 and Lys20 on H4 [32]. To determine if the accumulation of condensed chromatin in winter carp was correlated with an increased of these histone modifications we used different antibodies against histone H4 and H3 modifications (Fig. 2). Antibodies against mono and tri methyl K20 histone H4 have been used to determine if the expression of these heterochromatin markers was modified during acclimatization. Hepatocytes nuclear extracts were prepared from winter (W) and summer (S) adapted carps and used for western blotting. Interestingly, none of the heterochromatin mono and tri methyl

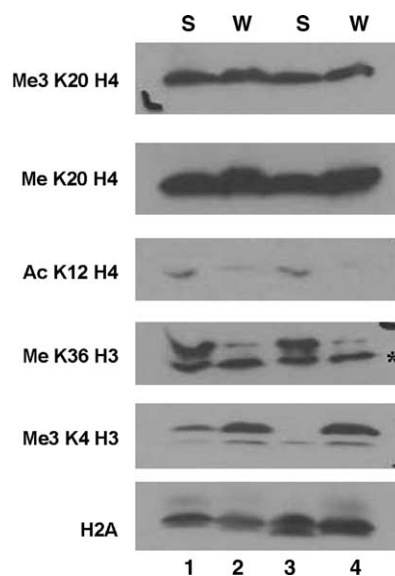


Fig. 2. Histone H4 and H3 modification during acclimatization. Liver nuclear protein extracts were prepared from summer (lanes 1 and 3) or winter (lanes 2 and 4) adapted carps and used in western blotting experiments. Antibodies against trimethyl and monomethyl K20 H4, and triMeK4H3 were used as markers of heterochromatin. Acetyl K12 H4 and MeK36H3 were used as markers of euchromatin. The asterisk in the MeK36H3 panel indicates a non-specific band detected by the antibody as described by Abcam (Ab9048). The same extracts were also probed with an antibody against H2A histone. Each lane corresponds to a different fish. Analysis of other individual fish showed similar pattern (data not shown).

K20H4 marker shows significant difference between winter and summer conditions, indicating that these histones modifications are probably not associated with the drastic reorganization of chromatin and the regulation of gene expression during this process. We next looked at the expression of the tri methyl K4H3 modification which is generally associated with active gene [33], however, recent reports indicate that it could also be associated with heterochromatin region [34] or that these modification could be found flanking the heterochromatin region [35]. Interestingly, we found that the tri methyl K4H3 is significantly more expressed in winter conditions (Fig. 2) which could then be in agreement with the enrichment of heterochromatin in winter. The acetylation level of K12H4 and the mono methylation of K36H3 which are modifications usually associated with gene activation, seems more important in the summer condition (Fig. 2), which could be also in agreement with a higher transcriptional activity during that period.

Incorporation of histone variant could be another way to regulate chromatin structure and function [13,14]. One of these variants, macroH2A has a structural and particular localization suggesting that its incorporation within specific chromatin domains could be involved in gene silencing. Immunofluorescence studies indicate that macroH2A is preferentially located on the inactive X chromosome [21,24–26] and macroH2A could be involved in generation or maintenance of the hypo-acetylated state of the histones (Doyen et al., submitted) suggesting that macroH2A could be an important factor for the establishment or maintenance of repressed chromatin together with other epigenetic chromatin markers [36–38]. Furthermore, recent proteomic studies of the nucleolar compartment have identified the variant histone macroH2A within the nucleolar compartment [27–29]. However it has not been shown yet that macroH2A is associated with rDNA sequences or that it is involved in the silencing of rDNA. In order to determine if the expression of macroH2A could play a role in the reorganization of chromatin, we undertook to characterize the expression of macroH2A in these two extreme physiological conditions. We first cloned and sequenced carp macroH2A2 (Gene Bank accession number DQ173494; data not shown). Sequence analysis showed that the H2A-like and NHR domains of carp macroH2A2 are 87% and 67% identical, respectively, to the human and mouse protein.

To analyze the level of macroH2A2 mRNA in liver cells from winter and summer adapted carps we performed RT-PCR using total RNA (Fig. 3A). This experiment revealed that the expression of macroH2A2 mRNA was drastically different under these two conditions. MacroH2A2 mRNA was undetectable in the summer condition, whereas it was well expressed in cells isolated from winter-adapted animals. This data suggest that the down regulation of the expression of many genes (including ribosomal DNA genes) and the formation of condensed chromatin during acclimatization to the winter conditions are correlated with an increased expression of the macroH2A2 variant mRNA. To determine if this increased level of macroH2A2 mRNA was associated with an increased protein level a western blot analysis was performed on nuclear protein extracts from both conditions (Fig. 3B). Although the global pattern of nuclear protein is very similar in summer and winter-adapted liver cells (Fig. 3B, compare lane 1 and 2), the macroH2A protein level shows a significant increase (7–8-fold) during the winter acclimatization (compare

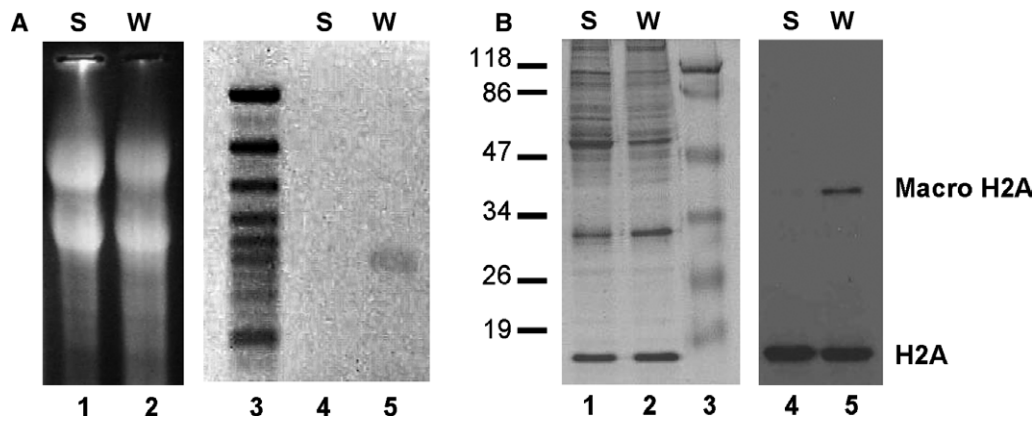


Fig. 3. macroH2A expression in summer- and winter-acclimatized liver cells. (A) RT-PCR analysis of macroH2A mRNA expression. Total RNA extracted from liver of summer- (S, lane 1) and from winter-adapted (W, lane 2) carp were used for the RT-PCR. Lanes 1 and 2 show the ethidium bromide staining of the RNA. After the RT-PCR reaction as described in the material and methods, the PCR product was analyzed on a 1% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining (lanes 3–5). (B) Western blot analysis of the expression of macroH2A. Nuclear proteins from liver of winter (W)- and summer (S)-adapted carps were stained with Coomassie (lanes 1 and 2) and then probed with antibodies against macroH2A (lanes 4 and 5). The same blot was then probed with antibodies against H2A. Molecular weight is shown in lane 3.

lane 4 and 5). This increased macroH2A protein level is not the result of a general increased of histone proteins since the same blot revealed with an anti-H2A antibody show that the expression of H2A protein is not affected during the winter-acclimatization process. Immunofluorescence analysis was then performed to further characterize the expression of macroH2A in winter and summer acclimatized cells (Fig. 4). In summer cells no significant signals could be detected in nuclei confirming the data of the western blot (Fig. 3B) showing that the amount of macroH2A protein is very low in these cells. In contrast, in winter cells, a strong signal is found throughout the nucleus. Altogether these data show that during the winter acclimation, the dramatic change in gene expression and chromatin organization is accompanied by a modification of histone composition and not by an increase of classical

heterochromatin markers histone H4 mono and trimethyl modifications.

3.3. Ribosomal DNA genes are hypermethylated in winter-adapted hepatocytes

Many studies have pointed out the importance of cytosine base methylation of CpG dinucleotides for the establishment of constitutive heterochromatin and in some case of facultative heterochromatin. It has been shown that silent ribosomal genes are methylated at CpG residues [39]. Since the dramatic change in nucleolar structure during the winter-acclimatization process is accompanied by the down regulation of ribosomal gene expression, we wanted to determine if this down regulation of ribosomal gene expression was correlated to a modification of CpG methylation within the ribosomal promoter sequence. DNA was extracted from cells exposed to both conditions, submitted to *HpaII* digestion (inhibited by methylation) then analysed by PCR using different pairs of primers (Fig. 5). We analyzed two different CCGG sites at –30 and +45. If these CpG residues are methylated, DNA will be resistant to *HpaII* cleavage, and a PCR product will be detected. As a control we used a pair of primers (–28/–10; +24/+45) located between the 2 studied CpG residues, which will give a PCR product independently of the methylation state of DNA. As shown in Fig. 5, DNA isolated from winter-adapted animals is significantly more resistant to *HpaII* cleavage than DNA isolated from summer adapted animals. Quantitative PCR indicated a 3.5-fold (–30) and 3.2-fold (+45) resistance to cleavage in winter compared to summer conditions, indicating that in cold condition, ribosomal DNA promoter sequences are hypermethylated.

Our study shows that the expression of the histone variant macroH2A is drastically modified upon acclimatization. MacroH2A interferes with transcription factor binding, SWI/SNF nucleosome remodeling [30] and polymerase II transcription (Doyen et al. submitted) potentially through enhancing the interaction of the histone octamer with the nucleosomal DNA [40]. Furthermore, the C-terminal non-histone domain of macroH2A may be involved in ADP-ribosylation of chromatin with potential implications for transcriptional silencing

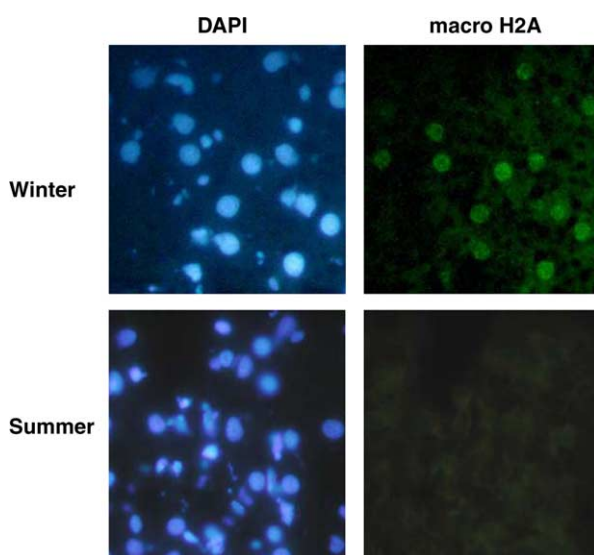


Fig. 4. Immunofluorescence analysis of the expression of macroH2A. Liver fragments from winter- and summer-acclimatized animals were frozen then treated for staining with macroH2A antibodies. Nuclei were stained with DAPI.

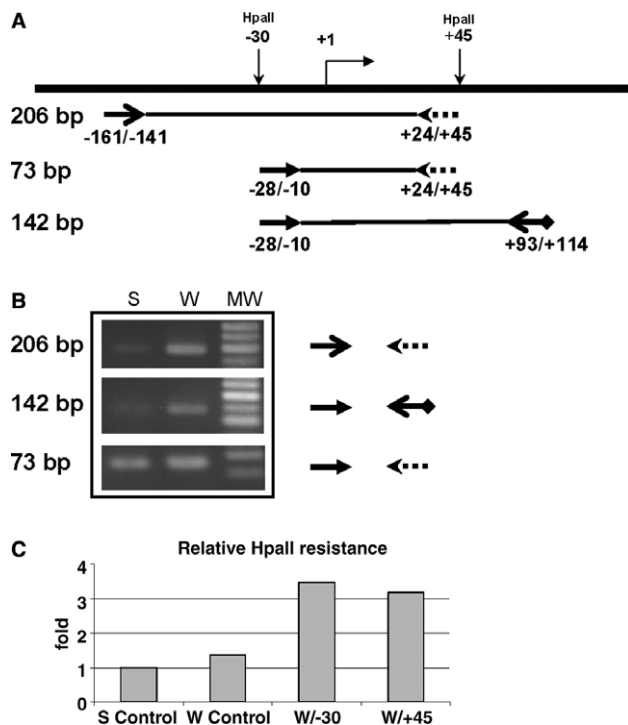


Fig. 5. Ribosomal genes are hypermethylated in winter-acclimatized animals. DNA was extracted from hepatocytes cells isolated from summer (S) and winter (W) acclimatized carps and methylation at CpG site was analyzed by QPCR after *HpaII* digestion. (A) Map of the carp ribosomal DNA gene with the position of the -30 and +45 studied CpG sites. Primers used for the PCR reactions are indicated together with the length of the expected PCR product. (B) PCR analysis with the different primers as indicated on the left on the figure. On the right of the panel are indicated the length of the PCR fragment. Amplification with internal primers (lower panel) is used as internal control since amplification is independent on the presence of the methylated state of DNA. (C) Quantification of the PCR assays.

[14,40]. Recent reports indicate that macroH2A may accumulate in constitutive heterochromatin and could contribute to maintaining its repressed state [37] and that it could contribute to transcriptional silencing acting in synergy with other repressive markers such as DNA methylation, histone deacetylation and methylation [36]. Expression of macroH2A seems to vary greatly according to the cell type [41], and in this study, we show that its expression is drastically up regulated during the cold acclimatization process. The regulated expression of histones variants, and in particular of macroH2A as shown in this study, could be key regulatory factors for the global reorganization of chromatin structure and the regulation of gene expression.

Acknowledgement: This work was supported by grants from the CNRS, Région Rhone Alpes, ECOS-CONICYT C02B01, FONDECYT 1040197, Universidad Andres Bello (DIUNAB 37-04).

References

[1] Vera, M.I., Norambuena, L., Alvarez, M., Figueroa, J., Molina, A., Leon, G. and Krauskopf, M. (1993) Reprogramming of nucleolar gene expression during the acclimatization of the carp. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39, 665–674.

