



**HAL**  
open science

## Etude des fonctions mitotiques du domaine amino-terminal de CENP-A

Damien Goutte-Gattat

► **To cite this version:**

Damien Goutte-Gattat. Etude des fonctions mitotiques du domaine amino-terminal de CENP-A. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENV079 . tel-00716378

**HAL Id: tel-00716378**

**<https://theses.hal.science/tel-00716378>**

Submitted on 10 Jul 2012

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire et moléculaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Damien GOUTTE-GATTAT**

Thèse dirigée par **Stefan DIMITROV**

préparée au sein du laboratoire **INSERM U823**  
et de l'École Doctorale **Chimie et Sciences du Vivant**

## Étude des fonctions mitotiques du domaine amino-terminal de CENP-A

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2011**,  
devant le jury composé de :

**Dr. Stefan DIMITROV**

Institut Albert Bonniot, Grenoble, directeur de thèse

**Pr. Hans GEISELMANN**

Institut Jean Roger, Grenoble, président

**Dr. Marie-Josèphe GIRAUD PANIS**

Laboratoire de Biologie et Pathologie des Génomes, Nice, rapporteur

**Dr. Pierre JALINOT**

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Lyon, rapporteur

**Dr. Marie-Noëlle PRIOLEAU**

Institut Jacques Monod, Paris, examinateur

**Dr. Dimitrios SKOUFIAS**

Institut de Biologie Structurale, Grenoble, examinateur



## Résumé

Le variant d'histone CENP-A est le facteur responsable de la détermination épigénétique du centromère. Il permet le recrutement de nombreuses protéines centromériques, et constitue ainsi la brique fondatrice du kinétochore. Il possède un domaine amino-terminal non structuré dont la fonction précise reste encore à élucider, bien qu'il soit déjà établi chez certaines espèces que ce domaine est requis pour le bon fonctionnement du centromère et conséquemment le bon déroulement de la mitose. Nous avons construit des lignées cellulaires humaines exprimant stablement diverses formes mutantes de CENP-A, qui nous ont permis de réaliser des expériences de pseudogénétique en supprimant l'expression de la protéine CENP-A endogène. Nous observons une augmentation drastique du taux de défauts de ségrégation des chromosomes et de cellules plurinucléées dans des cellules exprimant uniquement le domaine globulaire de CENP-A, ce qui est en accord avec les données de la littérature et confirme l'importance du domaine amino-terminal. Un phénotype similaire est observé dans des cellules exprimant une protéine CENP-A entière mais dont le domaine amino-terminal n'est pas phosphorylable. Nos résultats montrent l'implication de la phosphorylation de la sérine de CENP-A dans le bon déroulement de la mitose, et suggèrent que la fonction mitotique du domaine amino-terminal est centrée sur cette seule phosphorylation.

## Mots-clés

chromatine, variant d'histone, mitose, phosphorylation

## Signalement de la thèse en langue anglaise

### Title

Investigating Functions of CENP-A N-tail in Mitosis

### Abstract

The histone variant CENP-A is the epigenetic factor responsible for centromere determination. It allows the recruitment of a handful of centromeric proteins, and thus acts as the primary foundation for the kinetochore. It comprises an unstructured amino-terminal domain to which no precise function has yet been assigned, although it is established in some species that the mere presence of that domain is required for proper centromere function and thus successful completion of mitosis. We have established several human cell lines stably expressing GFP-tagged CENP-A constructs, allowing us to perform pseudogenetic experiments by siRNA-mediated silencing of the endogenous CENP-A. Our results show a dramatic increase of mitotic defects and plurinuclear cells when cells express only the globular domain of CENP-A; this is in accordance with the literature and confirms the importance of the amino-terminal tail. More importantly, a similar increase of mitotic defects is observed when cells express a full-length, but non-phosphatable, CENP-A. Our results show the involvement of the phosphatable serine 7 of CENP-A in the successful completion of mitosis, and may suggest that the role of the whole amino-terminal tail of CENP-A could be reduced to this single phosphorylation event.

### Keywords

chromatin, histone variant, mitosis, phosphorylation

# Remerciements

Je remercie en premier lieu Stefan DIMITROV de m'avoir accueilli toutes ces années dans son équipe et d'avoir supervisé ce travail de thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe n° 4 ; particulièrement Fabienne HANS, qui a guidé mes premiers pas dans cet univers. Les anciens membres de l'équipe, que j'ai vu partir avec une pointe de regret, sont pleinement concernés.

Je remercie encore les enseignants des UE BIO110, BIO121, BIO361 et BIO421 avec qui j'ai effectué mes services de moniteur et d'ATER au cours des quatre dernières années.

Merci à Axelle pour nos nombreuses discussions et le soutien mutuel que nous nous sommes apportés.

Un remerciement tout particulier à Patrick ; c'est grâce à vous que tout cela a été possible en premier lieu, je ne l'ai pas oublié.

Une pensée pour vous, Djessy, Yan et Joey. Il a suffi que je m'absente le temps de faire quelques études — à peine dix ans — pour que vous deveniez des grands derrière mon dos. Aux yeux de votre oncle vous resterez probablement « ses petits » pour encore une bonne dizaine d'années.

# Table des matières

Table des figures . . . . .	vii
Liste des tableaux . . . . .	viii
Liste des abbréviations . . . . .	ix
<b>I Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 La chromatine</b>	<b>2</b>
1.1 Le nucléosome . . . . .	2
1.1.1 Les histones . . . . .	3
1.1.2 La particule de cœur . . . . .	5
1.1.3 Le chromatosome . . . . .	6
1.2 Niveaux d'organisation supérieurs . . . . .	6
1.2.1 Le nucléofilament . . . . .	7
1.2.2 La fibre de 30 nm . . . . .	8
1.2.3 Le chromosome mitotique . . . . .	10
1.3 Dynamique chromatinienne . . . . .	11
1.3.1 Facteurs de remodelage . . . . .	11
1.3.2 Modifications post-traductionnelles des histones . . . . .	12
1.3.3 Variants d'histones . . . . .	14
<b>2 La mitose</b>	<b>18</b>
2.1 Déroulement et régulation de la mitose . . . . .	18
2.1.1 Déroulement de la mitose . . . . .	18
2.1.2 Régulation de la mitose . . . . .	19
2.2 Le fuseau mitotique . . . . .	22
2.2.1 Les microtubules . . . . .	22
2.2.2 Les centrosomes . . . . .	23
2.2.3 Le kinétochore . . . . .	24
2.3 Mouvements des chromosomes . . . . .	25
2.3.1 Accrochage au fuseau mitotique . . . . .	25
2.3.2 Congression . . . . .	26
2.3.3 Ségrégation . . . . .	27
2.3.4 Le point de contrôle du fuseau mitotique . . . . .	28
<b>3 La chromatine centromérique</b>	<b>31</b>
3.1 Détermination épigénétique du centromère . . . . .	31
3.2 Structure de la chromatine centromérique . . . . .	32
3.3 Chromatine centromérique et transcription . . . . .	35
3.4 Le variant d'histone centromérique CENP-A . . . . .	35

3.4.1	Structure et conservation . . . . .	35
3.4.2	Maintenance de CENP-A aux centromères . . . . .	36
3.4.3	CENP-A et l'assemblage du kinétochore . . . . .	39
3.4.4	Fonctions extra-mitotiques . . . . .	40
3.4.5	CENP-A et pathologie . . . . .	40
3.4.6	Le domaine amino-terminal . . . . .	41
<b>II Matériels et méthodes</b>		<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>45</b>
4.1	Construction des plasmides . . . . .	45
4.1.1	PCR . . . . .	45
4.1.2	Construction de GFP-CENP-A et dérivés . . . . .	46
4.1.3	Construction de GFP-H3-CENP-A et dérivés . . . . .	47
4.2	Construction des lignées cellulaires . . . . .	47
4.3	ARN interférence contre CENP-A . . . . .	48
4.4	Immunofluorescence . . . . .	48
4.5	Préparation d'extraits protéiques nucléaires . . . . .	49
4.6	Immunoblots . . . . .	50
4.7	Préparation d'extraits d'ARN poly-adenylés . . . . .	51
4.8	RT-PCR . . . . .	51
<b>III Résultats et discussion</b>		<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Résultats</b>	<b>53</b>
5.1	Introduction . . . . .	55
5.2	Results . . . . .	58
5.2.1	A CENP-A tail is required in mitosis . . . . .	60
5.2.2	CENP-A tail phosphorylation is required in mitosis . . . . .	61
5.2.3	Localization of mitotic checkpoint proteins . . . . .	63
5.2.4	CENP-A tail phosphorylation is required for CENP-C localization . . . . .	65
5.3	Discussion . . . . .	67
5.4	Acknowledgements . . . . .	70
5.5	Supplementary figures . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Discussion</b>	<b>75</b>
6.1	De la validité des résultats . . . . .	75
6.2	De l'importance du domaine amino-terminal de CENP-A . . . . .	76
6.3	Du rôle de la phosphorylation de CENP-A . . . . .	78
6.4	Des perspectives . . . . .	80
<b>A</b>	<b>Autres publications</b>	<b>81</b>
<b>B</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>100</b>

# Table des figures

1.1	Le nucléosome . . . . .	3
1.2	Les histones de cœur . . . . .	4
1.3	La particule de cœur du nucléosome . . . . .	5
1.4	Le nucléofilament et la fibre chromatinienne . . . . .	7
2.1	Déroulement de la mitose . . . . .	19
2.2	Structure du kinétochore . . . . .	24
2.3	Attachements des kinétochores au fuseau mitotique . . . . .	29
3.1	Organisation de l'ADN centromérique . . . . .	32
3.2	Organisation de la chromatine centromérique . . . . .	34
3.3	Conservation des protéines CenH3 . . . . .	36
5.1	CENP-A NH <sub>2</sub> -tails are highly divergent . . . . .	58
5.2	CENP-A NH <sub>2</sub> -tail is required in mitosis . . . . .	59
5.3	CENP-A phosphorylation is required in mitosis . . . . .	62
5.4	Localization and behavior of checkpoint proteins . . . . .	64
5.5	Localization of CCAN anchor proteins . . . . .	66
5.6	Role of CENP-A phosphorylation in mitosis . . . . .	68
5.7	Localization of GFP-CENP-A fusions . . . . .	70
5.8	Duration of mitosis in GFP-CENP-A cell lines . . . . .	71
5.9	SAC function in GFP-CENP-A cell lines . . . . .	71
5.10	Localization of CENP-B . . . . .	72
5.11	Localization of ZWINT . . . . .	72
5.12	Localization of Bub1 . . . . .	73
5.13	Localization of INCENP . . . . .	74



# Liste des tableaux

4.1	Amorces utilisées . . . . .	46
4.2	Anticorps primaires. . . . .	49
4.3	Anticorps secondaires. . . . .	50

# Liste des abbréviations

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	adénosine diphosphate
<b>APC/C</b>	<i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>BSA</b>	<i>bovine serumalbumin</i>
<b>CAD</b>	<i>CENP-A distal complex</i>
<b>CATD</b>	<i>CENP-A targeting domain</i>
<b>CENP-A<sup>NAC</sup></b>	<i>CENP-A nucleosome associated complex</i>
<b>CCAN</b>	<i>constitutive centromere-associated network</i>
<b>CPC</b>	<i>chromosomal passengers complex</i>
<b>CREST</b>	<i>calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasia</i>
<b>dNTP</b>	désoxynucléotide triphosphate
<b>END</b>	<i>essential N-terminal domain</i>
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>γ-TURC</b>	<i>γ-tubulin ring complex</i>
<b>HAT</b>	histone acétyl transférase
<b>HDAC</b>	histone déacétylase
<b>HFD</b>	<i>histone fold domain</i>
<b>H(K)MT</b>	histone (lysine) méthyl transférase
<b>KMN</b>	Kn1–Mis12–Ndc80
<b>MCAK</b>	<i>mitotic-centromere-associated kinesin</i>
<b>MCC</b>	<i>mitotic checkpoint complex</i>
<b>MMLV</b>	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
<b>NCP</b>	<i>nucleosome core particle</i>
<b>PARG</b>	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
<b>PARP</b>	poly(ADP-ribose) polymérase
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffer saline</i>
<b>PCM</b>	<i>pericentriolar material</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>

<b>PRMT</b>	<i>protein arginine methyltransferase</i>
<b>SAC</b>	<i>spindle [assembly] checkpoint</i>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecylsulfate</i>
<b>shRNA</b>	<i>short hairspin RNA</i>
<b>siRNA</b>	<i>short interfering RNA</i>
<b>SVF</b>	sérum de veau foetal

# Première partie

## Introduction

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

— Thomas EDISON

# Chapitre 1

## La chromatine

La chromatine est la forme sous laquelle se présente le matériel génétique dans le noyau des cellules eucaryotes. Elle a été identifiée en 1881 par Walther FLEMMING comme une substance nucléaire dotée d'une forte affinité pour les colorants qui lui a donné son nom, « chromatine » (Olins and Olins, 2003). Sa composition globale est d'un tiers d'acide désoxyribonucléique (ADN) — découvert à la même époque, mais dont le rôle comme support de l'information génétique ne sera montré qu'en 1944 — et deux tiers de protéines ; la moitié de la fraction protéique est composée de petites protéines basiques appelées « histones », l'autre moitié étant composée de protéines diverses collectivement désignées « protéines non-histones ».

### 1.1 Le nucléosome

Le nucléosome représente l'unité de base de la chromatine. Il est formé d'une particule de cœur ou *nucleosome core particle* (NCP), elle-même constituée d'un fragment d'environ 150 paires de bases d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. L'addition de 20 paires de bases supplémentaires et d'une histone dite « de liaison » forme le chromatosome. Le terme nucléosome désigne *stricto sensu* l'association d'un chromatosome avec un segment d'ADN de liaison, bien qu'il soit fréquemment employé pour désigner

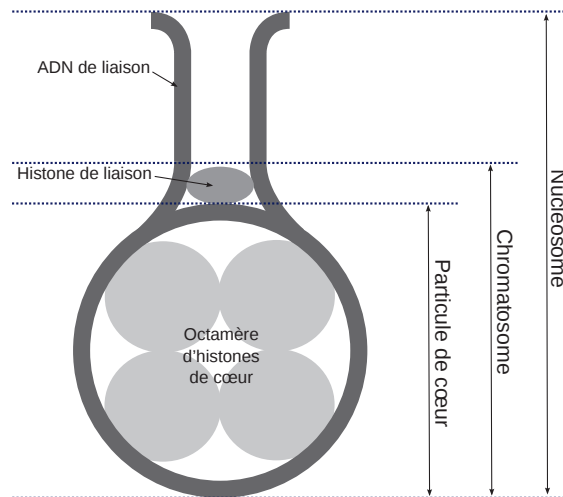


FIGURE 1.1 – Représentation schématique du nucléosome et de ses sous-parties : la particule de cœur, formée de l'octamère d'histones et d'environ 150 paires de bases ; et le chromatosome, formé par l'association de la particule de cœur avec l'histone de liaison H1.

uniquement le chromatosome ou même la particule de cœur (figure 1.1).

### 1.1.1 Les histones

Les histones représentent la moitié de la composante protéique de la chromatine. Elles ont été découvertes peu après la chromatine elle-même, en 1884 par Albrecht KOSSEL (Olins and Olins, 2003). Ce sont de petites protéines d'environ 15 kDa, très basiques. Il en existe cinq classes, H1, H2A, H2B, H3 et H4, réparties en deux familles en fonction de leur contribution à la structure du nucléosome. Les histones de la classe H1 contribuent à la formation du chromatosome, et sont dites « histones de liaison » ; les histones des quatre autres classes contribuent à la formation de la particule de cœur du nucléosome, et sont dites pour cette raison « histones de cœur ».

Les quatre histones de cœur partagent une structure générale identique, consistant en un domaine globulaire (structuré) central flanqué d'une extension amino-terminale de 15 à 45 résidus et d'une extension carboxy-terminale beaucoup plus courte, de quelques résidus seulement (figure 1.2a). La caractéristique principale du domaine globulaire est la présence de l'*histone fold domain* (HFD), un motif structural formé d'une longue hélice  $\alpha$  centrale flanquée par deux hélices  $\alpha$  plus petites auxquelles elle est reliée par deux courtes boucles (Arents et al., 1991). Ce motif est retrouvé dans un grand nombre de protéines, depuis les bactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs, et définit la famille des

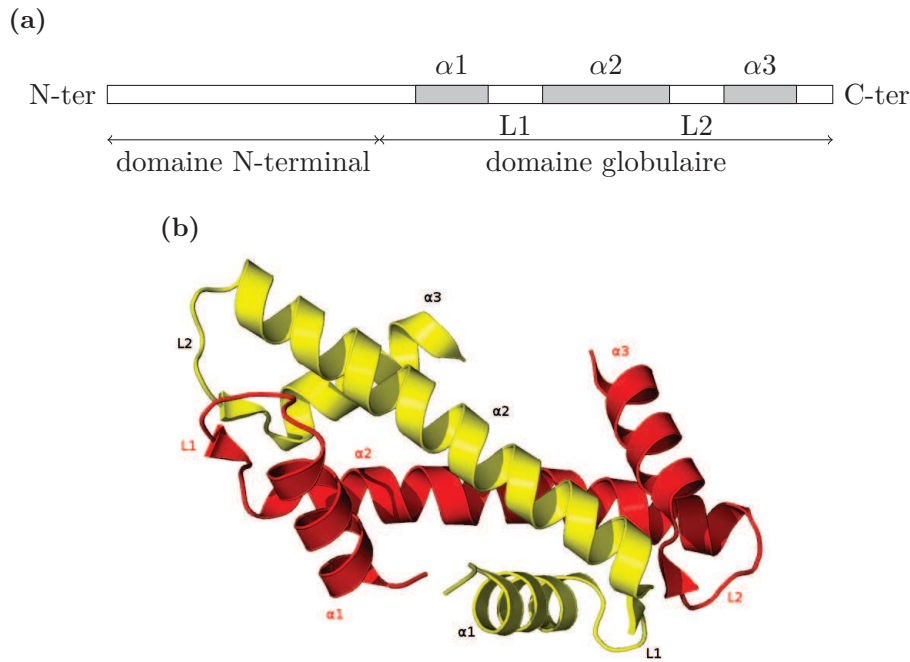


FIGURE 1.2 – Structure des histones de cœur. (a) Représentation schématique d’une histone de cœur. Les segments grisés indiquent les hélices  $\alpha$  du domaine histone-fold. (b) Structure de deux domaines histone-fold interagissant selon le motif dit de la « poignée de main », qui permet la dimérisation des histones.

protéines « histone-like » (Sullivan et al., 2002). Le domaine HFD permet la dimérisation des protéines qui le contiennent, grâce à une interaction qualifiée de « poignée de main » (figure 1.2b) (Arents and Moudrianakis, 1995). Les extensions amino-terminales sont très divergentes entre les quatre classes d’histones de cœur, et ne sont pas structurées.

Les histones de la classe H1 ont une structure à trois domaines : un domaine amino-terminal d’environ 45 résidus ; un domaine central globulaire très conservé d’environ 75 résidus ; et un domaine carboxy-terminal d’une centaine de résidus (Happel and Doenecke, 2009). Les domaines N- et C-terminaux des différents sous-types d’histones H1 sont divergents en taille et en séquence, mais possèdent tous une proportion importante de résidus basiques. Le domaine carboxy-terminal n’est pas structuré en solution aqueuse, mais acquiert une structure secondaire spécifique sitôt associé à l’ADN (Roque et al., 2005). Le domaine central globulaire n’est pas un domaine histone-fold (Arents and Moudrianakis, 1995) ; les histones de la classe H1 ne présentent pas de similarité avec les histones de cœur.

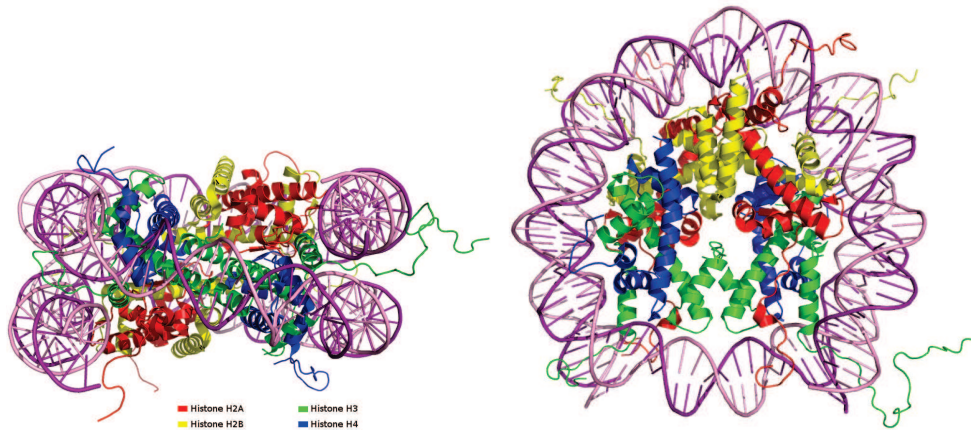


FIGURE 1.3 – Structure de la particule de cœur du nucléosome, telle que résolue par cristallographie aux rayons X.

### 1.1.2 La particule de cœur

La particule de cœur est un sous-ensemble du nucléosome découvert et défini par la protection de l'ADN contre la digestion par des nucléases. Elle contient un cœur protéique formé de deux exemplaires de chacune des histones de cœur. Autour de ce cœur protéique s'enroulent environ 150 paires de bases d'ADN sur environ un tour trois quart. Les histones et l'ADN contribuent chacun environ pour moitié à la masse totale de la particule, soit 205 kDa (Harp et al., 2000).

L'octamère d'histones résulte de l'assemblage de deux dimères H3–H4 et de deux dimères H2A–H2B (figure 1.3). Les deux dimères H3–H4 s'associent via une interaction entre les hélices  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  des deux histones H3, formant un tétramère  $(\text{H3–H4})_2$ . Chaque dimère H2A–H2B s'associe ensuite au tétramère via une interaction similaire entre les hélices  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  des histones H2A et H4 (Luger et al., 1997). Les interactions en poignée de main entre chaque paires d'histones provoquent la formation de ponts  $\beta$  entre les boucles L1 et L2. Ces ponts constituent une partie des sites de liaison à l'ADN. L'association entre l'octamère d'histones et le fragment d'ADN est principalement le fait de l'insertion des chaînes latérales des résidus arginine dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN (Harp et al., 2000).



### 1.1.3 Le chromatosome

Le chromatosome est formé par l'association d'une histone de liaison H1 à la particule de cœur (Holde and Zlatanova, 1999). L'histone H1 lie l'ADN au niveau où celui-ci rentre et sort de la particule de cœur. Elle induit le rapprochement des ADN de liaison entrant et sortant sur une trentaine de paires de bases, limitant leurs mouvements et scellant ainsi le complexe nucléo-protéique. Ce faisant, elle contribue à protéger environ 20 paires de bases supplémentaires en plus des quelques 150 associés à la particule de cœur.

D'autres protéines que des histones H1 sont susceptibles de lier les ADN de liaison. Il a été proposé de les désigner collectivement « protéines de liaison », et d'étendre la définition du chromatosome pour inclure toute association d'une particule de cœur avec une protéine de liaison, qu'il s'agisse ou non d'une histone (Zlatanova et al., 2008). La nature de la protéine de liaison est supposée influencer à la fois sur les propriétés du nucléosome et sur la capacité de la fibre de chromatine à former des structures d'ordre supérieur.

## 1.2 Niveaux d'organisation supérieurs

Dans le contexte de la chromatine, un « niveau d'organisation supérieur » désigne tout assemblage de nucléosomes adoptant une conformation spatiale reproductible. L'exemple le plus flagrant d'une telle structure de niveau supérieur est le chromosome mitotique. Les concepts de structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, définis pour l'étude des protéines, peuvent être appliqués à l'étude de la structure de la chromatine (Woodcock and Dimitrov, 2001), avec l'enchaînement des nucléosomes constituant la structure primaire, et les interactions entre nucléosomes donnant lieu à des structures secondaires et au-delà.

Le niveau de structure le plus élevé, et le degré de compaction de l'ADN résultant, varie avec le cycle cellulaire et la nature de la chromatine. En interphase, la chromatine existe sous deux formes : l'euchromatine et l'hétérochromatine, cette dernière étant plus compacte et constituant un environnement réfractaire à la transcription. En phase M, l'ensemble de la chromatine forme les chromosomes mitotiques. Le taux de compaction

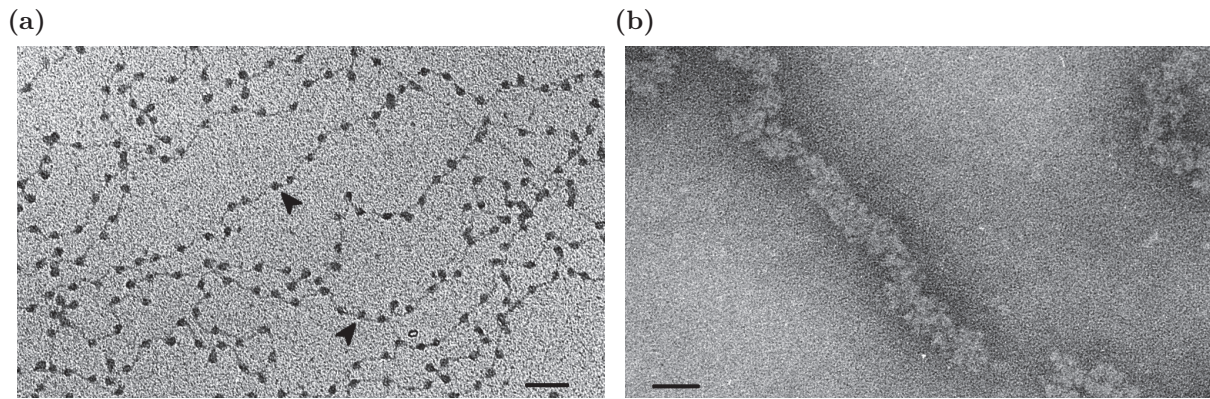


FIGURE 1.4 – Les premiers niveaux d’organisation de la chromatine. Micrographies électroniques de nucléofilaments (a) et d’une fibre de chromatine de 30 nm (b). L’enchaînement des particules de cœur (flèches) sur le nucléofilament a valu à cette structure son surnom de « collier de perles ». Échelles : 50 nm.

de l’ADN est alors maximal ; chez les mammifères, il est d’un facteur d’environ 20 000  $\times$  par rapport à de l’ADN nu, 50  $\times$  par rapport à de l’euchromatine, 4  $\times$  par rapport à de l’hétérochromatine (Belmont, 2006).

### 1.2.1 Le nucléofilament

La « structure primaire » de la chromatine est constituée par l’enchaînement des nucléosomes le long d’un double-brin d’ADN. Cet enchaînement forme le nucléofilament, ou fibre de chromatine de 10 nm (parfois 11 nm, selon les auteurs), ou encore de façon imagée le « collier de perles », en raison de l’apparence de cette structure lorsqu’elle fut observée en microscopie électronique dans les années 1970 (figure 1.4a). Les particules de cœur y apparaissent séparées par un segment d’ADN de liaison dont la longueur varie selon les espèces et les tissus entre 20 pb chez la levure bourgeonnante à 70 pb dans le sperme des échinodermes (Woodcock et al., 2006). Bien qu’il s’agisse de la première structure chromatinienne caractérisée *in vitro*, le nucléofilament n’est néanmoins vraisemblablement qu’un artefact expérimental résultant de l’exposition de la chromatine à de faibles forces ioniques, l’enchaînement de nucléosomes n’adoptant jamais une conformation aussi étendue dans des conditions physiologiques (Hansen, 2002).

### 1.2.2 La fibre de 30 nm

Le niveau de structure suivant est représenté par la fibre de chromatine de 30 nm, observée *in vitro* dans des conditions de salinité physiologiques et en présence d'histone de liaison à raison d'une histone de liaison par nucléosome (figure 1.4b). L'agencement exact des nucléosomes au sein de cette fibre fait depuis plus de trente ans l'objet d'un débat qui n'est pas encore tranché aujourd'hui. Deux modèles sont principalement proposés : le modèle « solénoïde », dans lequel le nucléofilament s'enroule en une hélice simple, en surface de laquelle les nucléosomes consécutifs du nucléofilament sont adjacents (Robinson and Rhodes, 2006) ; et le modèle « zig-zag », dans lequel les nucléosomes consécutifs sont alternativement d'un côté et de l'autre de la fibre, formant une hélice double (Bednar et al., 1998).

Le débat est d'autant plus délicat à trancher que la fibre chromatinienne est une structure dynamique, dont la conformation exacte peut varier en fonction de plusieurs paramètres comme la force ionique, les propriétés du nucléosome et la présence de protéines auxiliaires (Hansen, 2002). L'existence même d'une fibre chromatinienne de 30 nm de structure unique, *in vivo*, peut ainsi être remise en cause (Tremethick, 2007).

Si les travaux sur la fibre de chromatine de 30 nm n'ont pas permis d'apporter de réponse définitive sur sa structure, ils ont en revanche permis de mieux comprendre les mécanismes dirigeant la compaction du nucléofilament. Deux voies de compaction sont aujourd'hui considérées : une voie *intrinsèque*, où la compaction ne dépend que des propriétés du nucléofilament, et une voie *extrinsèque*, où la compaction est modulée par des protéines associées au nucléofilament.

#### Compaction intrinsèque

La structure des nucléosomes, incluant les extensions amino-terminales des histones de cœur, influence directement la capacité du nucléofilament à former une fibre. En particulier, l'extension N-terminale de l'histone H4 est indispensable à la formation d'une telle fibre (Dorigo et al., 2003) : elle interagit avec un « patch acide » formé par l'histone H2A à la surface de la particule de cœur (Luger et al., 1997), et favorise ainsi les interactions

inter-nucléosomes. L'étendue du patch acide, qui peut être modifiée par l'incorporation de sous-types variants de l'histone H2A, module directement la compaction de la fibre résultante (Fan et al., 2004).

Le rôle de l'histone de liaison dans la compaction du nucléofilament est aujourd'hui peu clair (Woodcock et al., 2006). La présence d'histones de liaison dans un rapport stœchiométrique 1:1 avec les particules de cœur a longtemps été considérée comme strictement nécessaire à la formation de la fibre chromatinienne, sur la base notamment des expérimentations *in vitro*. L'histone de liaison se voyait également attribuer un rôle général d'inhibiteur de la transcription, ce qui pouvait s'expliquer par sa propension supposée à compacter le nucléofilament et à réduire ainsi l'accessibilité de l'ADN. Cette vue est depuis peu remise en cause; la formation de fibres chromatiniennes *in vitro* en absence d'histone H1 (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005) et l'absence d'effets transcriptionnels majeurs *in vivo* (Fan et al., 2005) laissent supposer pour l'histone de liaison un rôle plus complexe que celui initialement imaginé.

### Compaction extrinsèque

Plusieurs protéines ou complexes protéiques ont été remarqués pour leur capacité à s'associer au nucléofilament et à favoriser sa compaction. MeCP2 est un inhibiteur de transcription; l'explication première de son effet inhibiteur réside dans sa capacité à lier les dinucléotides CpG méthylés et à recruter des histones déacétylases, créant un contexte chromatinien défavorable à la transcription. Néanmoins, il a été montré que cette protéine pouvait se lier au nucléofilament en absence de méthylation et provoquer sa compaction *in vitro* (Georgel et al., 2003), suggérant une régulation transcriptionnelle indépendante de l'acétylation des histones.

Les protéines du complexe Polycomb sont responsables au cours du développement du maintien de certains gènes dans un état inactif (Ringrose and Paro, 2004). Ce complexe s'associe à la particule de cœur du nucléosome, indépendamment des extensions N-terminales des histones, à raison d'un complexe Polycomb pour trois nucléosomes. Il impose au nucléofilament une conformation compacte spécifique, distincte de la fibre de

30 nm typique, et qui interdit *in vitro* la transcription ou le remodelage de la chromatine (Francis et al., 2004).

D'autres protéines s'étant vues attribuer un rôle dans la compaction du nucléofilament incluent MENT, une protéine exprimée dans les cellules sanguines différenciées (Grigoryev et al., 1999; Springhetti et al., 2003), et HP1, une marque typique de l'hétérochromatine (Zhao et al., 2000; Eissenberg and Elgin, 2000).

### 1.2.3 Le chromosome mitotique

Au début de la mitose, l'ensemble de la chromatine adopte une conformation de compaction maximale, qui apparaît sous la forme des chromosomes mitotiques. Le chromosome mitotique typique a une forme de X aplati, avec deux chromatides parallèles maintenues à proximité l'une de l'autre par des cohésines. Les principaux éléments fonctionnels du chromosome sont les télomères, qui protègent l'ADN aux extrémités de chaque chromatide, et les centromères, qui constituent les points d'ancrage par lesquels les microtubules mobilisent les chromatides au cours de la mitose. Le plus long chromosome humain fait environ 10  $\mu\text{m}$  de long pour un peu moins de 2  $\mu\text{m}$  de large, et contient 250 Mb d'ADN dans chaque chromatide (Marko, 2008).

La structure et la formation de ces chromosomes sont encore peu connues et largement débattues. Un des premiers modèles proposés, dit des *boucles radiales*, suppose que les fibres de 30 nm forment des boucles d'environ 50 à 100 kb d'ADN de long fixées à un squelette de protéines non-histones (Marsden and Laemmli, 1979), mais la réalité de ce squelette protéique, qui pourrait n'être qu'un artefact expérimental, n'est pas certaine (Belmont, 2002). Les modèles de type *repliement hiérarchique* proposent que le chromosome mitotique résulte de plusieurs niveaux de repliement successifs, les fibres de chromatine de 30 nm s'enroulant en fibres plus épaisses qui à leur tour s'enroulent en fibres de niveau supérieur (Belmont et al., 1987). La structure de ces hypothétiques fibres de plus haut niveau reste inconnue. Elles pourraient s'organiser autour d'un squelette axial de condensines permettant de stabiliser la chromatide (Almagro et al., 2004; Kireeva et al., 2004) et de lui conférer les propriétés élastiques révélées par des essais d'étirement de

chromosomes *in vitro* (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999).

## 1.3 Dynamique chromatinienne

La chromatine n'est pas une structure figée. Son remodelage partiel ou total lui confère de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles permettant notamment le déroulement d'activités nucléaires comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. Trois mécanismes principaux assurent ce dynamisme de la chromatine : la mobilisation des nucléosomes par des complexes de remodelage, la modification post-traductionnelle des histones, et l'incorporation de variants d'histone au sein des nucléosomes.