- [2] Vera, M.I., Kausel, G., Barrera, R., Leal, S., Figueroa, J. and Quezada, C. (2000) Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 beta subunit gene in the carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 735–740.
- [3] Buckley, B.A., Owen, M.E. and Hofmann, G.E. (2001) Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J. Exp. Biol.* 204, 3571–3579.
- [4] Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J. and Cossins, A.R. (1996) Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818.
- [5] Gracey, A.Y. and Cossins, A.R. (2003) Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 231–259.
- [6] Gracey, A.Y., Fraser, E.J., Li, W., Fang, Y., Taylor, R.R., Rogers, J., Brass, A. and Cossins, A.R. (2004) Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16970–16975.
- [7] Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 148–151.
- [8] Travers, A. (1999) An engine for nucleosome remodeling. *Cell* 96, 311–314.
- [9] Peterson, C.L. and Workman, J.L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 187–192.
- [10] Langst, G. and Becker, P.B. (2001) Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Sci.* 114, 2561–2568.
- [11] Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294.
- [12] Podrabsky, J.E. and Somero, G.N. (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* 207, 2237–2254.
- [13] Kamakaka, R.T. and Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants?. *Genes Dev.* 19, 295–310.
- [14] Ladurner, A.G. (2003) Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* 12, 1–3.
- [15] Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411–422.
- [16] Dhillon, N. and Kamakaka, R.T. (2000) A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell* 6, 769–780.
- [17] Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J. and Luger, K. (2004) Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* 23, 3314–3324.
- [18] Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J. and Dimitrov, S. (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* 5, 715–720.
- [19] Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* 152, 375–384.
- [20] Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2004) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J.* 23, 3815–3824.
- [21] Chadwick, B.P., Valley, C.M. and Willard, H.F. (2001) Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 29, 2699–2705.
- [22] Pehrson, J.R. and Fujii, R.N. (1998) Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26, 2837–2842.
- [23] Pehrson, J.R. and Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398–1400.
- [24] Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599–601.

- [25] Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (2001) MACROH2A2, a new member of the macroH2A core histone family. *J. Biol. Chem.* 276, 21776–21784.
- [26] Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R. and Brockdorff, N. (1999) Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J. Cell Biol.* 147, 1399–1408.
- [27] Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. and Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77–83.
- [28] Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12, 1–11.
- [29] Scherl, A., Couste, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D. and Diaz, J.J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13, 4100–4109.
- [30] Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11, 1033–1041.
- [31] Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S. and Westerfield, M. (2001) The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res.* 29, 87–90.
- [32] Sims III, R.J., Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19, 629–639.
- [33] Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.
- [34] Spada, F., Vincent, M. and Thompson, E.M. (2005) Plasticity of histone modifications across the invertebrate to vertebrate transition: histone H3 lysine 4 trimethylation in heterochromatin. *Chromosome Res.* 13, 57–72.
- [35] Sullivan, B.A. and Karpen, G.H. (2004) Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1076–1083.
- [36] Hernandez-Munoz, I., Lund, A.H., van der Stoop, P., Boutsma, E., Muijters, I., Verhoeven, E., Nusinow, D.A., Panning, B., Marahrens, Y. and vanLohuizen, M. (2005) Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone macroH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7635–7640.
- [37] Grigoryev, S.A., Nikitina, T., Pehrson, J.R., Singh, P.B. and Woodcock, C.L. (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J. Cell Sci.* 117, 6153–6162.
- [38] Ma, Y., Jacobs, S.B., Jackson-Grusby, L., Mastrangelo, M.A., Torres-Betancourt, J.A., Jaenisch, R. and Rasmussen, T.P. (2005) DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. *J. Cell Sci.* 118, 1607–1616.
- [39] Santoro, R. and Grummt, I. (2001) Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol. Cell* 8, 719–725.
- [40] Abbott, D.W., Chadwick, B.P., Thambirajah, A.A. and Ausio, J. (2005) Beyond the Xi: macroH2A chromatin distribution and post-translational modification in an avian system. *J. Biol. Chem.* 280, 16437–16445.
- [41] Abbott, D.W., Laszczak, M., Lewis, J.D., Su, H., Moore, S.C., Hills, M., Dimitrov, S. and Ausio, J. (2004) Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* 43, 1352–1359.

The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity

Khalid Ouararhni,¹ Réda Hadj-Slimane,¹ Slimane Ait-Si-Ali,¹ Philippe Robin,¹ Flore Mietton,² Annick Harel-Bellan,¹ Stefan Dimitrov,^{2,3} and Ali Hamiche^{1,4}

¹Laboratoire Epigénétique et Cancer, Centre national de la recherche scientifique (CNRS) FRE 2944, 94801 Villejuif, France;

²Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) U309, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France; ³Laboratoire Joliot-Curie, École normale supérieure (ENS) de Lyon, 69007 Lyon, France

The histone variant mH2A is believed to be involved in transcriptional repression, but how it exerts its function remains elusive. By using chromatin immunoprecipitation and tandem affinity immunopurification of the mH2A1.1 nucleosome complex, we identified numerous genes with promoters containing mH2A1.1 nucleosomes. In particular, the promoters of the inducible *Hsp70.1* and *Hsp70.2* genes, but not that of the constitutively expressed *Hsp70.8*, were highly enriched in mH2A1.1. PARP-1 was identified as a part of the mH2A1.1 nucleosome complex and was found to be associated with the *Hsp70.1* promoter. A specific interaction between mH2A1.1 and PARP-1 was demonstrated and found to be associated with inactivation of PARP-1 enzymatic activity. Heat shock released both mH2A1.1 and PARP-1 from the *Hsp70.1* promoter and activated PARP-1 automodification activity. The data we present point to a novel mechanism for control of *Hsp70.1* gene transcription. mH2A1.1 recruits PARP-1 to the promoter, thereby inactivating it. Upon heat shock, the *Hsp70.1* promoter-bound PARP-1 is released to activate transcription through ADP-ribosylation of other *Hsp70.1* promoter-bound proteins.

[*Keywords:* Histone variant; mH2A; PARP-1; ADP-ribosylation; transcription]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received May 31, 2006; revised version accepted October 19, 2006.

The fundamental unit of chromatin, the nucleosome core, is a multisubunit structure consisting of four different histone types (Luger et al. 1997). An important way to control chromatin function is to alter the biochemical make-up of the nucleosome by replacing an individual histone with a histone variant. This enables the structure and function of the nucleosome to be regulated in a very precise way (Malik and Henikoff 2003).

The histone variant macroH2A (mH2A) is an unusual core histone related to canonical H2A. mH2A consists of a histone H2A-like domain fused to a large C-terminal nonhistone region (NHR). The NHR is also termed the macro domain (Pehrson and Fried 1992). Two closely related but distinct mH2A genes, mH2A1 and mH2A2, have been identified (Pehrson and Fuji 1998; Chadwick and Willard 2001; Costanzi and Pehrson 2001). mH2A1 has two splice variants, mH2A1.1 and mH2A1.2 (Pehrson et al. 1997).

A number of studies suggest that mH2A could play an

essential role in heterochromatin establishment or maintenance (Costanzi and Pehrson 1998; Rasmussen et al. 2000; Chadwick and Willard 2002; Grigoryev et al. 2004). mH2A has been shown to reside in close proximity to pericentric heterochromatin (Costanzi et al. 2000); it was also found associated with the facultative heterochromatin of the inactive X chromosomes in female mammals (Costanzi and Pehrson 1998). However, mH2A is expressed at similar levels in male and female cells (Rasmussen et al. 1999), suggesting that its function is not restricted to X-chromosome inactivation. In vitro, mH2A was found able to inhibit SWI/SNF nucleosome remodeling and to interfere with initiation of Polymerase II transcription (Angelov et al. 2003; Doyen et al. 2006). These data suggest that mH2A could be involved in transcription repression, but precisely how it could exert this function is still largely unknown.

The macrodomain of mH2A bears strong homology with proteins found in several types of single-stranded RNA (ssRNA) viruses (Pehrson and Fuji 1998). The recent crystallization of AF1521, a protein consisting of a stand-alone macro domain from *Archaeoglobus fulgidus*, suggests that macro domains, including that found

⁴Corresponding author.

E-MAIL hamiche@vjf.cnrs.fr; FAX 33-1-49-58-33-07.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.396106>.

in mH2A, could possess catalytic activity toward ADP-ribosylated substrates (Allen et al. 2003). The macro domain product of the yeast gene YBR022w exhibits ADP-ribose-1"-phosphate (Appr-1"-p)-processing activity (Martzén et al. 1999), indicating that macro domains are phosphoesterases. The presence of macro domains in some poly(ADP-ribose) polymerases (PARP-9 and PARP-14) hints at a functional role in poly-ADP-ribosylation (Allen et al. 2003; Ame et al. 2004).

In this work we show that the promoters of the inducible human *HSP-70.1* and *HSP-70.2* genes, but not the constitutively expressed *HSP-70.8* gene (*HSC70*), are very highly enriched in mH2A1.1. By using a TAP-ChIP (for tandem-affinity purification and chromatin immunoprecipitation assay) approach we have identified promoters of numerous other genes enriched in macroH2A1.1. We also show that mH2A1.1 interacts specifically with PARP-1 through its macro domain. We present evidence suggesting that this interaction is crucial for the keeping the *HSP-70.1* promoter silenced. Our data point to a novel mechanism for the transcriptional repression of *HSP-70.1* through down-regulation of the activity of PARP-1 by mH2A1.1, and they suggest that numerous highly regulated genes could be kept silenced by this novel mechanism.

Results

Identification of *Hsp70* as a mH2A1.1 target gene

A number of studies point to a general involvement of mH2A in heterochromatin establishment and transcription repression (Costanzi and Pehrson 1998; Angelov et al. 2003; Chadwick and Willard 2004; Grigoryev et al. 2004). The mechanisms by which this repression is achieved are not really known (Angelov et al. 2003; Ladurner 2003; Abbott et al. 2005). We have used a highly specific ChIP assay that is based on the TAP method (Nakatani and Ogryzko 2003) to identify specific DNA sequences associated with mH2A1.1. The approach, termed TAP-ChIP, is schematically described in Figure 1. It uses a HeLa cell line stably expressing mH2A1.1 fused to its N terminus with double HA and Flag peptides (e-mH2A1.1). The immunofluorescence staining of e-mH2A1.1 in these cells reveals that the tagged histones colocalize with chromatin (Fig. 1A), indicating that the presence of the tag epitopes does not interfere with their deposition and association with chromatin. It is important to note that the expression level of the tagged protein did not exceed 30% of the endogenous mH2A1, as evidenced by Western blot using an anti-mH2A1 antibody (Fig. 1B).

Nuclei from the tagged cells were digested with controlled amounts of micrococcal nuclease to give predominantly mono- and dinucleosomes (see Fig. 1C, lane 4). Epitope-tagged mH2A1.1 (e-mH2A1.1) nucleosomes were first immunopurified with anti-Flag antibody followed by a second immunopurification with anti-HA antibody. e-mH2A1.1 nucleosomes were proteinase K digested, and the DNA was phenol extracted. The purified

DNA was then treated with T4 DNA kinase, and 3' A-overhangs were added using Taq DNA polymerase (see Fig. 1D). The DNA fragments corresponding to e-mH2A1.1 nucleosomes were cloned into the pcDNA3.1-Topo vector using TA cloning technology. The transformed clones were checked for inserts, sequenced using vector-specific primers, and then a Blast search in the genome database was carried out. This approach has allowed the identification of numerous genes associated with mH2A1.1 (Supplementary Table 1). One of the genomic sequences identified corresponded to the *Hsp70.1* gene. *Hsp70.1* is inducible in response to heat shock and chemical stress. We further focused on this gene.

mH2A1.1 specifically targets the *Hsp70.1* promoter

To confirm the association of mH2A1.1 with the *Hsp70.1* gene, we have complemented the TAP-ChIP approach with a combination of standard ChIP and either semiquantitative or real-time PCR. The sheared, formaldehyde-treated chromatin from HeLa cells expressing e-mH2A1.1 histone was immunoprecipitated with anti-Flag and anti-HA epitope antibodies. The precipitated chromatin was analyzed using PCR primer pairs that cover either the promoter or the coding region of the *Hsp70.1* gene. The PCR products were then run on an agarose gel for analysis. The results show that the DNA fragment spanning the *Hsp70.1* promoter (P, 191 base pairs [bp]) was enriched, whereas the fragment located in the coding region (C, 363 bp) was not (see Fig. 2A). We then used real-time PCR to quantify the relative enrichment of e-mH2A1.1 in the promoter region. Two different dilutions of each sample were analyzed independently by Q-PCR with the aforementioned primers. PCR values were normalized against values obtained with chromatin from nontagged cells. The results, presented in Figure 2B, show that e-mH2A1.1 is enriched 45 times on the promoter region of the *Hsp70.1* gene compared with the coding region.

We next asked if the ectopically expressed mH2A1.1 (e-mH2A1.1) accurately reflects the distribution of native protein throughout the genome and hence if the target genes identified by our TAP-ChIP approach are indeed the real in vivo targets of mH2A1.1. To study this, we examined the in vivo distribution of the endogenous mH2A1 on the *Hsp70.1* promoter using a nontagged HeLa cell line. The ChIP assays were performed with a highly specific polyclonal antibody directed against the NHR of mH2A1, and the distribution of mH2A1 on *Hsp70.1* was determined by semiquantitative (Fig. 2C) or real-time PCR (Fig. 2D). The results show that the promoter region of *Hsp70.1* is enriched 27-fold with endogenous mH2A1 (Fig. 2D).

Note that the antibody used specifically recognizes mH2A1 (it does not react with mH2A2) (data not shown), but it does not differentiate between mH2A1.1 and mH2A1.2, and consequently this ChIP assay cannot really differentiate which of the two splice variants specifically associates with the *Hsp70.1* promoter. Never-