### 1.3.1 Facteurs de remodelage

Les complexes de remodelage de la chromatine exploitent l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP pour moduler l'état de compaction de la chromatine en déplaçant, éjectant ou modifiant les nucléosomes. Les complexes de remodelage connus à ce jour appartiennent à quatre familles distinctes mais partageant toutes certaines propriétés :

- ils ont une certaine affinité pour le nucléosome ;
- ils possèdent des domaines capable de reconnaître certaines modifications post-traductionnelles des histones ;
- ils exhibent une activité ATPasique ADN-dépendante ou nucléosome-dépendante, par laquelle ils peuvent mobiliser l'ADN et rompre les interactions histone-ADN ;
- cette activité ATPasique est régulée, soit par un autre domaine au sein de la même enzyme, soit par d'autres protéines du complexe ;
- ils peuvent interagir avec d'autres facteurs chromatiniens, notamment des facteurs de transcription.

Les familles de complexes de remodelage sont définies en fonction de la sous-unité portant l'activité ATPasique. Ces familles sont SWI/SNF (*switching defective/sucrose nonfermenting*) (Mohrmann and Verrijzer, 2005), ISWI (*imitation switch*) (Corona and

Tamkun, 2004), CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*) (Marfella and Imbalzano, 2007) et INO80 (*inositol requiring 80*) (Bao and Shen, 2007).

### 1.3.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones, et particulièrement leurs extrémités amino-terminales, sont la cible d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles, un phénomène reconnu dès les années 1960 (Allfrey et al., 1964). Certaines de ces modifications sont associées à des processus comme la transcription, la réparation de l'ADN ou la condensation de la chromatine. La présence d'une ou plusieurs histones modifiées peut altérer les propriétés du nucléosome, mais seulement dans une faible marge (Mutskov et al., 1998). Les modifications post-traductionnelles des histones exerceraient donc plutôt leurs effets non pas tant par l'altération du nucléosome que par le recrutement de protéines spécifiques sur les histones modifiées. Une forme plus poussée de ce modèle postule qu'outre les modifications individuelles, les *combinaisons* de modifications peuvent avoir une signification propre et recruter des protéines distinctes, laissant imaginer un « code histone » (Strahl and Allis, 2000). Cette hypothèse reste néanmoins largement débattue, faute notamment d'un lien de causalité clairement établi entre des modifications post-traductionnelles et l'activation ou la répression de la transcription (Henikoff and Shilatifard, 2011).

#### Principales modifications

**Acétylation** L'acétylation des histones est une réaction d'amidation résultant en l'addition d'un groupement acétyl sur le groupement amine  $\epsilon$  des résidus lysines. Cette modification est fréquemment associée à une activation de la transcription, l'hypo-acétylation des histones étant inversement associée à la chromatine transcriptionnellement inactive (Grunstein, 1997 ; Katan-Khaykovich and Struhl, 2002). La réaction est catalysée par des histones acétyltransférases (HAT), dont il existe deux types : les HAT de type A, localisées dans le noyau et impliquées dans l'acétylation des histones au sein de la chromatine, et les HAT de type B, localisées dans le cytoplasme et qui acétylent les histones nouvellement synthétisées avant leur transfert dans le noyau (Sternier and Berger, 2000). Le retrait du

groupement acétyl est catalysée par des histones déacétylases (HDAC), qui reconnaissent les lysines acétylés via un domaine spécialisé, le *bromodomaine* (Dhalluin et al., 1999 ; Jacobson et al., 2000).

**Méthylation** La méthylation des histones est l'addition d'un à trois groupements méthyles sur un résidu lysine ou d'un ou deux groupements méthyles sur un résidu arginine. La méthylation sur lysine est catalysée par des *histone (lysine) methyltransferases* (H(K)MT), la méthylation sur arginine par des *protein arginine methyltransferases* (PRMT). Chaque enzyme cible généralement un résidu bien précis, et l'effet net de la méthylation varie selon le résidu modifié et le nombre de groupements méthyles transférés (Lachner and Jenuwein, 2002 ; Lachner et al., 2003). Trois lysines, en particulier, sont associées à une activation de la transcription lorsqu'elles sont méthylées : H3K4, H3K36 et H3K79 ; inversement, la méthylation de H3K9, H3K27 et H4K20 est fréquemment associée à une répression de la transcription. La di- et tri-méthylation de H3K9, en particulier, est une marque typique de l'hétérochromatine, qui est directement reconnue par la protéine HP1 (Bannister et al., 2001).

**Phosphorylation** La phosphorylation est l'addition d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. C'est un mécanisme de régulation majeur, agissant comme un interrupteur moléculaire et contrôlant un grand nombre d'aspects de la vie de la cellule (notamment, le cycle cellulaire). Dans la chromatine, la phosphorylation semble occuper une place moins prépondérante. Néanmoins, la phosphorylation de H3 en H3S10 et H3S28 est impliquée dans la condensation des chromosomes au début de la mitose, et est médiée par les kinases mitotiques Aurora (Hans and Dimitrov, 2001). La phosphorylation de H2A.X, un variant de l'histone H2A, est associée à la réparation des cassures double-brins de l'ADN (Rogakou et al., 1998).

**Ubiquitination** L'ubiquitine est une protéine acide globulaire de 8,6 kDa hautement conservée chez les eucaryotes. L'ubiquitination est l'addition d'une ou plusieurs ubiquitines sur le groupement amine  $\epsilon$  des résidus lysines. Dans le cytoplasme, l'ubiquitination



est essentiellement associée au contrôle de la dégradation des protéines, les protéines ubiquitinées étant envoyées vers le protéasome. Au sein de la chromatine, deux principaux sites de (mono)-ubiquitination des histones ont été identifiés : H2A sur K119 et H2B sur K120 (Jason et al., 2002). L'ubiquitination des histones ne conduit pas à leur dégradation. La mono-ubiquitination de H2B est associée à l'activation et l'élongation de la transcription (Vitaliano-Prunier et al., 2008 ; Pavri et al., 2006) ; la mono-ubiquitination de H2A, à l'inverse, est impliquée dans le maintien de la répression transcriptionnelle imposée par le complexe Polycomb (Wang et al., 2004).

**ADP-ribosylation** La poly(ADP-ribosyl)ation est la fixation d'un polymère d'ADP-ribose, plus ou moins long et éventuellement branché, à une protéine. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), ubiquitaire chez les eucaryotes, la réaction inverse par l'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Toutes les histones sont susceptibles d'être ADP-ribosylées, et cette modification altère grandement la conformation du nucléosome. La poly(ADP-ribosyl)ation est impliquée à la fois dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (D'Amours et al., 1999).

### 1.3.3 Variants d'histones

Chaque classe d'histone, exceptée la classe H4, comprend plusieurs sous-types distingués en fonction de leur profil d'expression :

- les sous-types dont l'expression est couplée à la réplication de l'ADN ;
- les sous-types dont l'expression est indépendante de la réplication de l'ADN ;
- les sous-types exprimés spécifiquement dans certains tissus ou à certaines étapes du développement.

Dans les cellules cyclantes, les sous-types dont l'expression est couplée à la réplication sont majoritaires dans la chromatine, c'est pourquoi on les qualifie d'histones *conventionnelles* ou *canoniques*. Par opposition, les autres sous-types sont collectivement appelés des *variants d'histones*.

Les gènes codant les histones conventionnelles sont généralement présents en de multiples copies dans le génome et sont organisés en clusters — chez l’homme, trois clusters sur les chromosomes 1 et 6 (Marzluff et al., 2002). Ils présentent des caractéristiques atypiques pour des gènes eucaryotes, comme l’absence d’introns et une terminaison de la transcription signalée par une structure de type tige-boucle au lieu d’un signal de poly-adénylation. Plusieurs mécanismes de régulation, à la fois transcriptionnels et post-transcriptionnels, assurent que les niveaux d’ARN messagers augmentent drastiquement au cours de la phase S et chutent brutalement sitôt l’ADN répliqué (Osley, 1991).

À l’opposé, les gènes codants les variants d’histones ne sont présents qu’en une ou deux copies et sont répartis isolément dans tout le génome. Ils possèdent tous au moins un intron et un signal de poly-adénylation. Par définition, les produits de ces gènes ont tous la capacité de remplacer l’histone conventionnelle correspondante dans un nucléosome ; l’incorporation d’un tel variant dans un nucléosome est susceptible de conférer au nucléosome variant des propriétés structurales et fonctionnelles distinctes de celles d’un nucléosome conventionnel.

### **Variants de H2A**

La classe H2A comprend le plus grand nombre de variants, parmi lesquels les variants H2A.Z et H2A.X, retrouvés chez la plupart des eucaryotes, et les variants H2A.Bbd et MacroH2A, spécifiques des vertébrés.

H2A.Z représente environ 10 % des histones H2A totales. Sa suppression est létale au stade embryonnaire chez la drosophile (Daal and Elgin, 1992) et la souris (Faast et al., 2001). Un nucléosome variant contenant H2A.Z en lieu et place de l’histone H2A conventionnelle présente une structure moins stable qu’un nucléosome conventionnel (Abbott et al., 2001), pouvant permettre un accès plus facile à la double hélice d’ADN. Chez la levure, H2A.Z est impliquée dans l’activation de la transcription et la prévention de l’hétérochromatinisation (Meneghini et al., 2003).

H2A.X est caractérisée par la présence à son extrémité C-terminale d’un motif conservé contenant une sérine phosphorylable. La forme phosphorylée de la protéine, indépendam-

ment de l'espèce, est désignée  $\gamma$ -H2A.X. La phosphorylation intervient notamment en réponse à des cassures double-brin de l'ADN (Rogakou et al., 1998), où des foci  $\gamma$ -H2A.X apparaissent dans les dix minutes suivant l'induction des cassures et disparaissent progressivement dans les deux heures. H2A.X sous sa forme phosphorylée participe à la réparation des cassures, notamment en aidant au recrutement de facteurs de réparation et en favorisant le remodelage de la chromatine à proximité du site de lésion (Thiriet and Hayes, 2005). Elle n'est toutefois pas strictement indispensable au processus de réparation (Yuan et al., 2010).

MacroH2A est caractérisée par une large extension C-terminale, le domaine *macro*. Elle est associée à la répression de la transcription et est notamment trouvée enrichie sur le chromosome X inactif (Mietton et al., 2009). Sa présence dans un nucléosome perturbe à la fois le recrutement de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et le remodelage du nucléosome par le complexe SWI/SNF (Angelov et al., 2003), ainsi que l'acétylation des histones nécessaire à la transcription (Doyen et al., 2006b).

À l'inverse de macroH2A, H2A.Bbd, un variant identifié plus récemment, est exclue du chromosome X inactif (d'où son nom, *Bbd* pour *Barr-body deficient*) et est associée à la chromatine transcriptionnellement active (Chadwick and Willard, 2001). H2A.Bbd forme un nucléosome dont la particule de cœur est plus relâchée qu'un nucléosome conventionnel, et qui ne protège que 118 à 128 pb d'ADN (Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006a). Ce nucléosome est résistant au remodelage par SWI/SNF mais plus perméable à la transcription *in vitro* (Angelov et al., 2004).

## Variants de H2B

Les variants de la classe H2B sont peu nombreux et ceux actuellement décrits ne sont exprimés que dans les tissus testiculaires, laissant supposer un rôle spécifique au cours de la gamétogenèse. Ces variants incluent TH2B (*Testis H2B*) et H2B.FWT. TH2B remplace majoritairement l'histone conventionnelle H2B dans les spermatocytes chez le rat (Meistrich et al., 1985). Chez l'homme, elle est exprimée tout au long de la spermatogenèse, où elle est trouvée dans des régions précises de la chromatine tels que les télomères

(Zalensky et al., 2002). H2B.FWT est un variant étonnamment divergent (environ 45 % d'identité avec les histones H2B conventionnelles) qui ne semble présent que chez l'homme et les grands singes (Churikov et al., 2004). Elle est associée aux régions télomériques. La reconstitution de nucléosomes *in vitro* contenant ce variant a montré que H2B.FWT ne perturbe pas le remodelage du nucléosome par SWI/SNF, mais que son domaine N-terminal, très divergent par rapport à H2B, ne lui permet pas de contribuer à l'assemblage du chromosome mitotique (Boulard et al., 2006).

### Variants de H3

La classe H3 comprend cinq sous-types : deux sous-types conventionnels H3.1 et H3.2, et trois sous-types variants H3.3, H3.4 (ou H3.t, ou TH3) et CenH3. À l'exception de CenH3, tous les sous-types sont homéomorphes, c'est-à-dire qu'ils ne divergent entre eux que par quelques résidus (un résidu entre H3.1 et H3.2 par exemple).

Le variant H3.3 ne diverge de H3.1 que par cinq résidus et de H3.2 par quatre résidus. Il est généralement associé à la chromatine transcriptionnellement active (Ahmad and Henikoff, 2002 ; McKittrick et al., 2004) et est supposé être une marque distinctive des gènes actifs (Hake and Allis, 2006), quoique ce rôle soit depuis peu remis en cause au vu de la présence de H3.3 dans des régions d'hétérochromatine constitutive (Szenker et al., 2011).

Le variant H3.4, divergeant de H3.1 par quatre résidus et de H3.2 par cinq résidus, est un variant spécifique des tissus testiculaires. Chez le rat, il représente jusqu'à 40 % des histones H3 totales tout au long de la spermatogenèse (Meistrich et al., 1985). Chez l'homme, son expression est restreinte aux spermatoocytes, où il représente potentiellement l'histone H3 majoritaire (Witt et al., 1996). Le nucléosome H3.4 apparaît moins stable que le nucléosome conventionnel, avec notamment une plus faible interaction entre le tétramère H3.4:H4 et les dimères H2A:H2B (Tachiwana et al., 2010).

Le variant CenH3, ou CENP-A, est un variant spécifique de la chromatine centromérique. Il est au cœur de ce travail de thèse et sera conséquemment détaillé un peu plus loin.

*We are survival machines—robots vehicles  
blindly programmed to preserve the selfish  
molecules known as genes.*

— Richard DAWKINS

# Chapitre 2

## La mitose

La mitose est le processus par lequel une cellule eucaryote répartit son matériel génétique lors de sa division. Avec la cytokinèse, la division effective de la cellule en deux cellules-filles, elle constitue la phase M du cycle cellulaire. Après avoir rappelé brièvement le déroulement de la mitose, nous nous arrêterons plus particulièrement sur les structures et mécanismes impliqués dans la mobilisation des chromosomes.

### 2.1 Déroulement et régulation de la mitose

#### 2.1.1 Déroulement de la mitose

La mitose est divisée en cinq phases. Au cours de la prophase (figure 2.1a), la chromatine interphasique se condense jusqu'à former des chromosomes bien individualisés ; les deux centrosomes migrent chacun vers un pôle de la cellule et émettent des microtubules dans toutes les directions ; l'enveloppe nucléaire disparaît. En prométaphase (figure 2.1b), les chromosomes désormais totalement condensés migrent vers un plan équatorial, la plaque métaphasique. Ce mouvement, dit de *congression*, est notamment dû au fuseau mitotique, un ensemble de microtubules reliant les centrosomes aux chromosomes auxquels ils s'attachent au niveau du centromère. Les chromosomes restent sur la plaque métaphasique pendant toute la métaphase (figure 2.1c), pendant laquelle la cellule s'as-

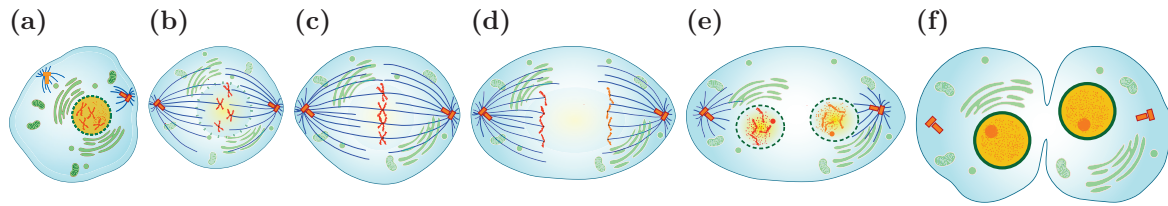


FIGURE 2.1 – Déroulement de la mitose. (a) Prophase : les chromosomes se condensent et la membrane nucléaire disparaît. (b) Prométaphase : capture des chromosomes par les microtubules. (c) Métaphase : alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. (d) Anaphase : les chromatides se séparent et migrent vers les pôles. (e) Télaphase : les chromosomes se décondensent et les membranes nucléaires se reforment. (f) Cytokinèse : division du cytoplasme.

sure de la bonne orientation et du bon attachement bipolaire de chaque chromosome au fuseau mitotique. Survient alors l'anaphase (figure 2.1d), où la cohésion des chromatides sœurs est rompue et où chaque chromatide migre vers un pôle de la cellule. En télaphase (figure 2.1e), au terme de cette migration, une enveloppe nucléaire se reforme autour des deux lots de chromatides, les microtubules du fuseau mitotique se dissocient et la chromatine commence à se décondenser. Parallèlement à la télaphase, se produit la cytokinèse (figure 2.1f), la division du cytoplasme ; un anneau contractile se resserme progressivement et conduit à la séparation presque totale des deux cellules-filles qui ne sont plus reliées que par une petite structure très dense, le corps résiduel, dont la disparition signe la fin effective de la division cellulaire.

### 2.1.2 Régulation de la mitose

L'ensemble des processus mitotiques est strictement contrôlé. Deux mécanismes moléculaires ont une importance prépondérante dans ce contrôle : la protéolyse, qui permet de dégrader un effecteur lorsque sa fonction n'est plus nécessaire, et la phosphorylation, qui sert d'interrupteur à de nombreuses enzymes et permet leur activation ou désactivation. Nous nous concentrerons ici sur quelques-unes des familles de kinases impliquées dans le contrôle de la mitose.

#### Principales kinases mitotiques

**La famille CDK** Les kinases de la famille CDK (*cyclin dependent kinases*) sont parmi les plus importants chefs d'orchestre de la progression à travers le cycle cellulaire. En

mitose, la kinase prédominante de cette famille est CDK1. Exprimée à partir de la phase G2, elle est maintenue inactivée par la phosphorylation de ses résidus thréonine-14 et tyrosine-15, médiée par les kinases Wee1 et Myt1. La déphosphorylation de ces résidus par Cdc25 et l'association à la cycline B permet l'activation de la kinase et signe l'entrée de la cellule en mitose.

Les cibles du complexe cycline B/CDK1 sont multiples et incluent notamment : les lamines, ce qui conduit à leur dépolymérisation et à la rupture de l'enveloppe nucléaire ; des kinésines et autres protéines liées aux microtubules, favorisant l'assemblage du fuseau mitotique ; les condensines, impliquées dans la condensation des chromosomes ; les cohésines situées sur les bras des chromosomes.

Finalement, lors de la transition métaphase/anaphase, la destruction de la cycline B par l'*anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C) conduit à la désactivation de CDK1, ce qui ouvre la voie aux processus de complétion et de sortie de la mitose.

**La famille PLK** La famille des PLK (*Polo-like kinases*) regroupe les homologues de la protéine Polo, identifiée chez la drosophile dans un crible visant des altérations du fuseau mitotique. Chez les mammifères, cette famille comprend quatre membres, PLK1 à 4, PLK1 étant celle impliquée en mitose (Weerdt and Medema, 2006). Elle est exprimée à partir de la phase G2. Initialement répartie dans toute la cellule, elle est localisée aux niveaux des centrosomes et des kinétochores de la prophase à la métaphase. Elle est majoritairement dégradée par l'APC/C lors de la transition métaphase/anaphase, exceptée une fraction qui subsiste sur le fuseau central et le corps résiduel en fin de mitose.

PLK1 favorise l'entrée en mitose, à la fois par une activation directe du complexe cycline B/CDK1 et par la phosphorylation de Cdc25c, qui promeut sa localisation nucléaire (Roshak et al., 2000). Au niveau des centrosomes, elle favorise le recrutement des complexes  *$\gamma$ -tubulin ring complex* ( $\gamma$ -TURC) par la phosphorylation de Asp (Petronczki et al., 2008). Sur les kinétochores, elle contribue au recrutement du complexe NDC80 (Wong and Fang, 2005). Finalement, elle participe à la transition métaphase/anaphase, soit en phosphorylant directement des sous-unités de l'APC/C (Golan et al., 2002), soit en promouvant la dégradation d'un de ses inhibiteurs, Emi1.

**La famille NRK** La kinase NIMA (*never in mitosis A*) a été identifiée chez *Aspergillus nidulans* dans un crible visant des mutants du cycle cellulaire ; les mutants *nimA* restaient arrêtés en phase G2 sans jamais entrer en mitose. Les homologues de NIMA définissent la famille NRK ou *NIMA-related kinases* (O’Connell et al., 2003). Chez les vertébrés, l’homologue fonctionnel le plus probable est la kinase NEK2. Elle est essentiellement impliquée dans la maturation et la séparation des centrosomes. En phosphorylant C-Nap1, elle favorise la dissolution d’une structure maintenant les centrosomes ensemble après leur duplication (Bahe et al., 2005) ; elle rompt également l’interaction entre la protéine Rootletin et la  $\beta$ -caténine, ce qui est nécessaire à la séparation des centrosomes (Bahmanyar et al., 2008).

**La famille Aurora** La protéine fondatrice de la famille Aurora est la kinase du même nom identifiée chez la drosophile dans un criblant visant des mutants de la formation du fuseau mitotique. Cette famille comprend trois membres chez les mammifères, Aurora A, B et C. Aurora C semble exprimée spécifiquement dans les cellules germinales, ce qui laisse supposer une possible fonction spécialisée dans la division méiotique. Aurora A et Aurora B sont toutes deux impliquées dans la mitose somatique et partagent quelques caractéristiques communes : elles sont exprimées uniquement en G2/M ; leur activation dépend de leur association à des co-facteurs spécifiques couplée à une autophosphorylation ; elles sont dégradées en fin de mitose par ubiquitination dépendante de l’APC/C.

**Aurora A** contribue à l’entrée en mitose et à la maturation des centrosomes. Elle affiche initialement une localisation cytoplasmique, où elle forme un complexe avec son cofacteur Bora. Le complexe Bora/Aurora A phosphoryle notamment PLK1 (Macûrek et al., 2008 ; Seki et al., 2008), ce qui a pour effet de favoriser à la fois l’entrée en mitose (par l’action de PLK1 sur le complexe cycline B/CDK1) et la phosphorylation et la dégradation de Bora. Aurora A s’associe alors à son autre cofacteur, TPX2 (Chan et al., 2008), qui la localise au niveau des centrosomes. Là, elle permet le recrutement de plusieurs éléments du matériel péricentriolaire (Hannak et al., 2001) et la mobilisation de protéines associées aux microtubules (Dutertre et al., 2002). Elle phosphoryle également la fraction centrosomique



de Cdc25 (Dutertre et al., 2004), permettant de maintenir l'activation locale du complexe cycline B/CDK1.

**Aurora B** est le membre enzymatique du complexe *chromosomal passengers complex* (CPC), un ensemble de protéines caractérisées par leur profil de localisation au cours de la mitose. Ce complexe, et notamment la protéine INCENP, permet à la fois l'autoactivation complète de la kinase et sa bonne localisation. Les fonctions d'Aurora B suivent son voyage au travers de la cellule en division. En prophase, elle est associée aux bras des chromosomes, où elle participe à la condensation de la chromatine par la phosphorylation des condensines et la sérine-10 de H3 (Giet and Glover, 2001 ; Lipp et al., 2007) ; elle assiste également au retrait des cohésines le long des bras, conjointement avec PLK1 (Giménez-Abián et al., 2004). En prométaphase et métaphase, localisée sur les centromères, elle supervise l'attachement des microtubules aux kinétochores, notamment en déstabilisant les attachements incorrects (Shang et al., 2003 ; Liu and Lampson, 2009 ; Tanaka et al., 2002 ; Lampson et al., 2004 ; Cimini et al., 2006 ; Knowlton et al., 2006) et en activant le point de contrôle du fuseau mitotique. En télophase, elle est localisée sur le fuseau central, pour le désassemblage duquel elle est requise (Buvelot et al., 2003). Enfin, en cytokinèse, sur le corps résiduel, elle contribue à la formation de l'anneau contractile (Minoshima et al., 2003).

## 2.2 Le fuseau mitotique

### 2.2.1 Les microtubules

Le fuseau mitotique est composé de microtubules, une structure cylindrique formée par l'association de treize protofilaments eux-mêmes composés d'hétérodimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline (Nogales, 2001). C'est une structure polarisée : l'agencement des dimères de tubuline est tel que les deux extrémités d'un protofilament ne sont pas équivalentes ; tous les protofilaments d'un microtubule étant orientés dans le même sens, on différencie ainsi une extrémité n'exposant que des molécules d' $\alpha$ -tubuline, qualifiée de positive (+), et une

extrémité n'exposant que des molécules de  $\beta$ -tubuline, qualifiée de négative (-).

Le microtubule est une structure hautement dynamique, dont la longueur varie par l'ajout ou le retrait de dimères de tubuline aux extrémités du polymère (Desai and Mitchison, 1997). L'extrémité d'un microtubule alterne entre des phases de polymérisation lente et des phases de dépolymérisation rapide (« catastrophe »), en fonction notamment de la concentration locale en dimères de tubuline. À une extrémité donnée, le taux de polymérisation et la fréquence des catastrophes déterminent si le microtubule est globalement en phase de croissance ou de rétraction. Chaque extrémité peut exhiber des propriétés dynamiques distinctes, ce qui confère au microtubule la possibilité de croître ou de se rétracter dans un sens particulier.

Lorsque les propriétés dynamiques des deux extrémités sont telles qu'une extrémité croît au même rythme que l'extrémité opposée décroît, on observe un phénomène de « tapis roulant » (*treadmilling*) : les dimères de tubuline ajoutés à l'extrémité croissante sont progressivement décalés vers l'extrémité décroissante où ils se dissocient du polymère ; la longueur du microtubule reste constante (Margolis and Wilson, 1998).

### 2.2.2 Les centrosomes

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules de la cellule. Il est dupliqué lors de la phase S et les deux centrosomes résultants définissent les pôles du fuseau mitotique lors de la division qui s'ensuit (Urbani and Stearns, 1999). C'est un organelle d'environ 1  $\mu\text{m}$  de large constitué d'une paire de centrioles (eux-mêmes un assemblage de neuf triplets de microtubules) entourés d'un matériel péricentriolaire (*pericentriolar material*, PCM) amorphe. Un composant majeur du PCM est un complexe annulaire de  $\gamma$ -tubuline,  $\gamma$ -TURC, qui sert de modèle de nucléation pour la formation de microtubules (Zheng et al., 1995). Au cours de la mitose la capacité de nucléation des centrosomes est accrue par le recrutement de plus grandes quantités de  $\gamma$ -TURC (Khodjakov and Rieder, 1999 ; Piehl et al., 2004). Cela permet une augmentation rapide de nombre de microtubules émis à partir du centrosome et ainsi la formation du futur fuseau mitotique. Toutefois, le centrosome n'est pas strictement indispensable dans ce processus, et un fuseau mitotique

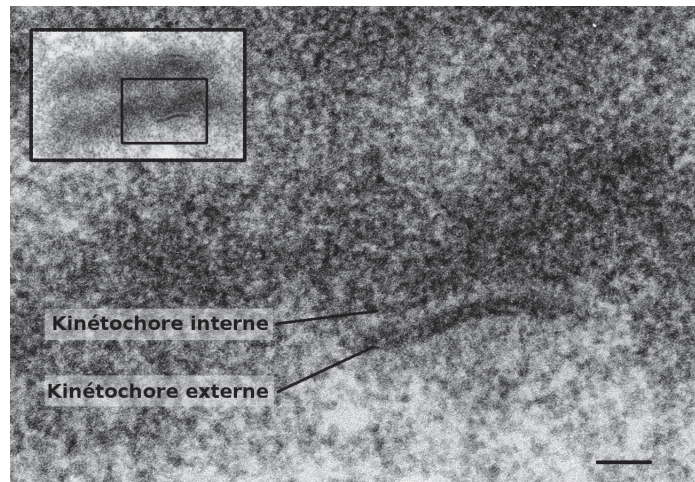


FIGURE 2.2 – Le kinétochore. Micrographie électronique d'un chromosome de souris (en encart) et vue agrandie de la région du kinétochore. Échelle : 100 nm.

fonctionnel peut se former en absence de centrosome (Mahoney et al., 2006). Le centrosome a également un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire (Doxsey et al., 2005).

### 2.2.3 Le kinétochore

Le kinétochore est un complexe protéique transitoire associé aux centromères au cours de la mitose. C'est par son intermédiaire que les microtubules du fuseau mitotique accrochent les chromosomes.

Observé en microscopie électronique (figure 2.2), le kinétochore présente une morphologie trilamellaire révélant trois régions (McEwen et al., 2007) : le kinétochore interne, très étroitement associé à la chromatine ; le kinétochore externe, une région épaisse de 50 à 60 nm qui sert d'interface avec les microtubules ; et le kinétochore central, une région peu dense aux électrons séparant les deux précédentes. Un réseau de fibres, la couronne fibreuse, est associé à la surface du kinétochore externe.

Le kinétochore le plus simple, celui de *Sacharromyces cerevisiae*, fixe un seul microtubule. Il est constitué d'environ soixante protéines (McAinsh et al., 2003 ; Westermann et al., 2007) essentiellement réparties en cinq complexes : CBF3, Ndc80, Mtw1, Spc105 et Dam1. Trois d'entre eux, Ndc80, Mtw1 (appelé Mis12 chez l'homme) et Spc105 (Knl1 chez l'homme) sont conservés chez les eucaryotes supérieurs (Musacchio and Salmon, 2007 ; Cheeseman and Desai, 2008 ; Welburn and Cheeseman, 2008), ce qui suggère que leurs

kinétochores, plus volumineux et qui lient chacun plusieurs microtubules (15 à 20 microtubules pour un kinétochore humain) sont formés d'une répétition du module élémentaire trouvé chez la levure (Joglekar et al., 2008). Un autre complexe, le *constitutive centromere-associated network* (CCAN), est également conservé chez tous les eucaryotes et est supposé être la fondation du kinétochore, le socle sur lequel le reste du kinétochore est assemblé. Néanmoins, l'association permanente de la plupart des membres de ce complexe au centromère (d'où son nom), opposée à la nature transitoire du kinétochore, commande de considérer le CCAN comme un composant de la chromatine centromérique davantage que comme un composant du kinétochore.

Le module fonctionnel élémentaire du kinétochore est le réseau Knl1–Mis12–Ndc80 (KMN), constitué des trois complexes conservés Ndc80, Mtw1/Mis12 et Spc105/Knl1 (Cheeseman et al., 2006). Dans ce réseau, le complexe Ndc80 interagit directement avec le microtubule, avec une affinité faible mais qui augmente de façon synergique lorsqu'il est associé aux complexes Mtw1/Mis12 et Spc105/Knl1. Le complexe Ndc80 comprend quatre protéines et forme une structure cylindrique avec deux têtes globulaires à chaque extrémité, séparées par une longue région super-enroulée (Ciferri et al., 2007). Une extrémité du cylindre, composée des régions globulaires de Ndc80 et de Nuf2, lie directement les microtubules (Cheeseman et al., 2006 ; Wei et al., 2007) ; l'autre extrémité, composée des régions globulaires de Spc24 et Spc25 (Wei et al., 2006), est associée au kinétochore interne. Chaque microtubule est lié au kinétochore par plusieurs complexes KMN (Joglekar et al., 2006).

## 2.3 Mouvements des chromosomes

### 2.3.1 Accrochage au fuseau mitotique

Tous les mouvements des chromosomes au cours de la mitose nécessitent leur accrochage aux microtubules du fuseau mitotique. Les microtubules accrochés à un kinétochore forment une fibre K ; ces microtubules sont orientés avec leur extrémité (+) ancrée au kinétochore et leur extrémité (–) ancrée au centrosome.

Deux modèles, non-nécessairement exclusifs, tentent d'expliquer comment les chromosomes sont accrochés aux microtubules du fuseau mitotique au cours de la prométaphase. Le modèle « recherche et capture » (McIntosh et al., 2002) propose que les microtubules émis à partir des centrosomes explorent l'espace avoisinant dans toutes les directions jusqu'à entrer en contact avec un kinétochore. Les microtubules ayant établi un tel contact sont stabilisés alors que ceux dont la recherche est infructueuse sont dépolymérisés. Ce mécanisme est permis notamment par l'augmentation de la nucléation des microtubules au niveau des centrosomes, conséquence du recrutement accru de  $\gamma$ -tubuline et de l'action d'Aurora A (Khodjakov and Rieder, 1999; Brittle and Ohkura, 2005).

Le modèle d'« auto-assemblage » propose que des microtubules se forment au voisinage immédiat de la chromatine, indépendamment des centrosomes. Une partie d'entre eux au moins sont accrochés par les kinétochores et s'orientent parallèlement pour former une fibre K (McKim and Hawley, 1995). Ce modèle pourrait expliquer la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel observé en l'absence de centrosome (Mahoney et al., 2006).

### 2.3.2 Congression

La congression est le processus par lequel les chromosomes accrochés au fuseau mitotique s'alignent sur la plaque métaphasique en prométaphase. Le mouvement général en direction de la plaque métaphasique est généralement accompagnée de mouvements oscillatoires en direction de l'un et l'autre des deux pôles.

Une des forces responsables de ces mouvements provient de la dépolymérisation des extrémités positives des microtubules associés à un kinétochore; le raccourcissement de la fibre K qui en résulte entraîne le chromosome en direction du pôle correspondant. Sur le kinétochore opposé, on observe une polymérisation des extrémités positives des microtubules et l'élongation de la fibre K, mais ce phénomène ne permet pas de « pousser » le chromosome vers la plaque métaphasique (Khodjakov and Rieder, 1996).

Un autre mécanisme contribuant à la congression est le déplacement latéral d'un chromosome le long d'une fibre K déjà formée. Ce mouvement est possible grâce à l'action de moteurs moléculaires associés aux microtubules ayant une activité motrice dirigée

vers l'extrémité positive, comme la kinésine CENP-E (Kapoor et al., 2006). Il permet la congression d'un chromosome non encore bi-orienté, et favorise justement la bi-orientation en rapprochant le chromosome de la plaque métaphasique et donc des faisceaux de microtubules émis par le pôle opposé.

### 2.3.3 Ségrégation

La ségrégation des chromatides vers les deux futures cellules-filles au cours de l'anaphase est le résultat de deux mouvements distincts définissant deux sous-phases, l'anaphase A et l'anaphase B. Au cours de l'anaphase A, les chromatides migrent en direction du pôle qui leur fait face ; au cours de l'anaphase B — qui ne commence pas nécessairement après l'anaphase A, un chevauchement temporel des deux phases étant possible —, les pôles eux-mêmes migrent dans des directions opposées. La contribution de chaque mouvement à la ségrégation des chromatides est variable entre les espèces et les types cellulaires.