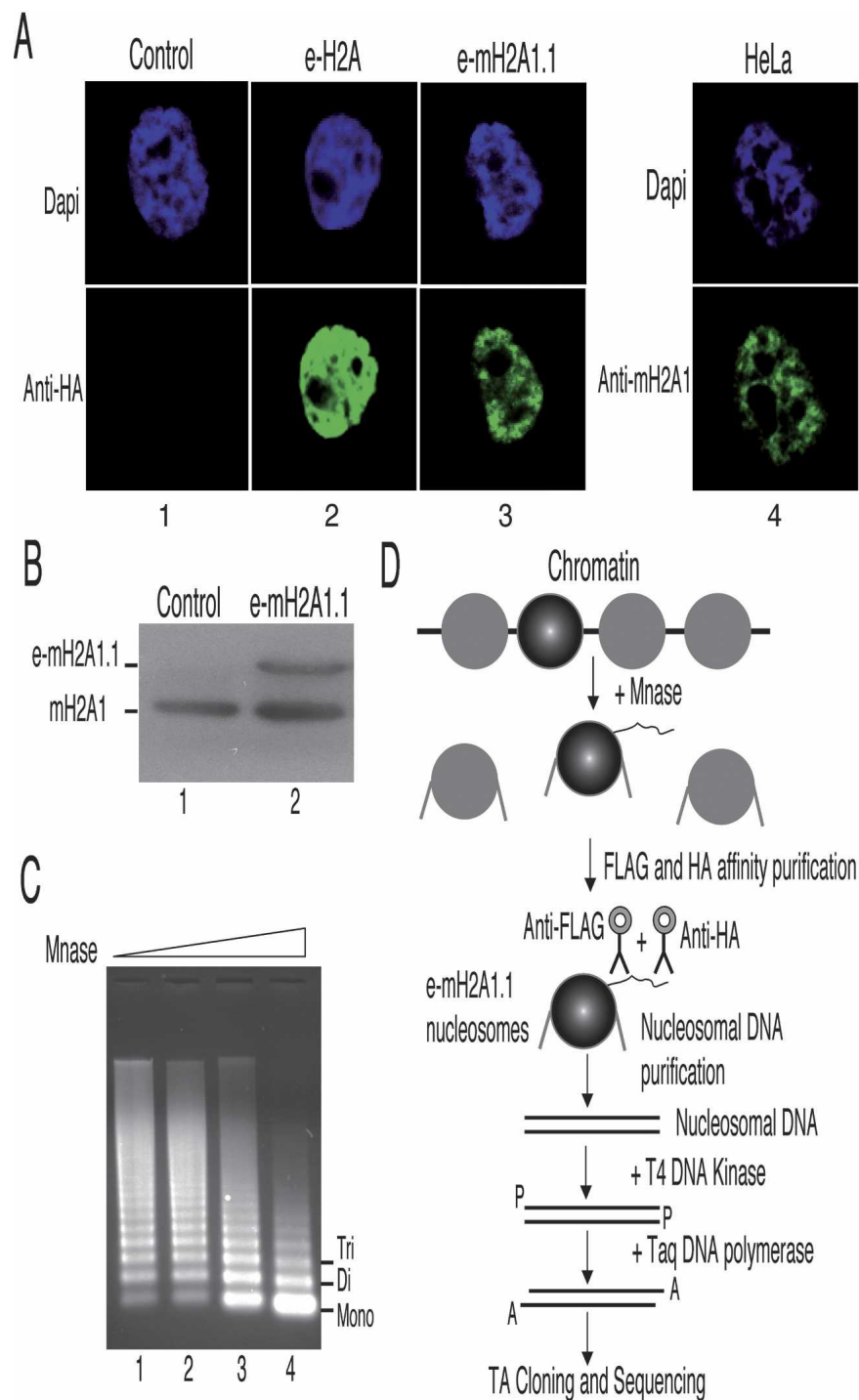


Figure 1. Preparation and purification of e-mH2A1.1 nucleosomes. (A) e-mH2A1.1 associates with chromatin. HeLa cell lines stably expressing either e-H2A (column 2) or e-mH2A1.1 (column 3) were stained with DAPI (*top*) and anti-HA antibody (*bottom*). (Column 4) Control HeLa cell line stained with DAPI (*top*) and anti-macroH2A1 antibody (*bottom*). (B) Western blot quantification of e-mH2A1.1 expression level in HeLa cells. Total extracts isolated from HeLa cells expressing e-mH2A1.1 or not were resolved by SDS-PAGE, blotted, and revealed with anti-macroH2A1 antibody. (C) Preparation of e-mH2A1.1 nucleosomes. Nuclei from a HeLa cell line stably expressing an epitope-tagged version of mH2A1.1 were digested with increasing amounts of micrococcal nuclease; the DNA from the digested samples was purified and resolved in 1% agarose gel. (D) Schematics of the TAP-ChIP approach used for the purification of e-mH2A1.1 nucleosomes and identification of the DNA sequences associated with e-mH2A1.1.

theless, bearing in mind that the TAP-ChIP assay identified only mH2A1.1 interacting with the *Hsp70.1* promoter, these data could be viewed as confirming the specific association of mH2A1.1 with the *Hsp70.1* promoter.

The *Hsp70* family encompasses at least 11 different genes. Some of these genes, such as the *Hsp70.1* gene, are heat-shock inducible, whereas others are constitutively expressed (Tavaria et al. 1996). We next asked if

mH2A1.1 was associated with the promoters of other inducible genes of the *Hsp70* family as well as with constitutively expressed *Hsp70* genes. We used a candidate approach, focusing on the heat-shock-inducible *Hsp70.2* and the constitutively expressed *Hsp70.8* (*Hsc70*) genes (Dworniczak and Mirault 1987). A ChIP assay using the anti-Flag and anti-HA antibodies was carried out with formaldehyde cross-linked chromatin isolated from HeLa cell lines stably expressing e-mH2A1.1. The real-

time PCR quantification (using primers specific for the respective promoters) clearly showed that the promoter region of the *Hsp70.2* gene was enriched in e-mH2A1.1 to an extent similar to that of the *Hsp70.1* gene, whereas the presence of e-mH2A1.1 was barely detectable at the promoter of the *Hsp70.8* gene (Fig. 2E). These data suggest that mH2A1.1 may in general be preferentially associated with inducible heat-shock genes.

Characterization of mH2A1.1-associated nucleosomes

The specific localization of mH2A1.1 on the *Hsp70.1* promoter suggests that this histone variant may be as-

Figure 2. mH2A1.1 is associated with the *Hsp70.1* and *Hsp70.2*, but not with the *Hsp70.8* promoter. (A) Analysis of e-mH2A1.1 distribution on the *Hsp70.1* locus using semiquantitative PCR. Mono- and dinucleosomes were purified from HeLa cells stably expressing tagged macro-H2A1.1 histone by TAP as described in Figure 1D. Input DNA and DNA isolated from the immunoprecipitated samples were amplified by PCR with *Hsp70.1* promoter (P) and coding (C) region primers, and the amplified products were separated on a 2% agarose gel. Molecular masses of the amplification products are indicated on the right side of the figure. Lane M corresponds to a molecular ladder. The panel "Input" (lower part of the figure) shows the fragments amplified from the input fraction (the starting material before immunoprecipitation) with primers specific for the promoter (P) and the coding (C) sequence. (B) e-mH2A1.1 is associated exclusively with the promoter region of the *Hsp70.1* gene. Nucleosomes were isolated from a HeLa cell line stably expressing e-mH2A1.1. Input DNA and the DNA isolated from tandem-immunoaffinity-purified e-mH2A1.1 nucleosomes were amplified by real-time PCR. The histograms show the relative enrichment of e-mH2A1.1 on the promoter (P/Input) and the coding region (C/Input) versus the input DNA. (C) Distribution of endogenous mH2A1 on the *Hsp70.1* locus using semiquantitative PCR. Nucleosomes were isolated from a control HeLa cell line (not expressing e-mH2A1.1), and the particles associated with the endogenous mH2A1 were immunoprecipitated with an anti-mH2A1 antibody. The input and the DNA isolated from the immunoprecipitated samples were amplified by semiquantitative PCR using the same primers as in A. The amplified products were separated on a 2% agarose gel. Molecular masses of the PCR-amplified fragments are indicated on the right side of the figure. Lane M corresponds to a molecular ladder. At the lower part of the figure (panel "Input") are shown the fragments amplified from the input material by using primers specific for the promoter (P) and coding (C) sequences. (D) Quantitative real-time PCR of the DNA isolated from the immunoprecipitated nucleosomes with anti-mH2A1 antibody. Nucleosomes were isolated from control HeLa cells and immunoprecipitated with anti-mH2A1 antibody. The DNA isolated from the nucleosomes was amplified by using real-time PCR as described in B. Histograms show the amount of immunoprecipitated DNA as a function of percent input DNA. (E) The promoter regions of the inducible *Hsp70.1* and *Hsp70.2*, but not that of the constitutively expressed *Hsp70.8* gene, are highly enriched in mH2A1. DNA isolated from the nucleosomes immunoprecipitated with the anti-mH2A1 antibody was quantitated by real-time PCR using primers specific for the promoters of *Hsp70.1*, *Hsp70.2*, and *Hsp70.8* genes, respectively. Histograms show the amount of DNA immunoprecipitated as a function of percent input DNA.

sociated with the silencing of the promoter of the *Hsp70.1* gene. To clarify this question we have identified the proteins specifically associated with mH2A1.1 chromatin. e-mH2A1.1 and e-H2A nucleosomes were purified from the corresponding stably established HeLa cell lines by double immunoaffinity purification using anti-Flag and anti-HA antibodies as described above. The purified complexes were run on 4%–12% gradient polyacrylamide gels containing SDS that were then stained with silver (Fig. 3A). As expected, immunoblotting with anti-Flag antibody revealed one specific band at the expected size for e-mH2A1.1 or e-H2A within the respective complexes (Fig. 3B). Numerous polypeptides were found associated with e-mH2A1.1 and e-H2A nucleosomes (Fig. 3A). Mass spectrometric analyses identified histones H3, H4, H2A, H2B, mH2A1.1, Ku80, Ku70, Hsp70, HDAC1, the two subtypes of H1 (H1.1 and H1.2), HP1 α , HP1 β , and poly(ADP-ribose) polymerase I (PARP-1) as components common to the e-mH2A1.1 and e-H2A complexes (Fig. 3A). Some proteins, including RCC1, DEK, MEP50, etc, were identified mainly in the mH2A1.1 nucleosome complex. A comprehensive list of the identified proteins, with their accession numbers, is presented in Supplementary Table 2. Although both complexes were found to contain PARP-1, only the e-mH2A1.1 complex had a significant amount of PARP-1. Importantly, the amount of PARP-1 present in the complex was found to be proportional to the amount of e-mH2A1.1 and histone H4 (Fig. 3A; Supplementary Fig.

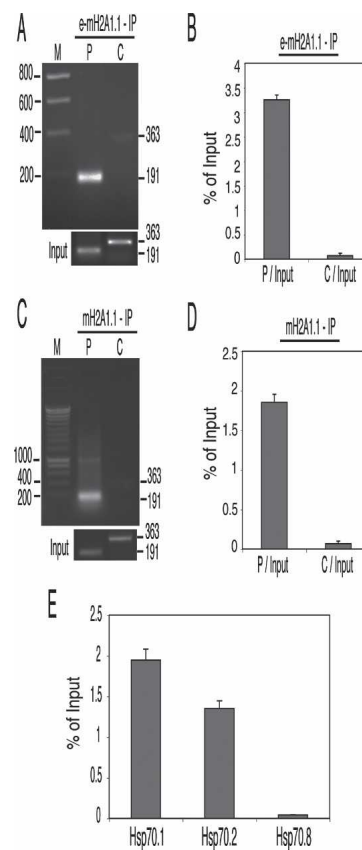
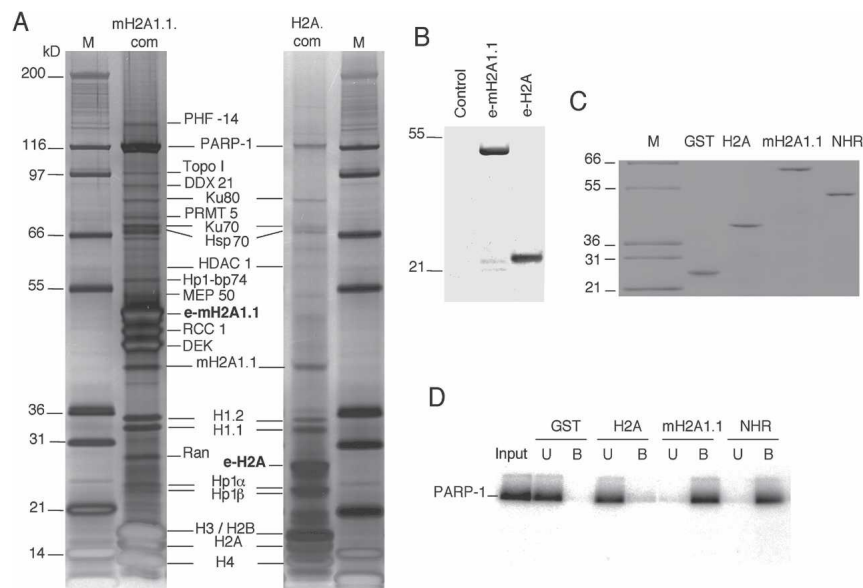


Figure 3. Characterization of H2A and mH2A1.1 complexes. (A) Silver staining of the e-H2A (H2A.com) and e-mH2A1.1 (mH2A1.1.com) nucleosome complexes isolated from HeLa cell lines stably expressing either e-H2A or e-mH2A1.1 proteins. The polypeptides identified by mass spectrometric analyses are indicated. Lane M corresponds to a protein molecular weight marker. The molecular masses of the markers are indicated on the left. (B) Western blot analysis of HeLa cells expressing e-mH2A1.1 and e-H2A. Total extracts isolated from control HeLa cells (control), stable HeLa cells expressing e-mH2A1.1 (e-mH2A1.1), and stable HeLa cells expressing e-H2A (e-H2A) were resolved by SDS-PAGE, blotted, and revealed with anti-Flag antibody. The molecular masses of the protein mass markers are indicated on the left. (C) Purification of recombinant GST-histones. Recombinant GST (GST), GST-H2A (H2A), GST-mH2A1.1 (mH2A1.1), or GST-NHR (NHR) were produced in bacteria and purified on glutathione Sepharose 4B (Amersham) according to the manufacturer's instructions. The samples were quantified, run on a 12% SDS-PAGE gel, and stained with Coomassie blue. (Lane M) Protein molecular mass marker. (D) GST pull-down experiment. Human recombinant PARP-1 was incubated with either recombinant GST (GST), GST-H2A (H2A), GST-mH2A1.1 (mH2A1.1), or GST-NHR (NHR). Beads were washed, and unbound (U) and bead-bound proteins (B) were run on a 12% SDS-PAGE gel, blotted, and revealed with anti-PARP-1 antibody.



1), suggesting a direct interaction between mH2A1.1 and PARP-1. In contrast, the H2A complex contained ~10 times less PARP-1 (the ratio between PARP-1 and histone H4 was found to be close to 0.1) (Fig. 3A, right panel).

To test if mH2A1.1 interacts specifically with PARP-1, we have expressed and purified fusions of GST with conventional H2A, full-length mH2A1.1, and with its NHR only (Fig. 3C) and have performed a series of GST pull-down experiments (Fig. 3D). A GST-H2A fusion and GST alone were used as controls. Identical amounts of the GST fusions (Fig. 3C), immobilized on glutathione Sepharose beads, were incubated with PARP-1, the beads were washed, and the proteins were eluted from the beads and subjected to SDS-PAGE. After transfer, the blot was revealed with an anti-PARP-1 antibody. Both mH2A1.1 and the NHR were found to interact with PARP-1 (Fig. 3D). This reaction was specific, since only a background signal was observed for GST-H2A and GST (Fig. 3D). These data demonstrate that mH2A1.1 interacts with PARP-1 through its NHR. Since the *Hsp70.1* promoter was highly enriched with mH2A1.1, the above data suggest that the *Hsp70.1* should be also enriched with PARP-1 and that the *Hsp70.1*-associated mH2A1.1 could be involved in the sequestration of PARP-1 on the promoter.