#### Anaphase A

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

La dépolymérisation des microtubules par leur extrémité positive (du côté du kinétochore) provoque le raccourcissement des fibres K et la traction des chromatides en direction du pôle (Gorbsky et al., 1987 ; Gorbsky et al., 1988). Le même effet peut également être obtenu par une dépolymérisation à l'extrémité négative (du côté du centrosome) associée à une polymérisation de l'extrémité positive, si le taux de dépolymérisation est supérieur au taux de polymérisation (Khodjakov and Kapoor, 2005 ; Kwok and Kapoor, 2007)..

Plusieurs protéines motrices apparaissent impliquées dans le mouvement des chromatides en direction des pôles, bien que le rôle exact de chacune d'elle reste peu clair. Une des premières identifiées est la dynéine, retrouvée associée aux kinétochores lors de l'anaphase et exhibant une activité motrice dirigée vers l'extrémité négative (Pfarr et al., 1990 ;

Steuer et al., 1990) ; son rôle pourrait être de livrer des protéines favorisant la dépolymérisation aux pôles (Gaetz and Kapoor, 2004). De telles protéines incluent des membres de la famille kinésine-13 (Ganem and Compton, 2004).

## Anaphase B

Après la séparation initiale des chromatides, se forme sur la plaque équatoriale laissée vacante une nouvelle structure microtubulaire, le « fuseau central » (*central spindle*), constitué de microtubules en provenance des deux pôles. Les moteurs moléculaires recrutés au niveau du fuseau central font « glisser » les microtubules anti-parallèles, générant ainsi des forces qui éloignent chaque moitié du fuseau l'une de l'autre et contribuent aux mouvements des centrosomes (Brust-Mascher and Scholey, 2002 ; Brust-Mascher et al., 2004 ; Zhu et al., 2005).

Les microtubules astraux, reliant les centrosomes au cortex cellulaire, contribuent également à la migration des centrosomes (Rosenblatt, 2005).

### 2.3.4 Le point de contrôle du fuseau mitotique

Le point de contrôle du fuseau mitotique ou *spindle [assembly] checkpoint* (SAC) a pour fonction d'empêcher la cellule d'entrer précocément en anaphase avant que tous les chromosomes ne soient correctement attachés au fuseau mitotique. L'attachement correct est l'attachement dit amphitélétique (figure 2.3), dans lequel le kinétochore de chaque chromatide est lié à des fibres K venant du centrosome qui lui fait face. Les autres types d'attachements possibles sont : l'attachement monotélétique, où un seul des deux kinétochores est lié au fuseau ; l'attachement syntélétique, où les deux kinétochores sont liés à des fibres K en provenance du même centrosome ; et l'attachement mérotélétique, où l'un des kinétochores est lié à des fibres K en provenance des deux centrosomes. En présence de chromosomes non attachés ou attachés de manière incorrecte, le SAC retarde la transition métaphase/anaphase jusqu'à la résolution du problème d'attachement.

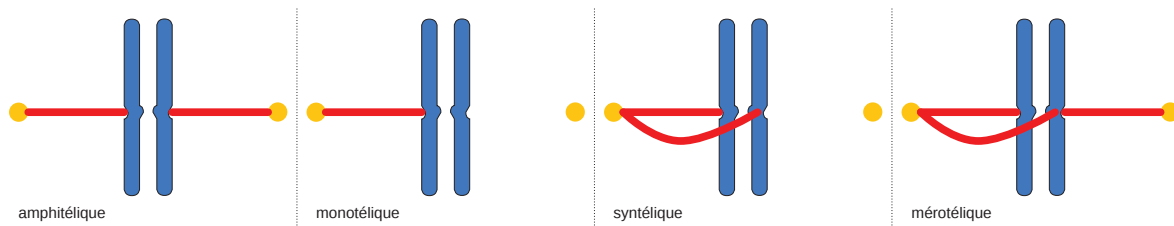


FIGURE 2.3 – Attachements des kinétochores au fuseau mitotique. Les différents attachements possibles sont présentés. L'attachement amphitélétique est l'attachement correct, le seul qui permette la ségrégation adéquate des chromatides en anaphase.

### La transition métaphase/anaphase

L'effecteur majeur de la transition métaphase/anaphase est le complexe APC/C–Cdc20. Il possède une activité E3-ubiquitine ligase dirigée notamment contre la sécurine, un inhibiteur stœchiométrique de la séparase. La dégradation de la sécurine lève l'inhibition sur la séparase, qui peut alors détruire la protéine Smc3, un membre du complexe des cohésines (Haering and Nasmyth, 2003). La destruction de Smc3 permet la séparation des chromatides sœurs et l'entrée en anaphase. Une autre cible de l'APC/C–Cdc20 est la cycline B1, dont la dégradation signe la fin de l'activité du complexe cycline B1–Cdk1 et promeut la sortie de la mitose.

### Activation du SAC

Le point de contrôle du fuseau mitotique est activé par la présence de kinétochores non-attachés au fuseau mitotique. Il suffit d'un seul kinétochore non-attaché pour activer le point de contrôle et retarder la transition vers l'anaphase (Rieder et al., 1994). Chez les métazoaires, le SAC est systématiquement et normalement activé en début de mitose, avant la capture des kinétochores par les microtubules du fuseau (Musacchio and Salmon, 2007), et est désactivé sitôt tous les kinétochores convenablement attachés.

L'activation du SAC se traduit par la formation du complexe *mitotic checkpoint complex* (MCC), composé des protéines Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20. Ce complexe est responsable de l'inhibition du complexe APC/C par un mécanisme non encore élucidé : séquestration de Cdc20 empêchant la formation du complexe APC/C–Cdc20 actif, interaction directe avec l'APC/C provoquant une conformation fermée de celui-ci (Herzog et al., 2009), ou encore dégradation précoce de Cdc20 (Pan and Chen, 2004 ; Nilsson et al.,



2008; Ge et al., 2009).

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

### Détection des attachements incorrects

L'absence de microtubules sur un kinétochore permet de détecter les attachements incomplets (monotéliques), mais ne permet pas de détecter les attachements incorrects (syntéliques et mérotéliques, figure 2.3). Un autre signal que l'absence de microtubules est donc nécessaire pour permettre la correction de ces attachements. Le modèle courant repose sur la tension entre les deux kinétochores d'un même chromosome (Kelly and Funabiki, 2009). Dans ce modèle, l'absence de tension suffisante conduit la kinase Aurora B (localisée en métaphase au niveau des centromères) à déstabiliser les interactions entre kinétochore et microtubules. Aurora B peut agir notamment en phosphorylant directement les membres du réseau KMN, réduisant leur affinité pour les microtubules (Welburn et al., 2010); elle phosphoryle également la kinésine *mitotic-centromere-associated kinesin* (MCAK), stimulant son activité de dépolymérisation des microtubules (Knowlton et al., 2006). L'effet net de l'action d'Aurora B est la rupture de l'attachement; elle n'active pas directement le SAC, mais transforme un signal d'absence de tension en un signal d'absence d'attachement, susceptible d'activer le SAC par la voie Mad2.

*Try to learn something about everything and  
everything about something.*

— Thomas Henry HUXLEY

## Chapitre 3

# La chromatine centromérique

Le centromère est une structure chromosomique hautement différenciée qui gouverne l'assemblage des kinétochores et permet la répartition équilibrée du matériel génétique. On distingue essentiellement deux types de centromères : ceux des chromosomes *monocentriques*, qui contiennent un seul centromère apparaissant généralement sous la forme d'une constriction sur le chromosome mitotique ; et ceux des chromosomes *holocentriques*, dont le centromère est réparti sur toute la longueur du chromosome. Dans le reste de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux cas des chromosomes monocentriques.

### 3.1 Détermination épigénétique du centromère

L'ADN centromérique est caractérisée par sa forte variabilité d'une espèce à l'autre (Sullivan et al., 2001). Les centromères les plus simples, ceux de *S. cerevisiae*, ont une séquence de 125 pb contenant trois éléments fonctionnels conservés (CDEI, II et III). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, les centromères consistent en des régions de 40 à 100 kb formés d'une séquence centrale unique de 4 à 5 kb flanquée de séquences répétées (*imr* et *otr(dg/dh)*). Chez la drosophile, le seul centromère caractérisé au niveau de la séquence d'ADN correspond à une région de 420 kb constituée de répétitions en tandem d'ADN satellite, interrompues par des éléments transposables. Chez l'homme, les centromères s'étendent sur plusieurs mégabases et sont constitués de répétitions d'un motif d'environ

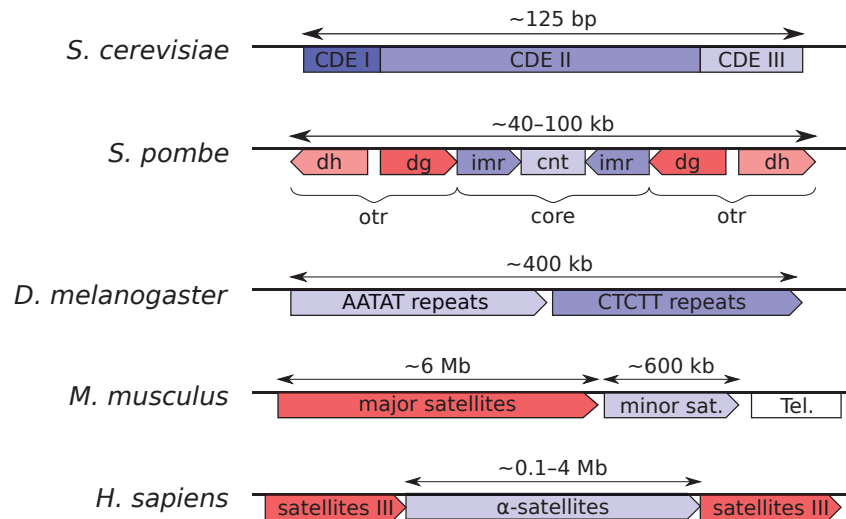


FIGURE 3.1 – Organisation de l'ADN centromérique (en bleu) et péricentromérique (en rouge) chez différents eucaryotes. CDE, *Centromere DNA element*; cnt, *central core*; imr, *innermost repeats*; otr, *outer repeats*; Tel, ADN télomérique.

170 pb, l'ADN  $\alpha$ -satellite.

L'absence de conservation des ADN centromériques a amené la suggestion que la fonction du centromère et sa position sur le chromosome ne sont pas déterminées par la séquence nucléotidique. D'autres observations sont venues renforcer cette hypothèse (Karpen and Allshire, 1997). L'ADN centromérique n'apparaît ni nécessaire ni suffisant pour supporter la fonction du centromère. Non nécessaire, car un centromère fonctionnel peut se former sur des régions n'offrant aucune similitude avec des régions centromériques (Marshall et al., 2008). Non suffisant, car la seule présence d'ADN de type centromérique ne conduit pas systématiquement à un centromère fonctionnel.

Il est aujourd'hui fermement établi que l'identité et la fonction du centromère sont définies épigénétiquement et dépendent d'une structure chromatinienne spécialisée plutôt que de la séquence d'ADN sous-jacente. Contrairement à la séquence d'ADN, la chromatine associée aux centromères possède plusieurs caractéristiques relativement bien conservées chez les eucaryotes.

## 3.2 Structure de la chromatine centromérique

Initialement considérée comme de l'hétérochromatine, la chromatine centromérique présente des particularités qui la distinguent aussi bien de l'hétérochromatine que de

l'euchromatine et en font une chromatine unique et spécialisée. Sa caractéristique majeure est la présence du variant centromérique de l'histone H3, CENP-A. Ce variant est le principal candidat pour la marque épigénétique de la chromatine centromérique.

La structure du nucléosome contenant CENP-A est une question ouverte et plusieurs modèles sont actuellement proposés (revus par Black and Cleveland, 2011). L'hypothèse la plus probable est un nucléosome à cœur octamérique, similaire à un nucléosome conventionnel dans lequel les deux histones H3 seraient remplacées par deux protéines CENP-A (Sekulic et al., 2010). Les autres possibilités incluent :

- un nucléosome à cœur octamérique, mais dans lequel l'ADN s'enroule en formant une hélice droite (Lavelle et al., 2009) ;
- un nucléosome à cœur tétramérique, formé de deux dimères CENP-A-H4 (Williams et al., 2009) ;
- un nucléosome à cœur tétramérique, constitué d'un seul exemplaire des quatre histones H2A, H2B, CENP-A et H4 (Furuyama and Henikoff, 2009) ;
- un nucléosome à cœur hexamérique, composé de deux exemplaires de chacune des histones CENP-A et H4, et deux exemplaires de la chaperonne de CENP-A (Mizuguchi et al., 2007).

Black and Cleveland, 2011 ont proposé que les nucléosomes non-octamériques représentent des étapes intermédiaires de la maturation des nucléosomes CENP-A octamériques.

Récemment, la structure d'un nucléosome octamérique à deux CENP-A a été résolue. Tachiwana et al., 2011 ont montré qu'un tel nucléosome présente une structure globalement similaire à celle d'un nucléosome H3 — en contradiction avec des rapports précédents faisant état d'une structure nettement distincte (Sekulic et al., 2010) — mais dans laquelle seulement 121 paires de bases sont visibles, indiquant que treize paires de bases à chacune des extrémités de l'ADN nucléosomal ne sont pas structurées.

La chromatine centromérique est formée d'une alternance de régions contenant des nucléosomes CENP-A et de régions contenant des nucléosomes conventionnels (figure 3.2a), chacune de ces régions s'étalant sur environ 15 à 40 kb (Blower et al., 2002). Lors de la

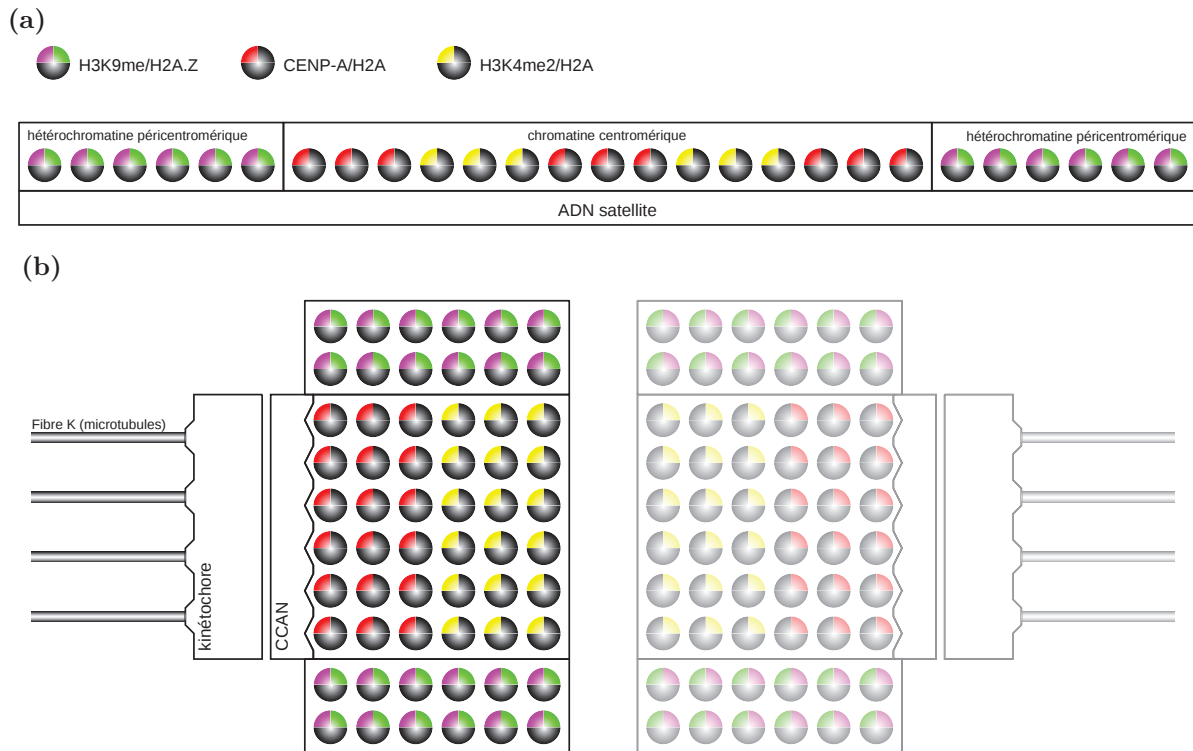


FIGURE 3.2 – Organisation linéaire (a) et spatiale (b) de la chromatine centromérique et péri-centromérique.

condensation du chromosome mitotique, ces régions du nucléofilament forment une structure d'ordre supérieure telle que tous les nucléosomes CENP-A sont exposés en surface du centromère alors que les nucléosomes conventionnels sont placés dans la profondeur du centromère interne (figure 3.2b). Les nucléosomes H3 de la chromatine centromérique sont diméthylés sur la lysine-4 de H3 (H3K4me2), une marque fréquemment associée aux régions promotrices, et sont hypo-acétylés (Sullivan and Karpen, 2004).

La chromatine centromérique ne recouvre qu'une partie centrale de l'ADN centromérique sous-jacent ; chez l'homme, elle représente une région de 500 à 1500 kb (Blower et al., 2002), alors que l'ADN  $\alpha$ -satellite peut s'étendre sur plusieurs mégabases. La chromatine située de part et d'autre de la chromatine centromérique est désignée comme la chromatine péri-centromérique. Elle présente les marques typiques de l'hétérochromatine, notamment la méthylation de la lysine-9 de H3 associée à la présence de la protéine HP1 (Sullivan and Karpen, 2004). En outre, elle est enrichie en variant H2A.Z (Greaves et al., 2007).

### 3.3 Chromatine centromérique et transcription

Il a longtemps été supposé que la chromatine centromérique, assimilée — à tort — à de l'hétérochromatine, était réfractaire à la transcription. Néanmoins, plusieurs éléments laissent aujourd'hui supposer que la transcription de l'ADN sous-jacent à la chromatine centromérique est possible. Ainsi, des transcrits homologues à l'ADN centromérique ont déjà été détectés chez les mammifères et les plantes (Bouzinba-Segard et al., 2006 ; Neumann et al., 2007), et des gènes codants peuvent résider et être exprimés dans des régions centromériques (Yan et al., 2006 ; Saffery et al., 2003). Chez *S. pombe*, l'ARN polymérase II est trouvée enrichie sur la chromatine centromérique au cours de la phase S (Chen et al., 2008). La transcription des séquences centromériques pourrait même également jouer un rôle important dans la fonction du centromère, en étant notamment impliquée dans le recrutement de protéines centromériques (Wong et al., 2007 ; Grewal and Elgin, 2007).

### 3.4 Le variant d'histone centromérique CENP-A

#### 3.4.1 Structure et conservation

La protéine CENP-A est un variant de l'histone H3. Il existe chez tous les eucaryotes étudiés, sous le nom de Cse4p chez *S. cerevisiae*, Cnp1 chez *S. pombe*, CID chez *Drosophila melanogaster*, ou encore Cenpa chez *Mus musculus*. Le nom *CenH3* (*centromeric H3*) a été proposé pour désigner uniformément cette protéine indépendamment de l'espèce.

Comme toutes les histones, CENP-A est composée de deux domaines distincts, un domainal carboxy-terminal globulaire et une extension, ou queue, amino-terminale non structurée. Le domaine globulaire partage 62 % d'identité avec le domaine globulaire de l'histone conventionnelle H3, tandis que l'extension N-terminale est complètement différente. Cette distinction entre les deux domaines se retrouve également en comparant les différentes protéines CenH3 entre elles (figure 3.3) : le domaine globulaire est très conservé à travers les eucaryotes, tandis que le domaine N-terminal apparaît très divergent.

Curieusement, c'est le domaine globulaire qui semble conférer à CENP-A les propriétés qui la distinguent de l'histone conventionnelle H3, et non le domaine N-terminal qui en

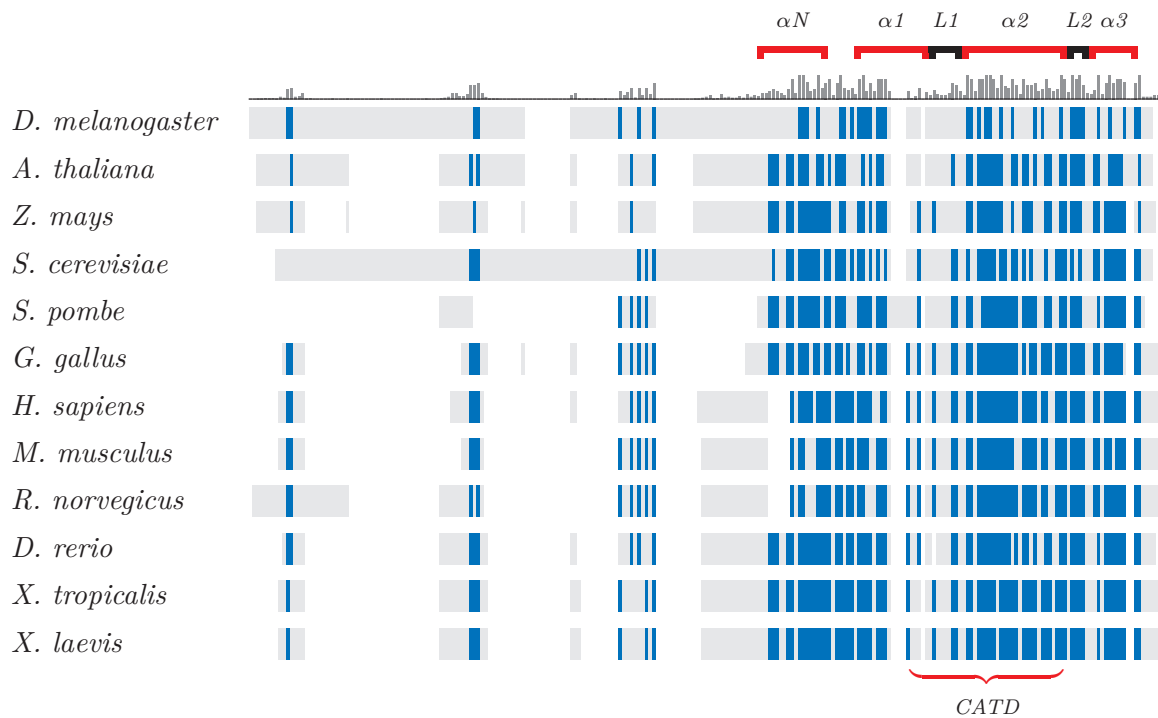


FIGURE 3.3 – Alignement des séquences des protéines CenH3/CENP-A chez quelques eucaryotes. Les résidus conservés apparaissent en bleu. Les structures secondaires du domaine globulaire sont figurés en haut.

est pourtant le plus différent. L'importance du domaine globulaire est apparue très tôt quand il a été montré qu'il était nécessaire à la localisation centromérique spécifique de la protéine (Sullivan et al., 1994). La partie essentielle aux fonctions de CENP-A a par la suite été réduite à un domaine plus court, le *CENP-A targeting domain* (CATD), constitué uniquement de la boucle L1 et de l'hélice  $\alpha 2$  du domaine histone-fold (Black et al., 2004), et les dernières données cristallographiques mettent notamment en évidence l'importance de deux résidus situés dans la boucle L1 (Tachiwana et al., 2011). Le CATD confère au tétramère CENP-A:H4 une conformation plus rigide que celle du tétramère H3:H4 (Black et al., 2007a), et cette différence est supposée impliquée à la fois dans le ciblage de CENP-A vers la chromatine centromérique et dans les fonctions qu'elle doit y remplir.

### 3.4.2 Maintenance de CENP-A aux centromères

La présence de CENP-A dans la chromatine centromérique étant requise pour la fonction du centromère, il est nécessaire de recharger périodiquement de nouvelles protéines

CENP-A sur ladite chromatine à mesure que l'ADN est répliqué lors de chaque cycle. Pour les histones conventionnelles, ce rechargement intervient lors de la phase S et est dépendant de la réplication de l'ADN (Osley, 1991). Il n'en va pas de même pour CENP-A, qui n'est pas exprimé au cours de la phase S (Shelby et al., 1997). La déposition de CENP-A sur la chromatine apparaît comme un processus complexe, aux étapes multiples, et impliquant notamment un passage obligatoire à travers la mitose (Jansen et al., 2007).

Lors de la réplication de l'ADN centromérique, les nucléosomes CENP-A sont répartis de manière équilibrée entre les deux molécules d'ADN naissantes, laissant sur chacune d'elles des « trous » qui sont soit laissés vides de nucléosomes, soit plus probablement occupés par des nucléosomes conventionnels contenant l'histone H3. En phase G2, le gène CENP-A commence à s'exprimer et les protéines CENP-A nouvellement synthétisées sont prises en charge par la chaperone spécifique de CENP-A, HJURP (Shuaib et al., 2010 ; Dunleavy et al., 2009 ; Foltz et al., 2009), qui reconnaît spécifiquement le CATD de CENP-A.

Le chargement de CENP-A sur la chromatine n'intervient pas avant la fin de la mitose. La première étape semble être le fait d'un complexe formé par les protéines Mis18 $\alpha$ , Mis18 $\beta$ , RbAp46, RbAp48 et M18BP1 (Fujita et al., 2007). Ce complexe est transitoirement associé à la chromatine centromérique entre la télophase et le début de la phase G1 et est indispensable au recrutement de CENP-A. Il n'est toutefois jamais directement associé à cette dernière, ce qui suggère que son rôle est de préparer la chromatine centromérique pour autoriser ultérieurement le chargement de CENP-A qui doit être médié par d'autres facteurs. La nature exacte de cette préparation reste à élucider mais pourrait impliquer la diméthylation de la lysine-4 de l'histone H3 ou la transcription de l'ADN  $\alpha$ -satellite sous-jacent au centromère (Allshire and Karpen, 2008 ; Bergmann et al., 2011)

L'étape suivante est la déposition effective de CENP-A sur la chromatine centromérique. Cette étape est médiée par HJURP et nécessite la marque H3K4me2 sus-mentionnée (Bergmann et al., 2011). Cette déposition est supposée impliquer la maturation d'un complexe pré-nucléosomal, formé de HJURP et du tétramère CENP-A:H4, en un nucléosome octamérique complet (Black and Cleveland, 2011), un processus qui s'étend dans les pre-



mières heures de la phase G1 et nécessite l'intervention de complexes de remodelage de la chromatine (Perpelescu et al., 2009). Finalement, une dernière étape, intervenant en fin de phase G1 et impliquant les GTPases Cdc42 et Rac, et leurs facteurs associés, est nécessaire pour stabiliser les nucléosomes fraîchement incorporés (Lagana et al., 2010).

**Chez *S. cerevisiae*** La protéine Cse4p est déposée dans un nucléosome unique centré sur la séquence CDEII. Cette déposition nécessite préalablement l'association du complexe CBF3, qui reconnaît spécifiquement la séquence de 25 pb de l'élément CDEIII (Furuyama and Biggins, 2007). La chaperonne de Cse4p, Scm3p (homologue de HJURP), interagit d'une part avec la protéine Cse4p néo-synthétisée et d'autre part avec Ndc10p, un membre du complexe CBF3, et est donc en mesure d'amener directement Cse4p à sa place (Camahort et al., 2007). Le rôle de Scm3p pourrait en outre dépasser celui d'un simple facteur de déposition, puisqu'il pourrait être une composante à part entière du nucléosome Cse4p, où il remplacerait les histones H2A et H2B (Mizuguchi et al., 2007). Une incorporation ectopique de Cse4p dans des régions non centromériques peut être corrigée par l'intervention de facteurs de remodelage (Gkikopoulos et al., 2011) ou par dégradation protéolytique (Collins et al., 2004).

**Chez *S. pombe*** La déposition de Cnp1 intervient au cours des phases S et G2 (Takayama et al., 2008). La chaperonne Sim3 prend en charge la protéine Cnp1 néosynthétisée et la délivre à une seconde chaperonne Sim1 (homologue de HJURP et de Scm3) pour la déposition effective dans la chromatine centromérique (Mellone et al., 2009). Les protéines Mis16 et Mis18 (homologues de RbAp46/48 et de Mis18 $\alpha/\beta$ ), associées à la chromatine centromérique pendant l'interphase, sont nécessaires à cette déposition. Il y a interaction directe de la chaperonne Sim1 avec le complexe Mis16-Mis18 (Williams et al., 2009), à la différence de ce qui se passe chez les mammifères où le complexe RbAp46/48-Mis18 $\alpha/\beta$  ne permet le recrutement de HJURP que de façon indirecte.

### 3.4.3 CENP-A et l'assemblage du kinétochore

La position de CENP-A au cœur de la chromatine centromérique la place au sommet de la hiérarchie des protéines nécessaires à l'assemblage du kinétochore. L'absence de CENP-A empêche toute formation du kinétochore (Blower and Karpen, 2001), et sa surexpression et sa localisation ectopique entraînent une mauvaise localisation d'une partie au moins des protéines du kinétochore (Van Hooser et al., 2001). Notamment, CENP-A est au moins partiellement responsable du recrutement centromérique du complexe CCAN, qui représente l'interface entre la chromatine centromérique et le kinétochore interne (Cheeseman and Desai, 2008). Chez l'homme, le CCAN peut être subdivisé en deux sous-complexes, définis biochimiquement en fonction de leur relation avec les nucléosomes CENP-A : le *CENP-A nucleosome associated complex* (CENP-A<sup>NAC</sup>), composé des protéines CENP-C, CENP-H, CENP-M, CENP-N, CENP-T et CENP-U, qui interagit directement avec les nucléosomes CENP-A ; et le *CENP-A distal complex* (CAD), composé des protéines CENP-K, CENP-L, CENP-O, CENP-P, CENP-Q, CENP-R et CENP-S, qui interagit avec les membres du CENP-A<sup>NAC</sup> (Foltz et al., 2006).

Depuis peu, le rôle des différents membres du CENP-A<sup>NAC</sup> et leurs interactions avec CENP-A commencent à être précisés. Le nucléosome CENP-A et sa structure atypique peut être reconnu par deux protéines distinctes, CENP-C et CENP-N (Carroll et al., 2010). Les deux protéines reconnaissent des éléments différents du nucléosome CENP-A. CENP-C reconnaît spécifiquement un court peptide C-terminal (LEEGLG) de CENP-A, qui est suffisant pour localiser CENP-C sur le centromère, alors que CENP-N reconnaît le CATD (Carroll et al., 2009). CENP-C et CENP-N sont donc susceptibles de s'associer simultanément et indépendamment au nucléosome CENP-A, d'où elles peuvent recruter les autres membres du CCAN (Carroll et al., 2010). Au-delà du CCAN, CENP-C peut par ailleurs recruter directement le complexe Mis12 (Screpanti et al., 2011), et avec lui le réseau KMN, le cœur du kinétochore.

Le CCAN pourrait néanmoins avoir une seconde ancre dans le centromère, constitué des protéines CENP-T et CENP-W. Il a été montré que ces deux protéines s'associent directement avec la chromatine centromérique, non sur les nucléosomes CENP-A, mais

sur les nucléosomes H3 (Hori et al., 2008), et contribuent également et indépendamment au recrutement du CCAN. Le rôle de CENP-C/CENP-N d'une part, CENP-T/CENP-W d'autre part, comme les deux ancrs du kinétochore, immédiatement au-dessus de CENP-A dans la hiérarchie de l'assemblage du kinétochore, semble confirmé par l'observation que l'incorporation forcée de CENP-C et CENP-T suffit à assembler un kinétochore ectopique fonctionnel, indépendamment de CENP-A (Gascoigne et al., 2011a).

### 3.4.4 Fonctions extra-mitotiques

Une réduction drastique du niveau de CENP-A dans la chromatine centromérique a été constatée dans des cellules sénescents (Maehara et al., 2010). Cette réduction s'accompagne d'une hétérochromatinisation de la chromatine centromérique, résultant en une perte progressive de la fonction du centromère. Inversement, la suppression de l'expression de CENP-A est capable d'induire la sénescence de façon p53-dépendante. Le niveau de CENP-A a également été trouvé diminuant en fonction de l'âge dans des cellules pancréatiques humaines, où la protéine devient quasiment indétectable après 30 ans (Lee et al., 2010). Les implications de ces observations restent à apprécier, mais elles laissent supposer un rôle de CENP-A dans le vieillissement. Par ailleurs, la protéine est rapidement recrutée sur les sites de lésion double-brin de l'ADN (Zeitlin et al., 2009), d'où une possible implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

### 3.4.5 CENP-A et pathologie

De par son rôle primordial dans l'assemblage du kinétochore et, indirectement, le point de contrôle du fuseau mitotique, une altération de l'expression ou de la localisation de CENP-A est susceptible de conduire à une aneuploïdie, conséquence de défauts de ségrégation des chromosomes. L'aneuploïdie étant elle-même une porte d'entrée possible pour le cancer, une implication directe de CENP-A dans le développement de certaines tumeurs est envisageable. CENP-A a été trouvée surexprimée dans des tumeurs du colon, où elle tend à occuper des régions chromatiniennes non centromériques au détriment des centromères (Tomonaga et al., 2003). La surexpression de CENP-A et les défauts de ségrégation

qui en résultent pourrait être un des mécanismes par lesquels la perte de la protéine du rétinoblastome engendre une instabilité génomique favorable au développement tumoral (Amato et al., 2009). Une étude sur les tumeurs des cellules germinales testiculaires a identifié CENP-A comme un des principaux marqueurs du développement de ce type de cancers, avec une augmentation de l'expression d'un facteur 20 par rapport à un tissu testiculaire sain (Biermann et al., 2007).

CENP-A est également impliquée dans des pathologies auto-immunes, comme cible d'auto-anticorps dirigés contre le centromère. Les premières protéines centromériques humaines, dont CENP-A, ont d'ailleurs été initialement identifiées grâce à de tels auto-anticorps provenant de patients souffrant du syndrome CREST, une sclérodémie auto-immune (Palmer et al., 1987). Ces auto-anticorps pourraient perturber le bon fonctionnement du centromère, expliquant l'aneuploïdie constatée dans ces pathologies (Jabs et al., 1993).

### 3.4.6 Le domaine amino-terminal

L'importance de l'extension amino-terminale non structurée de CENP-A demeure peu claire. Si une telle extension est présente chez toutes les espèces, elle apparaît très divergente, à la fois en longueur et en séquence (figure 3.3). Cela tend à suggérer que les fonctions essentielles de la protéine sont portées par le domaine structuré carboxy-terminal, beaucoup plus conservé. L'identification au sein du domaine structuré du CATD, seul responsable du ciblage centromérique de CENP-A (Vermaak et al., 2002; Black et al., 2004), est venu conforter cette hypothèse. Conséquemment, le domaine amino-terminal de CENP-A n'a reçu que peu d'intérêt au cours des dernières années. Plusieurs éléments, néanmoins, laissent supposer que ce domaine peut jouer un rôle important.