Heat shock induces mH2A1.1 and PARP-1 displacement and massive ADP-ribosylation of the *Hsp70.1* promoter-associated proteins

Seeking to comprehensively describe the function of mH2A1.1 in the regulation of *Hsp70.1* and its relation-

ship with PARP-1, we have examined the events occurring at the *Hsp70.1* promoter during heat-shock-dependent transcriptional activation using a ChIP assay. In addition to the e-mH2A1.1 stable cell line, two other stable HeLa cell lines expressing Flag-HA-tagged versions of either H3 (e-H3) or H3.3 (e-H3.3) histones were established. Initially we focused on the fate of the *Hsp70.1* promoter-associated PARP-1 and e-mH2A1.1 upon heat-shock treatment. The cells were heat-shocked for 5, 10, 20, or 30 min at 42°C and, immediately after the heat shock, treated with formaldehyde. Then ChIP was carried out using antibodies against e-mH2A1.1 (anti-Flag or anti-HA antibodies) and against PARP-1, and the amount of bound promoter in the ChIP samples was quantified by Q-PCR (Fig. 4A). As a control, chromatin was immunoprecipitated in the absence of specific antibodies. At 5 min of heat-shock treatment, an ~30% increase of the amount of PARP-1-associated *Hsp70.1* promoter was observed that then sharply decreased upon longer heat-shock treatment, and at 30 min of treatment it already dropped to ~10% of its initial level before the heat shock. A similar behavior (except at 5 min of heat-shock treatment) was observed for e-mH2A1.1. Analogous ChIP experiments were also carried out using anti-ADP-ribose antibody (Fig. 4B). A background amount of ADP-ribose polymer was present at the *Hsp70.1* promoter before heat shock. Five minutes of heat-shock activation resulted in a drastic increase of the promoter-associated ADP-ribose polymer, which decreased upon longer heat-shock treatment (Fig. 4B). Remarkably, the time course of decrease of the ADP-ribose polymer associated with the *Hsp70.1* promoter closely followed that of PARP-1 (Fig. 4, cf. A and B). These re-

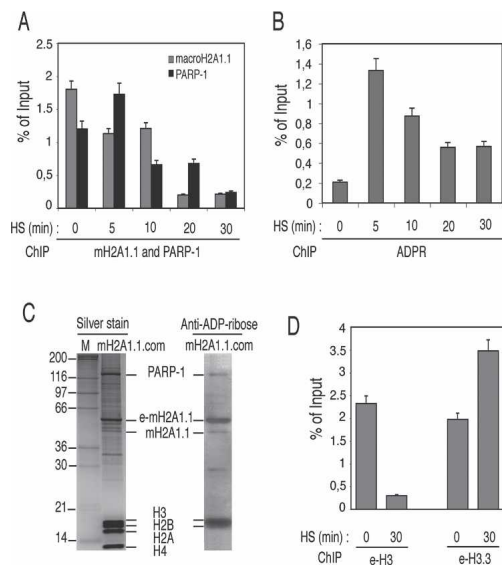


Figure 4. ChIP analysis reveals a dynamic protein exchange and a dramatic increase of protein ADP-ribosylation of the *Hsp70.1* promoter upon heat-shock activation. Distinct HeLa cell lines stably expressing Flag-HA-tagged versions of either mH2A1.1, or H3 or H3.3 histones were used in the experiments. A nontagged HeLa cell line was used as a negative control. (A) Time course of the heat-shock-induced displacement of mH2A1.1 and PARP-1 from the *Hsp70.1* promoter. The cells were heat-shocked for the times indicated and then immediately treated with formaldehyde to cross-link the proteins to DNA. ChIP was carried out by using either anti-Flag or anti-PARP-1 antibodies. The DNA isolated from the immunoprecipitated samples was amplified by real-time PCR. The histograms show the amount of *Hsp70.1* immunoprecipitated promoter DNA as a percent of the input DNA. The means and standard deviations of three independent experiments are presented. (B) Time course of the ADP-ribosylation of the proteins associated with the *Hsp70.1* promoter upon heat shock. The experiment was carried out as in A, but using anti-ADP-ribose antibody. The amounts of ADP-ribose on the *Hsp70.1* promoter are presented as copy numbers of the PCR-amplified products. The means and standard deviations of three independent experiments are presented. (C) mH2A1.1 is ADP-ribosylated. (Left panel) The e-mH2A1.1 complex was isolated from stable HeLa cell lines, separated on a 12% PAGE containing SDS, and silver-stained. The first lane shows the molecular markers with the molecular masses indicated at left. The right panel shows the Western blot of the complex revealed by anti-ADP-ribose antibody. Note that e-mH2A1.1, H3, and H2B are heavily ADP-ribosylated. PARP-1 is also found to be ADP-ribosylated, but to a lesser extent. (D) Removal of histone H3 and replacement with H3.3 at the *Hsp70.1* promoter upon heat shock. The ChIP experiments were carried out as described in A by using anti-Flag antibody and cells expressing either epitope-tagged H3 (e-H3) or epitope-tagged H3.3 (e-H3.3). The DNA isolated from the immunoprecipitated samples was amplified by real-time PCR. The histograms show the amount of *Hsp70.1* promoter DNA immunoprecipitated before (0 min) and after 30 min of heat shock as a percent of input DNA. The means and standard deviations of three independent experiments are given.

sults provide evidence that macroH2A1.1 and PARP-1 were present on the *Hsp70.1* promoter before activation and that heat shock induced their displacement from the promoter. Since ADP-ribosylation is essential for the release of chromatin-bound proteins (for a recent review, see Kim et al. 2005), we hypothesized that both macroH2A1 and PARP-1 could be ADP-ribosylated. To test this, we isolated e-mH2A1.1 nucleosome complexes and used a highly specific anti-ADP-ribose antibody (Supplementary Fig. 5) to visualize the association of the polymer with the proteins of the e-mH2A1.1 nucleosome complex in the absence of heat shock (Fig. 4C). The Western blot showed that both PARP-1 and e-mH2A1.1, as well as the core histones H3 and H2B, were ADP-ribosylated (Fig. 4C, right panel), a result in agreement with the literature (Abbott et al. 2005). These results suggested that upon heat-shock activation not only mH2A1.1 and PARP-1, but also the core histones, should be heavily ribosylated and consequently released from the *Hsp70.1* promoter in an ADP-ribosylation-dependent manner. And this was indeed found to be the case, since upon 30 min of heat-shock treatment the amount of histone e-H3-associated *Hsp70.1* promoter dropped to ~10% of its initial value before the heat shock (Fig. 4D, left panel). In parallel, the amount of the histone variant e-H3.3-interacting *Hsp70.1* promoter increases close to twofold (Fig. 4D, right panel), a result in agreement with the reported data for other genes (Chow et al. 2005; Mito et al. 2005; Schwartz and Ahmad 2005).

These observations suggest that mH2A1.1 could be associated with the establishment and/or maintenance of the inactive state of the *Hsp70.1* promoter and that heat-shock activation induces its displacement from the promoter. In addition, our results indicate that PARP-1 ADP-ribosylation activity is inhibited while PARP-1 is sequestered (possibly by mH2A1.1) on the promoter. PARP-1 becomes active when it is released from the *Hsp70.1* promoter and modifies promoter-associated histones, thus leading to an accumulation of ADP-ribose moieties.

mH2A1.1 regulates PARP-1 enzymatic activity

To study the above-suggested interference of mH2A1.1 with the enzymatic activity of PARP-1, we carried out a series of in vitro experiments (Figs. 5, 6). The objective was to test if a perturbation in the folding of mH2A1.1 might affect PARP-1 activity and facilitate the release of the otherwise mH2A1.1 nucleosome-associated PARP-1. To this end we generated point mutations in the mH2A1.1 gene that convert a HXTX motif at positions 213–216 in mH2A1.1 to alanines (AAAA) (Supplementary Fig. 4). These mutations were chosen since they could affect a mH2A1.1 putative phosphoesterase activity (Allen et al. 2003). Indeed, this HXTX motif is present in other macro domains that possess catalytic activity toward ADP-ribosylated substrates (Supplementary Fig. 4; Allen et al. 2003). Mutations in this motif abolish the phosphoesterase activity of the macro-domain proteins (Hofmann et al. 2000; Nasr and Filipowicz 2000). This

motif is also in close proximity to the mH2A1.1 pocket (Allen et al. 2003; Chakravarthy et al. 2005), which binds ADP-ribose (and possibly mono-ADP-ribosylated PARP-1) and its derivative O-acetyl-ADP-ribose (Karras et al. 2005; Kustatscher et al. 2005), so that mutations in the motif may be expected to affect the binding.

To test if the above mutations affect the binding of mono-ADP-ribose, increasing amounts of recombinant wild-type (WT) and mutated (Mut) mH2A1.1 macro domains were purified to homogeneity, incubated with 32 P-ADP-ribose, and blotted (in duplicate) onto PVDF membranes to detect the labeled proteins (Fig. 5A, upper panel). The duplicate membrane was Coomassie-stained as a control for equal loading (Fig. 5A, lower panel). The obtained results confirmed the weaker binding of mono-ADP-ribose to the mutated e-mH2A1.1 compared with its binding to the WT e-mH2A1.1 (Fig. 5A, upper panel). This provides evidence that the structure of the e-mH2A1.1 pocket that binds ADP-ribose (Karras et al. 2005; Kustatscher et al. 2005) was perturbed in the mutated protein.

If the folding of mH2A1.1 is important for the affinity of PARP-1 binding within the e-mH2A1.1 nucleosome complex, alterations in the folding of e-mH2A1.1 should

affect PARP-1 binding. To address this, we have purified WT and Mut e-mH2A1.1 complexes under different conditions of stringency; i.e., at 150 mM (Fig. 5B, left panel) and 300 mM (Fig. 5B, middle panel) NaCl. Remarkably, the amount of PARP-1 associated with the WT and Mut complexes isolated at 150 mM NaCl differed only slightly (see the quantification at Fig. 5B, right panel). However, the picture was completely different for the complexes isolated at 300 mM NaCl (Fig. 5B, middle panel and quantification). In this case, the amount of PARP-1 that remained associated with the mutated e-mH2A1.1 nucleosome complex did not exceed 8%–10% of that associated with the WT e-mH2A1.1 nucleosome complex (Fig. 5B, quantification). Therefore, 300 mM NaCl was able to strongly perturb the binding of PARP-1 to the mutated e-mH2A1.1 within the nucleosome complex, arguing for weaker interaction between PARP-1 and the mutated e-mH2A1.1. This suggests that, in vivo at the *Hsp70.1* promoter, the amount of PARP-1 associated with mutated e-mH2A1.1 would be smaller compared with that associated with the WT e-mH2A1.1. We found this indeed to be the case (Fig. 5C). Briefly, we performed ChIP experiments with anti-PARP-1 by using chromatin isolated from HeLa cell lines stably express-

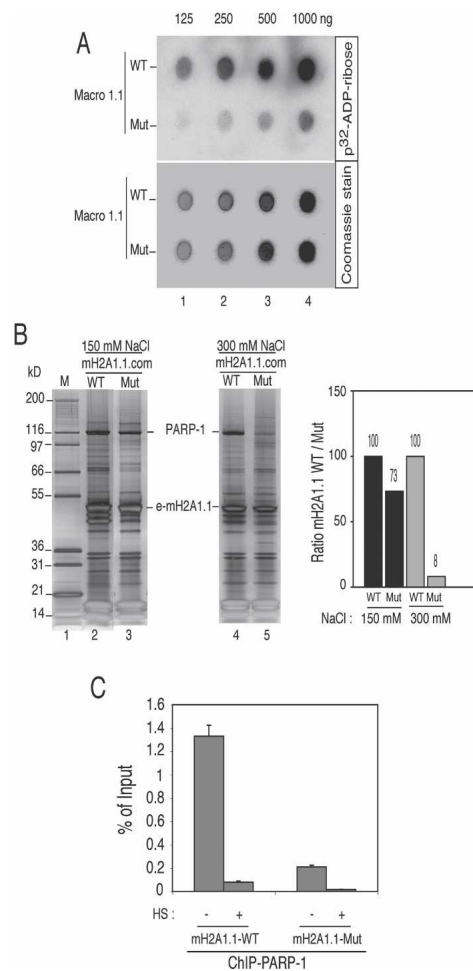


Figure 5. Weaker binding of PARP-1 within the mutated mH2A1.1 nucleosome complex. (A) Altered binding of mono-ADP-ribose to the mutated mH2A1.1. Recombinant wild-type (WT) and mutated (Mut) mH2A1.1 were purified to homogeneity. Increasing amounts of both proteins were loaded (in duplicate) on filters. One filter was then incubated with 32 P-ADP-ribose (upper panel), whereas the other one was stained with Coomassie blue as a control for equal loading (lower panel). Note that the binding of the 32 P-ADP-ribose to the mutated mH2A1.1 was much weaker compared with that for the wild-type protein. (B) Increasing the ionic strength releases the mutated, but not the wild-type, e-mH2A1.1 protein from the nucleosome complex. The wild-type (WT) and mutated (Mut) mH2A1.1 nucleosome complexes were isolated from cell lines stably expressing the WT or the mutated e-mH2A1.1 histone using either 150 mM NaCl (left panel) or 300 mM NaCl (right panel). The complexes were run on a 4%–12% PAGE gradient containing SDS, then silver-stained. The positions of e-mH2A1.1 and PARP-1 are indicated. (M) Protein molecular mass marker. The right panel presents the quantification of PARP-1 (relative to histone H1) within the WT and mutated e-mH2A1.1 complexes, isolated in 150 mM and 300 mM NaCl, respectively. Note the drastic decrease of the amount of PARP-1 within the mutated mH2A1.1 complex isolated at 300 mM NaCl. (C) The amount of PARP-1 associated in vivo with the *Hsp70.1* promoter in the stable cell lines expressing mutated e-mH2A1.1 is much lower compared with that associated with the *Hsp70.1* promoter in the stable cell lines expressing WT e-mH2A1.1. Non-heat-shocked (HS; -) and heat-shocked (for 30 min at 42°C) (HS; +) cell lines were treated with formaldehyde to cross-link the proteins to DNA, and ChIP was carried out using anti-PARP-1 antibody. Amounts of the real-time PCR-amplified *Hsp70.1* promoter DNA fragments are presented as a percent of input DNA. Note the strong decrease of the amount of PARP-1 associated with the *Hsp70.1* promoter of the control cells expressing the mutated e-mH2A1.1, compared with that of the control cells expressing the WT protein.