Chez *S. cerevisiae*, une fonction essentielle a été attribuée à une partie du domaine N-terminal de Cse4p, le domaine *essential N-terminal domain* (END). Ce domaine apparaît nécessaire à l'assemblage et la ségrégation des chromosomes (Chen et al., 2000), et son absence est létale (Morey et al., 2004). Chez la drosophile, un motif riche en arginines au sein du domaine N-terminal de CID a été impliqué dans le recrutement de BubR1,

une protéine clef du point de contrôle du fuseau mitotique (Torras-Llort et al., 2010); ce motif apparaît relativement conservé, bien que cryptique, dans les homologues de CID. Chez le poulet, CENP-A est nécessaire au recrutement de BubR1 (Régner et al., 2005), bien que ce rôle n'ait pas été assignée à une partie précise de la protéine. Chez l'homme, la délocalisation des protéines centromériques CENP-C, hSMC1 et HZwint-1 vers les bras des chromosomes, consécutive à la surexpression de CENP-A, est dépendant du domaine N-terminal de CENP-A (Van Hooser et al., 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, la déposition centromérique de HTR12 au cours de la méiose résulte d'un mécanisme distinct de celui employé au cours de la mitose et semble nécessiter le domaine N-terminal de HTR12 (Ravi et al., 2011).

Considérés ensemble, tous ces éléments suggèrent fortement que le domaine N-terminal de CENP-A, depuis les levures jusqu'aux eucaryotes supérieurs, remplit une fonction cruciale dans la division cellulaire. Cette hypothèse est troublante au regard de l'absence de conservation de ce domaine à travers les eucaryotes.

La protéine Cse4p de *S. cerevisiae* peut remplacer fonctionnellement CENP-A dans des cellules humaines lorsque l'expression de CENP-A est altérée par interférence ARN (Wieland et al., 2004), malgré la divergence du domaine N-terminal entre les protéines des deux espèces (figure 3.3). L'histone conventionnelle H3 humaine peut faire de même dès lors que la boucle L1 et l'hélice  $\alpha 2$  de son domaine histone-fold sont remplacées par le CATD (Black et al., 2007b), malgré là encore les différences importantes entre les domaines N-terminaux de H3 et de CENP-A. De même chez *A. thaliana*, le domaine N-terminal de HTR12 peut être remplacé par celui de H3 sans conséquences sur le déroulement de la mitose (Ravi and Chan, 2010). Les contraintes pesant sur la séquence du domaine N-terminal semblent donc faibles, ce qui est cohérent avec l'absence de conservation mais soulève immédiatement une question : quelle fonction commune peut être portée par des séquences peptidiques aussi différentes que celles des domaines N-terminaux de CENP-A ?

Chez l'homme, CENP-A est phosphorylée sur sa sérine-7 en prophase et prométaphase (Zeitlin et al., 2001b). La phosphorylation est transitoire et n'est plus détectable à partir de la télophase. Elle semble être médiée successivement par Aurora A en prophase et

Aurora B en prométaphase (Kunitoku et al., 2003). Elle apparaît nécessaire à la bonne congression et ségrégation des chromosomes, ainsi qu'à la complétion de la cytokinèse (Zeitlin et al., 2001a), possiblement en régulant la bonne localisation des protéines du CPC comme INCENP et Aurora B, ainsi que la phosphatase PP1 $\gamma$ 1. À l'heure actuelle, aucun autre rapport que les deux sus-cités (Zeitlin et al., 2001a ; Kunitoku et al., 2003) n'a étudié le rôle de la phosphorylation de CENP-A au cours de la mitose. Une modification post-traductionnelle similaire n'a pas été détectée sur les homologues de CENP-A chez les autres eucaryotes.

### Objectifs

Au vu des éléments rapportés ci-dessus, il apparaît nettement que de multiples interrogations subsistent concernant le domaine amino-terminal de CENP-A. Le travail de thèse présenté ici vise conséquemment à mieux comprendre l'importance et le rôle de ce domaine au cours de la mitose. L'étude concernera la protéine CENP-A humaine et répondra particulièrement aux questions suivantes :

**Le domaine N-terminal de CENP-A est-il requis pour le bon déroulement de la mitose ?** Chez la levure bourgeonnante, le domaine N-terminal de Cse4p est impliqué dans la ségrégation des chromosomes ; la bonne ségrégation des chromosomes chez l'homme dépend-elle de la présence du domaine N-terminal de CENP-A ?

**Les domaines N-terminaux de CENP-A et de H3 sont-ils fonctionnellement équivalents ?** S'il apparaît que le domaine N-terminal de CENP-A remplit effectivement une fonction mitotique, cette fonction peut-elle être remplie aussi efficacement par le domaine correspondant de l'histone conventionnelle H3 ?

**La phosphorylation de CENP-A est-elle impliquée dans sa fonction mitotique ?** Les travaux de Zeitlin et al., 2001a et de Kunitoku et al., 2003 suggèrent que tel est le cas, mais les résultats des deux études ne sont pas entièrement concordants, ce qui plaide pour une nouvelle évaluation du rôle de la phosphorylation de CENP-A.

## Deuxième partie

### Matériels et méthodes

*The most essential characteristic of scientific technique is that it proceeds from experiment, not from tradition. The experimental habit of mind is a difficult one for most people to maintain; indeed, the science of one generation has already become the tradition of the next.*

— Bertrand RUSSEL

# Chapitre 4

## Matériels et méthodes

### 4.1 Construction des plasmides

#### 4.1.1 PCR

Les réactions d'amplification par PCR sont réalisées dans un volume de 50 µl contenant 100 ng d'ADN matrice, 1 × de Expand High Fidelity PCR Buffer, 0,4 mM de dNTP, 500 nM de chacune des amorces sens et antisens (toutes les amorces utilisées sont listées en table 4.1) et 1 U de Expand High Fidelity Taq DNA Polymerase (Roche). Le programme de PCR type, adapté en fonction de la taille des fragments à amplifier et des caractéristiques des amorces, comprend une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C ; trente cycles comportant chacune une étape de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 55 °C et une étape d'élongation de 1 minute à 72 °C ; et une étape finale de terminaison de 5 minutes à 72 °C.

Les produits de PCR sont purifiés sur gel d'agarose et clonés dans le vecteur intermédiaire pGEM-T Easy (Promega) avant d'être sous-clonés dans le vecteur cible approprié.



Nom	Séquence (5' → 3')
BI-GFP	<u>ggatccatggtgagcaagggcgagg</u>
GFP-EI	<u>tggacgagctgtacaaggaattc</u>
GFP-HIII	<u>tggacgagctgtacaagctt</u>
EI-CPA	<u>gaattcggcccgcgccgtcgcagccgtaaaccggaagcg</u>
EI-CPA-S7A	<u>gaattcggcccgcgccgtcgcGCcggtaaaccggaagcg</u>
EI-CPA-G	<u>gaattcggcccgcgccgagcctggggcgccagc</u>
CPA-SI	<u>ctggaagaaggtctgggctaagtgcgac</u>
HIII-H3	<u>aagcttgcccgaaccaagcagactgc</u>
H3-EI	<u>cgccgctaccagaagtccactgaattc</u>
H3-S10A+	cagactgctcgcaagGccacgggtgggaaagcg
H3-S10A-	cgctttcccaccctggCcttgcgagcagtctg
H3-S10E+	cagactgctcgcaagGAAacgggtgggaaagcg
H3-S10E-	cgctttcccaccctTTCcttgcgagcagtctg
H3-S28A+	aaggctgctcgaagGCcgctccagccaccggc
H3-S28A-	gccggtggctggagcgGCctttcgagcagcctt
H3-S28E+	aaggctgctcgaagGAAgctccagccaccggc
H3-S28E-	gccggtggctggagcTTCctttcgagcagcctt

TABLE 4.1 – Amorces utilisées pour la construction des clones CENP-A et dérivés. En souligné, les sites de restriction ; en capitales, les nucléotides modifiés pour insérer les mutations ponctuelles dans les séquences codantes.

### 4.1.2 Construction de GFP-CENP-A et dérivés

La séquence codante de la *green fluorescent protein* (GFP) est amplifiée à partir d'un plasmide pEGFP-C1 (Clontech) avec le couple d'amorces BI-GFP et GFP-EI. Le produit de PCR est cloné dans les sites BamHI/EcoRI du vecteur pBABE-puro<sup>1</sup>, produisant le vecteur ci-après désigné « pBABE-GFP ». La séquence codante de CENP-A est amplifiée à partir d'un plasmide de Tanaka et al., 2004, exprimant un ARN messager insensible aux ARN interférents dirigés contre l'ARN messager CENP-A endogène. Le fragment amplifié avec les amorces EI-CPA et CPA-SI est cloné dans les sites EcoRI/SalI du vecteur pBABE-GFP, produisant le vecteur final pBABE-GFP-CENP-A.

Les clones GFP-CENP-A et GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> sont construits de la même manière, en utilisant comme amorce sens EI-CPA-G et EI-CPA-S7A respectivement.

1. Plasmide Addgene n° 1764, <http://www.addgene.org/1764>

### 4.1.3 Construction de GFP-H3-CENP-A et dérivés

La séquence de la protéine de fusion GFP-H3-CENP-A est construite dans le vecteur intermédiaire pGEM-T Easy par clonage successif des séquences de la GFP (amplifiée par BI-GFP et GFP-HIII), du domaine amino-terminal de H3 (amplifiée par HIII-H3 et H3-EI) et du domaine globulaire de CENP-A (amplifiée par EI-CPA-G et CPA-SI). La séquence complète est ensuite sous-clonée dans le vecteur pBABE-puro dans les sites BamHI/Sall, produisant le vecteur final pBABE-GFP-H3-CENP-A.

Le clone GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A est construit par deux mutagenèses dirigées successives sur le clone précédent avec les deux couples d'amorces H3S10A+/H3S10A- et H3S28A+/H3S28A-. Les mutagenèses dirigées sont réalisées avec le kit QuickChange (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur. Le clone GFP-H3<sup>SE</sup>-CENP-A est construit de la même manière avec les amorces H3S10E+/H3S10E- et H3S28E+/H3S28E-.

## 4.2 Construction des lignées cellulaires

Des lignées de cellules HeLa exprimant stablement les constructions GFP-CENP-A et dérivés sont construites par infection rétrovirale avec le virus de la leucémie murine de Moloney (*Moloney murine leukemia virus*, MMLV) produit par des cellules d'emballage Phoenix amphotropes (Swift et al., 2001).

Les cellules  $\Phi$ NX-ampho sont transfectées en boîtes de 10 cm par 6  $\mu$ g d'ADN et 18  $\mu$ g de GeneJuice (Merck) selon les recommandations du fournisseur ; brièvement, l'ADN et l'agent transfectant sont dilués dans 800  $\mu$ l de milieu sans sérum (OptiMEM, Invitrogen) et incubés pendant 15 minutes à température ambiante, puis la solution est ajoutée, goutte-à-goutte, dans les boîtes de culture. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C pendant deux jours.

Les cellules HeLa cibles sontensemencées à 30 % de confluence dans des boîtes de 10 cm. Deux jours après la transfection des cellules viroproductrices, leur milieu est collecté et remplacé par 10 ml de milieu frais. Le surnageant viral est centrifugé 5 minutes à 1200 rpm, puis filtré sur un filtre 0,45  $\mu$ m. Pour chaque boîte de cellules cibles, 5 ml de

surnageant viral sont mélangés avec 5 ml de milieu frais et 8 µg/ml de polybrène (Sigma Aldrich). Le milieu de culture des cellules cibles est alors remplacé par cette solution virale, et les cellules sont replacées dans l'incubateur. L'infection est répétée à trois reprises en deux jours. Le lendemain de la quatrième infection, les cellules cibles sontensemencées dans de nouvelles boîtes après dilution, et incubées en présence de 3 µg/ml de puromycine.

### 4.3 ARN interférence contre CENP-A

L'expression de la protéine CENP-A endogène est altérée en transfectant les cellules avec des *short hairspin RNA* (shRNA) dirigés contre son ARN messenger (HuSh shRNA, Origene). Les transfections sont réalisées avec 6 µg d'ADN et 18 µl de GeneJuice (Merck) selon les recommandations du fournisseur : l'ADN et l'agent transfectant sont dilués dans 800 µl d'OptiMEM (Invitrogen) et incubés pendant 15 minutes à température ambiante, puis la solution est ajoutée goutte-à-goutte sur les cellules préalablementensemencées dans des boîtes de 10 cm. Le lendemain de la transfection, les cellules sont divisées et ré-ensemencées dans de nouvelles boîtes de 10 cm (pour les analyses par Western-blot et RT-PCR) ou dans des plaques 24 puits (pour les analyses par immunofluorescence).

Alternativement, sont également utilisés des *short interfering RNA* (siRNA) (Sigma). Les transfections sont alors réalisées dans des plaques 6 puits avec 20 nM de siRNA mélangés avec 12 µl de HiPerfect (Qiagen) dans 100 µl d'OptiMEM ; le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être ajouté aux cellules. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu frais et les cellules sont incubées pour encore quarante-huit heures avant collecte ou fixation.

### 4.4 Immunofluorescence

Pour les analyses par immunofluorescence, les cellules sont cultivées sur des lamelles traitées par 0,2 mg/ml de poly-D-Lysine dans des plaques 24 puits. Elles sont fixées avec une solution de PBS 1 ×, PFA 2 % pendant 20 minutes à 37 °C et rincées trois fois au PBS. Elles sont perméabilisées par 0,2 % de Triton pendant trois minutes, puis saturées par du

Cible	Référence	Dilution en IF	Dilution en WB
Aurora B	Epitomics 1788-1	1/500	—
Bub1	Chemicon mab3610	1/200	—
BubR1	Chemicon mab3612	1/200	—
CENP-A	Epitomics 1745-1	—	1/1000
CENP-B	Abcam 25734	1/500	—
CENP-C		1/16000	—
CENP-T/W	Gifts from Gascoigne et al., 2011a	1/2500	—
Centromère	Immunovision HCT0100	1/1000	—
H2B	Upstate 07-371	—	1/5000
H3S10P	Upstate 06-570	—	1/1000
H3S28P	Upstate 07-145	—	1/1000
INCENP	Abcam 36463	1/500	—
Lamines	Santa Cruz 6217	1/150	—
Tubuline	Sigma T5168	—	1/2000
ZWINT	Abcam 84367	1/500	—

TABLE 4.2 – Anticorps primaires.

PBS 1 ×, BSA 2 % pendant 30 minutes. Après saturation, les lamelles sont placées dans une chambre humide et incubées successivement avec la solution d'anticorps primaires pendant 1 heure à 37 °C, puis avec la solution d'anticorps secondaires pendant 30 minutes à 37 °C; trois lavages au PBS sont réalisés après chaque incubation. Si nécessaire, les lamelles sont également incubés dans une solution de Hoechst à 0,5 mg/ml pour marquer l'ADN avant le montage final sur lame.

Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans une solution de PBS 1 ×, BSA 3 %, Tween 0,05 %. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés en tables 4.2 et 4.3, respectivement.

## 4.5 Préparation d'extraits protéiques nucléaires

Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1 × et centrifugées à 1400 rpm, 4 °C pendant 5 minutes. Elles sont resuspendues dans 100 µl de tampon de lyse (NaCl 15 mM, Tris 15 mM, KCl 60 mM, sucrose 11 %, EDTA 2 mM, EGTA 0,5 mM, DTT 1 mM, spermine 0,2 mM, spermidine 0,65 mM, PMSF 0,5 mM, NP-40 2 %, pH 7,5) et incubées 5 minutes sur glace, puis centrifugées à 13 200 rpm, 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant

Espèce cible	Détection	Référence	Dilution
Souris	Cyanine 2	Jackson 115-225-146	1/300
	Cyanine 3	Jackson 115-165-146	1/300
	péroxydase	GE Healthcare 931V	1/5000
Lapin	Cyanine 2	Jackson 111-225-144	1/300
	Cyanine 3	Jackson 111-165-144	1/300
	péroxydase	GE Healthcare 934V	1/5000
Chèvre	Cyanine 2	Jackson 705-225-147	1/300
	Cyanine 3	Jackson 705-165-147	1/300
Homme	Alexa 594	Invitrogen A11014	1/300

TABLE 4.3 – Anticorps secondaires.

est collecté et le culot repris dans 50  $\mu$ l de « tampon D » (tampon de lyse sans EDTA ni EGTA) et centrifugé à nouveau à 13 200 rpm, 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et ajouté au surnageant précédent, l'ensemble constituant l'*extrait cytoplasmique*. Le culot est repris dans 50  $\mu$ l de « tampon B » (tampon de lyse à 500 mM de NaCl) et centrifugé une dernière fois à 13 200 rpm, 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant constitue l'*extrait nucléaire soluble*. Le culot est resuspendu dans 50  $\mu$ l de PBS 1  $\times$  et constitue l'*extrait chromatinien*. Pour la préparation d'extraits destinés à être utilisés dans la détection de phospho-épitopes, 0,5 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et 80 mM de  $\beta$ -glycérophosphate, comme inhibiteurs de phosphatases, sont ajoutés à tous les tampons.

## 4.6 Immunoblots

Les extraits protéiques sont dénaturés par addition de tampon de Laemmli (Tris pH 6.8 60 mM, SDS 10 %, glycérol 6 %,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 %, bleu de bromophénol) et par incubation à 100 °C pendant 10 minutes. Après centrifugation, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS), puis électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est saturée par une solution de PBS 1  $\times$ , lait 5 %, Tween 0,1 % pendant 30 minutes, puis incubée successivement avec les solutions d'anticorps primaires et secondaires pendant une heure à température ambiante (alternativement, pour la solution d'anticorps primaires, pendant une nuit

à 4 °C). Quatre lavages au PBS 1 ×, NaCl 0,4 M, Triton 0,5 % sont réalisés après chaque incubation.

Les anticorps utilisés sont listés en tables 4.2 et 4.3. Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de PBS 1 ×, SVF 10 %, Tween 0,2 % ; les secondaires dans une solution de PBS 1 ×, lait 1 %, Tween 0,02 %. La membrane est révélée par le système ECL Plus (Amersham).

## 4.7 Préparation d'extraits d'ARN poly-adiénylés

Les ARN totaux sont préparés à partir des cellules par la méthode d'extraction au thiocyanate de guanidine (Chomczynski and Sacchi, 2006). Brièvement, le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de TRIzol (Invitrogen) et incubé 5 minutes à température ambiante avant addition de 0,2 ml de chloroforme. Le mélange est centrifugé à 12 000 ×g, 4 °C pendant 15 minutes et la phase aqueuse est récupérée. Les ARN sont ensuite précipités par 500 µl d'isopropanol et centrifugés à 12 000 ×g, 4 °C pendant 10 minutes.. Le culot est lavé par 1 ml d'éthanol 75 % et centrifugé à 7500 ×g, 4 °C pendant 5 minutes, puis resuspendu dans 10 µl d'eau libre de toute RNase. Les ARN poly-adiénylés sont ensuite purifiés sur une colonne Oligotex (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur.

## 4.8 RT-PCR

L'ADN résiduel éventuel est dégradé par digestion à la DNase I (Ambion) pendant 30 minutes à 37 °C. La DNase est ensuite inactivée par addition de 5 mM de EDTA et incubation à 70 °C pendant 10 minutes. Les ARN sont rétro-transcrits par 10 U/ml de Superscript II RT (Invitrogen) à 42 °C pendant 50 minutes avec une amorce oligo-dT<sub>16</sub>, puis la réaction est arrêtée par 15 minutes d'incubation à 70 °C. Les ADN complémentaires d'intérêt sont amplifiés par PCR dans les conditions données en section 4.1.1, avec les amorces suivantes : contre le gène de la GAPDH, Qiagen Quantitect QT01192646 ; contre l'ADN  $\alpha$ -satellite, le couple d'amorces ASAT-F, 5'-TCA TTC CCA CAA ACT GCG TTG-3', et ASAT-R, 5'-TCC AAC GAA GGC CAC AAG A-3'.

## Troisième partie

### Résultats et discussion

*“When you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.”*

— Sir Arthur Conan DOYLE

# Chapitre 5

## Résultats

### Avant-propos

Les résultats du projet relatif au domaine amino-terminal de CENP-A sont présentés sous la forme du manuscrit soumis aux éditeurs pour publication. La version du manuscrit intégrée à ce mémoire de thèse ne comprend ni bibliographie ni section « Materials and methods » : les appels bibliographiques renvoient à la bibliographie générale en fin de mémoire ; pour les protocoles utilisés, on se rapportera au chapitre 4.



**The phosphorylation of the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A, but not its amino acid composition and sequence, is required for CENP-C localization and assembly of active kinetochores**

Damien Goutte-Gattat<sup>1,#</sup>, Muhammad Shuaib<sup>2,#</sup>, Thierry Gautier<sup>1</sup>,  
Dimitrios Skoufias<sup>3</sup>, Ali Hamiche<sup>2,\*</sup>, and Stefan Dimitrov<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch cedex 1, France

<sup>3</sup>Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, UMR 5075, Grenoble cedex 1, France

**Corresponding authors:**

\*Stefan Dimitrov, E-mail: dimitrov@ujf-grenoble.fr, Fax: (33) 4 76 54 95 95; Tel: (33) 4 76 54 94 73

\*Ali Hamiche, E-mail: hamiche@igbmc.u-strasbg.fr, Fax: (33) 4 33 88 65 32 01; Tel: (33) 3 88 65 32 50

#These authors contributed equally to this work.

## **Abstract**

We have studied the role of the NH<sub>2</sub>-terminus of human CENP-A and its serine 7 phosphorylation in mitosis. We used stable HeLa cell lines expressing GFP fusions with distinct silent resistant CENP-A mutants. The siRNA-mediated depletion of endogenous CENP-A resulted in strong mitotic and cytokinesis phenotypes and delocalization of CENP-C from the centromeres. These effects were completely rescued by the concomitant expression of phosphorylatable either GFP-CENP-A or GFP-H3-CENP-A (a fusion of the histone fold domain of CENP-A with the NH<sub>2</sub>-terminus of H3). Under identical conditions neither

the NH<sub>2</sub>-terminal deletion mutant GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup> nor both non-phosphorylatable GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> (in this mutant the NH<sub>2</sub>-CENP-A tail serine 7 was substituted with alanine) and GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A (containing the NH<sub>2</sub>-tail of H3 with phosphorylatable serine 10 and serine 28 substituted with alanine) were able to rescue the cell phenotypes and to localize CENP-C to centromeric chromatin. These data evidence that the phosphorylation of the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A *per se*, but not its length, composition and aminoacid sequence, is required for localization of CENP-C to centromeres and the formation of active kinetochores.

## 5.1 Introduction

The basic structural unit of chromatin, the nucleosome, consists of an octamer of core histones (two each of H2A, H2B, H3 and H4), around which DNA is wrapped in  $\sim 1.65$  superhelical turns (Luger et al., 1997). Histone H1 interacts with the entry/exit of the linker DNA, induces the formation of the stem linker structure (Hamiche et al., 1996; Syed et al., 2010) and is essential for the formation and the maintenance of the 30 nm chromatin fiber (Makarov et al., 1983). The core histones within the histone octamer (Arents and Moudrianakis, 1993) and the nucleosome (Luger et al., 1997) exhibit a structure (histone fold) domain and flexible NH<sub>2</sub>-tails. The tails interact with both nucleosomal and linker DNA (Stefanovsky et al., 1989) and their posttranslational modifications are important for several cell processes (Strahl and Allis, 2000).

Each cell, in addition to the conventional histones, expresses histone variants (Van Holde et al., 1980). Histone variants are non-allelic histone isoforms and each conventional histone, with the exception of H4, possesses histone variants. The incorporation of histone variants generally confers novel structural and functional properties to the nucleosome (reviewed in Boulard et al., 2007). For example, the histone variant mH2A interferes with nucleosome remodeling and transcription factor binding (Angelov et al., 2003) and affects negatively transcription (Doyen et al., 2006b; Ouararhni et al., 2006). The incorporation of H2A.Bbd, another histone variant from the H2A family, results, on the contrary of mH2A, in the generation of a nucleosome with more open conformation, which affects positively

transcription (Angelov et al., 2004; Doyen et al., 2006a; Zhou et al., 2007; Eirín-López et al., 2008). The histone variant H2A.Z, essential for mammalian development (Faast et al., 2001), is implicated in the equilibrium between different chromatin conformational states and appears to play a role in chromosome segregation (Rangasamy et al., 2004).

CENP-A is a histone variant which replaces the canonical histone H3 at the centromere (Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1991) and its CATD domain is essential for targeting (Shelby et al., 1997; Black et al., 2004; Vermaak et al., 2002). The CENP-A deposition requires the histone chaperone HJURP (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Shuaib et al., 2010). A conserved HJURP short N-terminal domain of 26 aminoacids, the TTLY box, recognizes and specifically binds to the CATD domain of CENP-A (Shuaib et al., 2010).

CENP-A marks epigenetically the centromeres and the kinetochores, ones of the most elaborated cell structures (for reviews see Henikoff and Dalal, 2005; Buscaino et al., 2010). Indeed, the presence of CENP-A is required for the assembly of active kinetochores and its depletion results in numerous mitotic problems, such as chromosome misalignments and segregation defects, generation of chromosome bridges, aneuploidy, etc. (Régnier et al., 2005). This reflects the serious alterations due to the absence of CENP-A in the composition and organization of the kinetochore including the delocalization of the inner kinetochore proteins CENP-C, CENP-I and CENP-H as well as the outer kinetochore components HEC1, Mad2 and CENP-E (Régnier et al., 2005).

Recently, the crystal structure of the CENP-A nucleosome was solved (Tachiwana et al., 2011). Two main structural differences, compared to the conventional nucleosome, were found, namely: (i) in the CENP-A nucleosome only 121 bp were seen, suggesting that 13 bp from each nucleosomal end show high degree of flexibility, and (ii) the two extra amino acids in the loop 1 region made it exposed to the solvent. These structural differences would be important for the distinct organization of centromeric chromatin (Tachiwana et al., 2011).

During last years the studies of CENP-A were focused mainly on its histone-fold domain. The NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A, which is not required for centromeric targeting

(Shelby et al., 1997; Chen et al., 2000; Vermaak et al., 2002) appeared, however, to play an important role in both mitosis and meiosis. In yeast, the NH<sub>2</sub>-tail of Cse4p (the homologue of mammalian CENP-A) has an essential function distinct from that of the histone fold domain in chromosome assembly and segregation (Chen et al., 2000) and its deletion is lethal (Morey et al., 2004). The over-expression of CENP-A in human cells and its mistargeting on chromosome arms led to delocalization of CENP-C, hSMC1 and HZWint-1 from the centromeres to the chromosome arms and this effect was dependent on the NH<sub>2</sub>-tail (Van Hooser et al., 2001). The reported data in *A. thaliana* suggested the existence of meiosis-specific loading pathway for CENP-A requiring its NH<sub>2</sub>-terminus (Ravi et al., 2011).

Human CENP-A is phosphorylated at its NH<sub>2</sub>-terminus at serine 7 in mitosis and simultaneous co-detection showed that phosphorylation of CENP-A and histone H3 are separate events in G2/M (Zeitlin et al., 2001b). Only two reports (Zeitlin et al., 2001a; Kunitoku et al., 2003) have addressed directly the role of CENP-A phosphorylation in mitosis. Both manuscripts have used very similar approaches (transient or stable transfection and subsequent overexpression of CENP-A non-phosphorylatable mutant GFP-CENP-A<sup>S7A</sup>), but the reported results were contradictory. Zeitlin et al., 2001a observed a delay of the terminal stage of cytokinesis and mislocalization of only three kinetochore proteins: Aurora B, INCENP and PP1 $\gamma$ 1. Although, according to Kunitoku et al., 2003, the overexpression of GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> induces severe mitotic phenotypes including prolongation of mitosis, chromosome misalignment with chromosomes failing to achieve bipolar microtubule attachment, etc. suggesting that CENP-A phosphorylation is crucial for kinetochore function. Noteworthy, the observed mitotic and cytokinesis defects in both studies are determined by the negative dominant role of CENP-A<sup>S7A</sup> and might reflect some artificial situation due to the overexpression of this CENP-A mutant.

In this work we have addressed the role of NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A and its phosphorylation by using HeLa stable cell lines expressing different GFP-CENP-A silent resistance mutants. All the mutants studied (the non-phosphorylatable GFP-CENP-A<sup>S7A</sup>, the NH<sub>2</sub>-terminal deletion mutant GFP-CENP-A <sup>$\Delta$ N</sup>, both swapped tail phosphorylatable

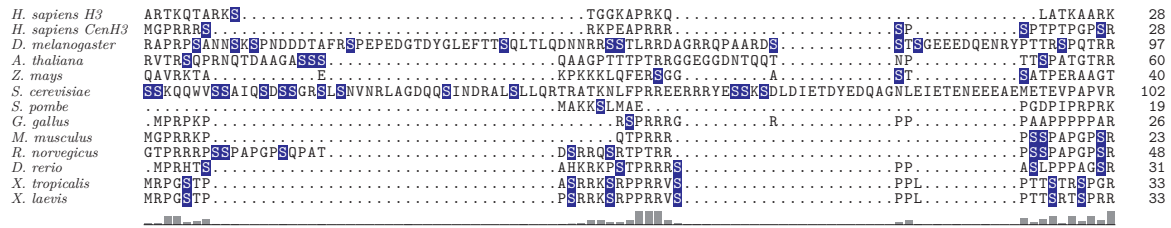


Figure 5.1 – The NH<sub>2</sub>-tails of CENP-A are poorly conserved throughout eukaryotes. Sequence alignment of CENP-A NH<sub>2</sub>-tails from different species. The name of species are indicated in the left part of the panel. The serine residues are indicated in blue.

GFP-H3-CENP-A (composed of the histone-fold domain of CENP-A fused to the NH<sub>2</sub>-terminus of H3) and non phosphorylable GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A (containing the NH<sub>2</sub>-tail of H3 with serine 10 and serine 28 substituted with alanine)) do not exhibit dominant negative effects. Experiments using depletion of the endogenous CENP-A by siRNA treatment shows that the mere phosphorylation of CENP-A, but not its length, composition and aminoacid sequence, is required for the localization of several kinetochore proteins and the assembly of active kinetochores.

## 5.2 Results

The sequence alignment of the CENP-A NH<sub>2</sub>-termini of different species shows that they are not at all conserved neither in length, aminoacid composition and sequence (figure 5.1). Although, the deletion of the NH<sub>2</sub>-terminus in yeast (Morey et al., 2004) and plants (Ravi and Chan, 2010) is lethal. These data create a paradox since from one hand the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A is required for organism survival and from the other hand, it appears that there is no evolution pressure to conserve at least some specific elements of the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus, suggesting that it is not essential. How this could be explained? One of the objectives of this work is to give an explanation of this paradox by using human cells as a model system.

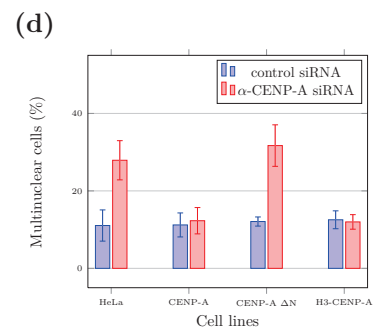
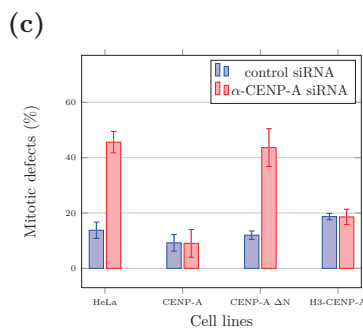
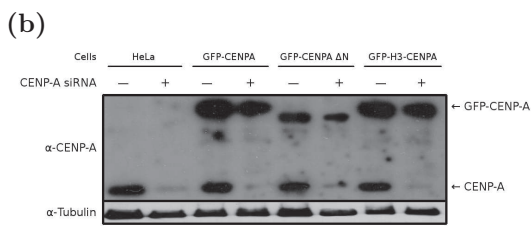
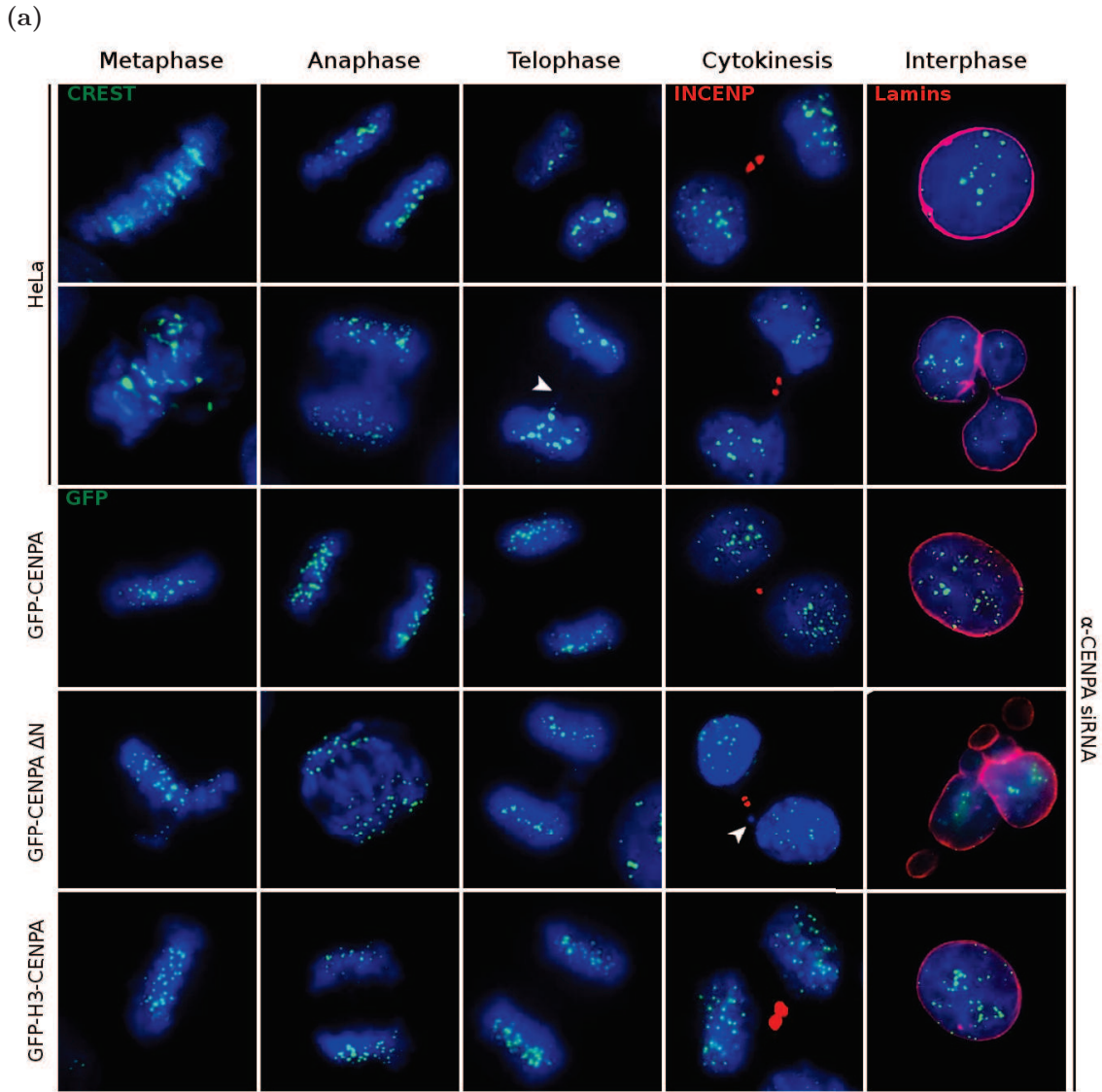


Figure 5.2 – The NH<sub>2</sub>-tail of CENP-A is required for mitosis and the H3 swapped NH<sub>2</sub>-tail CENP-A chimera rescues the CENP-A null phenotype. (a) Cell cycle visualization, after CENP-A suppression by siRNA treatment, of naive HeLa cell (2nd row) or stably expressing silent resistant either full length GFP-CENP-A (3rd row) or tailless GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup> (4th row) or GFP-H3-CENP-A swapped tail mutant (5th row). The first row shows the naive cells not treated with siRNA. GFP fluorescence or an anti-centromere auto-antibody (CREST) were used for the visualization of centromeres. Antibodies against INCENP and lamina were used to detect the midbody during cytokinesis and the nuclear envelope in interphase cells; blue, DNA. (b) Western-blot detection of the GFP-CENP-A fusions or endogenous CENP-A. (c) Histograms showing the percentage of mitotic defects at 72 hours post-transfection with siRNA against CENP-A in the indicated cell lines; HeLa, naive cell line. For each experiment no less than 400 cells were counted. (d) Same as (c), but for the percentage of multinuclear cells. For each experiment no less than 400 cells were counted.