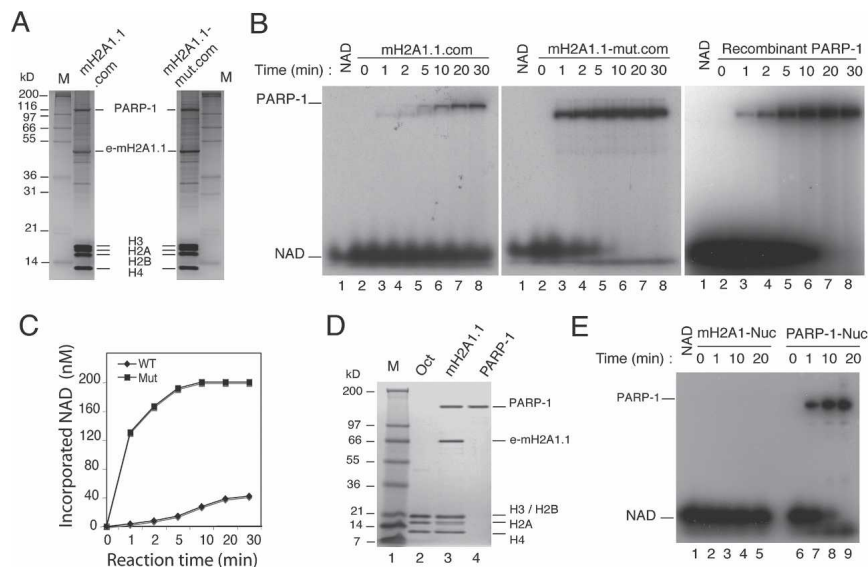


Figure 6. mH2A1.1 down-regulates PARP-1 enzymatic activity. (A) Silver staining of the purified wild-type macroH2A1.1 (e-mH2A1.1) and the mutant (e-mH2A1.1-mut) nucleosomes used for measurement of PARP-1 enzymatic activity. The complexes were isolated using 100 mM NaCl. The bands corresponding to PARP-1, e-mH2A1.1, and the conventional core histones are indicated. (M) Protein molecular mass marker. (B) Kinetic analysis of PARP-1 activity of purified mH2A1.1 complex (left panel), purified mH2A1.1 mutant complex (middle panel), and recombinant PARP-1 (right panel) in the presence of 200 nM 32 P-NAD $^{+}$. To measure the auto-ADP-ribosylation activity of the recombinant PARP-1, an amount of nucleosomes (100 ng) and recombinant PARP-1 equal to that in the mH2A1.1 complexes was used. Note the close auto-ADP-ribosylation kinetics of the recombi-

nant PARP-1 and the PARP-1 in the mH2A1.1-mut.com. (C) Quantification of the data shown in B. Note the dramatic difference in the auto-ADP-ribosylation kinetics of PARP-1 associated with the wild-type and the mutated mH2A1.1 complexes. (D) Twelve percent SDS-PAGE of the purified e-mH2A1.1 octamers and associated PARP-1. e-mH2A1.1 nucleosome complexes were loaded on a hydroxyl apatite column, and after washing with 0.65 M NaCl the remaining proteins were eluted with 2 M buffered solution of NaCl. To purify PARP-1 from the histone octamers, the 2 M NaCl eluate was supplemented with 1 M urea and passed through an agarose-nickel column. (Lanes 1,2) Molecular mass marker and conventional histone octamer as a control. (Lane 3) The protein composition of the 2 M NaCl eluate. (Lane 4) The purified PARP-1. (E) Kinetic analysis of PARP-1 activity associated with *in vitro* reconstituted nucleosomes containing either conventional core histones (lanes 2–5) or purified e-mH2A1.1 core histones (lanes 6–9). The samples were incubated with 32 P-NAD $^{+}$ and run on 12% PAGE containing SDS. Lane 1 contains 32 P-NAD $^{+}$ only.

ing either WT or mutated e-mH2A1.1, and Q-PCR to quantify the amount of PARP-1-associated *Hsp70.1* promoter. The quantification showed that no more than 15% of *Hsp70.1* promoter was associated with PARP-1 in the cells expressing the mutated e-mH2A1.1, as compared with that found in the cells expressing the WT protein. Taken together, all of the above data demonstrate, both *in vitro* and *in vivo*, that the folding of mH2A1.1 is crucial for the binding of PARP-1 to chromatin.

We next measured the auto-ADP-ribosylation activity of the PARP-1 associated with the mutant and wild-type e-mH2A1.1 nucleosome complexes. The two complexes were isolated under the same conditions by double immunoaffinity purification in a buffered solution containing 100 mM NaCl (Fig. 6A). Under these conditions, the relative amount of PARP-1 associated with the mH2A1.1-mut complex was the same as that associated with the wild-type mH2A1.1 complex (Fig. 6A). To measure the auto-ADP-ribosylation activity of PARP-1, wild-type and mutant complexes containing the same amount of associated PARP-1 (100 ng) were incubated in the presence of mononucleosomes and 32 P- α -NAD $^{+}$ (Fig. 6B). A solution containing conventional nucleosomes and recombinant human PARP-1 (100 ng) was used as a positive control (Fig. 6B). The reaction was arrested at the indicated times and the samples loaded on a 12% SDS-PAGE gel. After completion of electrophoresis, the auto-ADP-ribosylated PARP-1 was visualized by autoradiography (Fig. 6B).

Incubation of the wild-type mH2A1.1 complex with mononucleosomes in the presence of 32 P- α -NAD $^{+}$ resulted in a poor labeling of PARP-1 with very slow kinetics (Fig. 6B, left panel). Undeniably, the intensity of the band corresponding to PARP-1 was weak even at 30 min of incubation (the longest time of incubation) (Fig. 6B, left panel). The kinetics and extent of auto-ADP-ribosylation of PARP-1 associated with e-mH2A1.1-mut nucleosomes were, however, completely different (Fig. 6B, middle panel). A strong PARP-1 labeling was already observed at 1 min of incubation; it increased linearly with time and reached completion within 5–10 min (Fig. 6B, middle panel). In addition, the extent of PARP-1 labeling during the first minute was at least 37 times higher than that of the PARP-1 associated with the wild-type e-mH2A1.1 nucleosomes (Fig. 6C, quantification). These results strongly suggest that the interaction of mH2A1.1 with PARP-1 interferes with the PARP-1 auto-ADP-ribosylation activity. Indeed, perturbation of the folding of the mutated mH2A1.1 (Fig. 5A,B) would result in a perturbation of the specific interaction between the mutated mH2A1.1 and PARP-1 (Fig. 5B), which in turn would allow PARP-1 to adopt a conformation close to that of the enzyme free in solution, with higher enzymatic activity. Our data on the auto-ADP-ribosylation of recombinant PARP-1 are in agreement with this, since both the kinetics and the degree of auto-ADP-ribosylation of recombinant PARP-1 were similar to these of the PARP-1 associated with the mutant e-mH2A1.1 (Fig. 6B, cf. middle and right panels). Note

that the NAD concentrations used here are close to the physiological concentrations and do not allow the formation of a highly branched PARP-1 (see Supplementary Fig. 2).

Since the e-mH2A1.1 mononucleosome complex contains, in addition to PARP-1, a number of other proteins (Supplementary Table 2), it is difficult to completely exclude the possibility that some of these proteins might, like e-mH2A1.1, interact with PARP-1 and also interfere with its enzymatic activity. To rule this out, we sought to purify the e-mH2A1.1 octamers and the associated PARP-1, to reconstitute the e-mH2A1.1 nucleosome-PARP-1 complex from highly purified components, and to measure the enzymatic activity of the associated e-mH2A1.1 nucleosome PARP-1. To this end, we generated a new HeLa cell line stably expressing a triple-tagged version of mH2A1.1 (Flag-HA-His). This allowed the purification of the e-mH2A1.1 histone octamer and PARP-1 from the e-mH2A1.1 nucleosome complex. Briefly, the Flag-HA purified mononucleosomes were adsorbed on a hydroxyl apatite column and washed with 0.65 M NaCl. Washing the column with 0.65 M NaCl released all of the associated proteins, with the exception of PARP-1, (Fig. 6D, lane 3; data not shown), providing evidence for a very strong binding of PARP-1 to e-mH2A1.1 nucleosomes (note that the e-mH2A1.1 and PARP-1 remaining on the column are in roughly stoichiometric amounts, suggesting that one molecule of nucleosomal e-mH2A1.1 might be complexed with one molecule of PARP-1).

The e-mH2A1.1 octamer and PARP-1 were released from the column with a buffered solution containing 2 M NaCl (Fig. 6D, lane 3) and were used for reconstitution of the e-mH2A1.1-PARP-1 nucleosome complex. The auto-ADP-ribosylation activity of the PARP-1 associated with the reconstituted e-mH2A1.1 nucleosomes was then tested (Fig. 6E). A solution containing conventional nucleosomes and native PARP-1 (purified from the 2 M NaCl eluate of the hydroxyl apatite column-immobilized e-mH2A1.1 nucleosome complex) (Fig. 6D, lane 4; see Materials and Methods for details) was used as a positive control (Fig. 6E). The reaction was arrested at the indicated times and the samples were loaded on a 12% SDS-PAGE gel. After completion of electrophoresis, the auto-ADP-ribosylated PARP-1 was visualized by autoradiography (Fig. 6E). Incubation of the *in vitro* reconstituted e-mH2A1.1 nucleosomes with PARP-1 in the presence of ^{32}P - α -NAD⁺ resulted in a complete inactivation of its enzymatic activity (Fig. 6E, lanes 2–5), while the same PARP-1, when incubated with conventional mononucleosomes, showed a strong ADP-ribosylation activity, which increased with time and reached completion within 10–20 min (Fig. 6E, lanes 6–9). In addition, incubation of the *in vitro* reconstituted mH2A1.1 nucleosomes containing PARP-1 in the presence of a 100-fold excess of conventional nucleosomes (Supplementary Fig. 6) failed to reactivate PARP-1, further confirming that the specific interaction between PARP-1 and mH2A1.1 determines the “inactivation” of the enzyme.

Suppression of mH2A1 expression interferes with the heat-shock response

According to reported data, PARP-1 is required for the heat-shock-induced puffing and *hsp70* expression in *Drosophila* larvae (Tulin and Spradling 2003). A whole set of data in this manuscript show that in mammalian cells, PARP-1 is intimately related with mH2A1.1, which in turn suggests that mH2A1.1 should also be involved in the heat-shock response. Bearing this in mind, suppression of the expression of either mH2A1.1 or PARP-1 would be expected to affect the heat-shock response. To test this, we designed two small interfering RNAs (siRNAs) corresponding to the mRNA sequences of either mH2A1 or PARP-1 and used them for transfection in HeLa cells. A scrambled (Scr) sequence was used as a negative control. Forty-eight hours post-transfection, cells were heat-shocked for 30 min at 42°C and left to recover for 30 min at 37°C. Cells were then harvested and assayed both for suppression of the expression of mH2A1.1 and PARP-1 (by Western blotting) and for the transcription of *Hsp70.1* (by RT-PCR) (Fig. 7).

Transfection with the specific siRNA strongly inhibited the expression of PARP-1 and mH2A1, whereas transfection with the scrambled control sequence had no effect (Fig. 7A). The RT-PCR revealed that the knockdown of either PARP-1 or mH2A1 dramatically down-regulated transcription of the *Hsp70.1* gene, which dropped to background level (the level in the absence of heat shock) in the case of PARP-1 and to about twice the background level when mH2A1 was knocked down (Fig. 7B). In contrast, HeLa cells transfected with a scrambled siRNA (Scr) behaved like the nontransfected control and did not show any repression of *Hsp70.1* activation (Fig. 7B).

In order to confirm these results, we also performed a kinetic analysis of *Hsp70.1* activation in the presence of macroH2A1 siRNAs (Fig. 7C). HeLa cells transfected or not with macroH2A1 siRNA were heat-shocked for 30 min at 42°C and the expression of *Hsp70.1* was monitored by real-time RT-PCR after 10, 20, and 30 min of recovery. The results clearly show that down-regulation of macroH2A1 with a specific siRNA results in a very strong decrease and a delay of the heat-shock response (Fig. 7C). We conclude that the knockdown of mH2A1 has an effect similar to that of PARP-1 knockdown on the heat-shock response. Since mH2A1 appeared to be involved in the association of PARP-1 with the *Hsp70.1* promoter, one would expect that the depletion of mH2A1 by siRNA treatment would severely reduce the amount of *Hsp70.1* promoter-associated PARP-1, which in turn would interfere with the heat-shock response. The CHIP data (Fig. 7D) demonstrated that the depletion of mH2A1 resulted, as expected, in a strong decrease of the amount of PARP-1 interacting with the *Hsp70.1* promoter.

Note that the siRNA used for mH2A1 suppression recognizes both the mRNA of mH2A1.1 and the mRNA of mH2A1.2 (see Materials and Methods for details). Our data thus reflect the effect of the suppression of both

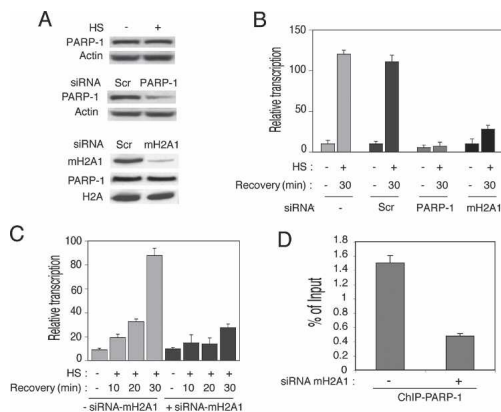


Figure 7. siRNA knockdown of the expression of mH2A1.1 or PARP-1 delays the heat-shock response. (A) The siRNA treatment efficiently suppresses the expression of mH2A1 and PARP-1. HeLa cells were transfected with siRNA specific for either PARP-1 or mH2A1, or with scrambled siRNA. Forty-eight hours post-transfection the cells were heat-shocked; after a recovery of 30 min, they were collected and lysed. PARP-1 (middle panel) and mH2A1 (lower panel) were detected by Western blotting using specific antibodies. Immunodetection of actin and H2A was used as control for equal loading. (Lower panel) The level of PARP-1 expression was checked before and after macroH2A1 knock-down. The upper panel shows the amount of PARP-1 before and after heat shock (HS). Note the strong and specific suppression of both PARP-1 and mH2A1 in cells treated with the respective siRNA. (B) Inhibition of mH2A1.1 and PARP-1 expression by siRNA affects the heat-shock response in a similar way. HeLa cells were transfected or not with either macroH2A1-specific siRNA (mH2A1), PARP-1-specific siRNA (PARP-1), or unrelated siRNA (Scr, scrambled). After the heat shock the cells were allowed to recover for 30 min, and RNA was isolated from the different samples. The real-time PCR quantification of the relative amount of *Hsp70.1* mRNA versus GAPDH mRNA in HeLa cells before (HS; -) and after (HS; +) a heat shock is shown. Each histogram presents the mean and standard deviation of three independent experiments. (C) Kinetic analysis of *Hsp70.1* activation in knocked-down mH2A1.1 HeLa cells. The cells were transfected with mH2A1-specific siRNA (+siRNA-mH2A1) or without any siRNA (-siRNA-mH2A1), and RNA was isolated at 10, 20, or 30 min after the heat shock (HS; +) or in the absence of any heat shock (HS; -). Each histogram is the measured (by real-time PCR) relative amount of *Hsp70.1* mRNA versus GAPDH mRNA at the indicated times before (HS; -) or after (HS; +) a heat shock. The means and standard deviations of three independent experiments are presented. (D) Suppression of the expression of mH2A1 with siRNA down-regulates the amount of PARP-1 associated with the *Hsp70.1* promoter. Control nontreated (-siRNA-mH2A1) and siRNA-treated (+siRNA-mH2A1) HeLa cells were cross-linked with formaldehyde and used for ChIP with anti-PARP-1 antibody. DNA was isolated from both ChIP samples and submitted to real-time PCR amplification with primers specific for the *Hsp70.1* promoter.

mH2A1.1 and mH2A1.2 on the expression of *Hsp70.1*. However, since only mH2A1.1 was found associated with the *Hsp70.1* promoter, we attributed the observed effect only to the ablation of mH2A1.1.