### 5.2.1 The CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus, but not its composition and sequence, is required for mitosis

In order to see if the concept for the essential role of the NH<sub>2</sub>-CENP-A tail is also valid in human cells, we asked first whether its deletion results in the generation of specific cell phenotypes. To address this question we have established stable HeLa cell lines which express silent resistant either GFP-CENP-A or NH<sub>2</sub>-tail CENP-A deletion mutant (GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup>) or GFP-H3-CENP-A (a swapped tail mutant consisting of the tail of conventional H3 fused to the histone fold domain of CENP-A). The expression of endogenous CENP-A was then suppressed by using siRNA treatment and the resulting cell phenotypes were observed by fluorescent microscopy. Importantly, all of the GFP fusions localize to the centromeres and the expression of either one of them in the control, not siRNA treated cells, had no effects on the cells (figure 5.2a, supplementary figures 5.7 to 5.12). Indeed, no mitotic or cytokinesis defects or delay in mitosis were observed (figure 5.2a, supplementary figure 5.8). In addition, the spindle assembly checkpoint (SAC) functions normally (figure 5.4b, supplementary figure 5.9) and the localization of several centromeric and kinetochore proteins were found identical to the localization of these proteins in the parental naive cells (figures 5.4 and 5.5, supplementary figures 5.10 to 5.12). We conclude that the established HeLa cell lines expressing either one of the GFP fusions behave identically to the naive parental HeLa cells.

The siRNA treatment leads to very efficient suppression of CENP-A expression: more than 85-90% of the endogenous CENP-A was depleted in each of the cell lines used and, as expected, the expression of silent resistant GFP fusions was remained unaffected (figure 5.2b). In agreement with the reported data (Régnier et al., 2005), the depletion of CENP-A in naive HeLa cells has deleterious effects on mitosis and cytokinesis (figure 5.2a, compare 1st and 2nd rows). Multiple mitotic defects such as chromosome misalignment, presence of lagging chromosomes, chromatin bridges, polyploidic nuclei, etc. were observed in cells depleted of CENP-A (figure 5.2a, 2nd row). The presence of stably expressed GFP-CENP-A in the siRNA treated HeLa cells was sufficient to completely rescue the severe mitotic (figure 5.2a, 3rd row and quantification presented in figure 5.2c) and

cytokinesis (figure 5.2a, 3rd row and quantification presented in figure 5.2d) phenotypes. Importantly, no rescue was detected in CENP-A siRNA treated HeLa cells, stably expressing GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup>, the NH<sub>2</sub>-tail CENP-A deletion mutant (figure 5.2a, 4th row and see figures 5.2c and 5.2d for quantification). These data agrees with the reports in the literature for yeast (Morey et al., 2004) and plants (Ravi and Chan, 2010) and illustrates the crucial role of the CENP-A NH<sub>2</sub>-tail in mitosis in human cells.

A complete rescue was also found in endogenous CENP-A depleted HeLa cell lines which express stably the swapped tail mutant GFP-H3-CENP-A (figure 5.2a, 5th row, see for quantification figures 5.2c and 5.2d). This result demonstrates that the NH<sub>2</sub>-tail of histone H3 can function identically to the NH<sub>2</sub>-tail of CENP-A in mitosis in human cells if it is targeted to the centromeric chromatin.

### 5.2.2 The phosphorylation of the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A is required in mitosis

Taken together the above described data show that neither the composition nor the aminoacid sequence of human CENP-A NH<sub>2</sub>-tail are required for its mitotic and cytokinesis function. Then, what is the feature(s) which determines the mitotic function(s) of CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus? Examination of the alignment of the CENP-A NH<sub>2</sub>-termini from different species shows that the CENP-A NH<sub>2</sub>-tail of each one of the species contains serines (see figure 5.1). We hypothesized that serine phosphorylation of CENP-A is a general feature essential for mitosis.

To test this, we have established HeLa cell lines stably expressing silent resistant either non-phosphorylatable GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> mutant (in this mutant the phosphorylatable in mitosis serine 7 was substituted with alanine) or non-phosphorylatable GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A swapped tail mutant (the two phosphorylatable serines 10 and 28 of the H3 tail of the fusion mutant were substituted with alanine), treated them with CENP-A siRNA and then analyzed the capacity of the mutants to rescue the CENP-A depletion phenotypes (figure 5.3). In cells expressing the GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A fusion, as expected and in contrast to cells expressing the GFP-H3-CENP-A fusion containing phosphorylatable serines in



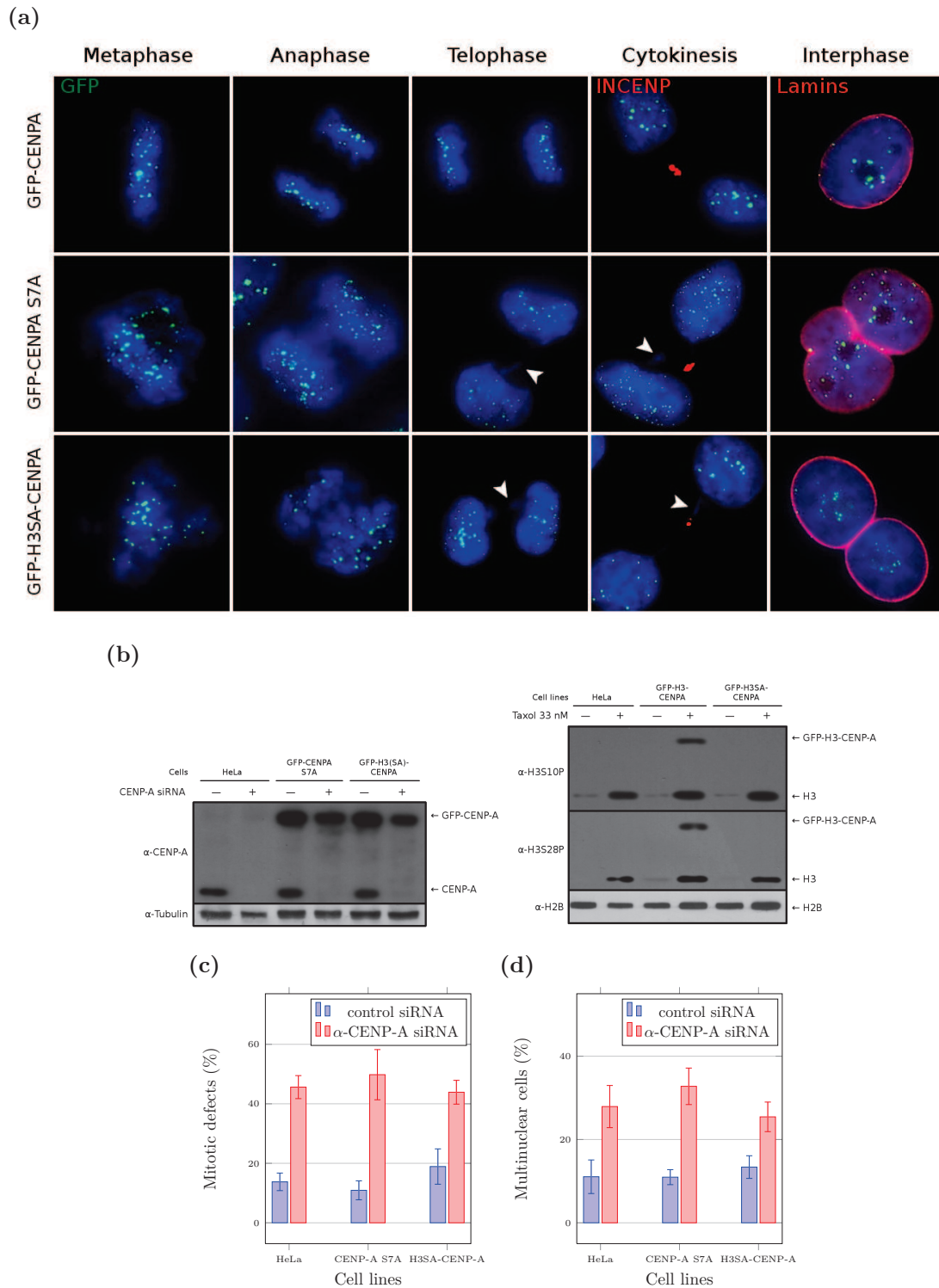


Figure 5.3 – Both non-phosphorylatable NH<sub>2</sub>-tail mutants GFP-CENP-A and GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A are unable to rescue the CENP-A knocked down cell phenotype. (a) Cell cycle microscopy visualization (after CENP-A suppression by siRNA treatment) of HeLa cells stably expressing silent resistant either GFP-CENP-A (1st row) or non-phosphorylatable NH<sub>2</sub>-tail GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> (2nd row) or GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A (3rd row) mutants. The natural GFP fluorescence was used for the visualization of CENP-A. Antibodies against INCENP and lamina were used to detect midbody during cytokinesis and the nuclear envelope in interphase cells, respectively; blue, DNA. (b) Western-blot analysis of the GFP-CENP-A mutants and endogenous CENP-A in control (–) and siRNA treated (+) cells at 72 hours post-transfection (left panel), and phosphorylation status of the tail swapped chimeras in random cycling (–) or taxol-arrested (+) cells (right panel). The types of cells used are indicated on the top part of panels. Arrows indicate the positions of the GFP fusions or endogenous proteins. (c) Histograms showing the percentage of mitotic defects at 72 hours post-transfection with siRNA against CENP-A in the indicated cell lines; HeLa, naive cell line. For each experiment no less than 400 cells were counted. (d) Same as (c), but for the percentage of multinuclear cells. For each experiment no less than 400 cells were counted.

its NH<sub>2</sub>-terminus (note that both serine 10 and serine 28 are phosphorylated in GFP-H3-CENP-A), the GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A fusion was not phosphorylated in mitosis (figure 5.3b, right panel). The siRNA treatment led to very efficient decrease (more than 85% of the endogenous CENP-A was depleted), without affecting the amount of the silent resistant non-phosphorylatable fusions (figure 5.3b, left panel). Although, the presence of neither GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> nor GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A was able to rescue the severe cell phenotypes due to the depletion of endogenous CENP-A (figure 5.3a). Indeed, the quantification of both the mitotic and cytokinesis defects were the same (within the margin of experimental errors) for siRNA treated naive HeLa cells and HeLa cells stably expressing either GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> or GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A (figures 5.3c and 5.3d). Thus, the absence of phosphorylation of the GFP fusions is responsible for their inability to fulfill their mitotic and cytokinesis functions. We conclude that the phosphorylation of the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus *per se*, and not its aminoacid composition and sequence, is required for mitosis.

### 5.2.3 Localization of mitotic checkpoint proteins in CENP-A-depleted stable cell lines expressing the GFP-CENP-A fusions

A possible reason for the inability of the tail deletion and both non-phosphorylatable GFP-CENP-A fusions to rescue the cell phenotypes after CENP-A depletion could reflect an induced mislocalization of the proteins from the *chromosomal passengers complex* in the respective CENP-A depleted cell lines since: (i) the suppression of the expression of the different members of CPC resulted in a similar phenotype (Scrittore et al., 2005; Hans et al., 2009), (ii) the CPC is localized in the inner kinetochore in close proximity to CENP-A chromatin (Scrittore et al., 2005; Hans et al., 2009), and (iii) Aurora B, the only CPC member with enzymatic activity, is believed to phosphorylate CENP-A in mitosis (Zeitlin et al., 2001a; Kunitoku et al., 2003). With this in mind, we have studied how the depletion of CENP-A affects the localization of Aurora B in mitosis and how the expression of the studied GFP-CENP-A fusions rescues it. In agreement with the available data (Liu et al.,

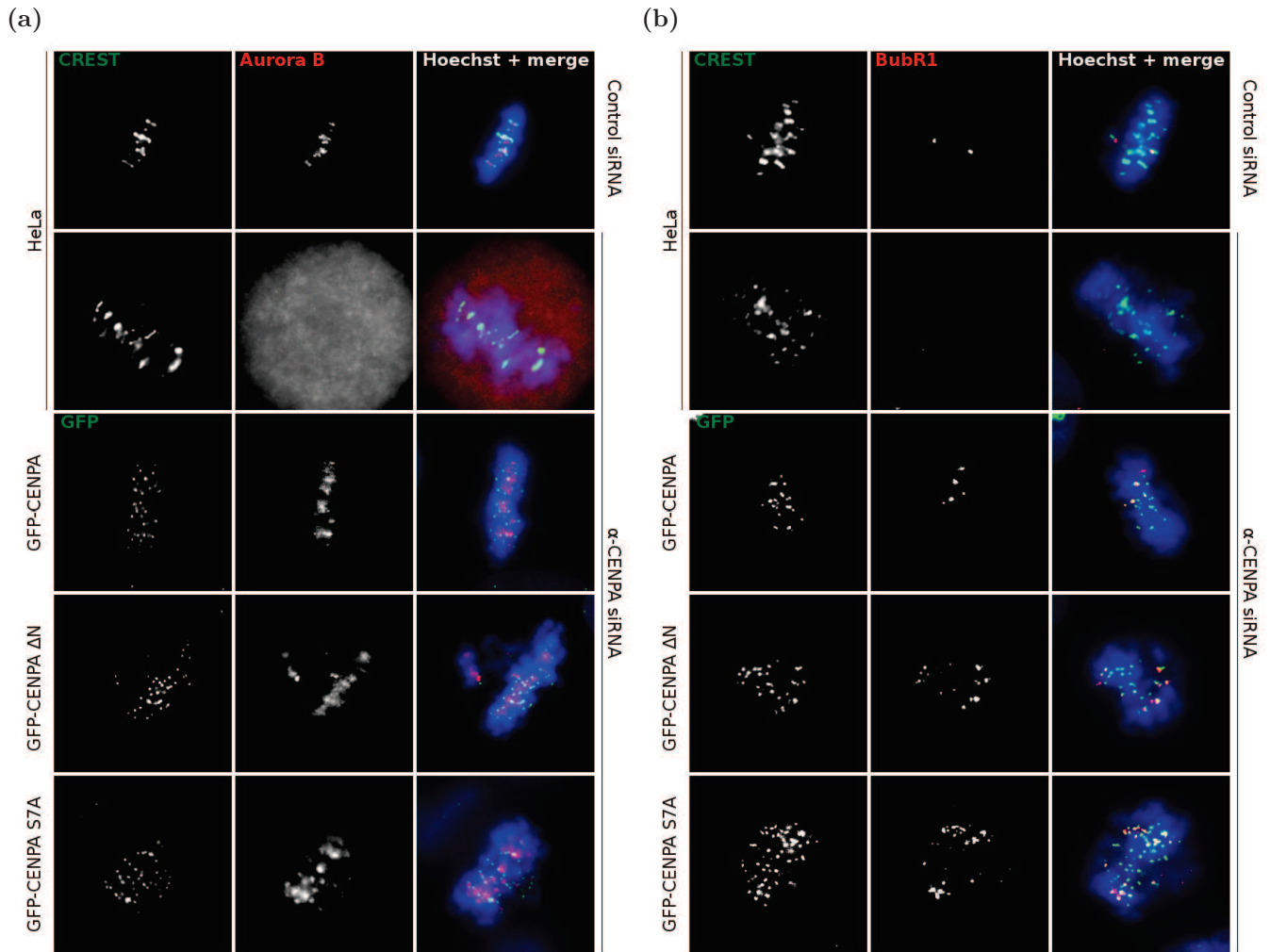


Figure 5.4 – The absence of neither the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A nor its phosphorylation affects the localization of both Aurora B and BubR1 in mitosis. (a) Visualization of Aurora B, after CENP-A siRNA treatment, in naive (2nd row) and stable HeLa cell lines, expressing either silent resistant GFP-CENP-A (3rd row) or GFP-CENP-A <sup>$\Delta$ N</sup> (4th row) or GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> (5th row). The first row shows Aurora B localization in cells treated with control siRNA. Centromeres were visualized by using CREST antiserum (rows 1–2) or GFP fluorescence. (b) Same as (a) but for BubR1.

2006), the suppression of the expression of CENP-A results in complete mislocalization of Aurora B from the centromeres (figure 5.4a, compare 1st and 2nd rows). The ectopic expression of intact GFP-CENP-A as well as each one of the mutant GFP fusions rescues, however, completely the localization of Aurora B on the centromeres (figure 5.4a, rows 3–5). INCENP, another CPC member, was found not to be affected by the depletion of CENP-A and the expression of the GFP fusions (supplementary figure 5.13).

The picture was very similar to that of Aurora B when studying the mitotic behavior of BubR1, another protein from the mitotic checkpoint: depletion of CENP-A impairs the distribution pattern of BubR1 on the centromeres and the ectopic expression of each one of the GFP fusions rescues it (figure 5.4b). These data evidence that the functions of the proteins from the mitotic checkpoints are not affected by both the absence of the tail of CENP-A and its phosphorylation.

#### **5.2.4 The absence of phosphorylation of NH<sub>2</sub>-tail of CENP-A alters the association of CENP-C, but not of CENP-T, with the centromeres**

CENP-C and CENP-T, two members of the *constitutive centromere-associated network*, form the chromatin-based platform required for vertebrate kinetochore assembly (Gascoigne et al., 2011a; for a recent review see Perpelescu and Fukagawa, 2011). In addition, the depletion of CENP-A expression in TD40 chicken cells leads to mislocalization of CENP-C (Régner et al., 2005). With this in mind, we have next analyzed how the expression of the GFP fusions affects the localization of CENP-C and CENP-T in the stable HeLa cell lines depleted from endogenous CENP-A. As seen (figure 5.5a, compare 1st and 2nd row), depletion of CENP-A results, as in the case of TD40 chicken cells (Régner et al., 2005), in a complete mislocalization of CENP-C. Both GFP-CENP-A and the phosphorylable swapped tail mutant GFP-H3-CENP-A completely rescue the centromere distribution pattern of CENP-C (figure 5.5a, 3rd and 6th rows). Although, the expression of neither NH<sub>2</sub>-tail CENP-A deleted mutant (GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup>) nor the other two non-phosphorylable CENP-A mutants (GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> and GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A) were

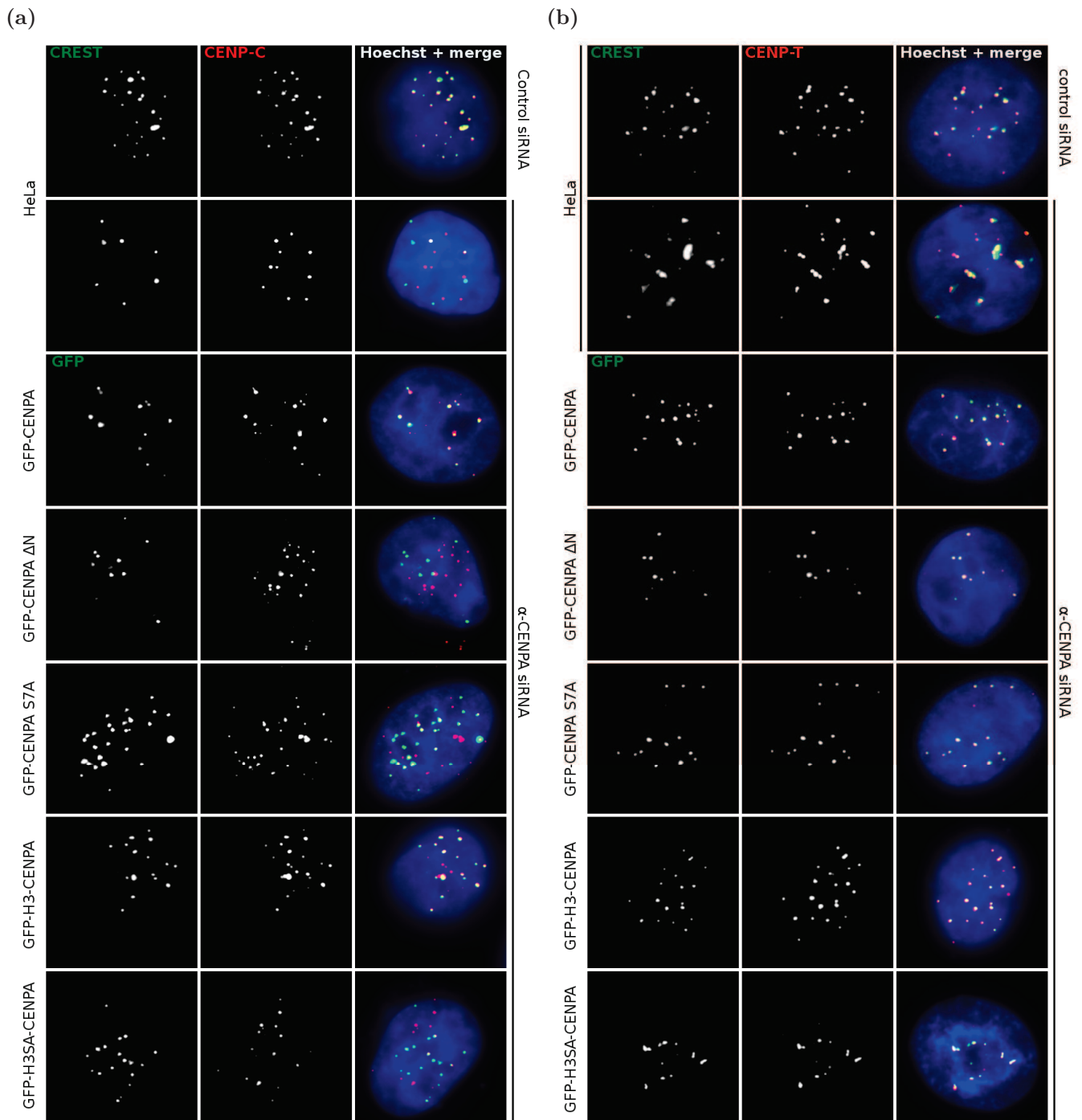


Figure 5.5 – The absence of the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A or its phosphorylation affects the localization of CENP-C, but this of CENP-T. (a) Localization of CENP-C in CENP-A depleted cells stably expressing the indicated silent resistant GFP-CENP-A fusions (rows 3–7). The first two rows show the localization of CENP-C in naive HeLa cells, treated (2nd row) or untreated (1st row) with CENP-A siRNA. In naive HeLa cells, the centromere were stained with CREST antiserum; blue, DNA. (b) Same as (a), but for CENP-T. Note the complete delocalization of CENP-C from the centromeric chromatin.

able to rescue the mislocalization pattern of CENP-C. Indeed, in all three cases CENP-C does not colocalize with the GFP-stained centromeres (figure 5.5a, rows 4, 5, 7). These data demonstrate that the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus and its phosphorylation are required for the centromere localization and function of CENP-C. In addition, the results with GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A evidence that the phosphorylation of the H3 tail of this swapped tail mutant was necessary for the rescue of the CENP-C localization and function. As for CENP-T, the depletion of CENP-A does not affect its centromeric distribution pattern (figure 5.5b), further confirming that CENP-T and CENP-C use distinct pathways for assisting the assembly of active kinetochores (Gascoigne et al., 2011a).

### 5.3 Discussion

In this work we have studied the role of the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus and its phosphorylation in mitosis. HeLa stable cell lines expressing a series of silent resistant GFP-CENP-A mutants were established. Importantly, the controlled expression of the different mutants has no effect on the stable HeLa cell lines, i.e. they behave identically to the parental naive HeLa cells. This has allowed to carry out the experiments in endogenous CENP-A depleted cells, a *sine qua non* condition for understanding the implication of the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus and its phosphorylation in mitosis.

We have first shown that the tail of CENP-A was required for mitosis in human cells, a result in agreement with the data in yeasts (Morey et al., 2004) and plants (Ravi and Chan, 2010). The experiments with the swapped tail fusion GFP-H3-CENP-A demonstrated that the tail of histone H3 in this mutant was also able to rescue the severe mitotic and cell division phenotype due to the depletion of CENP-A. The same finding, i.e. the requirement of “some kind” of CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus for proper mitosis proceeding, was also recently reported in plants (Ravi and Chan, 2010). The data for both non-phosphorylatable GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> and GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A fusions illustrate that the phosphorylation *per se* and not the aminoacid composition and sequence of the CENP-A tail is required for mitosis. These results could explain why the NH<sub>2</sub>-termini of different species are completely divergent in length, aminoacid composition and sequence, but al-

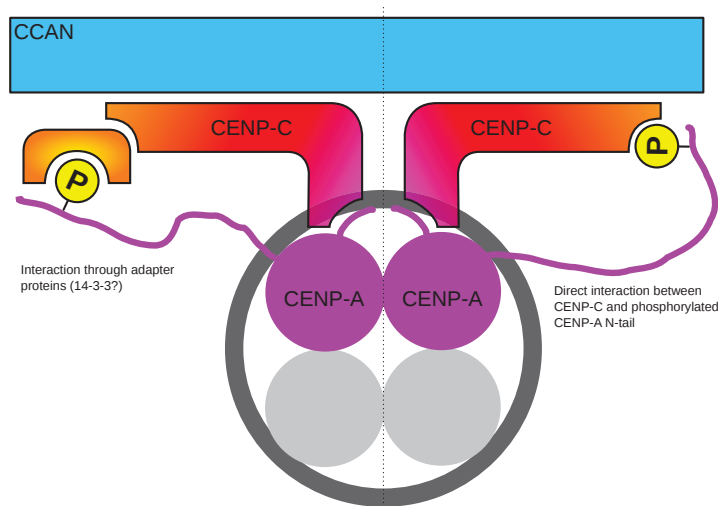


Figure 5.6 – Schematics for the role of the phosphorylation of the NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A during mitosis.

ways contain serine residues (figure 5.1). We speculate that during mitosis the NH<sub>2</sub>-tail of CENP-A is phosphorylated in the different species (probably at different site(s) along their tail) and that this phosphorylation is required for proper mitosis proceeding.

How does the tail of CENP-A function in mitosis? Our data show that the absence of the CENP-A tail induces a mislocalization of CENP-C. Remarkably, the absence of phosphorylation in both GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> and GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A fusions results in a pronounced inability of these proteins to rescue the centromeric distribution pattern of CENP-C. This evidences that the phosphorylation of the tail of CENP-A or of the tail of H3 (in the swapped tail mutant) is essential for the rescue, and supports our suggestion for the requirement of mitotic phosphorylation of the CENP-A tail in different species. We hypothesize that the phosphorylated NH<sub>2</sub>-terminus of CENP-A stabilizes directly or indirectly (through some “bridging” proteins) the centromeric localization of CENP-C (figure 5.6). CENP-C is constitutively associated with the centromeres during the cell cycle, while CENP-A is phosphorylated during mitosis only (Zeitlin et al., 2001b). In mitosis the kinetochores are, however, subjected to tension until they segregated completely at telophase and it is possible that the CCAN needs to be stronger “attached” to the centromeric chromatin to support the tension. The phosphorylated CENP-A tail should act as some type of specific mitotic “glue” sticking CENP-C to the centromeric chromatin. The “glue” to act requires the phosphorylation of the tail only and the tail

length, aminoacid composition and sequence appear not to be important. The removal of the CENP-A tail or the inability to phosphorylate it at mitosis would result in CENP-C “detachment” from the centromeres and its mislocalization. The absence of CENP-C from the kinetochores would in turn lead in unproper kinetochore assembly and severe mitotic and cytokinesis phenotypes (Gascoigne et al., 2011a) and this is exactly what we observed. This simplified scenario could also explain the capacity of the phosphorylable CENP-A mutants to rescue the phenotypes due to the depletion of endogenous CENP-A. Alternatively, the phosphorylation of the CENP-A NH<sub>2</sub>-terminus could act as a signal for conformational changes in the structure of CENP-C and/or for association with other kinetochore proteins, a process which would lead to stabilization of the CENP-C binding to centromere chromatin in mitosis.

Histone modifications were proposed to be essential in numerous processes vital for the cell (reviewed in Strahl and Allis, 2000). Although, since few years this view was challenged. Analysis of the histone modification patterns and timing rather suggest that histone modifications are easily explained as consequences of nucleosome disruption in the presence of histone modifying enzymes (Henikoff and Shilatifard, 2011). The use of the recently developed very elegant genetic approach in *D. melanogaster* shows that this might indeed be the case for the methylated lysine 27 of H3, a histone mark which was believed to be involved in Polycomb-dependent gene regulation and to be required for fly development (Günesdogan et al., 2010). The possibility to suppress the expression of histone variants in cells in culture offers an unique possibility to study the function of histone variant modifications in cells derived from much more complex organisms than *D. melanogaster*. Our study illustrates the requirement of the phosphorylation of a single residue (serine 7) of CENP-A for mitosis and cell division and evidences that this modification is not a consequence from the mitotic process. Thus, histone modifications should be studied “case by case” to understand their functional roles.



## 5.4 Acknowledgements

We thank R. Charton for participation in the initial experiments. This work was supported by grants from INSERM, CNRS, ANR “EPIVAR” n° 08-BLAN60320-02 (A.H. and S.D.), ANR n° NT09-485720 “CHROREMBER” (to S.D.), INCA (A.H. and S.D.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (A.H. and S.D.).

## 5.5 Supplementary figures

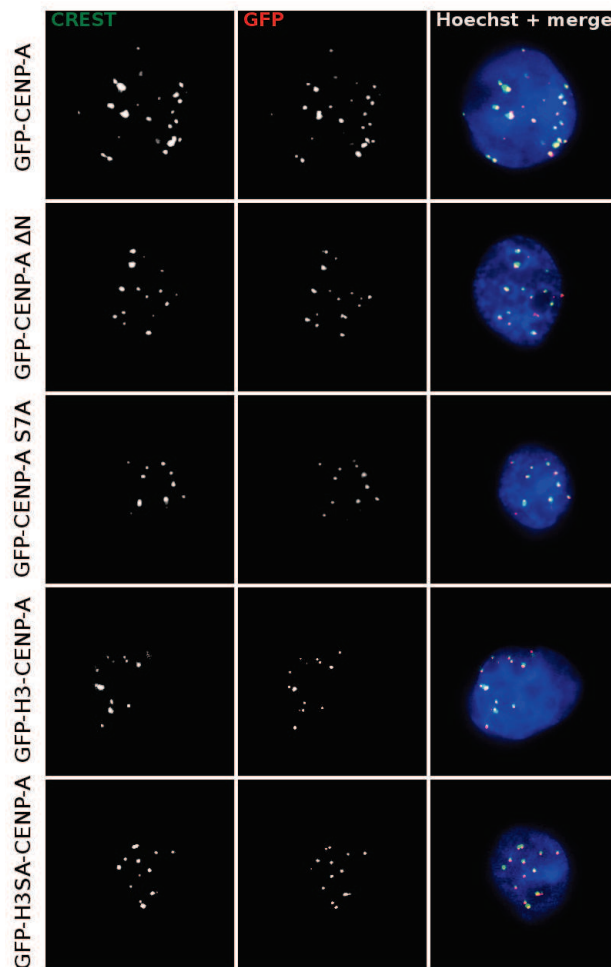


Figure 5.7 – The silent resistant GFP-CENP-A fusions, stably expressed in the HeLa cells, are incorporated into centromeric chromatin. Stable HeLa cell lines, expressing the indicated GFP-CENP-A fusions were established. The natural fluorescence of the GFP and CREST antiserum were used for detection of the CENP-A fusions and the centromeres, respectively; blue, DNA. Note the complete co-localization of the GFP and CREST signals.

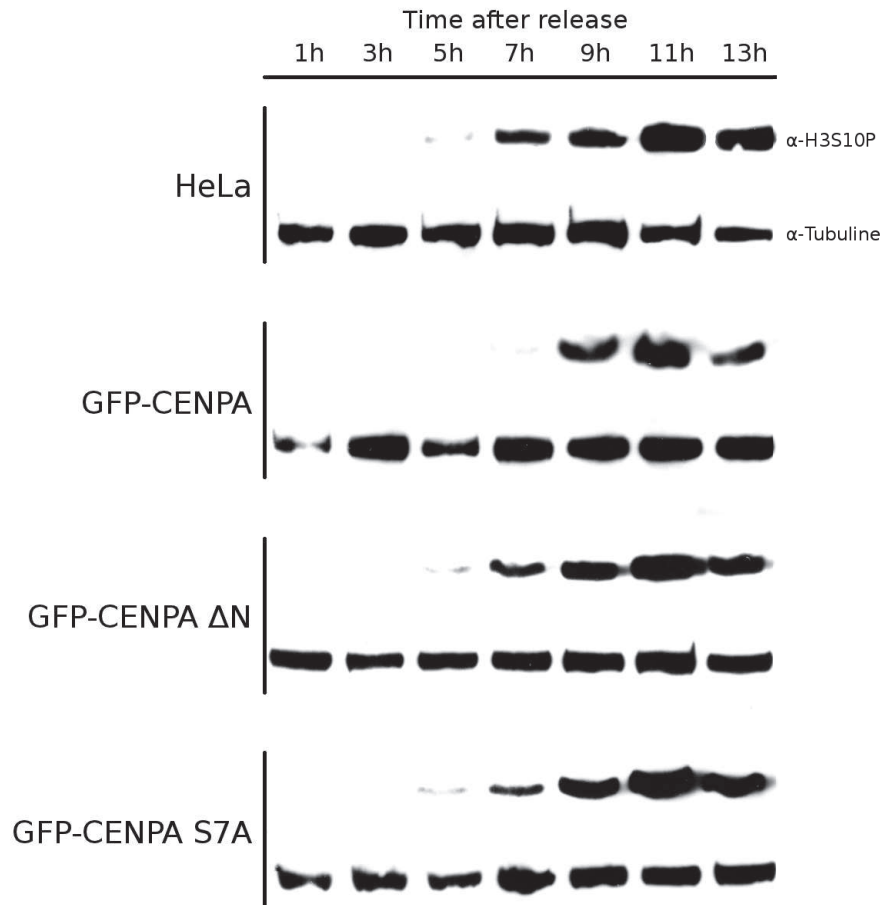


Figure 5.8 – The stable expression of the silent resistant GFP-CENP-A fusions does not affect the duration of mitosis. Western-blot analysis of the phosphorylation status of H3 serine 10 in the indicated cell lines. Cells were synchronized by double thymidine block (2 mM) and collected at the indicated time after being released.

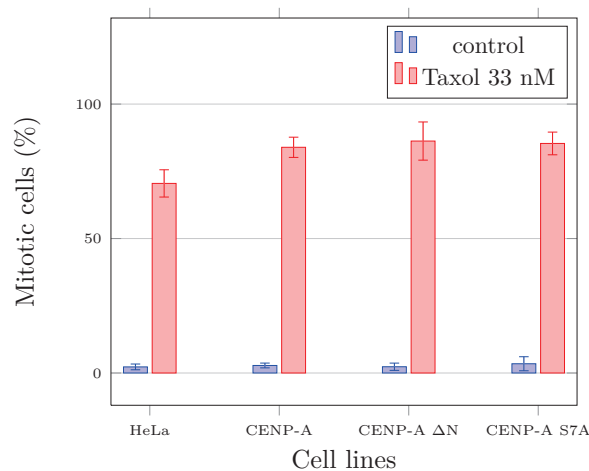


Figure 5.9 – The spindle assembly checkpoint (SAC) functions normally in cells expressing the silent resistant GFP fusions. Naive HeLa cells and cells expressing the silent resistant GFP fusions were blocked in mitosis by 33 nM taxol during 18 hours; mitotic cells were then shaken off from the culture support and counted.

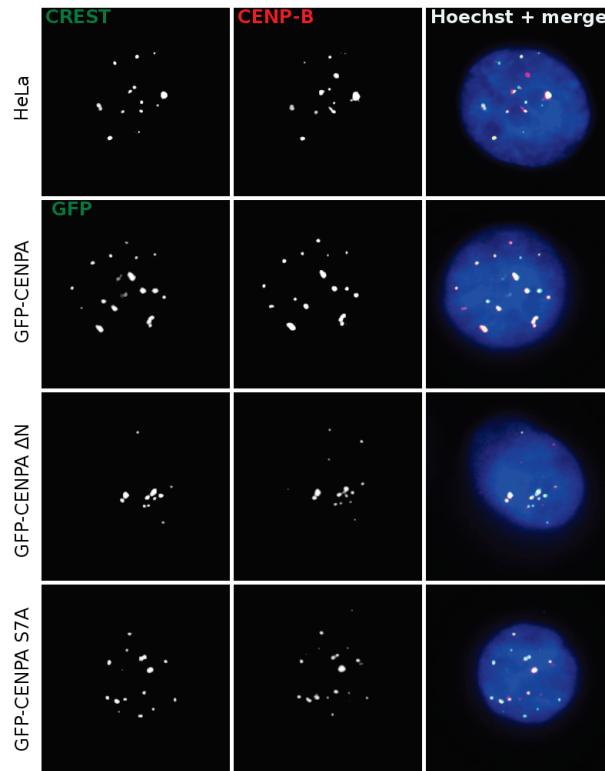


Figure 5.10 – CENP-B localization pattern is not disturbed in cells expressing the silent resistant GFP fusions. Naive HeLa cells and cells stably expressing the GFP fusions were submitted to immunofluorescence using an antibody against centromeric protein CENP-B. Centromeres were visualized with CREST antiserum (1st row) or GFP fluorescence; blue, DNA.

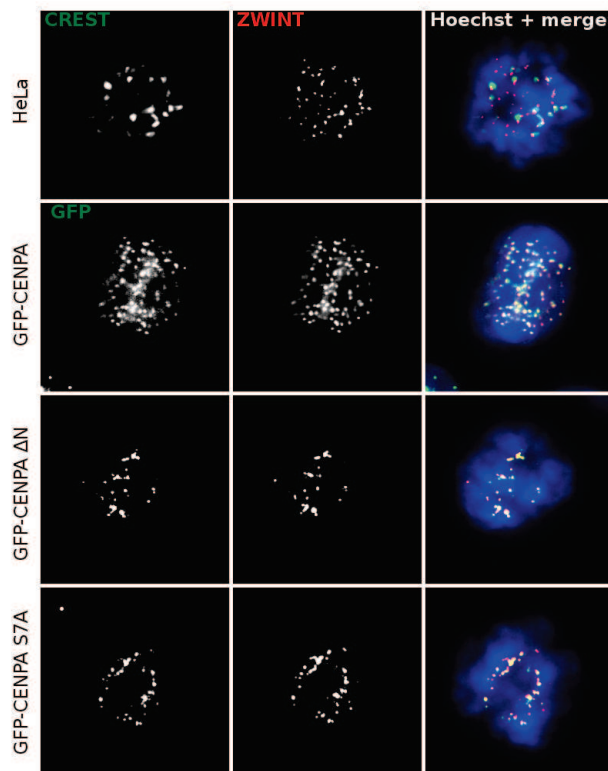


Figure 5.11 – ZWINT localization pattern is not disturbed in cells expressing the silent resistant GFP fusions. Same as supplementary figure 5.10, but for ZWINT.

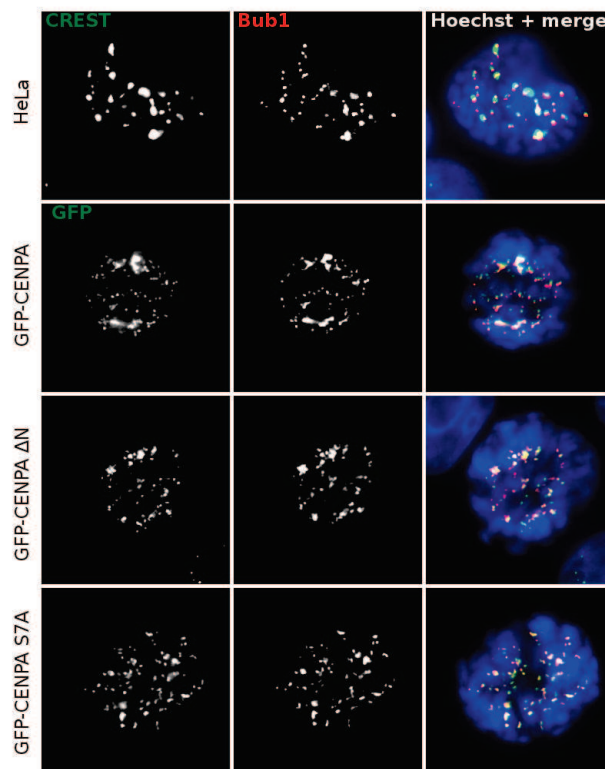


Figure 5.12 – Bub1 localization pattern is not disturbed in cells expressing the silent resistant GFP fusions. Same as supplementary figure 5.10, but for Bub1.

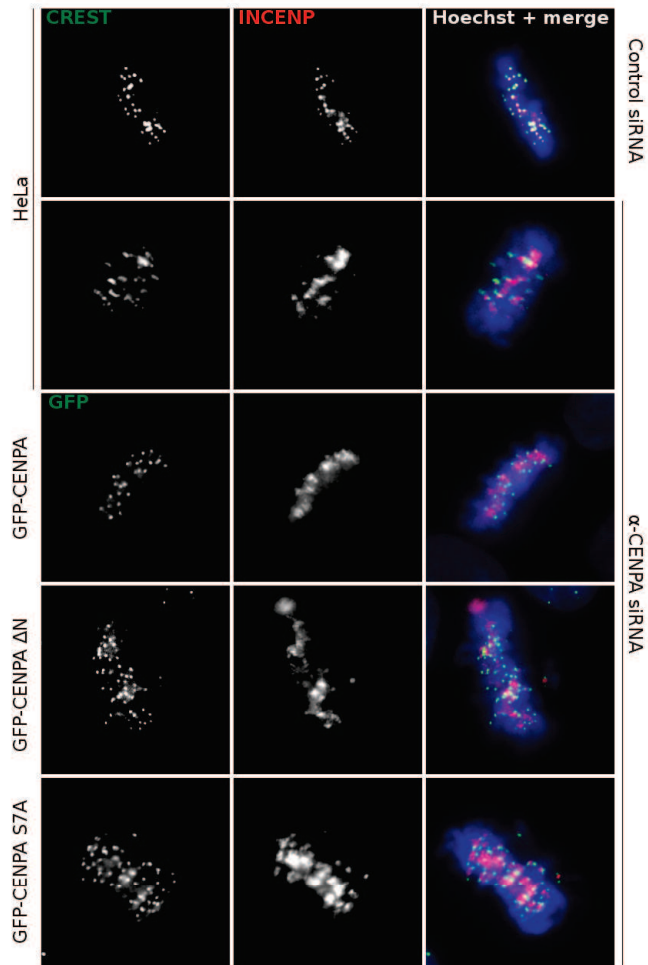


Figure 5.13 – INCENP behavior in mitosis is not affected by CENP-A depletion and stable expression of silent resistant GFP-CENP-A fusions. Localization of CPC member INCENP in CENP-A depleted cells stably expressing the indicated GFP-CENP-A fusions. The first row shows the localization of INCENP in naive, untreated HeLa cells. Centromeres were visualized with CREST antiserum (1st and 2nd rows) or GFP fluorescence; blue, DNA.

*I suppose the process of acceptance will pass through the usual four stages: (i) this is worthless nonsense; (ii) this is an interesting, but perverse, point of view; (iii) this is true, but quite unimportant; (iv) I always said so.*

— John Burdon Sanderson HALDANE

## Chapitre 6

### Discussion

#### 6.1 De la validité des résultats

L'ensemble des résultats présentés au chapitre précédent repose sur l'exploitation des lignées cellulaires établies, exprimant stablement la protéine GFP-CENP-A ou une forme altérée de celle-ci. Ces lignées représentent une source possible d'artefacts qu'il est nécessaire d'évaluer pour apprécier la signification et la pertinence des résultats obtenus.

Un premier point à remarquer est qu'en dépit du promoteur fort (le LTR du virus MMLV) contrôlant l'expression des transgènes, les fusions GFP-CENP-A ne sont que modérément sur-exprimées par rapport au gène CENP-A endogène. Lorsqu'elle est trop fortement surexprimée, CENP-A a tendance à se déposer sur l'ensemble de la chromatine au lieu de cibler spécifiquement la chromatine centromérique (Van Hooser et al., 2001), entraînant avec elle une délocalisation d'une partie des protéines du CCAN et du kinétochore. Dans les lignées utilisées ici, les protéines GFP-CENP-A présentent constamment une localisation restreinte à la chromatine centromérique.

De plus, la seule présence des protéines de fusion ne semble pas perturber le déroulement de la mitose, dès lors que la protéine CENP-A native est toujours exprimée. Aucun phénotype mitotique (allongement de la durée de la mitose, accumulation de défauts

de ségrégation, altération du SAC) n'est observé sur les cellules en l'absence de traitement visant à réduire l'expression de CENP-A endogène. Ceci est valable pour toutes les lignées utilisées, y compris celles exprimant les mutants sans extension N-terminale (GFP-CENP-A $\Delta^N$ ) ou à l'extension N-terminale non-phosphorylable (GFP-CENP-A $^{S7A}$ , GFP-H3 $^{SA}$ -CENP-A), indiquant que ces mutants n'exercent pas d'effets de dominance négative.

Enfin, l'interférence ARN dirigée contre l'ARNm CENP-A permet d'obtenir une réduction drastique de l'expression de la forme endogène de CENP-A. L'efficacité du traitement par les siRNA anti-CENP-A est cruciale, puisqu'il est établi que la quantité de CENP-A présente au sein de la chromatine centromérique est nettement excédentaire par rapport à la quantité minimale requise pour assurer la bonne fonction du centromère (ainsi, 10 % de la quantité nominale de CENP-A sont toujours suffisant pour permettre le recrutement d'Aurora B par exemple, voir Liu et al., 2006). Par ailleurs, comme attendu le traitement n'affecte pas l'expression des protéines de fusion exogènes, dont la séquence codante est suffisamment différente de celle du gène sauvage pour empêcher toute reconnaissance par les ARN interférents. C'est une condition indispensable au déroulement d'une étude de *pseudogénétique* (remplacement d'une protéine endogène par une forme mutante, sans altération génétique du gène sauvage).

## 6.2 De l'importance du domaine amino-terminal de CENP-A

Les résultats obtenus avec le mutant GFP-CENP-A $\Delta^N$  montrent sans ambiguïté que la présence de l'extension N-terminale de CENP-A est requise pour le bon déroulement de la mitose. La protéine GFP-CENP-A $\Delta^N$  adopte comme attendu une localisation centromérique — puisque son domaine C-terminal, non modifié, contient le CATD, seul responsable de cette localisation (Black et al., 2007b) —, mais s'avère incapable de prévenir l'accumulation de défauts de congression et de ségrégation des chromosomes consécutifs à la suppression de la protéine CENP-A native. La détermination centromérique et la parti-

icipation au déroulement de la mitose sont donc deux fonctions distinctes de CENP-A, et si la première dépend uniquement du domaine structuré, la seconde est portée au moins en partie par l'extension N-terminale.

L'étude du mutant GFP-H3-CENP-A, dans lequel l'extension N-terminale de CENP-A est remplacée par celle de H3, montre que les extensions N-terminales de CENP-A et de H3 sont fonctionnellement équivalentes, ce mutant étant capable de prévenir les conséquences de la suppression de CENP-A aussi bien que la construction GFP-CENP-A. Surprenant de prime abord — puisqu'il suggère qu'une fonction essentielle ne dépend pas d'une séquence peptidique particulière —, ce résultat est néanmoins cohérent avec des études antérieures montrant que les fonctions de CENP-A peuvent être efficacement remplies par son homologue de levure Cse4p (Wieland et al., 2004) ou par une protéine H3 contenant le CATD (Black et al., 2007b). Il expliquerait également la faible conservation du domaine N-terminal de CENP-A à travers les eucaryotes. Quelle que soit la fonction du domaine N-terminal, elle ne fait peser que peu de contraintes sur la séquence peptidique. Une de ces contraintes est probablement une conformation non-structurée — une contrainte que la seule GFP, protéine globulaire, ne peut satisfaire dans le cas du mutant GFP-CENP-A<sup>ΔN</sup>.

La contrainte majeure, révélée par l'étude des mutants GFP-CENP-A<sup>S7A</sup> et GFP-H3<sup>SA</sup>-CENP-A, est la présence de résidus sérines phosphorylables. L'absence de tels résidus sur l'extension N-terminale conduit aux mêmes défauts mitotiques, et dans les mêmes proportions, que l'absence de toute l'extension N-terminale ou de la protéine CENP-A entière. Cela suggère fortement que la fonction mitotique du domaine N-terminal de CENP-A réside entièrement dans sa phosphorylation. Cette hypothèse est confortée par le fait que, pour divergentes que soient les extensions N-terminales de CENP-A à travers les eucaryotes, elles possèdent toutes au moins un résidu sérine potentiellement phosphorylable. Chez *S. pombe*, l'expression d'une forme non-phosphorylable de Cse4p conduit à une augmentation d'un facteur 2 à 3 du taux de défauts de ségrégation des chromosomes (Chen et al., 2000).

La critique majeure que l'on peut formuler à l'encontre de cette hypothèse vient de ce



que, à l'heure actuelle, la phosphorylation mitotique du domaine N-terminal de CENP-A n'a été observée que chez l'homme. Néanmoins, la famille de protéine kinases Aurora, supposées responsables de cette phosphorylation (Zeitlin et al., 2001a ; Kunitoku et al., 2003), est conservée chez l'ensemble des eucaryotes (Andrews et al., 2003).

### 6.3 Du rôle de la phosphorylation de CENP-A

Étant établi, du moins dans nos cellules, que la fonction mitotique du domaine N-terminal de CENP-A est portée par sa phosphorylation, reste alors à en élucider le mécanisme : quelle est, au juste, la fonction de cette phosphorylation ?

Les défauts de congression et de ségrégation des chromosomes observés orientent naturellement le regard vers le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC), qui a précisément pour rôle de prévenir de tels défauts. Le lien entre le SAC et la phosphorylation de CENP-A est immédiat, puisqu'Aurora B, une des protéines clefs du point de contrôle responsable de la détection et de la correction des mauvais attachements des chromosomes aux microtubules (Knowlton et al., 2006), est également responsable de la phosphorylation mitotique de CENP-A (Zeitlin et al., 2001a ; Kunitoku et al., 2003). Toutefois, si la perte de CENP-A conduit effectivement à l'absence de localisation de Aurora B sur le centromère (Liu et al., 2006), tous les mutants étudiés ici, y compris ceux dont l'extension N-terminale n'est pas phosphorylable, autorisent une localisation correcte de la kinase, infirmant l'hypothèse formulée par Kunitoku et al., 2003 selon laquelle le recrutement centromérique d'Aurora B dépend de la phosphorylation de CENP-A. BubR1, une autre kinase du SAC dont la localisation dépend de CENP-A (Régner et al., 2005), présente également un comportement normal dans toutes les lignées, excluant une localisation dépendante de la phosphorylation de CENP-A.

CENP-A a très tôt été identifiée comme la « fondation du kinétochore ». Derrière cette appellation quelque peu vague, le détail des interactions du kinétochore avec la chromatine centromérique et CENP-A est progressivement mis au jour (Gascoigne and Cheeseman, 2011b). La plate-forme minimale permettant l'assemblage du kinétochore semble ainsi être constituée des protéines CENP-C et CENP-T (Gascoigne et al., 2011a). CENP-C in-

teragit directement avec le nucléosome CENP-A (Carroll et al., 2010). Conséquemment, la localisation centromérique de CENP-C est perdue en absence de CENP-A, et les essais réalisés sur les différentes lignées GFP-CENP-A montrent que seules les formes phosphorylables (GFP-CENP-A et GFP-H3-CENP-A) restaurent une localisation correcte. Le recrutement ou la maintenance de CENP-C sur la chromatine centromérique dépend donc de la phosphorylation du domaine N-terminal de CENP-A, et il est probable qu'il s'agisse là de la fonction mitotique essentielle que doit remplir l'extension N-terminale de CENP-A.

Comment la phosphorylation de CENP-A peut-elle participer à la localisation centromérique de CENP-C? Une première hypothèse est celle d'une interaction directe de CENP-C avec l'extension N-terminale phosphorylée de CENP-A; il faut néanmoins noter qu'à l'heure actuelle, la littérature propose que l'interaction entre les deux protéines a lieu au niveau de l'extrémité *carboxy*-terminale de CENP-A (Carroll et al., 2010). Une autre hypothèse, que nous privilégions, suppose l'existence d'une protéine adaptatrice faisant le lien entre CENP-A et CENP-C. Une telle protéine reste à identifier, mais les protéines de la famille 14-3-3 nous semblent de bonnes candidates. Ces protéines lient spécifiquement des motifs phosphorylés et servent d'adaptateurs dans un grand nombre de processus (pour revue, voir Hermeking and Benzinger, 2006). Nous faisons l'hypothèse qu'une de ces protéines s'associe à l'extension N-terminale phosphorylée de CENP-A et interagit simultanément avec CENP-C, stabilisant ainsi l'ancrage de cette dernière à la chromatine centromérique.

Contre cette hypothèse, il faut noter que la séquence peptidique de CENP-A au voisinage de la sérine n° 7 ne correspond à aucun des deux motifs consensus reconnus par les 14-3-3 (RSXSXP ou RXXSXP); néanmoins, d'autres protéines sont connues pour interagir avec les 14-3-3 sans pour autant respecter ces consensus (Aitken, 2006). Par ailleurs, il a été récemment montré que les 14-3-3 interagissent avec l'extension N-terminale de H3 sur ses résidus S10 et S28 phosphorylés (Winter et al., 2008), ce qui expliquerait l'efficacité avec laquelle l'extension N-terminale de H3 peut remplacer celle de CENP-A dans le mutant GFP-H3-CENP-A.

## 6.4 Des perspectives

L'aboutissement du travail présenté dans ces pages soulève de nouvelles interrogations qui méritent considération.

**Quelle est l'étendue de la désorganisation du kinétochore en absence de phosphorylation de CENP-A ?** CENP-C constitue un des « piliers » du CCAN et est supposée directement responsable du recrutement centromérique de plusieurs protéines du CCAN et du kinétochore. La délocalisation de CENP-C du centromère lorsque CENP-A n'est pas phosphorylable devrait entraîner une mauvaise localisation des protéines recrutées par CENP-C — par exemple, certaines protéines du complexe KMN (Przewloka et al., 2011).

**Les protéines 14-3-3 sont-elles impliquées dans l'interaction entre CENP-C et l'extension N-terminale phosphorylée de CENP-A ?** Cette question peut être abordée sur trois points : (i) peut-il y avoir interaction entre une protéine 14-3-3 et l'extension N-terminale de CENP-A ? (ii) peut-il y avoir interaction entre une protéine 14-3-3 et CENP-C ? (iii) une protéine 14-3-3 est-elle associée à la chromatine CENP-A. Ce dernier point est actuellement en cours d'investigation par notre collaborateur Ali HAMICHE.

**Les homologues de CENP-A chez les autres eucaryotes sont-ils phosphorylés ?** Le cas échéant, la phosphorylation y remplit-elle la même fonction que celle que nous lui attribuons chez l'homme ? Dans le cas contraire, quel autre mécanisme peut être responsable du maintien de la localisation centromérique de CENP-C ?

*Science is a way of trying not to fool yourself. The first principle is that you must not fool yourself, and you are the easiest person to fool.*

— Richard FEYNMAN

## Annexe A

### Autres publications

# Single-base resolution mapping of H1–nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome

Sajad Hussain Syed<sup>a,b</sup>, Damien Goutte-Gattat<sup>a</sup>, Nils Becker<sup>c</sup>, Sam Meyer<sup>c</sup>, Manu Shubhdarshan Shukla<sup>a,b</sup>, Jeffrey J. Hayes<sup>d</sup>, Ralf Everaers<sup>c</sup>, Dimitar Angelov<sup>b</sup>, Jan Bednar<sup>e,f,1</sup>, and Stefan Dimitrov<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Joseph Fourier—Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, U823, Site Santé-BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France; <sup>b</sup>Université de Lyon, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5239/Institut National de la Recherche Agronomique 1237/Institut Fédératif de Recherche 128 Biosciences, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Physique and Centre Blaise Pascal, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5672, Université de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69634 Lyon Cedex 07, France; <sup>d</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester NY 14642; <sup>e</sup>Centre National de la Recherche Scientifique/Université Joseph Fourier—Grenoble 1, Laboratoire de Spectrométrie Physique, Unité Mixte de Recherche 5588, B.P. 87, 140 Avenue de la Physique, 38402 St. Martin d'Hères Cedex, France; and <sup>f</sup>Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Cellular Biology and Pathology and Department of Cell Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic (Public Research Institution), Albertov 4, 128 01 Prague 2, Czech Republic

Edited by Carl Wu, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved April 6, 2010 (received for review January 11, 2010)

**Despite the key role of the linker histone H1 in chromatin structure and dynamics, its location and interactions with nucleosomal DNA have not been elucidated. In this work we have used a combination of electron cryomicroscopy, hydroxyl radical footprinting, and nanoscale modeling to analyze the structure of precisely positioned mono-, di-, and trinucleosomes containing physiologically assembled full-length histone H1 or truncated mutants of this protein. Single-base resolution •OH footprinting shows that the globular domain of histone H1 (GH1) interacts with the DNA minor groove located at the center of the nucleosome and contacts a 10-bp region of DNA localized symmetrically with respect to the nucleosomal dyad. In addition, GH1 interacts with and organizes about one helical turn of DNA in each linker region of the nucleosome. We also find that a seven amino acid residue region (121–127) in the COOH terminus of histone H1 was required for the formation of the stem structure of the linker DNA. A molecular model on the basis of these data and coarse-grain DNA mechanics provides novel insights on how the different domains of H1 interact with the nucleosome and predicts a specific H1-mediated stem structure within linker DNA.**

nucleosome structure | chromatin higher order structure

The nucleosome is the fundamental repeating unit of chromatin in the nucleus of eukaryotic cells. The composition and the basic organization of the nucleosome is well established, and the structure of the nucleosomal core particle (NCP) has been described with nearly atomic precision by X-ray diffraction (1). However, similar information for the structure of a complete nucleosome, i.e., the NCP with associated linker DNA segments and a linker histone, is still lacking. Electron microscopy and electron cryomicroscopy (ECM) imaging have provided a relatively low-resolution picture of the complete nucleosome, both native (2) and reconstituted (3). However, important features of the structure remain obscure.

Linker histones are typically ~200 aa in length with a rather short nonstructured N terminus, followed by a ~70–80 aa structured (“globular”) domain, and a ~100 aa long apparently unstructured C terminal domain, highly enriched in lysines. The globular domain of the linker histone appears to be internally located in the 30-nm chromatin fiber (4, 5), but its exact position within the nucleosome remains a subject of debate (for review, see ref. 6). A second question not yet resolved concerns the interactions and location of the linker histone C terminus. These issues have their origin in difficulties related to the preparation of well-defined nucleosomal samples. Indeed, direct binding of linker histone to nucleosomes in vitro is inefficient and complicated by the formation of large aggregates because of the nonspecific association of linker histones with DNA (7, 8).

The situation can be considerably improved by using chaperones for linker histone deposition in vitro, a mechanism that is likely used in vivo (9). It was recently shown that NAP-1 could be used to efficiently and properly incorporate the somatic linker histone H1 as well as the embryonic linker histone B4 into a dinucleosome reconstituted on a DNA template containing a tandem repeat of the *Xenopus borealis* 5S RNA gene (8). The DNase I footprinting analysis of the 5S dinucleosome indicated that both B4 and H1 protected linker DNA. However, because histone octamers do not precisely position on this DNA sequence (10), details regarding the interaction of the linker histone with the nucleosomes core were not apparent from this experiment (8).

In this study we have used 601 DNA repeats to reconstitute precisely positioned mono-, di-, and trinucleosomes and NAP-1 to properly incorporate either wild-type histone H1 or NH<sub>2</sub> or COOH terminus truncated mutants. The structure of the H1-containing nucleosomal templates was analyzed by ECM, •OH footprinting, and coarse-grain molecular modeling. Our results provide a strikingly clear picture of how histone H1 binds to the nucleosome and indicate a specific H1-mediated organization of the linker DNA.

## Results

**NAP-1 Mediated Assembly of H1 and Truncation Mutants into Reconstituted Nucleosomes.** To investigate the complex interactions of H1 with nucleosomes, we reconstituted mono-, di-, and trinucleosomes by using templates on the basis of the 601 nucleosome positioning sequence to ensure that histone octamers were precisely positioned with respect to the DNA sequence. We also prepared full-length linker histone H1.5 and truncated mutants of this protein (Fig. 1A) and purified the recombinant proteins to homogeneity (Fig. 1B). We have used the H1.5 histone isoform because it is ubiquitously expressed in different tissues (for simplicity, we will refer to this protein as H1). We incubated H1 with the nucleosomes in either the presence or the absence of NAP-1, and the binding of histone H1 was evaluated by EMSA (Fig. 1C). Upon incubation with increasing amounts of H1, in the absence of NAP-1 the dinucleosome band exhibited shifts consistent with the binding of histone H1 and a smear throughout the

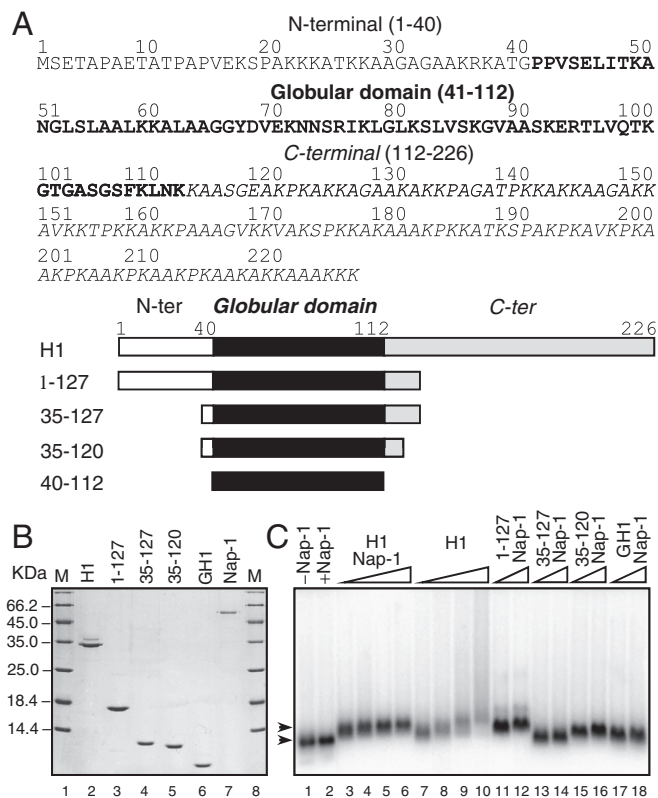
Author contributions: D.A., J.B., and S.D. designed research; S.H.S., D.G.-G., N.B., and S.M. performed research; S.H.S., N.B., M.S.S., R.E., D.A., J.B., and S.D. analyzed data; and J.J.H., R.E., J.B., and S.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr or jbednar@spectro.ujf-grenoble.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1000309107/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1000309107/-DCSupplemental).

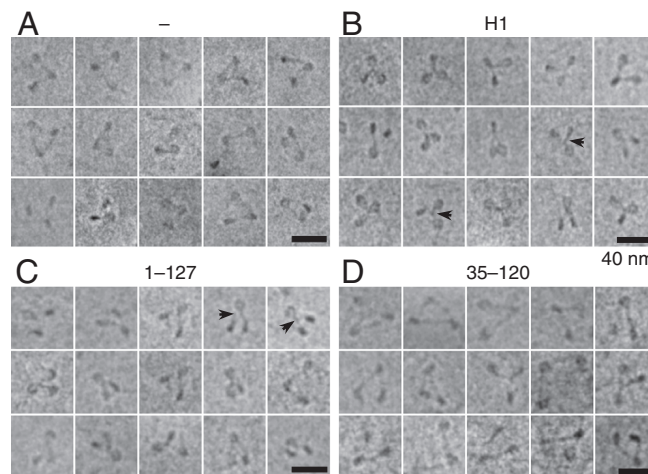


**Fig. 1.** NAP-1 facilitates binding of linker histone H1 and truncation mutants to 601 dinucleosomes. (A) Primary structure of histone H1 (Upper) and schematics of the histone H1 deletion mutants (Lower). (B) 15% SDS-PAGE of purified recombinant full-length H1, truncation mutants, and NAP-1. (C) Agarose gel electrophoresis of 601 dinucleosomes incubated with increasing amounts of either full-length histone H1 alone (lanes 7–10), NAP-1-histone H1 complex (lanes 3–6), or a complex of NAP-1 and the indicated H1 truncation mutants (lanes 11–18). Lanes 1 and 2, control dinucleosome without H1 and dinucleosomes incubated with NAP-1 only.

lane of the gel indicative of the formation of aggregates at higher H1:dinucleosome ratios (Fig. 1C, lanes 7–10). This result is in complete agreement with the reported data and reflects the superstoichiometric association of histone H1 with the dinucleosomes (8). However, when NAP-1 was present in the reaction, the binding of histone H1 resulted in sharp, well-defined bands indicating the homogenous formation of dinucleosomes initially bound by one H1 and, upon increasing the NAP-1-H1 concentration, bound by two H1s (Fig. 1C, lanes 3–6). Importantly, further increases in the amount of NAP-1-H1 in the reaction did not change either the shape or the mobility of the band, consistent with the reported capacity of NAP-1 to act as an histone H1 chaperone, facilitating proper H1 binding to nucleosomes in a 1:1 stoichiometry (8, 9). Importantly, NAP-1 was also able to mediate the binding of the H1 truncation mutants, including the globular domain of histone H1, GH1 (AA 40–112), to nucleosomes (Fig. 1C, lanes 11–18).

**ECM Imaging of Trinucleosomes Containing Either Full-Length Histone H1 or Truncation Mutants.** To evaluate the overall structure of nucleosomes containing H1, we examined the conformation of trinucleosomes by using ECM. Trinucleosomal particles were used in order to best approximate the situation in native chromatin, where nucleosomes are surrounded by neighbors. The central nucleosome in the trinucleosomal particle thus experiences an environment more similar to that in native chromatin than a mononucleosome.

Fig. 2 shows a gallery of trinucleosomes without H1 (Fig. 2A) and trinucleosomes bound by full-length H1 or selected H1



**Fig. 2.** H1 binding to nucleosomes organizes linker DNA into a stem structure. Representative ECM images of reconstituted 601 trinucleosomes. Shown are trinucleosomes in the absence of H1 (A) and trinucleosomes assembled with full-length histone H1 (B), the 1–127 H1 truncation mutant (C), or the 35–120 truncation mutant (D). NAP-1 was present in the experiments shown in A. The arrowheads indicate selected examples of the stem. (Scale bar, 40 nm.)

truncation mutants in the presence of NAP-1 (Fig. 2B–D). The nucleosomes without H1 adopt an open conformation with diverging DNA segments, most easily visualized on the central nucleosome, where DNA is entering and exiting the octamer at different sites (Fig. 2A). In cases with convenient projections, the short DNA segments on external nucleosomes also can be seen. In contrast, upon H1 association the structure of the nucleosome closes and the formation of a stem structure is clearly visible (Fig. 2B, Arrowheads). The structural properties of the stem are visually identical to that observed in native chromatin particles (see ref. 2). We conclude that the NAP-1 assisted incorporation of histone H1 results in the reconstitution of native-like chromatin structures.