Discussion

We report here a physical interaction between mH2A.1.1 and PARP-1. We present evidence suggesting that this interaction is crucial for keeping the *Hsp70.1* promoter silenced through down-regulation of the enzymatic activity of PARP-1 by mH2A1.1. This was confirmed by measuring the PARP-1 auto-ADP-ribosylation activity associated with a nucleosome complex containing a folding mutant of mH2A1.1. Heat-shock activation releases both PARP-1 and mH2A1.1 from the *Hsp70.1* promoter and induces a massive ADP-ribosylation of the promoter-associated proteins.

These observations imply that PARP-1 and mH2A1.1 act in concert to regulate the transcriptional status of the *Hsp70.1* promoter in mammalian cells. What is the precise mechanism of this regulation? A number of studies have considered PARP-1 as a regulator of chromatin structure and transcription, but conflicting results have left its role unclear (Kraus and Lis 2003; Pirrotta 2004). Several authors have reported a distinct role of PARP-1 in gene regulation (Oei et al. 1998). A recent study reported that *Drosophila* PARP-1 is a component of a repressive complex, which is also essential for gene activation (Ju et al. 2004). In another study, *Drosophila* PARP-1 was found to be broadly distributed in the euchromatic arms of polytene chromosomes (Tulin and Spradling 2003). At most sites, PARP-1 is inactive, but its enzymatic activity is required at sites of active transcription such as ecdysteroid and heat-shock-induced puffs (Tulin and Spradling 2003). Therefore, PARP-1 may have a dual function, being in some cases implicated in gene activation, whereas in others it could be implicated in gene silencing. This dual function of PARP-1 appeared to be important since mammalian cells have evolved and express a specialized histone variant mH2A1.1, which through its NHR can sequester PARP-1 to target DNA sequences. Upon association with the mH2A chromatin, PARP-1 becomes a part of a transcriptional repressive complex. Based on our data, we hypothesized that upon heat shock, the folding of the NHR of mH2A1.1 is perturbed. Such perturbation may be the result of a specific NHR modification (e.g., phosphorylation) associated with the heat shock. This perturbation of the folding of mH2A would affect the mH2A1.1-PARP-1 interaction and allow PARP-1 to "recover" its enzymatic activity and to ADP-ribosylate itself and the neighboring histones. The ADP-ribosylation would assist the removal of the histones from the *Hsp70.1* promoter and allow the activation of transcription. A massive protein ribosylation would require a dissociation of PARP-1 from mH2A1.1 chromatin, and this is indeed the case, since our ChIP data show no PARP-1 associated with the *Hsp70.1* promoter at 30 min of heat shock (Fig. 4). The auto-ADP-ribosylation was not, however, sufficient to release PARP-1 from mH2A1.1 chromatin (see Supplementary Fig. 3), suggesting that another factor, possibly a chromatin remodeling complex, assists in this process.

The above scenario also implies a crucial dual role of mH2A1, in both silencing and activation of transcription

Ouararhni et al.

of the *Hsp70.1* promoter. The silencing, as mentioned above, is achieved through the presence of mH2A1.1 on the *Hsp70.1* promoter and the sequestration and subsequent "inactivation" of PARP-1. The role of mH2A1.1 in *Hsp70.1* promoter activation involves keeping PARP-1 at the right place (associated with the *Hsp70.1* promoter), which upon heat shock and subsequent change in the conformation of mH2A results in having an active enzyme at the *Hsp70.1* locus at the right time. Thus, it is not surprising that the knockdown of mH2A1.1, like the knockdown of PARP-1, caused an important decrease and delay in the transcription of the *Hsp70.1* gene in response to heat shock (Fig. 7). This mechanism of transcriptional regulation has the advantage of allowing very quick transcriptional responses to environment stimuli.

Material and methods

Plasmid construction

Full-length human cDNA clones of H2A (IMAGE 757500), mH2A1.1 (IMAGE 6187051), H3 (IMAGE 5181234), and H3.3 (IMAGE 4872658) were purchased from Invitrogen. The complete coding sequence from each clone was PCR-amplified with primers incorporating restriction enzyme recognition sites and subcloned into the XhoI–NotI sites of the pREV-HTF retroviral vector or pGEX-5X.1 vector (Amersham) using standard techniques.

Purification of e-H2A and e-mH2A1.1 nucleosome complexes

Nuclear pellets prepared from HeLa cells expressing the H2A and mH2A1.1 proteins fused with N-terminal double-HA and double-Flag epitope tags (e-H2A/e-mH2A1.1) were digested with micrococcal nuclease to give predominantly mononucleosomes. Mononucleosomes containing e-H2A or e-mH2A1.1 were purified from the resulting material by immunoprecipitation on anti-Flag antibody-conjugated agarose. After elution with the Flag peptide, the bound nucleosomes were further affinity-purified by anti-HA antibody-conjugated agarose and eluted with the HA peptide.

GST pull-down assay

GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (pLysS) grown at 25°C. The soluble proteins were purified on glutathione Sepharose 4B beads (Amersham) by standard methods. Human recombinant PARP-1 (Alexis) was incubated for 1 h with the GST fusion proteins at 30°C while gentle mixing in PBS, 100 mM KCl, and 0.02% NP40. Beads were then extensively washed in the same buffer, and the bound proteins were eluted in SDS electrophoresis loading buffer, fractionated on SDS-PAGE, blotted, and revealed by a human anti-PARP-1 antibody (Alexis).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed using standard procedures. Rat anti-HA antibody (Roche) was used at 1:300 dilution; the secondary antibody used is a goat anti-rat IgG coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 1:400 dilution.

RNA isolation and quantification

Total RNA was extracted from 10⁷ HeLa cells and reverse-transcribed using a first-strand cDNA synthesis kit according to the

manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Real-time quantitative PCR was performed using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit and the LightCycler apparatus according to the protocol provided by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals). PCR was carried out with the following oligonucleotide pairs: 5'-CAGGTGATCAACGACGGAGACA-3' and 5'-GTTCGATCGTCAGGATGGACACG-3' for *Hsp-70.1*, and 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' and 5'-GGTGTCCGCTTGAAGTCAGAG-3' for GAPDH. The signals were normalized to the GAPDH signal. PCR products were verified on a 1.5% agarose gel.

Formaldehyde cross-linking and ChIP

Chromatin was prepared as described in Ferreira et al. (2001), with a cross-linking time of 10 min at 37°C and sonication to an average length of 400–800 bp. ChIPs were performed using the following antibodies: M2 anti-Flag agarose beads (Sigma), anti-PARP-1, and anti-ADP-ribose (Alexis). Samples were analyzed by Q-PCR on a LightCycler, and copy numbers were calculated as described in Ferreira et al. (2001). Two different dilutions of each sample were analyzed independently, and the results from Q-PCR were expressed as the fraction of the total number of input copies that were detected in each immunoprecipitate. Primers were *Hsp70.1* promoter: forward, 5'-GGCGAAACCCCTGGAATATTTCCCGA-3', and reverse, 5'-AGCCTTGGGA CAACGGGAG-3'; *Hsp70.1* coding region: forward, 5'-CAGGTGATCAACGACGGAGACA-3', and reverse, 5'-GTTCGATCGTCAGGATGGACACG-3'; GAPDH: forward, 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3', and reverse, 5'-GGTGTCCGCTGTTGAAGTCAGAG-3'; *Hsp70.2* promoter: forward, 5'-GGCCGAGAGTCAGGAGGAACC-3', and reverse, 5'-ACTCTTCCAGCTCCACCACAG-3'; *Hsp70.8* promoter: forward, 5'-TGTGGCTTCTTCGTTATTGGA-3', and reverse, 5'-AAATACCGCTGCCATCCCACCG-3'.

SiRNA-mediated silencing

HeLa cells in exponential growth were seeded onto six-well plates and transfected with 1 µg of mH2A1 siRNA (5'-AAGCAGGGUGAAGUCAGUAA-3'), PARP-1 siRNA (5'-AAGCCUCCGCUCCUGAACAAU-3') or scrambled control siRNA (5'-CAUGUCAUGUUCACAUCUCTT-3') using Lipofectamine (Invitrogen). Forty-eight hours post-transfection, cells were heat-shocked for 30 min at 42°C and left to recover for 10, 20, and 30 min at 37°C. Cells were then harvested and assayed for *Hsp70.1* expression by RT-PCR and, for mH2A1 and PARP-1 silencing, by immunoblotting. Synthetic siRNAs were purchased from Genset Prologo.

Antibodies

Antibodies employed were as follows: monoclonal anti-Flag antibody M2 (Sigma), monoclonal anti-HA antibody 9E (Roche), monoclonal anti-PARP-1 (Alexis), monoclonal anti-ADP-ribose (Alexis), polyclonal anti-mH2A1 (Stefan Dimitrov, INSERM, Grenoble, France), and anti- α -tubulin antibody (Sigma).

Purification of e-mH2A1.1 octamers and associated PARP-1

e-mH2A1.1 nucleosomes were purified from a HeLa cell line stably expressing a triple-tagged version of mH2A1.1 (Flag-HA-His). The purified mononucleosomes were adsorbed on a hydroxyapatite column and washed with 0.65 M NaCl, and the remaining proteins were eluted with 2 M NaCl. PARP-1 was then dissociated from e-mH2A1.1 octamers by incubation in 2

M NaCl and 1 M urea, and purified from the remaining histones by removing the histidine-tagged mH2A1.1 on an agarose-nickel column. The purified e-mH2A1.1 octamers containing PARP-1 and the free PARP-1 were quantified and frozen at -80°C until use.

Poly(ADP-ribosylation) assay

Poly(ADP-ribosylation) was performed *in vitro* in a 20- μL reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 200 nM α - ^{32}P NAD (10 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$) (Amersham), 100 ng of mononucleosomes, and 100 ng of recombinant PARP-1 or native mH2A1.1-associated PARP-1. The reaction was incubated for 1–30 min at 37°C , stopped with 1% SDS, and directly loaded on a 12% SDS-PAGE gel.

Acknowledgments

We thank C. Cremisi for her continuous support and L.L. Pritchard for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue Nationale contre le Cancer, and by grants from the Ministère de la Recherche (ACI Jeune Chercheur, ACI Biologie Cellulaire Moléculaire et Structurale, BCM0070 and ACI Interface Physique-Chimie-Biologie: DRAB, 2004, #04 2 136) and ANR Project no. NT05-1_41978.

References

- Abbott, D.W., Chadwick, B.P., Thambirajah, A.A., and Ausio, J. 2005. Beyond the Xi: MacroH2A chromatin distribution and post-translational modification in an avian system. *J. Biol. Chem.* **280**: 16437–16445.
- Allen, M.D., Buckle, A.M., Cordell, S.C., Lowe, J., and Bycroft, M. 2003. The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J. Mol. Biol.* **330**: 503–511.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882–893.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P., and Dimitrov, S. 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* **11**: 1033–1041.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. 2001. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: Identification of a second macroH2A variant. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 1101–1113.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. 2002. Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* **157**: 1113–1123.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 17450–17455.
- Chakravarthy, S., Gundimella, S.K., Caron, C., Perche, P.Y., Pehrson, J.R., Khochbin, S., and Luger, K. 2005. Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol. Cell Biol.* **25**: 7616–7624.
- Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., and Dillon, N. 2005. Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* **6**: 354–360.
- Costanzi, C. and Pehrson, J.R. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**: 599–601.
- Costanzi, C. and Pehrson, J.R. 2001. MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J. Biol. Chem.* **276**: 21776–21784.
- Costanzi, C., Stein, P., Worrada, D.M., Schultz, R.M., and Pehrson, J.R. 2000. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* **127**: 2283–2289.
- Doyen, C.M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., and Dimitrov, S. 2006. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell Biol.* **26**: 1156–1164.
- Dworniczak, B. and Mirault, M.E. 1987. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock ‘cognate’ protein. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5181–5197.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L.L., and Harel-Bellan, A. 2001. Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep.* **2**: 794–799.
- Grigoryev, S.A., Nikitina, T., Pehrson, J.R., Singh, P.B., and Woodcock, C.L. 2004. Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J. Cell Sci.* **117**: 6153–6162.
- Hofmann, A., Zdanov, A., Genschik, P., Ruvinov, S., Filipowicz, W., and Wlodawer, A. 2000. Structure and mechanism of activity of the cyclic phosphodiesterase of Appr>p, a product of the tRNA splicing reaction. *EMBO J.* **19**: 6207–6217.
- Ju, B.G., Solum, D., Song, E.J., Lee, K.J., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. 2004. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II δ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* **119**: 815–829.
- Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugioux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. 2005. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* **24**: 1911–1920.
- Kim, M.Y., Zhang, T., and Kraus, W.L. 2005. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: ‘PAR-laying’ NAD $^{+}$ into a nuclear signal. *Genes & Dev.* **19**: 1951–1967.
- Kraus, W.L. and Lis, J.T. 2003. PARP goes transcription. *Cell* **113**: 677–683.
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugioux, C., Scheffzek, K., and Ladurner, A.G. 2005. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 624–625.
- Ladurner, A.G. 2003. Inactivating chromosomes: A macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* **12**: 1–3.
- 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.
- Malik, H.S. and Henikoff, S. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**: 882–891.
- Martzen, M.R., McCraith, S.M., Spinelli, S.L., Torres, F.M., Fields, S., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. 1999. A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**: 1153–1155.
- Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* **37**: 1024–1025.
- Nakatani, Y. and Ogryzko, V. 2003. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol.* **370**: 430–444.

Ouararhni et al.