Intriguingly, the association of the H1 truncated mutants 1–177 or 1–127 (which lack either the last 50 or 100 aa from the H1 C terminus; see Fig. 1A) leads to a structure very similar to that obtained upon association of full-length H1 with the trinucleosome (Fig. 2; compare B with C and Fig. S1), although the statistical analysis showed that the amount of stem structure, formed in the central nucleosome of trinucleosomes reconstituted with the H1 truncation mutant 1–127, was ~15% less than that of trinucleosomes reconstituted with either full-length H1 or with the H1 truncation mutant 1–177 (Fig. S1B). In contrast, the 3D organization of the trinucleosomes assembled with the 35–120 mutant consisting of the globular domain and 5 and 8 aa from the NH<sub>2</sub> and COOH termini of H1, respectively, was similar to that of trinucleosomes without H1 (Fig. 2; compare A with D). We conclude that the H1 globular domain alone is not able to organize the linker DNA into a stem-like structure.

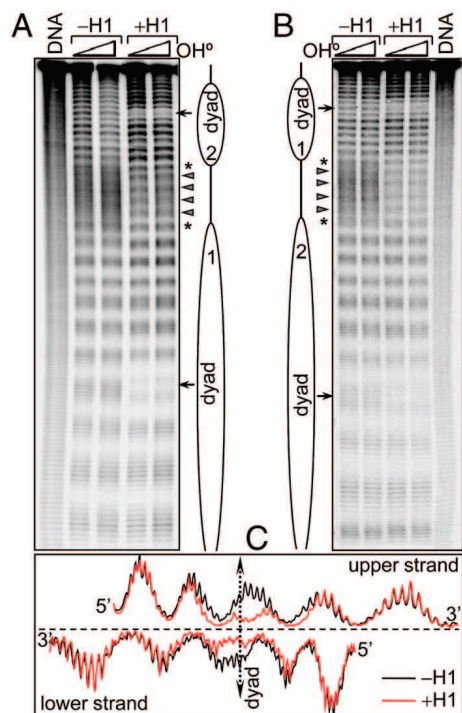
**Hydroxyl Radical Footprinting of Histone H1 Bound to Nucleosomes.**

ECM reveals the overall structure and 3D conformation of the nucleosomal particles. To correlate the generation of this structure with the interaction of the different domains of histone H1 with the nucleosomal DNA, we have used both DNase I and hydroxyl radical footprinting techniques. Initially, we applied these techniques to study the organization of dinucleosomes. The presence of full-length histone H1 but not of the globular domain affected the accessibility of the linker DNA to DNase I (Fig. S2). This result is in agreement with reported data (8, 11) and suggests an interaction of either the NH<sub>2</sub> and COOH termini of histone H1 or both with linker DNA. DNase I foot-

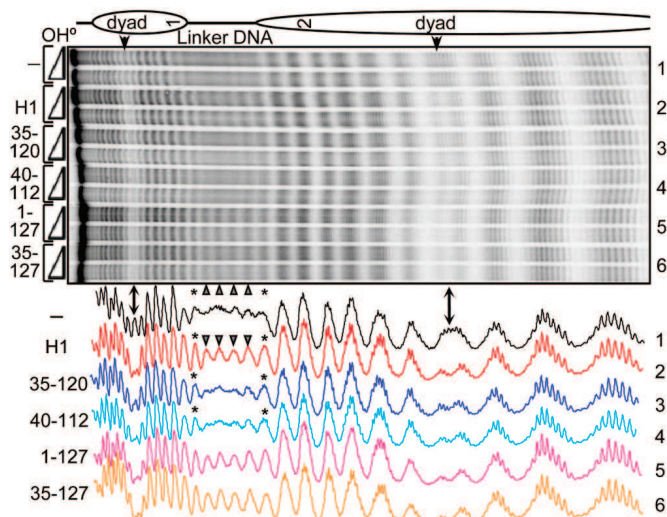
printing, however, did not resolve the precise localization of H1 on the nucleosome.

To more accurately identify regions of DNA interacting with H1 within the nucleosome, we employed footprinting with hydroxyl radicals, which provides single-base resolution information on protein–DNA contacts (12) (see *SI Materials and Methods*). Each of the nucleosomes within the dinucleosome without H1 showed a well-defined 10-bp repeat, because of the wrapping of the nucleosome core DNA around the histone octamer, whereas the linker DNA exhibited a uniform •OH cleavage pattern, similar to that of naked DNA (Fig. 3, lane DNA). However, in contrast to the DNase I experiments, the presence of H1 induced two major alterations in the •OH cleavage pattern of the dinucleosomal DNA (Figs. 3 and 4): (i) a strong decrease in the accessibility of DNA at the dyad axis of each individual nucleosome, where a 10-bp stretch of DNA symmetrically located about the dyad was protected by histone H1 (see Fig. 3C for details) and (ii) a clear 10-bp repeat in the cleavage pattern of the linker DNA.

To more closely approximate the physiological H1 binding environment and to correlate the binding of H1 with the 3D organization observed by ECM, we also carried out •OH footprinting with trinucleosomes without and with H1 (Fig. 5). The same types of alterations in the •OH cleavage pattern were observed upon histone H1 incorporation in these particles, namely, a clear pattern of protection at the dyad of each individual nucleosome and the appearance of a 10-bp repeat within the linker DNA (Fig. 5). Note that in this case the central nucleosome has two bona fide linkers and each linker exhibited the 10-bp repeat pattern. These types of structural changes because of the NAP-1 assisted incorporation of histone H1 were also observed with mononucleosomes, indicating that the protections were



**Fig. 3.** Hydroxyl radical footprinting of control and H1-containing dinucleosomes. (A) Sequencing gel analysis of •OH cleavage of dinucleosomes with <sup>32</sup>P label incorporated at the 3' end of the upper DNA strand. Lane 1, •OH cleavage pattern of the naked DNA template; lanes 2–5, •OH cleavage pattern of control and H1-containing dinucleosomes. The triangle and the asterisk highlight the digestion products of the central part and the ends of the linker DNA region, respectively. (B) Same as A but for dinucleosomes reconstituted with <sup>32</sup>P 3'-end-labeled lower DNA strand. (C) Scans of the •OH digestion pattern in the vicinity of the nucleosome dyad of control (Black) and H1-containing (Red) dinucleosomes.

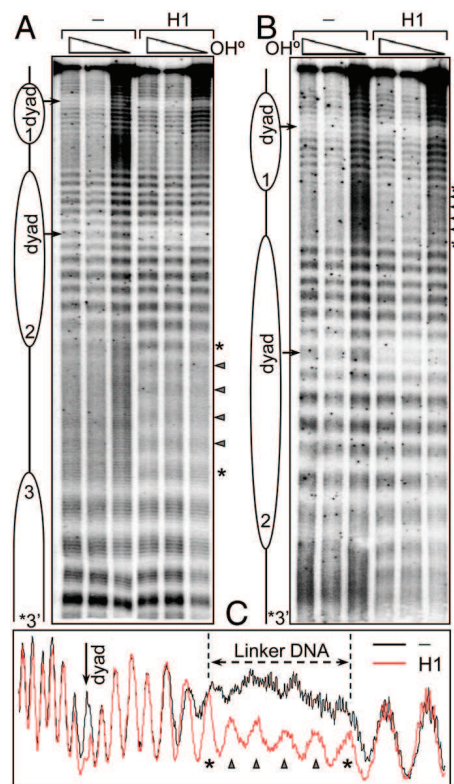


**Fig. 4.** Hydroxyl radical footprinting of control and H1 truncation mutants bound to dinucleosomes. The gel shows dinucleosomes in the absence of H1 (-) and in the presence of H1 or truncation mutants, as indicated on the left. Scans of the •OH cleavage patterns depicted in the gel are shown (Bottom). Cleavage products within the central part of the linker DNA are indicated by triangles, whereas asterisks indicate the 10 bp at either end of the linker DNA adjacent to the core region.

caused by H1 binding per se, and not H1-induced internucleosome interactions (Fig. S3).

#### The H1 Globular Domain Alone Protects 10 bp of DNA at the Nucleosome Dyad and DNA Beyond the Edge of the Nucleosome Core Region.

To determine the domain(s) of histone H1 required for the observed protection of the nucleosome against •OH cleavage,



**Fig. 5.** Hydroxyl radical footprinting of H1 bound to trinucleosomes. (A) •OH cleavage pattern of trinucleosomes without H1 (lanes 1–3) and with H1 (lanes 4–6). (B) shows the same samples as in A except run longer for better resolution of the linker region. (C) Scans of the •OH cleavage pattern of control, without H1 (Black) and H1-containing (Red) trinucleosomes.

we employed truncation mutants in the footprinting assay. We first concentrated on the globular domain of histone H1, GH1 (aa 40–112; see Fig. 1). As seen in Fig. 4, the association of GH1 with dinucleosomes resulted in a clear protection of the dyad similar to that observed with full-length H1, with ~10 bp of DNA located symmetrically about the dyad protected against •OH cleavage. Note that the binding of the slightly larger (compared to GH1) 35–120 mutant of H1 (containing an additional 5 and 8 aa from the H1 NH<sub>2</sub> and the COOH terminus, respectively) resulted in a footprint identical to that of GH1 (Fig. 4). Importantly, the association of this mutant with the mononucleosome (Fig. S3) led to the same pattern of protection of the dyad. Therefore, the globular domain of histone H1 interacts specifically with the central 10 bp of DNA in the nucleosome.

In addition to the protection of the dyad, the presence of either GH1 (aa 40–112) or the 35–120 H1 mutant in the dinucleosome also resulted in a symmetrical ~10 bp extension of DNA protection at both ends of the nucleosome core (Fig. 4, *Asterisks*). This additional protection of linker DNA was also observed in mononucleosomes bound by both GH1 and the 35–120 H1 mutant (Fig. S3). Taken together, the data described above demonstrate highly specific binding of the globular domain of H1 with 10 bp of DNA located precisely at the nucleosome dyad and an additional interaction with a total of ~20 bp of linker DNA distributed evenly at either end of the nucleosome core region.

#### Amino Acid Residues 121–127 of the H1 COOH Terminus Are Necessary for the Generation of the 10-bp Repeat in the •OH Cleavage Pattern of Linker DNA.

The footprints of nucleosomes associated with the histone H1 globular domain did not show a 10-bp repeat in the linker DNA, as was observed with full-length histone H1-bound particles. This suggested that either the NH<sub>2</sub> or the COOH termini of H1 or both are required for the generation of this repeat. We initially approached this question by studying the •OH cleavage pattern of dinucleosomes bound by H1 C terminus truncation mutant 1–127 (see Fig. 1 for details). Mono- and dinucleosomes bound by the deletion protein exhibited a 10-bp repeat in the linker DNA (Fig. 4 and Fig. S3). This indicated that either the NH<sub>2</sub> terminus or the portion of the C terminus remaining in the mutant or both are required for the generation of the repeat. To differentiate between these possibilities, we next carried out •OH footprinting of mono- and dinucleosomes assembled with the 35–127 truncation mutant of histone H1 in which the majority of the NH<sub>2</sub> terminus (35 aa) and 100 aa from the COOH terminus of histone H1 were removed. Both mononucleosomal and dinucleosomal particles bound by the 35–127 mutant showed a clear 10-bp repeat in the cleavage pattern of the linker DNA (Fig. 4 and Fig. S3). These results show that the NH<sub>2</sub> terminus is not required for the 10-bp repeat of the linker. Furthermore, because the linker repeat was not detected in 35–120 H1 mutant-associated particles, we conclude that a stretch of only seven aa (aa 121–127) within the COOH terminus of H1 plays the predominant role in the generation of the 10-bp repeat and thus in the structuring of the linker DNA.

#### Discussion

Our data resolve a long-standing issue in defining the structure of the nucleosome, the fundamental repeating subunit of eukaryotic chromatin, and shed light on how H1 binds to and organizes nucleosomal DNA. Despite numerous studies, the location and the interactions of the different domains of the linker histone with nucleosomal DNA have remained an unresolved and controversial issue. Many studies have focused on locating the binding site for the globular domain, which is responsible for structure-specific recognition of the nucleosome (13, 14). Past studies on the basis of the digestion of native chromatin with micrococcal nuclease and DNase I suggested a symmetrical model of the interaction of the linker histone with the nucleosome (11, 13, 15).

According to this model the linker histone interacts with both the dyad and the entering and exiting DNA from the core particle. More recently, cross-linking studies of the globular domain (GH5) of the linker histone H5 to nucleosomal DNA pointed to a “bridging model,” where GH5 interacts with DNA near the dyad and with only one (either the exiting or entering) of the linker DNA arms (16). Other studies using cross-linking and site-directed cleavage methods to map DNA contacts of H1 within reconstituted positioned 5S nucleosomes led to a proposal for an asymmetric location of the globular domain inside the gyres of DNA at a distance of ~65 bp from the dyad (17, 18). A recent experiment employing in vivo photobleaching microscopy supported the existence of two distinct DNA binding sites within the globular domain of the linker histone H1° and suggested that GH1° interacts with the DNA major groove about 10 bp from the dyad and with only one of the linker DNA arms adjacent to the nucleosome core (19).

Several factors likely contribute to the incongruence among the reported data. The previous in vitro studies used salt dialysis or direct binding to deposit histone H1 on the nucleosomes, which may have led to only a fraction of the nucleosomes exhibiting a proper 1:1 stoichiometric association with H1. In addition, the reconstitution on 5S DNA results in the formation of nucleosomes exhibiting multiple translational positions, which, in turn, would interfere with the mapping of histone H1:nucleosomal DNA contacts (10). The in vivo photobleaching studies suggested two regions for nucleosome interaction on the globular domain of H1° but modeling was constrained by assumptions regarding interactions with the linker DNA.

In this work we have overcome the above problems by using (i) a physiologically relevant linker histone chaperone (NAP-1) for deposition of histone H1, (ii) the 601 DNA sequence for nucleosome reconstitution, and (iii) a combination of ECM and •OH footprinting techniques. These approaches have allowed the reconstitution of precisely positioned nucleosomal templates containing physiologically assembled histone H1 or truncated mutants, mapping histone H1:DNA interactions within mono-, di-, and trinucleosomal templates at single-base resolution, and dissection of the role of distinct H1 domains in the 3D organization of the structures. The ECM data demonstrated that our reconstituted H1-containing trinucleosomes were visually indistinguishable from native trinucleosomes (2). Importantly, the presence of either full-length H1 or the 1–127 COOH terminus truncation mutant led to the generation of the characteristic stem structure of the linker DNA observed in native fibers (2). Hydroxyl radical footprinting showed that binding of full-length H1 caused the appearance of a clear 10-bp repeat in the •OH cleavage pattern along the entire length of the linker DNA. We attribute this repeat pattern as reflecting the H1-induced stem structure of the linker. Interestingly, in addition to the globular domain (35–120), only a seven amino acid residue stretch (aa 121–127) of the C terminus of H1 enriched in basic residues appeared to be necessary and sufficient for the induction of the 10-bp repeat and thus for the structuring of the linker DNA.

A second critical feature of the •OH cleavage patterns was the striking H1-dependent protection of DNA at the nucleosome dyad. In mono-, di-, and trinucleosomes, 10 bp of DNA located symmetrically about the dyad were clearly and consistently protected against •OH cleavage. This highly specific protection was also observed with all samples assembled with GH1. The corresponding patterns of protection on opposite DNA strands indicate that GH1 interacts with the minor groove of DNA in the center of the nucleosome, with the 10-bp binding site centered on the nucleosome dyad. Importantly, in addition to the protection of the dyad, GH1 binding alone also resulted in the protection of ~1 additional helical turn of DNA at each edge of the nucleosome core region, suggesting a direct and



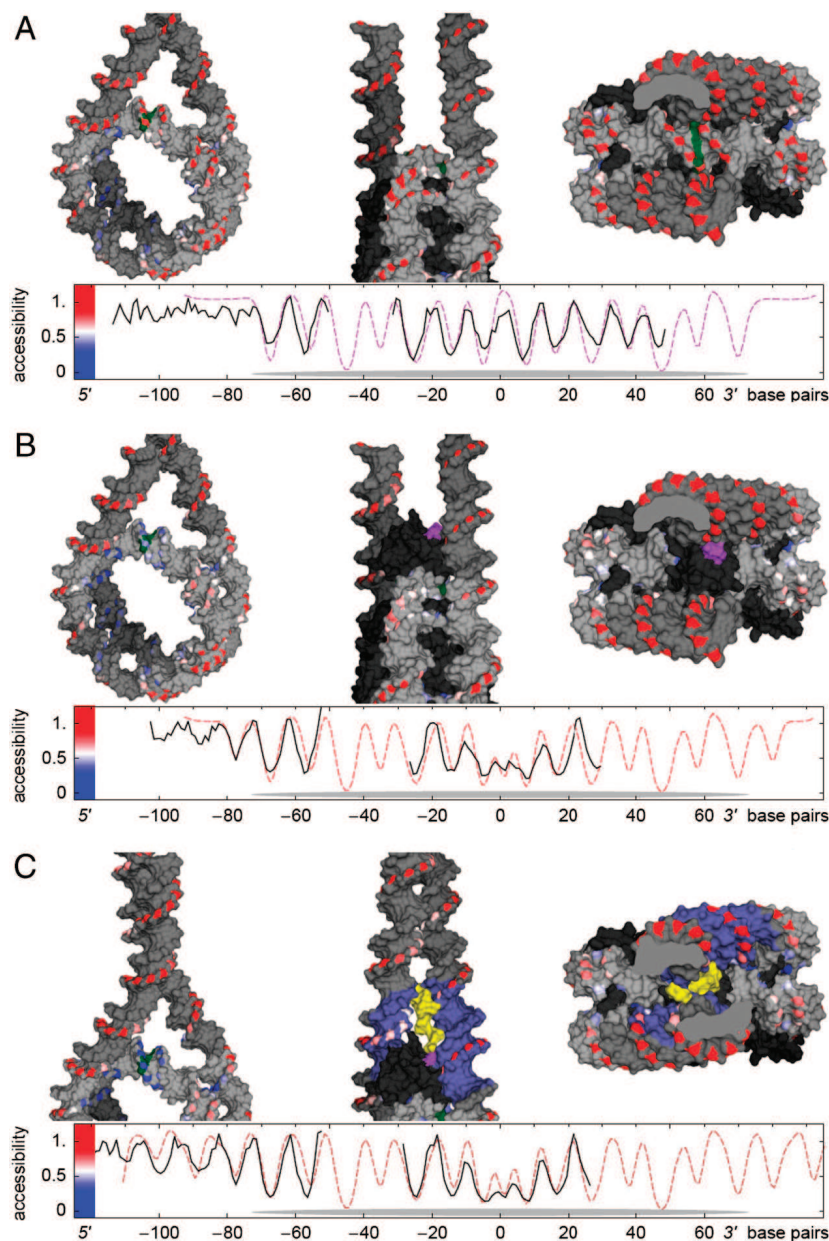
simultaneous interaction with both the DNA helices entering and exiting the nucleosome (see below).

The  $\bullet$ OH radicals used in the footprinting are known to primarily attack the C5' carbon atoms of the backbone sugars (20), allowing us to pinpoint protected sites in 3D molecular models of the nucleosome with Angstrom resolution. As a complementary test of proposed structures, we have determined protection patterns from the accessible surfaces of the C5' unified atoms (*SI Materials and Methods* and Fig. S4). The organization of the nucleosome without H1 bound is presented in Fig. 6*A* (*Upper* and *Movie S1*). Sites protected from  $\bullet$ OH cleavage (in blue) are located exclusively on the inside of the DNA superhelix and correspond to the DNA–histone octamer interface, whereas the outward-facing DNA (including the region around the dyad and the linkers) is freely accessible to  $\bullet$ OH (in red). The predicted accessibility profile (Fig. 6*A*, *Lower*) accurately reproduces the experimentally determined accessibilities (linear correlation coefficient  $R = 0.79$ ), thus validating our approach.

To discriminate between models for the structure of nucleosomes containing the globular domain of the linker histone (16, 17, 19, 21), we built corresponding structures by manually

placing a GH1 solution structure (22) into the nucleosome (see *SI Materials and Methods* and Fig. S5). The calculated footprinting pattern of a three-contact GH1–nucleosome particle on the basis of a model for the placement of H5 (GH5) by Fan and Roberts (21) (Fig. 6*B*, *Upper* and *Movie S2*) matches very well the experimental pattern: Both the dyad and  $\sim 1$  helical turn of the linker DNA to either side of the core region are protected against  $\bullet$ OH cleavage (Fig. 6*B*, *Lower*). In contrast, the suggested two-contact models (16, 17, 19) were incompatible with the strong protection observed at the dyad (see *Movies S3* and *S4* and Fig. S5).

For the linker DNA stem, which is formed with full-length H1 or the truncated mutants 1–127 or 35–127, models on the basis of high-resolution structural studies are not available. In this case the detailed register of the protected sites along the stem provides valuable structural information. To model the stem structure, we have aligned the linkers in space in such a way that their mutual protection reproduces the measured accessibility profile. We have assumed that the alignment was facilitated by neutralization of the linker DNA phosphates through interactions of the COOH terminus of H1 and NH<sub>2</sub> terminus of histone H3 [which is known



**Fig. 6.** Molecular models for the nucleosome particle. (A) Model of the nucleosome without H1. The model of the nucleosomal DNA alone and two views of the nucleosome with histones are shown in the top panel. The experimental  $\bullet$ OH-accessibility profile is depicted on the three-dimensional nucleosome structure by color coding the DNA deoxyribose C5' atoms from blue (maximal protection) to white (partial protection) to red (maximal accessibility). DNA C5' atoms without footprinting data and all other DNA are shown in gray, the dyad in green. Protein is shown in black (omitted in the left column). Views shown, from left to right, are (i) rotated sideways and up by 30° from the NCP superhelical axis, (ii) at right angles to the superhelical and dyad axes, and (iii) along the dyad axis. The bottom panel shows plots of the experimental  $\bullet$ OH-accessibility profile (*Solid Line*) and the corresponding model-derived accessibility profile (*Dashed Line*). Nucleosome core region is indicated by the gray oval. (B) Modeling of the nucleosome associated with the globular domain (GH1) of histone H1. The upper panel illustrates the location of GH1 in the nucleosome in the three-contact model, as described in the text. Note that GH1 protects the dyad and directly interacts with 10 bp of each linker DNA. The C terminus of GH1 is highlighted in magenta. (C) Model of the nucleosome associated with 35–127 H1 mutant. The location of the 35–127 H1 mutant and the 3D organization of the linker DNA stem obtained from constrained DNA elastic relaxation were determined as described in the text. Note the strong protection of the dyad and the presence of the 10-bp repeat within the linker DNA (*Bottom*). DNA within a 30 Å radius of the GH1 C terminus is colored blue. A hypothetical conformation of aa 112–127 is shown in yellow. Because the location of 5 aa (35–39) sequence of the NH<sub>2</sub> terminus is not known, this sequence was not shown in the model.

to associate with the linker DNA (23)] and that the most likely stem structure has minimal DNA elastic energy (see *SI Materials and Methods*). The resulting calculated stem structure, which satisfies these requirements, is shown in Fig. 6C, *Upper*. By construction, the structure-derived accessibility profile matches well the experimental profile (Fig. 6C, *Lower*). In the minimal-energy configuration, the linkers come together along ~20–30 bases outside the core particle, slightly curving into a two-start superhelical stem with a large pitch of around 100–120 bp (Fig. 6C, *Upper*; see also *Movie S5*). This structure has, as the core particle itself, a twofold symmetry.

The footprinting and ECM data also allowed us to predict how the stem structure might be generated and maintained. The short sequence of H1 (aa 121–127) required for the formation of the stem contains three positively charged amino acid residues, namely, K122, K124, and K125 (see Fig. 1A). These three lysines, together with the neighboring lysine K120, would interact with both DNA linkers in the vicinity of the binding site of the COOH end of GH1 (Fig. 6C). The binding of these additional four lysine residues together with the binding of GH1 would be sufficient to clamp the exiting and entering DNA and to form the stem structure (Fig. 6C, *Upper* and *Movie S5*). We hypothesize that the remaining part of the COOH terminus of H1 (aa 128–227; see Fig. 1A) serves to further neutralize the DNA phosphates and to facilitate transient contacts between the linkers resulting in a partial protection against •OH cleavage beyond the spatial extension of the COOH terminus of H1. In agreement with this hypothesis, our statistical analysis (Fig. S1B) shows that the linker DNA stem formed with the truncated mutant 35–127 was less stable compared to that formed with either full-length H1 or the H1 truncated mutant 1–177.

## Materials and Methods

**Preparation of Proteins and Nucleosomal Substrate.** Mouse NAP-1 and histones were bacterially expressed and purified by anion and cation exchange chromatography, respectively. Mononucleosomal 601-DNA was PCR amplified, whereas dinucleosomal and trinucleosomal constructs were subcloned from the 33x 200–601 DNA array (kindly provided by Daniela Rhodes, Cambridge, UK). DNA substrates were <sup>32</sup>P end-labeled (see *SI Text*). Nucleosomal substrates were prepared by salt dialysis method and H1 was deposited by using NAP-1 as described in ref. 8.

**Hydroxyl Radical Footprinting and ECM.** Control and H1 (or deletion mutant) assembled nucleosome samples were buffer exchanged into quencher-free buffer (5 mM Tris, pH 7.5, 5 mM NaCl, and 0.25 mM EDTA) by repeated filtration through 100 kDa cutoff centrifuges. The samples were treated with hydroxyl radicals (see *SI Text*) and analyzed on sequencing gel. ECM of the samples was performed on 200 ng/μL samples as described earlier (2).

**Coarse-Grained Modeling.** Hydroxyl radical accessibility of the different nucleosome models was computed and compared with the experimental data (16, 19, 21). The •OH accessibility was visualized by the Chimera software (24). Energy minimization was performed to improve the modeling of linker DNA organization. For detailed procedure, see *SI Text*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale de Recherches "EPIVAR" 08-BLAN-0320-02 (to S.D.), ANR-09-BLAN-NT09-485720 "CHROREMBER" (to D.A., J.B., and S.D.), the Association pour la Recherche sur le Cancer [Grant 4821 (to D.A.)], the Région Rhône-Alpes [Convention CIBLE 2008 (to D.A. and S.D.)], and the European Community's Seventh Framework Program FP7/2007-2013, Grant 2220085. J.B. acknowledges the support of the Czech Grants LC535, MSM0021620806, and AV0Z50110509. J.J.H. acknowledges National Institutes of Health Grant GM52426.

- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
- Bednar J, et al. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(24):14173–14178.
- Hamiche A, Schultz P, Ramakrishnan V, Oudet P, Prunell A (1996) Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J Mol Biol* 257(1):30–42.
- Dimitrov SI, Russanova VR, Pashev IG (1987) The globular domain of histone H5 is internally located in the 30 nm chromatin fiber: An immunological study. *EMBO J* 6(8):2387–2392.
- Russanova VR, Dimitrov SI, Makarov VL, Pashev IG (1987) Accessibility of the globular domain of histones H1 and H5 to antibodies upon folding of chromatin. *Eur J Biochem* 167(2):321–326.
- Zlatanova J, Seebart C, Tomschik M (2008) The linker-protein network: Control of nucleosomal DNA accessibility. *Trends Biochem Sci* 33(6):247–253.
- Clark DJ, Thomas JO (1986) Salt-dependent co-operative interaction of histone H1 with linear DNA. *J Mol Biol* 187(4):569–580.
- Shintomi K, et al. (2005) Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(23):8210–8215.
- Saeki H, et al. (2005) Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(16):5697–5702.
- Howe L, Ausio J (1998) Nucleosome translational position, not histone acetylation, determines TFIIIA binding to nucleosomal *Xenopus laevis* 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol* 18(3):1156–1162.
- Staynov DZ, Crane-Robinson C (1988) Footprinting of linker histones H5 and H1 on the nucleosome. *EMBO J* 7(12):3685–3691.
- Tullius TD (1988) DNA footprinting with hydroxyl radical. *Nature* 332(6165):663–664.
- Allan J, Hartman PG, Crane-Robinson C, Aviles FX (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288(5792):675–679.
- Crane-Robinson C (1999) How do linker histones mediate differential gene expression? *Bioessays* 21(5):367–371.
- Simpson RT (1978) Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17(25):5524–5531.
- Zhou YB, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muyldermans S (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395(6700):402–405.
- Pruss D, et al. (1996) An asymmetric model for the nucleosome: A binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* 274(5287):614–617.
- Hayes JJ, Kaplan R, Ura K, Pruss D, Wolffe A (1996) A putative DNA binding surface in the globular domain of a linker histone is not essential for specific binding to the nucleosome. *J Biol Chem* 271(42):25817–25822.
- Brown DT, Izard T, Misteli T (2006) Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 13(3):250–255.
- Balasuubramanian B, Pogozelski WK, Tullius TD (1998) DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17):9738–9743.
- Fan L, Roberts VA (2006) Complex of linker histone H5 with the nucleosome and its implications for chromatin packing. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(22):8384–8389.
- Cerf C, et al. (1994) Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: Full assignment, tertiary structure, and comparison with the globular domain of histone H5. *Biochemistry* 33(37):11079–11086.
- Stefanovsky V, Dimitrov SI, Russanova VR, Angelov D, Pashev IG (1989) Laser-induced crosslinking of histones to DNA in chromatin and core particles: implications in studying histone-DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 17(23):10069–10081.
- Pettersen EF, et al. (2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605–1612.

# The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling

Manu Shubdarshan Shukla<sup>1,2</sup>, Sajad Hussain Syed<sup>1,2</sup>, Damien Goutte-Gattat<sup>1</sup>, John Lalith Charles Richard<sup>1,2</sup>, Fabien Montel<sup>3</sup>, Ali Hamiche<sup>4</sup>, Andrew Travers<sup>5,6</sup>, Cendrine Faivre-Moskalenko<sup>3</sup>, Jan Bednar<sup>7,8,9</sup>, Jeffrey J. Hayes<sup>10</sup>, Dimitar Angelov<sup>2,\*</sup> and Stefan Dimitrov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Joseph Fourier - Grenoble 1; INSERM Institut Albert Bonniot, U823, Site Santé-BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, <sup>2</sup>Université de Lyon, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS-UMR 5239/INRA 1237/IFR128 Biosciences, Ecole Normale Supérieure de Lyon, <sup>3</sup>Université de Lyon, Laboratoire de Physique (CNRS UMR 5672) Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, <sup>4</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France, <sup>5</sup>MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK, <sup>6</sup>Fondation Pierre-Gilles de Gennes pour la Recherche, c/o LBPA, École Normale Supérieure de Cachan, 61 Avenue de Président Wilson, 94235 Cachan Cedex, France, <sup>7</sup>Institute of Cellular Biology and Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, <sup>8</sup>Department of Cell Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Albertov 4, 128 01 Prague 2, Czech Republic, <sup>9</sup>CNRS, Laboratoire de Spectrométrie Physique, UMR 5588, BP87, 140 Av. de la Physique, 38402 St. Martin d'Heres Cedex, France and <sup>10</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester NY 14642, USA

Received August 24, 2010; Revised November 1, 2010; Accepted November 2, 2010

## ABSTRACT

Histone variants within the H2A family show high divergences in their C-terminal regions. In this work, we have studied how these divergences and in particular, how a part of the H2A COOH-terminus, the docking domain, is implicated in both structural and functional properties of the nucleosome. Using biochemical methods in combination with Atomic Force Microscopy and Electron Cryo-Microscopy, we show that the H2A-docking domain is a key structural feature within the nucleosome. Deletion of this domain or replacement with the incomplete docking domain from the variant H2A.Bbd results in significant structural alterations in the nucleosome, including an increase in overall accessibility to nucleases, un-wrapping of ~10bp of DNA from each end of the nucleosome and associated changes in the entry/exit angle of DNA ends. These structural

alterations are associated with a reduced ability of the chromatin remodeler RSC to both remodel and mobilize the nucleosomes. Linker histone H1 binding is also abrogated in nucleosomes containing the incomplete docking domain of H2A.Bbd. Our data illustrate the unique role of the H2A-docking domain in coordinating the structural-functional aspects of the nucleosome properties. Moreover, our data suggest that incorporation of a 'defective' docking domain may be a primary structural role of H2A.Bbd in chromatin.

## INTRODUCTION

Eukaryotic chromatin is a highly dynamic structure, which regulates the functional aspects of the genome through its different structural states. Nucleosomes constitute the fundamental building blocks of chromatin and consist of an octamer of core histones containing two

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 472 728 898; Fax: +33 472 728 080; Email: dimitar.angelov@ens-lyon.fr  
Correspondence may also be addressed to Stefan Dimitrov. Tel: +33 476 549 473; Fax: +33 476 549 595; Email: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

copies each of H2A, H2B, H3 and H4, around which 146 bp of DNA is wound in  $\sim 1.65$  superhelical turns (1). A fifth histone, termed the linker histone, is associated with the linker DNA, which determines the trajectory of incoming and outgoing linker DNAs and facilitates interaction among neighboring nucleosomes (2,3). The binding of linker histones to nucleosomes is a major *in vivo* determinant of chromatin condensation (4). The core histones are comprised of a structured histone fold domain and unstructured NH<sub>2</sub>-termini (5). The linker histones and the NH<sub>2</sub>-termini of the core histones as well as their posttranslational modifications are required for the proper organization of both the chromatin fiber and the mitotic chromosomes (6–9). It is becoming increasingly clear now that the structural properties of individual nucleosomes dictate the local structure of chromatin, which may lead to specialized functional zones (10–12).

Two well-known modes to modulate individual nucleosome properties are covalent modifications (acetylation, methylation, ubiquitination, etc.) of core histones and ATP-dependent chromatin remodeling (13). An emerging concept in regulation of chromatin dynamics is incorporation of core histone variants within the nucleosome (14,15). Histone variants are non-allelic isoforms of conventional histones (2). The primary structure of histone variants shows various degrees of homology with the corresponding conventional major histone species. Incorporation of histone variants imparts new structural and functional properties to nucleosomes (12,16–26). The histone H2A family encompasses the greatest diversity of variants among core histones (14,27).

The members of the histone H2A family (H2A.1, H2A.X, H2A.Z, mH2A, H2A.Bbd, H2A.L2) show significant sequence variability at both NH<sub>2</sub>- and COOH-termini (28,29). While the implications of NH<sub>2</sub>-terminal heterogeneity still remain unclear, most of the recent work has been focused on COOH-terminal domain variations (12,16,17,21,24). Initially, it was demonstrated that the carboxyl terminal tail of H2A is essential for the stability of nucleosomal particles and that the H2A–H2B dimer displays a significant decrease in the affinity for the (H3–H4)<sub>2</sub> tetramer when the terminal 15 amino acids are removed by an endogenous protease (30). Interestingly, one of the latest described H2A variants, H2A.Bbd, exhibits a similar COOH-terminal truncation, i.e. an absence of both the COOH terminus and the very last segment of the docking domain which spans amino acids 82–119 in conventional H2A (31).

Nucleosomes-containing H2A.Bbd exhibit significant structural alterations, including a more relaxed structure and organization with only  $\sim 130$  bp of DNA in tight association with the core histones, in contrast to  $\sim 147$  bp in canonical nucleosome core particles (NCPs), suggesting release of  $\sim 10$ -bp nucleosomal DNA from each end of the octamer (19). Moreover, the H2A.Bbd–H2B dimer is less strongly associated with the H3/H4 tetramer resulting in lower stability of nucleosomes containing this variant (12,16,17,24). These reports suggest that the docking domain of H2A might be a key feature in maintaining the native structural and functional properties of the nucleosome.