- Nasr, F. and Filipowicz, W. 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclic nucleotide phosphodiesterase involved in the metabolism of ADP-ribose 1",2"-cyclic phosphate. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1676–1683.
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Ziegler, M., and Schweiger, M. 1998. A novel function of poly(ADP-ribosyl)ation: Silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry* **37**: 1465–1469.
- Pehrson, J.R. and Fried, V.A. 1992. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**: 1398–1400.
- Pehrson, J.R. and Fuji, R.N. 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2837–2842.
- Pehrson, J.R., Costanzi, C., and Dharia, C. 1997. Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J. Cell. Biochem.* **65**: 107–113.
- Pirrotta, V. 2004. The ways of PARP. *Cell* **119**: 735–736.
- Rasmussen, T.P., Huang, T., Mastrangelo, M.A., Loring, J., Panning, B., and Jaenisch, R. 1999. Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3685–3689.
- Rasmussen, T.P., Mastrangelo, M.A., Eden, A., Pehrson, J.R., and Jaenisch, R. 2000. Dynamic relocalization of histone MacroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation. *J. Cell Biol.* **150**: 1189–1198.
- Schwartz, B.E. and Ahmad, K. 2005. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes & Dev.* **19**: 804–814.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**: 23–28.
- Tulin, A. and Spradling, A. 2003. Chromatin loosening by poly-(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* **299**: 560–562.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, D. W., V. S. Ivanova, et al. (2001). "Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation." J Biol Chem 276(45): 41945-9.
- Abraham, R. T. and R. S. Tibbetts (2005). "Cell biology. Guiding ATM to broken DNA." Science 308(5721): 510-1.
- Agelopoulos, M. and D. Thanos (2006). "Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A." Embo J 25(20): 4843-53.
- Aguiar, R. C., K. Takeyama, et al. (2005). "B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity." J Biol Chem 280(40): 33756-65.
- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." Mol Cell 9(6): 1191-200.
- Allen, M. D., A. M. Buckle, et al. (2003). "The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A." J Mol Biol 330(3): 503-11.
- Andrabi, S. A., N. S. Kim, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal." Proc Natl Acad Sci U S A 103(48): 18308-13.
- Angelov, D., V. A. Bondarenko, et al. (2006). "Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes." Embo J 25(8): 1669-79.
- Angelov, D., A. Molla, et al. (2003). "The Histone Variant MacroH2A Interferes with Transcription Factor Binding and SWI/SNF Nucleosome Remodeling." Mol Cell 11(4): 1033-41.
- Angelov, D., A. Verdel, et al. (2004). "SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays." Embo J 23(19): 3815-24.
- Arents, G., R. W. Burlingame, et al. (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." Proc Natl Acad Sci U S A 88(22): 10148-52.
- Ausio, J. and K. E. van Holde (1986). "Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability." Biochemistry 25(6): 1421-8.
- Avner, P. and E. Heard (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." Nat Rev Genet 2(1): 59-67.
- Avner, P., M. Prissette, et al. (1998). "Molecular correlates of the murine Xce locus." Genet Res 72(3): 217-24.
- Babiarz, J. E., J. E. Halley, et al. (2006). "Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev 20(6): 700-10.
- Bacher, C. P., M. Guggiari, et al. (2006). "Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation." Nat Cell Biol 8(3): 293-9.
- Bao, Y., K. Konesky, et al. (2004). "Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA." Embo J 23(16): 3314-24.
- Bassing, C. H., H. Suh, et al. (2003). "Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors." Cell 114(3): 359-70.
- Becker, P. B. and W. Horz (2002). "ATP-dependent nucleosome remodeling." Annu Rev Biochem 71: 247-73.
- Black, B. E., M. A. Brock, et al. (2007). "An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 104(12): 5008-13.

- Boulard, M., T. Gautier, et al. (2006). "The NH₂ tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes." Mol Cell Biol 26(4): 1518-26.
- Bryant, H. E., N. Schultz, et al. (2005). "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase." Nature 434(7035): 913-7.
- Cadet, J., J. L. Ravanat, et al. (2006). "Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights." Photochem Photobiol 82(5): 1219-25.
- Carrel, L., C. Park, et al. (2006). "Genomic environment predicts expression patterns on the human inactive X chromosome." PLoS Genet 2(9): e151.
- Carrel, L. and H. F. Willard (2005). "X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females." Nature 434(7031): 400-4.
- Carruthers, L. M., J. Bednar, et al. (1998). "Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding." Biochemistry 37(42): 14776-87.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, et al. (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." Nat Cell Biol 5(7): 675-9.
- Celeste, A., S. Petersen, et al. (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." Science 296(5569): 922-7.
- Chadwick, B. P., C. M. Valley, et al. (2001). "Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome." Nucleic Acids Res 29(13): 2699-705.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2001). "Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant." Hum. Mol. Genet. 10: 1101-1113.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2001). "Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant." Hum Mol Genet 10(10): 1101-13.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2001). "A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome." J Cell Biol 152(2): 375-84.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2002). "Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome." J Cell Biol 157(7): 1113-23.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2003). "Barring gene expression after XIST: maintaining facultative heterochromatin on the inactive X." Semin Cell Dev Biol 14(6): 359-67.
- Chakravarthy, S., S. K. Gundimella, et al. (2005). "Structural characterization of the histone variant macroH2A." Mol Cell Biol 25(17): 7616-24.
- Chakravarthy, S. and K. Luger (2006). "The histone variant macro-H2A preferentially forms "hybrid nucleosomes"." J Biol Chem 281(35): 25522-31.
- Chang, P., M. Coughlin, et al. (2005). "Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function." Nat Cell Biol 7(11): 1133-9.
- Changolkar, L. N., C. Costanzi, et al. (2007). "Developmental changes in histone macroH2A1-mediated gene regulation." Mol Cell Biol 27(7): 2758-64.
- Changolkar, L. N. and J. R. Pehrson (2006). "macroH2A1 histone variants are depleted on active genes but concentrated on the inactive X chromosome." Mol Cell Biol 26(12): 4410-20.

- Chaumeil, J., P. Le Baccon, et al. (2006). "A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced." Genes Dev 20(16): 2223-37.
- Choi, Y. C., W. Gu, et al. (1996). "Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island." DNA Cell Biol 15(6): 495-504.
- Choo, J. H., J. D. Kim, et al. (2006). "Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions." Hum Mol Genet 15(5): 717-24.
- Chow, C. M., A. Georgiou, et al. (2005). "Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division." EMBO Rep 6(4): 354-60.
- Churikov, D., J. Siino, et al. (2004). "Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome." Genomics 84(4): 745-56.
- Clemson, C. M., L. L. Hall, et al. (2006). "The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences." Proc Natl Acad Sci U S A 103(20): 7688-93.
- Clerc, P. and P. Avner (2003). "Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice." Semin Cell Dev Biol 14(1): 85-92.
- Cohen-Armon, M., L. Visochek, et al. (2007). "DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation." Mol Cell 25(2): 297-308.
- Cosgrove, M. S., J. D. Boeke, et al. (2004). "Regulated nucleosome mobility and the histone code." Nat Struct Mol Biol 11(11): 1037-43.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (1998). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals." Nature 393(6685): 599-601.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (1998). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals." Nature 393: 599-601.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (2001). "MacroH2A2, a new member of the macroH2A core histone family." J. Biol. Chem. 276: 21776-21784.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (2001). "MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family." J Biol Chem 276(24): 21776-84.
- Costanzi, C., P. Stein, et al. (2000). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos." Development 127(11): 2283-9.
- Csankovszki, G., B. Panning, et al. (1999). "Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation." Nat Genet 22(4): 323-4.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, et al. (1999). "Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions." Biochem J 342 (Pt 2): 249-68.
- Daury, L., C. Chailleux, et al. (2006). "Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription." EMBO Rep 7(1): 66-71.
- Davidow, L. S., M. Breen, et al. (2007). "The search for a marsupial XIC reveals a break with vertebrate synteny." Chromosome Res 15(2): 137-46.
- de Napoles, M., J. E. Mermoud, et al. (2004). "Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation." Dev Cell 7(5): 663-76.
- de Wit, E., F. Greil, et al. (2007). "High-resolution mapping reveals links of HP1 with active and inactive chromatin components." PLoS Genet 3(3): e38.
- Dhillon, N. and R. T. Kamakaka (2000). "A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR." Mol Cell 6(4): 769-80.

- Dhillon, N., M. Oki, et al. (2006). "H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle." Mol Cell Biol 26(2): 489-501.
- Doyen, C. M., W. An, et al. (2006). "Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A." Mol Cell Biol 26(3): 1156-64.
- Doyen, C. M., F. Montel, et al. (2006). "Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome." Embo J 25(18): 4234-44.
- Egloff, M. P., H. Malet, et al. (2006). "Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains." J Virol 80(17): 8493-502.
- Ellis, L., D. O. Morgan, et al. (1987). "Heterologous transmembrane signaling by a human insulin receptor-v-ros hybrid in Chinese hamster ovary cells." Proc Natl Acad Sci U S A 84(15): 5101-5.
- Faast, R., V. Thonglairoam, et al. (2001). "Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development." Curr Biol 11(15): 1183-7.
- Fackelmayer, F. O. (2005). "A stable proteinaceous structure in the territory of inactive X chromosomes." J Biol Chem 280(3): 1720-3.
- Falck, J., J. Coates, et al. (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." Nature 434(7033): 605-11.
- Fan, Y., T. Nikitina, et al. (2003). "H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo." Mol Cell Biol 23(13): 4559-72.
- Fan, Y., T. Nikitina, et al. (2005). "Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation." Cell 123(7): 1199-212.
- Faraone-Mennella, M. R. (2005). "Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribosyl)ation of nuclear proteins." Biochem Cell Biol 83(3): 396-404.
- Fiegler, H., P. Carr, et al. (2003). "DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones." Genes Chromosomes Cancer 36(4): 361-74.
- Fiegler, H. and N. P. Carter (2004). "Genomic array technology." Methods Cell Biol 75: 769-85.
- Filippova, G. N., M. K. Cheng, et al. (2005). "Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development." Dev Cell 8(1): 31-42.
- Fitch, M. E., S. Nakajima, et al. (2003). "In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product." J Biol Chem 278(47): 46906-10.
- Fortini, P., E. Parlanti, et al. (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." J Biol Chem 274(21): 15230-6.
- Franklin, S. G. and A. Zweidler (1977). "Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals." Nature 266(5599): 273-5.
- Furuyama, T., Y. Dalal, et al. (2006). "Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 103(16): 6172-7.
- Ganesan, S., D. P. Silver, et al. (2002). "BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome." Cell 111(3): 393-405.
- Gautier, T., D. W. Abbott, et al. (2004). "Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome." EMBO Rep 5(7): 715-20.

- Gilbert, S. L., J. R. Pehrson, et al. (2000). "XIST RNA associates with specific regions of the inactive X chromatin." J Biol Chem 275(47): 36491-4.
- Gire, V. (2005). "[Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses?]." Med Sci (Paris) 21(5): 491-7.
- Gomez, M. and N. Brockdorff (2004). "Heterochromatin on the inactive X chromosome delays replication timing without affecting origin usage." Proc Natl Acad Sci U S A 101(18): 6923-8.
- Gong, F., Y. Kwon, et al. (2005). "Nucleotide excision repair in chromatin and the right of entry." DNA Repair (Amst) 4(8): 884-96.
- Govin, J., E. Escoffier, et al. (2007). "Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis." J Cell Biol 176(3): 283-94.
- Greaves, I. K., D. Rangasamy, et al. (2007). "H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere." Proc Natl Acad Sci U S A 104(2): 525-30.
- Gregoret, I. V., Y. M. Lee, et al. (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." J Mol Biol 338(1): 17-31.
- Grigoryev, S. A., T. Nikitina, et al. (2004). "Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence." J Cell Sci 117(Pt 25): 6153-62.
- Grune, T., J. Brzeski, et al. (2003). "Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI." Mol Cell 12(2): 449-60.
- Grutzner, F. and J. A. Graves (2004). "A platypus' eye view of the mammalian genome." Curr Opin Genet Dev 14(6): 642-9.
- Guillemette, B., A. R. Bataille, et al. (2005). "Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning." PLoS Biol 3(12): e384.
- Gupta, V., M. Parisi, et al. (2006). "Global analysis of X-chromosome dosage compensation." J Biol 5(1): 3.
- Hake, S. B. and C. D. Allis (2006). "Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis"." Proc Natl Acad Sci U S A 103(17): 6428-35.
- Hake, S. B., B. A. Garcia, et al. (2006). "Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants." J Biol Chem 281(1): 559-68.
- Harp, J. M., E. C. Uberbacher, et al. (1996). "X-ray diffraction analysis of crystals containing twofold symmetric nucleosome core particles." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 52(Pt 2): 283-8.
- Hassa, P. O., C. Buerki, et al. (2003). "Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1." J Biol Chem 278(46): 45145-53.
- Hassa, P. O., M. Covic, et al. (2001). "The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function." J Biol Chem 276(49): 45588-97.
- Hassa, P. O., S. S. Haenni, et al. (2005). "Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription." J Biol Chem 280(49): 40450-64.
- Hassan, A. H., P. Prochasson, et al. (2002). "Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes." Cell 111(3): 369-79.

- Heard, E. (2005). "Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome." Curr Opin Genet Dev 15(5): 482-9.
- Heard, E. and C. M. Disteche (2006). "Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome." Genes Dev 20(14): 1848-67.
- Hellman, A. and A. Chess (2007). "Gene body-specific methylation on the active X chromosome." Science 315(5815): 1141-3.
- Hernandez-Munoz, I., A. H. Lund, et al. (2005). "Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase." Proc Natl Acad Sci U S A 102(21): 7635-40.
- Hochegger, H., D. Dejsuphong, et al. (2006). "Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells." Embo J 25(6): 1305-14.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-74.
- Hore, T. A., E. Koina, et al. (2007). "The region homologous to the X-chromosome inactivation centre has been disrupted in marsupial and monotreme mammals." Chromosome Res 15(2): 147-61.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science 293(5532): 1074-80.
- Karras, G. I., G. Kustatscher, et al. (2005). "The macro domain is an ADP-ribose binding module." Embo J 24(11): 1911-20.
- Khochbin, S. (2001). "Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function." Gene 271(1): 1-12.
- Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." Cell 116(2): 259-72.
- Kim, M. Y., T. Zhang, et al. (2005). "Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal." Genes Dev 19(17): 1951-67.
- Kimura, H., N. Takizawa, et al. (2006). "A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cgamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B." J Cell Biol 175(3): 389-400.
- Klose, R. J. and Y. Zhang (2007). "Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation." Nat Rev Mol Cell Biol 8(4): 307-18.
- Kobor, M. S., S. Venkatasubrahmanyam, et al. (2004). "A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin." PLoS Biol 2(5): E131.
- Kohlmaier, A., F. Savarese, et al. (2004). "A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation." PLoS Biol 2(7): E171.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." Science 184(139): 868-71.
- Kouzarides, T. (2002). "Histone methylation in transcriptional control." Curr Opin Genet Dev 12(2): 198-209.
- Kozlov, S. V., M. E. Graham, et al. (2006). "Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation." Embo J 25(15): 3504-14.
- Kraus, W. L. and J. T. Lis (2003). "PARP goes transcription." Cell 113(6): 677-83.
- Kusch, T., L. Florens, et al. (2004). "Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions." Science 306(5704): 2084-7.
- Kustatscher, G., M. Hothorn, et al. (2005). "Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A." Nat Struct Mol Biol 12(7): 624-5.

- Ladurner, A. G. (2003). "Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription." Mol Cell 12(1): 1-3.
- Lee, J. T., L. S. Davidow, et al. (1999). "Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre." Nat Genet 21(4): 400-4.
- Lee, K. K. and J. L. Workman (2007). "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all." Nat Rev Mol Cell Biol 8(4): 284-95.
- Levy, N., A. Martz, et al. (2006). "XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage." Nucleic Acids Res 34(1): 32-41.
- Li, A., A. H. Maffey, et al. (2005). "Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B)." Biochemistry 44(7): 2529-35.
- Lindahl, T., C. Prigent, et al. (1993). "DNA joining in mammalian cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 58: 619-24.
- Liu, X., B. Li, et al. (1996). "Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*." Mol Cell Biol 16(8): 4305-11.
- Liu, Z., R. Oughtred, et al. (2005). "Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones." Mol Cell Biol 25(7): 2819-31.
- Loyola, A., G. LeRoy, et al. (2001). "Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription." Genes Dev 15(21): 2837-51.
- Luderus, M. E., B. van Steensel, et al. (1996). "Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex." J Cell Biol 135(4): 867-81.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature 389(6648): 251-60.
- Luk, E., N. D. Vu, et al. (2007). "Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ." Mol Cell 25(3): 357-68.
- Lusser, A. and J. T. Kadonaga (2003). "Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines." Bioessays 25(12): 1192-200.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)." Nature 190: 372-3.
- Lyon, M. F. (2006). "Do LINEs Have a Role in X-Chromosome Inactivation?" J Biomed Biotechnol 2006(1): 59746.
- Ma, Y., S. B. Jacobs, et al. (2005). "DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A." J Cell Sci 118(Pt 8): 1607-16.
- Margueron, R., P. Trojer, et al. (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" Curr Opin Genet Dev 15(2): 163-76.
- Martens, J. A. and F. Winston (2003). "Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes." Curr Opin Genet Dev 13(2): 136-42.
- Marti, T. M., E. Hefner, et al. (2006). "H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci U S A 103(26): 9891-6.
- Martianov, I., S. Brancorsini, et al. (2005). "Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 102(8): 2808-13.
- Marzluff, W. F. and R. J. Duronio (2002). "Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences." Curr Opin Cell Biol 14(6): 692-9.

- McKeown, K., L. Changolkar, et al. (2006). Utilizing cDNA subtraction to examine the effects of mH2A deletion in a colony of knockout female mice. 2006 MERCK/MERIAL national veterinary scholar symposium: creating the gumbo of progress, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.
- Meder, V. S., M. Boeglin, et al. (2005). "PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli." J Cell Sci 118(Pt 1): 211-22.
- Mendjan, S. and A. Akhtar (2007). "The right dose for every sex." Chromosoma 116(2): 95-106.
- Meneghini, M. D., M. Wu, et al. (2003). "Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin." Cell 112(5): 725-36.
- Menissier de Murcia, J., M. Ricoul, et al. (2003). "Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse." Embo J 22(9): 2255-63.
- Mermoud, J. E., C. Costanzi, et al. (1999). "Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation." J Cell Biol 147(7): 1399-408.
- Mermoud, J. E., C. Costanzi, et al. (1999). "Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation." J Cell Biol 147(7): 1399-408.
- Mermoud, J. E., A. M. Tassin, et al. (2001). "Centrosomal association of histone macroH2A1.2 in embryonic stem cells and somatic cells." Exp Cell Res 268(2): 245-51.
- Meyer, B. J. (2000). "Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose." Trends Genet 16(6): 247-53.
- Millar, C. B., F. Xu, et al. (2006). "Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast." Genes Dev 20(6): 711-22.
- Mizuguchi, G., X. Shen, et al. (2004). "ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex." Science 303(5656): 343-8.
- Mizuguchi, G., H. Xiao, et al. (2007). "Nonhistone Scm3 and Histones CenH3-H4 Assemble the Core of Centromere-Specific Nucleosomes." Cell 129(6): 1153-64.
- Monaco, L., U. Kolthur-Seetharam, et al. (2005). "Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14244-8.
- Morey, C., P. Navarro, et al. (2004). "The region 3' to Xist mediates X chromosome counting and H3 Lys-4 dimethylation within the Xist gene." Embo J 23(3): 594-604.
- Mutskov, V., D. Gerber, et al. (1998). "Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding." Mol. Cell. Biol. 18: 6293-6304.
- Nakajima, H., H. Nagaso, et al. (2004). "Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells." J Biol Chem 279(41): 42774-86.
- Nguyen, D. K. and C. M. Disteché (2006). "Dosage compensation of the active X chromosome in mammals." Nat Genet 38(1): 47-53.

- Nightingale, K. P., L. P. O'Neill, et al. (2006). "Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code." Curr Opin Genet Dev 16(2): 125-36.
- Nusinow, D. A., I. Hernandez-Munoz, et al. (2007). "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is inhibited by a histone H2A variant, MacroH2A, and contributes to silencing of the inactive X chromosome." J Biol Chem 282(17): 12851-9.
- O'Neill, L. P., A. M. Keohane, et al. (1999). "A developmental switch in H4 acetylation upstream of Xist plays a role in X chromosome inactivation." Embo J 18(10): 2897-907.
- Okamoto, I., A. P. Otte, et al. (2004). "Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development." Science 303(5658): 644-9.
- Okano, S., L. Lan, et al. (2003). "Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells." Mol Cell Biol 23(11): 3974-81.
- Ooi, S. L., J. R. Priess, et al. (2006). "Histone H3.3 variant dynamics in the germline of *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet 2(6): e97.
- Ota, K., M. Kameoka, et al. (2003). "Expression of histone acetyltransferases was down-regulated in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient murine cells." Biochem Biophys Res Commun 310(2): 312-7.
- Ouararhni, K., R. Hadj-Slimane, et al. (2006). "The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity." Genes Dev 20(23): 3324-36.
- Park, J. H., E. J. Park, et al. (2006). "Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction." Embo J 25(17): 3986-97.
- Park, Y. J., J. V. Chodaparambil, et al. (2005). "Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding." J Biol Chem 280(3): 1817-25.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, et al. (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol 10(15): 886-95.
- Pavri, R., B. Lewis, et al. (2005). "PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator." Mol Cell 18(1): 83-96.
- Pavri, R., B. Zhu, et al. (2006). "Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II." Cell 125(4): 703-17.
- Pehrson, J. R., C. Costanzi, et al. (1997). "Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes." J Cell Biochem 65(1): 107-13.
- Pehrson, J. R. and V. A. Fried (1992). "MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region." Science 257(5075): 1398-400.
- Pehrson, J. R. and V. A. Fried (1992). "MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region." Science 257: 1398-1400.
- Perche, P. Y., C. Vourc'h, et al. (2000). "Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density." Curr Biol 10(23): 1531-4.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, et al. (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol 81(3): 123-9.
- Pinto, R., C. Ivaldi, et al. (2005). "Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish." FEBS Lett 579(25): 5553-8.

- Plath, K., J. Fang, et al. (2003). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation." Science 300(5616): 131-5.
- Poirier, G. G., G. de Murcia, et al. (1982). "Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure." Proc Natl Acad Sci U S A 79(11): 3423-7.
- Raisner, R. M., P. D. Hartley, et al. (2005). "Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin." Cell 123(2): 233-48.
- Rangasamy, D., I. Greaves, et al. (2004). "RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation." Nat Struct Mol Biol 11(7): 650-5.
- Rao, B. J., S. K. Brahmachari, et al. (1983). "Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis." J Biol Chem 258(22): 13478-85.
- Rasmussen, T. P., M. A. Mastrangelo, et al. (2000). "Dynamic relocalization of histone MacroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation." J Cell Biol 150(5): 1189-98.
- Redon, C., D. Pilch, et al. (2002). "Histone H2A variants H2AX and H2AZ." Curr Opin Genet Dev 12(2): 162-9.
- Regnier, V., P. Vagnarelli, et al. (2005). "CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1." Mol Cell Biol 25(10): 3967-81.
- Rhodes, D. R., J. Yu, et al. (2004). "Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression." Proc Natl Acad Sci U S A 101(25): 9309-14.
- Richmond, T. J. and C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." Nature 423(6936): 145-50.
- Riedl, T., F. Hanaoka, et al. (2003). "The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA." Embo J 22(19): 5293-303.
- Robinson, P. J. and D. Rhodes (2006). "Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone." Curr Opin Struct Biol 16(3): 336-43.
- Rogakou, E. P., C. Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J Cell Biol 146(5): 905-16.
- Rougeulle, C. and P. Avner (2003). "Controlling X-inactivation in mammals: what does the centre hold?" Semin Cell Dev Biol 14(6): 331-40.
- Rougeulle, C., J. Chaumeil, et al. (2004). "Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome." Mol Cell Biol 24(12): 5475-84.
- Sado, T., M. H. Fenner, et al. (2000). "X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation." Dev Biol 225(2): 294-303.
- Sarma, K. and D. Reinberg (2005). "Histone variants meet their match." Nat Rev Mol Cell Biol 6(2): 139-49.
- Savarese, F., K. Flahndorfer, et al. (2006). "Hematopoietic precursor cells transiently reestablish permissiveness for X inactivation." Mol Cell Biol 26(19): 7167-77.
- Schalch, T., S. Duda, et al. (2005). "X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre." Nature 436(7047): 138-41.
- Schreiber, V., F. Dantzer, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." Nat Rev Mol Cell Biol 7(7): 517-28.
- Schuh, M., C. F. Lehner, et al. (2007). "Incorporation of Drosophila CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase." Curr Biol 17(3): 237-43.
- Schwartz, B. E. and K. Ahmad (2005). "Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3." Genes Dev 19(7): 804-14.

- Scrittore, L., D. A. Skoufias, et al. (2005). "A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function." Mol Biol Cell 16(1): 292-305.
- Silva, J., W. Mak, et al. (2003). "Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes." Dev Cell 4(4): 481-95.
- Silver, D. P., S. D. Dimitrov, et al. (2007). "Further evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome." Cell 128(5): 991-1002.
- Spatz, A., C. Borg, et al. (2004). "X-chromosome genetics and human cancer." Nat Rev Cancer 4(8): 617-29.
- Stargell, L. A., J. Bowen, et al. (1993). "Temporal and spatial association of histone H2A variant hv1 with transcriptionally competent chromatin during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*." Genes Dev 7(12B): 2641-51.
- Stewart, M. D., J. Li, et al. (2005). "Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment." Mol Cell Biol 25(7): 2525-38.
- Studitsky, V. M., W. Walter, et al. (2004). "Chromatin remodeling by RNA polymerases." Trends Biochem Sci 29(3): 127-35.
- Sullivan, B. A., M. D. Blower, et al. (2001). "Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths." Nat Rev Genet 2(8): 584-96.
- Sun, Y., X. Jiang, et al. (2005). "A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM." Proc Natl Acad Sci U S A 102(37): 13182-7.
- Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). "Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast." Nature 418(6893): 104-8.
- Suto, R. K., M. J. Clarkson, et al. (2000). "Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z." Nat Struct Biol 7(12): 1121-4.
- Swerdlow, A. J., M. J. Schoemaker, et al. (2005). "Mortality and cancer incidence in women with extra X chromosomes: a cohort study in Britain." Hum Genet 118(2): 255-60.
- Taddei, A., F. Hediger, et al. (2004). "The function of nuclear architecture: a genetic approach." Annu Rev Genet 38: 305-45.
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, et al. (2004). "Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis." Cell 116(1): 51-61.
- Thambirajah, A. A., D. Dryhurst, et al. (2006). "H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation." J Biol Chem 281(29): 20036-44.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (2005). "Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair." Mol Cell 18(6): 617-22.
- Tovich, P. R. and R. J. Oko (2003). "Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa." J Biol Chem 278(34): 32431-8.
- Tsuchiya, K. D., J. M. Greally, et al. (2004). "Comparative sequence and x-inactivation analyses of a domain of escape in human xp11.2 and the conserved segment in mouse." Genome Res 14(7): 1275-84.
- Tulin, A. and A. Spradling (2003). "Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci." Science 299(5606): 560-2.
- Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." Cell 111(3): 285-91.
- Turner, B. M. (2005). "Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones." Nat Struct Mol Biol 12(2): 110-2.
- Valley, C. M., L. M. Pertz, et al. (2006). "Chromosome-wide, allele-specific analysis of the histone code on the human X chromosome." Hum Mol Genet 15(15): 2335-47.

- van Attikum, H., O. Fritsch, et al. (2004). "Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair." Cell 119(6): 777-88.
- van Attikum, H. and S. M. Gasser (2005). "The histone code at DNA breaks: a guide to repair?" Nat Rev Mol Cell Biol 6(10): 757-65.
- van Holde, K. (1988). "Chromatin. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany."
- Vincent-Salomon, A., C. Ganem-Elbaz, et al. (2007). "X inactive-specific transcript RNA coating and genetic instability of the X chromosome in BRCA1 breast tumors." Cancer Res 67(11): 5134-40.
- Wang, M., W. Wu, et al. (2006). "PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways." Nucleic Acids Res 34(21): 6170-82.
- Ward, I. M. and J. Chen (2001). "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress." J Biol Chem 276(51): 47759-62.
- West, M. H. and W. M. Bonner (1980). "Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species." Biochemistry 19(14): 3238-45.
- Wilson, D. M., 3rd and V. A. Bohr (2007). "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease." DNA Repair (Amst) 6(4): 544-59.
- Woodfine, K., H. Fiegler, et al. (2004). "Replication timing of the human genome." Hum Mol Genet 13(2): 191-202.
- Wu, C. and J. R. Morris (2001). "Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence." Science 293(5532): 1103-5.
- Wutz, A., T. P. Rasmussen, et al. (2002). "Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA." Nat Genet 30(2): 167-74.
- Xu, N., C. L. Tsai, et al. (2006). "Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation." Science 311(5764): 1149-52.
- Yoda, K., S. Ando, et al. (2000). "Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7266-71.
- You, A., J. K. Tong, et al. (2001). "CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex." Proc Natl Acad Sci U S A 98(4): 1454-8.
- Zalensky, A. O., J. S. Siino, et al. (2002). "Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization." J Biol Chem 277(45): 43474-80.
- Zhang, H., D. N. Roberts, et al. (2005). "Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss." Cell 123(2): 219-31.
- Zhang, R., S. T. Liu, et al. (2007). "HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells." Mol Cell Biol 27(3): 949-62.
- Zhang, R., M. V. Poustovoitov, et al. (2005). "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA." Dev Cell 8(1): 19-30.
- Zheng, C. and J. J. Hayes (2003). "Structures and interactions of the core histone tail domains." Biopolymers 68(4): 539-46.
- Zhou, Y. B., S. E. Gerchman, et al. (1998). "Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome." Nature 395(6700): 402-5.
- Zofall, M., J. Persinger, et al. (2006). "Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome." Nat Struct Mol Biol 13(4): 339-46.

Zucchi, I., E. Mento, et al. (2004). "Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A 101(52): 18147-52.