In this work, we have elucidated the role of the docking domain of H2A in nucleosome remodeling and linker histone binding, two major factors which regulate chromatin dynamics. By using a series of COOH-truncated H2A mutants we show that the docking domain of H2A is required for both nucleosome remodeling and mobilization by RSC. In agreement with this, we found that RSC was unable to mobilize nucleosomes-containing H2A.ddBbd, a chimera of the histone-fold domain of H2A fused to the incomplete and significantly divergent docking domain of H2A.Bbd. We also demonstrate that the docking domain of H2A.Bbd induces strong alterations in nucleosome structure, resulting in the inability of linker histone H1 to bind to nucleosomal arrays containing this mutant and the abrogation of nucleosome remodeling by RSC.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of DNA probes

The 255-bp DNA probe was PCR amplified from pGEM-3Z-601 plasmid containing 601 positioning sequence in the middle (kindly provided by J. Widom and B. Bartholomew). The 5'-end labeling was performed by using <sup>32</sup>P-labeled primer in the PCR. For 'One Pot Restriction enzyme Assay' a set of eight pGEM-3Z-601.2 mutants were used as a template, each containing *Hae* III site at a different superhelical location, as described before (39). Briefly, a 278-bp fragment was amplified by PCR and 5'-end labeling was performed. Labeling of the fragment was done as described above. For DNaseI and  $\bullet$ OH footprinting a *Not*I restricted 205-bp 601 fragment was 3'-labeled using Klenow enzyme with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP in the presence of 50  $\mu$ M dGTP. All the DNA fragments were purified on 6% Native acrylamide gel prior to use for nucleosome reconstitutions. The 255-bp cold 601.1 DNA was amplified using PCR for reconstitution of nucleosomes used in AFM experiments. For H1-binding band-shift experiment, a 189-bp was PCR amplified and body labeled using  $\alpha$ -<sup>32</sup>P CTP. For hydroxyl radical footprinting and Electron Cryo-Microscopy (EC-M) to examine H1 binding, respective dinucleosomal and trinucleosomal DNA substrates were prepared as described (32).

### Proteins

pET3a, containing *Xenopus laevis* H2A between *Nde*I and *Bam*HI sites was used as the parent clone for construction of H2A C-terminal deletion mutants. ORFs corresponding to H2A  $\Delta$ 109,  $\Delta$ 97,  $\Delta$ 90 and  $\Delta$ 79 were PCR amplified and cloned into *Nde*I and *Bam*HI digested pET3a vector. H2A.ddBbd chimera was generated as described (19). All the recombinant histone proteins including full length *X. laevis* H2A, H2B, H3 and H4 were expressed in form of inclusion bodies in *Escherichia coli* Strain BL21(DE3) and purified as described (33). Yeast RSC complexes were purified as described (34). Full length human H1.5 clone was expressed in *E. coli* BL21-RIL strain and purified by SP-sepharose, followed by a second-step purification on Resource S cation exchange column. Mouse NAP-1

(mNAP-1) was also bacterially expressed and purified by Resource Q anion exchange column.

### Nucleosome reconstitutions

Nucleosome reconstitution was performed by the salt dialysis procedure (35). Briefly, 2.4  $\mu$ g Chicken erythrocyte Carrier DNA (200 bp average size) and 100 ng of either  $^{32}$ P-labeled 255-bp 601, *NotI* restricted 601.1 fragment, 189-bp 601 DNA or an equimolar mixture of eight different 278-bp 601.2 mutant DNA fragments (100 ng) 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  $\beta$  MeEtOH. Reconstitutions with unlabeled 255- and 623-bp unlabeled 601 DNA were also performed in absence of carrier DNA. In case of nucleosome reconstitutions with H2A deletion mutant or H2A.ddBbd proteins, H2A was replaced by an equimolar amount of corresponding protein in the histone octamer. All the nucleosome reconstitutions were verified on 5% native PAGE run with 0.25X TBE.

### DNaseI and hydroxyl radical footprinting

The 30 ng of nucleosomes, reconstituted on *Not I* digested 601 fragment, were digested with DNaseI in a volume of 7.5  $\mu$ l buffer (10 mM Tris pH 7.4, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml BSA, 50 mM NaCl, 0.01% NP40) for 2.5 min at room temperature. Additionally 1  $\mu$ g of plasmid DNA was added to the reaction mixture. Increasing amounts of DNase I (0.2, 0.3 and 0.45 units, respectively) were added to reactions. Reactions were arrested by adding 100  $\mu$ l of 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Hydroxyl radical footprinting was performed as essentially as described (36). DNA was phenol:chloroform extracted, precipitated and run on 8% denaturing PAGE. Gels were dried, exposed and imaged on phosphorimager (Fuji-FLA5100).  $\bullet$ OH footprinting on H1 deposited dinucleosomes was performed as described (32).

### AFM analysis

For the AFM imaging, 255 bp centrally positioned nucleosomes containing either H2A or H2A.ddBbd were immobilized onto APTES-mica surfaces as described previously. Image acquisition and analysis was done and DNA-complexed length ( $L_c$ ) and position ( $\Delta L$ ) distributions were constructed as described (19,37).

### H1 deposition

Full length human H1.5 was mixed with mNAP-1 in a 1:2 molar ratio (20 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT/10% glycerol, 0.1 mM PMSF) and incubated at 30°C for 15 min. These H1-mNAP1 complexes were then added increasing molar ratios (0.9, 1.25, 2.0) to nucleosomes (50 ng) reconstituted on 189-bp 601 DNA and incubated for another 15 min at 30°C. Binding efficiency was checked on a 2% agarose gel (0.25X TBE). For the E-CM experiments, a molar ratio of 1:2 (Trinucleosome: H1/Nap1) was used.

### EC-M

Histone H1 was deposited on to trinucleosomes as described above. The final reaction mixes (with or without H1) were concentrated to 200 ng/ml of DNA. Samples were prepared for cryo-electron microscopy essentially as described (19,32). A 3- $\mu$ l droplet of the solution was deposited on an electron microscopy grid with homemade perforated supporting film with surface treated by successive evaporation of carbon and platinum/carbon layers. The grid was immediately plunged into liquid ethane ( $-183^\circ\text{C}$ ) after removing the excess of the solution by brief blotting using Whatman No 1 filter paper. The Grid was transferred into Tecnai G2 Sphera 20 electron microscope using Gatan 626 cryotransfer holder. Sample was visualized at 80 kV acceleration voltage and images were recorded on Gatan Ultrascan1000 slow scan CCD camera at microscope nominal magnification either 14500 $\times$  or 25000 $\times$  (final pixel size 0.7 and 0.4 nm) with 2.5  $\mu$ m underfocus.

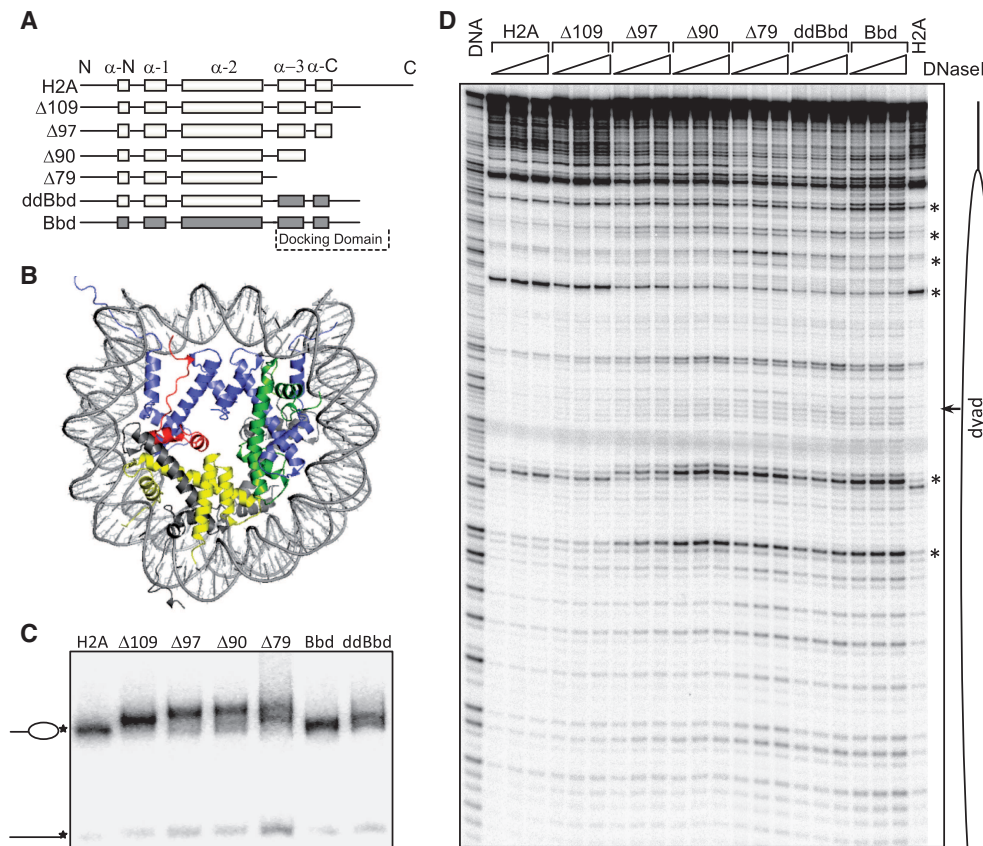
### Nucleosome mobilization and remodeling assays

Nucleosome mobilization reactions were performed with 30 ng of nucleosomes in remodeling buffer (RB) 10 mM Tris pH 7.4, 5% glycerol, 1 mM rATP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml BSA, 50 mM NaCl, 0.01% NP40) in a volume of 7.5  $\mu$ l at 29°C. RSC units were defined as described before (38). Nucleosomes were incubated with increasing amount of RSC for 45 min. Reactions were arrested by addition of 0.01 units of apyrase. Reaction products were resolved on 5% native PAGE. Gels were run in 0.25X TBE at room temperature and processed as described above. Sliding efficiency of indicated nucleosomes were calculated from quantification of gel scans. Remodeling assays were performed on nucleosomes reconstituted on *Not I* restricted 205-bp fragment (described above). Reaction conditions were similar to the nucleosome mobilization assays. Briefly, nucleosomes were remodeled in presence of 2.4 units of RSC for indicated time points and reactions were arrested by addition of 0.01 units of apyrase and 1  $\mu$ g plasmid DNA. Nucleosomes were then digested with 0.5 units of DNase I, processed and analysed as described above.

## RESULTS

### Deletion or alteration of the COOH-terminal region of H2A results in structural perturbations in the nucleosome

In order to understand the role of the COOH-terminal portion of H2A and the H2A-docking domain in nucleosome structure, we made serial COOH-deletion mutants using the *X. laevis* H2A protein as the parent clone (Figure 1A and Supplementary Figure S1A). Note that in the  $\Delta 79$  H2A mutant, both the docking domain and the COOH-terminus of H2A were completely deleted (Figure 1A and B). A chimeric protein, H2A.ddBbd, in which the docking domain of H2A was replaced with the docking domain of H2A.Bbd, was also constructed (Figure 1A). As controls, full length H2A and H2A.Bbd were used. All proteins were bacterially expressed and



**Figure 1.** Biochemical characterization of conventional, variant and mutant nucleosomes. (A) Cartoon drawing of H2A mutants used in the study. In H2A.ddBbd chimeric protein the docking domain and the last C-terminal part was replaced with docking domain of H2A.Bbd. (B) Structure of the NCP, modified from (1), to show the H2A docking domain within the NCP. H2A, H2B, H3 and H4 are shown in grey, yellow, blue and green, respectively. The docking domain of H2A (amino acids 82–118) is colored in red. (C) EMSA of the end-positioned conventional (lane 1), variant (lane 6), chimeric (lane 7) and mutant (lanes 2–5) nucleosomes reconstituted on 205 bp  $^{32}\text{P}$ -3'-labeled 601 DNA fragment. The 3'- $^{32}\text{P}$ -labeled position is indicated by an asterisk. Positions of nucleosomes and free DNA are indicated at the left of the figure. (D) DNase I footprinting of the nucleosomes described in (C). Nucleosomes were digested with increasing amount of DNase I (0.2, 0.3 and 0.45 units) for 2.5 min at room temperature (lanes 2–23). Free DNA (lane DNA) was digested with 0.01 units of DNase I under the same conditions. Major structural perturbations are indicated by asterisk. Position of nucleosomal dyad is indicated.

purified. The recombinant proteins were analyzed by 18% SDS-PAGE (Supplementary Figure S1B). Next, we used these recombinant proteins for nucleosome reconstitution. For this, nucleosome reconstitutions were performed using a salt-dialysis method and by replacing conventional H2A with mutant proteins in the reconstitution mixtures containing all four core histones and a 205-bp 601 DNA fragment. This DNA fragment strongly positions nucleosomes at one end and is an ideal substrate for DNase I based footprinting assays. Under the reconstitution conditions, very little free DNA was observed (with the exception of  $\Delta 79$  nucleosomes where the amount of free DNA was slightly higher), thus demonstrating efficient incorporation of mutant histones and reconstitution of *bona fide* nucleosomes in each case (Figure 1C). Note that the nucleosomes-containing deletion mutants of H2A exhibit a slower migration in the gel and this tendency increases with successive deletion in the COOH-terminal region. We attribute this to changes in conformation of linker DNA, which affects the migration in the gel (see below).

To test if the nucleosomes containing mutant and chimeric H2A exhibited, as suggested by their altered migration in native gel (Figure 1C), alterations in their structure, we have performed DNase I footprinting assays (Figure 1D). DNase I digestion of canonical nucleosomes gives a canonical 10-bp repeat, (19), indicative of the locations where the minor groove of nucleosomal DNA faces away from the histone surface and towards the solution. Incorporation of H2A  $\Delta 109$  in the nucleosome showed no major structural perturbations. However, subtle changes were observed in the vicinity of nucleosomal dyad. Further deletions of COOH terminal residues, i.e. H2A  $\Delta 97$ , which lacks the C-terminal section of the docking domain, and H2A  $\Delta 90$ , which lacks all of the COOH-terminal region as well as the last  $\alpha$ -helix of the docking domain, result in clear perturbation in the conformation of nucleosomal DNA. Similar perturbations are also seen when all of H2A COOH-terminal region as well the both  $\alpha$ -helices of the docking domain were deleted in nucleosomes-containing H2A  $\Delta 79$ , or when the H2A-docking domain was replaced with docking domain

of H2A.Bbd (H2A.ddBbd nucleosomes). Interestingly, nucleosomes containing H2A.ddBbd yield a DNase I digestion profile nearly identical to H2A.Bbd nucleosomes.

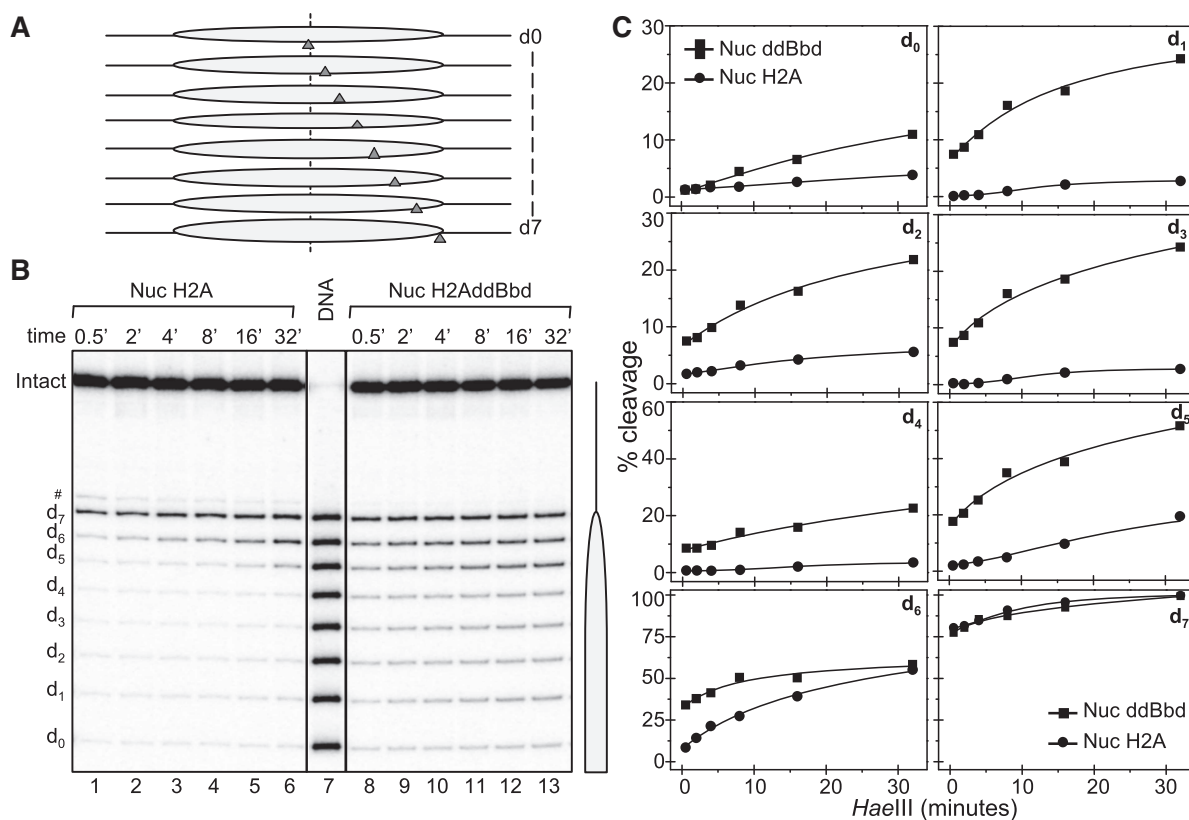
In parallel, we performed  $\bullet$ OH footprinting (Supplementary Figure S1C) on the same nucleosomes. All the nucleosomes show, as expected, a 10-bp repeat. The progressive deletion of the COOH-terminus of H2A affected, however, the quality of the  $\bullet$ OH digestion pattern, i.e. the contrast in the pattern decreased with increasing the length of the COOH-deleted sequence, with the  $\Delta$ 79 nucleosome being weaker compared to the parental H2A nucleosome pattern. Note that both H2A.Bbd and H2A.ddBbd nucleosomes exhibited  $\bullet$ OH digestion profiles very similar to that of  $\Delta$ 79 nucleosome. The DNase I and the  $\bullet$ OH-footprinting data, taken together, demonstrate that the lack of the docking domain or the presence of the docking domain of H2A.Bbd led to prominent structural perturbations within the nucleosomes.

### The docking domain of H2A stabilizes DNA wrapping throughout the nucleosome

To further study the role of the docking domain of H2A in the structure of the nucleosome, we used the ‘one pot’ assay to measure restriction enzyme accessibility all

along nucleosomal DNA in a single digestion reaction (39). Briefly, eight mutated 278-bp 601.2 DNA fragments [where each yields the same nucleosome positioning but has a unique *Hae* III restriction site, designated dyad-0 ( $d_0$ ) to  $d_7$ ], where the number indicates the number of helical turns from the dyad, see schematics, Figure 2A] (39), were mixed in an equimolar ratio and used to reconstitute either conventional or chimeric H2A.ddBbd nucleosomes. The reconstitutions were then digested with 5 U/ $\mu$ l *Hae* III at different time points and the digested DNA was purified and separated on a sequencing gel (Figure 2B). After exposure of the dried gel, product bands from the experiment were quantified and expressed as percentage of cut fractions (Figure 2C).

The accessibility of  $d_7$  (which is at the end of the core particle DNA) of the conventional H2A nucleosome differed from the other sites, since at the very initial points  $\sim$ 90% of this site was cleaved. A typical dynamic accessibility at  $d_6$  was also observed, where  $\sim$ 8–10% of this site was cleaved and reaches  $\sim$ 50% at the longest time of digestion (Figure 2B, lanes 1–6 and C). All the other *Hae* III sites were inaccessible to the restriction enzyme, in complete agreement with previous works (39,40). The picture is, however, completely different for the chimeric H2A.ddBbd nucleosomes (Figure 2B, lanes 8–13 and C).



**Figure 2.** One pot restriction accessibility assay of conventional and chimeric H2A.ddBbd nucleosomes. Both types of nucleosomes were digested with 5 U/ $\mu$ l *Hae* III for the times indicated and after arresting the reaction, the digested DNA was purified and run on a 8% PAGE under denaturing conditions. (A) Schematics of the one pot assay. (B) The gel shows *Hae* III digestion profile of conventional (lanes 1–6) and chimeric H2A.ddBbd (lanes 8–13) nucleosomes. Lane 7 represents naked DNA digested 0.5 U/ $\mu$ l *Hae* III. On the right part a drawing of the nucleosome is shown. (C) *Hae* III digestion profile of conventional (circles) and chimeric H2A.ddBbd (squares) nucleosomes, quantified from the gel image presented in (B).

Indeed, all the *Hae* III sites within the nucleosomal core showed significant accessibility even at the shorter time points of digestion. This accessibility reaches up to ~20–25% for sites 1–4. Site 5 was also much more accessible compared to canonical H2A nucleosomes, where ~20% of this site was cleaved in initial time points and reached to ~50% in highest time point. We attributed this effect as reflecting structural perturbations in histone–DNA interactions throughout the chimeric H2A.ddBbd nucleosomes. H2A.Bbd-containing nucleosomes showed a similar overall increase in accessibility profile (Supplementary Figure S2). Taken together, this indicates that the structural changes observed in the H2A.Bbd nucleosomes can be attributed to its defective domain to a large extent.

### The H2A-docking domain stabilizes the wrapping of one helical turn of DNA around the histone octamer at each edge of the nucleosome

The chimeric H2A.ddBbd nucleosomes showed altered DNase I and ●OH cleavage patterns as well as marked increases in *Hae* III accessibility all along the nucleosomal DNA. All these features are reminiscent of nucleosomes containing H2A.Bbd (16,17,19). Since H2A.Bbd nucleosomes are complexed with only ~130 bp of DNA, which in turn affects the entry/exit angle of the linker DNA (19), we wondered whether the H2A.ddBbd nucleosomes exhibited similar characteristics. We approached this question by using Atomic Force Microscopy (AFM).

We used AFM to measure the length of DNA complexed ( $L_c$ ) with the histone octamer in both conventional and H2A.ddBbd nucleosomes, centrally positioned on a 255-bp 601 DNA fragment (Figure 3A and B). Nucleosomes on this fragment exhibit two relatively long free DNA linkers, whose length can be precisely measured by AFM (21). This allows us to calculate both the length of DNA in complex with the histone octamer  $L_c$  ( $L_c = L_{tot} - L_+ - L_-$ , where  $L_{tot} = 255$  bp, the length of the 601 fragment used for reconstitution,  $L_+$  and  $L_-$  are the lengths of the DNA linkers, as measured from AFM images) and the variation relative to the DNA center position of the nucleosome  $\Delta L = (L_+ - L_-)/2$  (21). The data show that the H2A.ddBbd nucleosome is associated with only ~130-bp DNA, in contrast to the conventional nucleosome, determined to be associated with 146-bp DNA (Figure 3C). Note that the positions of both the conventional and the H2A.ddBbd nucleosomes were identical (Figure 3D). We conclude that the defective docking domain present in the H2A.ddBbd nucleosome affect the wrapping of ~10 bp of each end of the nucleosomal DNA but not the sequence-dependent positioning of the nucleosome on the DNA fragment.

### The docking domain of histone H2A is required for proper histone H1 binding to the nucleosome

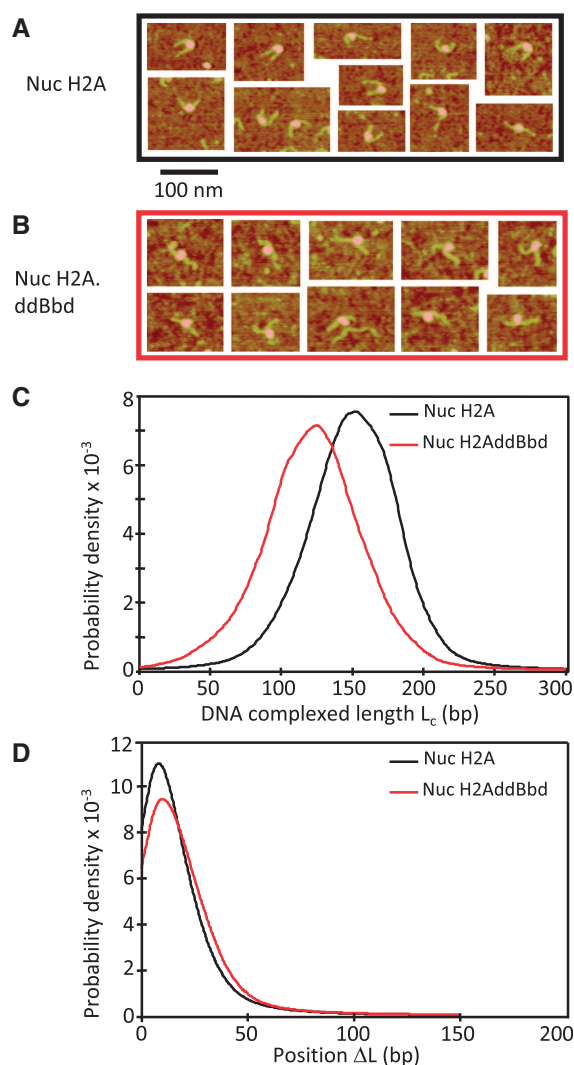
If the wrapping of the DNA is affected in H2A.ddBbd nucleosomes, which is especially pronounced at the ends, one should expect the entry/exit angle of nucleosomal DNA to be strongly altered and which might in turn affect the ability of linker histone to properly

bind to nucleosomes. We next examined this feature using Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), ●OH footprinting and EC-M.

First, we employed EMSA to examine the binding of linker histone H1 to mononucleosomal substrates. Nucleosomes containing either conventional H2A or chimeric H2A.ddBbd histones were reconstituted on a <sup>32</sup>P-labeled 189-bp 601 DNA sequence, which yields centrally positioned nucleosomes with 21 bp of linker DNA on either side of the nucleosome. Next, we used the method of Nap1-facilitated deposition of H1 on these nucleosomes (41). An increasing amount of H1–Nap1 complex (in a molar ratio of 1:2) was then added to H2A, H2A.Bbd and H2A.ddBbd nucleosomes. The binding reaction products were resolved on a 2% agarose gel (Figure 4A). As seen, the binding of H1 to conventional nucleosomes resulted in a well-defined band with slower electrophoretic mobility (Figure 4A, left panel), in agreement with previous results (41). However, in the case of H2A.Bbd nucleosomes, the electrophoretic pattern was somewhat different. Indeed, the presence of H1 induces a very diffuse band with slower electrophoretic mobility as well as a smearing all along the length of the gel (Figure 4A, middle panel). The picture was very similar in the case of H2A.ddBbd nucleosomes (Figure 4A, right panel). Also, a higher level of aggregation was observed in case of H2A.Bbd and H2A.ddBbd nucleosomes, suggesting improper binding of H1 to these nucleosomes.

To further examine H1 binding to these nucleosomes, we next employed hydroxyl radical footprinting. *Bona fide* binding of H1 to nucleosomes results in two characteristic alterations in the hydroxyl radical cleavage profile: a clear protection at the nucleosomal dyad and appearance of a 10-bp repeat structure in the linker DNA (32). We reconstituted H2A, H2A.Bbd and H2A.ddBbd dinucleosomes on a 423-end labeled DNA. Linker histone H1 was deposited on these dinucleosomal substrates as described above (also see Material and methods section) and ●OH footprinting was performed (Figure 4B). As expected, each one of the nucleosomes exhibits a 10-bp repeat in the region organized by the histone octamer and a random cleavage profile similar to naked DNA within the linker DNA region (Figure 4B lanes 1, 3 and 5; also see the lane scans in Supplementary Figure S3). The binding of linker histone H1 on the dinucleosomes-containing canonical H2A results in a clear footprint at the nucleosomal dyad as well as an appearance of 10-bp-repeat structure in the linker DNA (Figure 4B, lane 2 and Supplementary Figure S3). The picture was, however, completely different in the case of H2A.Bbd and H2A.ddBbd nucleosomes where neither of these characteristic features were obtained upon H1 deposition (Figure 4B, lanes 4 and 6 and Supplementary Figure S3). The ●OH cleavage profile remains essentially similar as in the absence of H1, clearly indicating that the absence of a canonical-docking domain results in complete abrogation of proper H1 binding to the nucleosomes. These results were further confirmed by visualization of H2A and H2A.ddBbd trinucleosomes by EC-M (Figure 4C). Typically, proper binding of linker histone





**Figure 3.** AFM imaging of conventional (H2A) and chimeric H2A.ddBbd nucleosomes. A 255-bp 601 DNA sequence was used to reconstitute centrally positioned conventional and H2AddBbd nucleosomes. The nucleosome samples were then visualized by AFM. Representative AFM images for the conventional (nuc H2A) and chimeric (nuc H2AddBbd) nucleosomes are shown in (A) and (B), respectively. (C) The complexed DNA length ( $L_c$ ) distribution for conventional and H2AddBbd nucleosomes is presented. Note that  $L_c$  peaks at  $\sim 130$  and  $\sim 150$  bp for the H2A.ddBbd and conventional nucleosomes, respectively. (D) Nucleosome position ( $\Delta L$ ) distribution for conventional and H2AddBbd nucleosomes. The numbers of particles used for the calculation of the distributions were  $N = 3247$  and 971 for conventional and H2A.ddBbd nucleosomes, respectively.

to nucleosomes or to nucleosomal arrays results in a specific spatial orientation of entry–exit DNA and the linker DNAs become juxtaposed to form a stem like structure (32,42). As expected, in the case of conventional H2A-containing trinucleosomes, the addition of H1 results in pulling together of incoming and outgoing linker DNAs towards the dyad axis (Figure 4C, upper panel). This leads to the formation of typical ‘stem structure’ (indicated by white arrows). Importantly, these H1-trinucleosome complexes were indistinguishable from

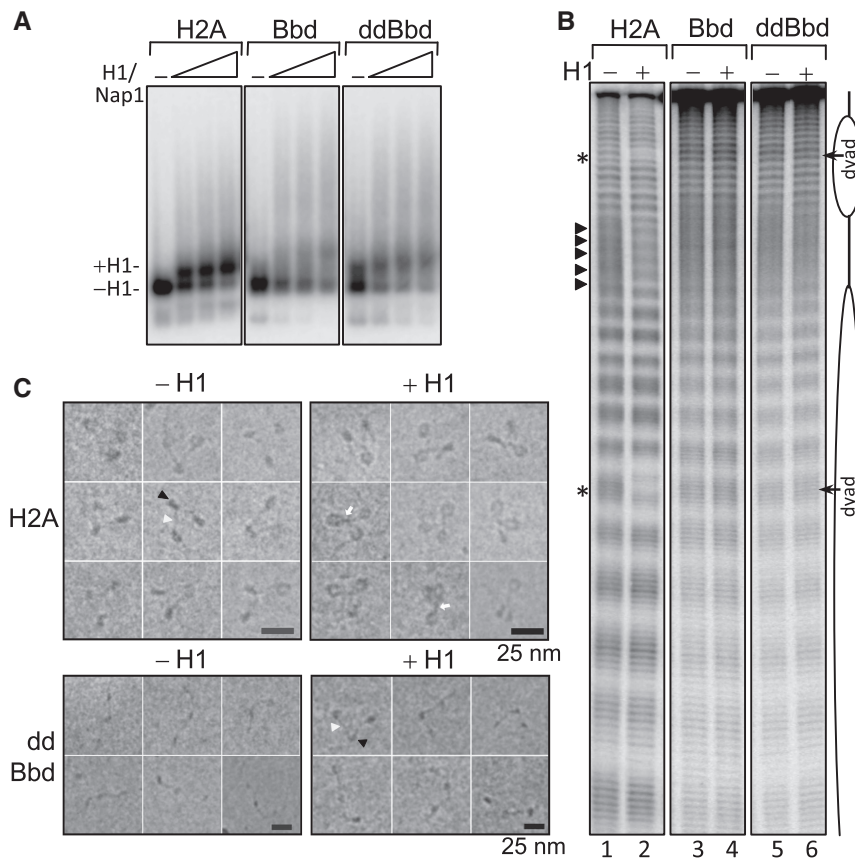
native H1-containing chromatin (42). The picture is, however, completely different in case of H2A.ddBbd containing trinucleosomes where no such stem structure was obtained in presence of H1 and the trinucleosomes retain their ‘beads on string structure’ with no change in entry–exit angle of DNA (Figure 4C, lower panel).

Taken together, these data clearly demonstrate that the docking domain of H2A is critical for the proper binding of H1 to nucleosomal substrates.

### The docking domain of H2A is required for both nucleosome remodeling and mobilization by RSC

It is well documented that H2A.Bbd-containing nucleosomes are refractory to SWI/SNF and ACF mediated remodeling and mobilization (16,19) as well as heat induced mobilization (17). Moreover, the observation that truncations in the H2A COOH-terminal domain and swapping the H2A-docking domain with that of H2A.Bbd resulted in perturbations similar to H2A.Bbd-containing nucleosomes led us to test whether these structural changes affect the capacity of RSC to act on nucleosomes. We first concentrated on nucleosome remodeling. To this end, we incubated the reconstituted nucleosomes (Figure 1) for different times with RSC in the presence of ATP. After arresting the remodeling reaction, the samples were digested with DNase I and the DNA analyzed on 8% sequencing gels (Figure 5). The prolonged incubation with RSC resulted in alterations of the DNase I cleavage pattern of conventional nucleosomes as several new bands corresponding to free DNA were observed. These changes in the cleavage pattern indicate efficient ATP-dependent remodeling by RSC, resulting in perturbations of the histone–DNA contacts (43). Upon incubation with RSC, very similar changes in the DNase I cleavage pattern were observed for  $\Delta 109$ ,  $\Delta 97$  and  $\Delta 90$  nucleosomes. However, in  $\Delta 90$  nucleosomes, the remodeling efficiency is reduced compared to nucleosomes containing full length H2A. Similarly, for the  $\Delta 79$ , H2A.ddBbd and H2A.Bbd particles, the efficiency of remodeling is progressively weakened (see the regions marked by asterisks). These results indicate a requirement for the H2A C-terminal region and especially the docking domain for efficient RSC remodeling of nucleosomes. Note that some structural alterations within the non-RSC treated  $\Delta 79$ , H2A.ddBbd and H2A.Bbd particles, reminiscent of these of the remodeled H2A,  $\Delta 109$ ,  $\Delta 97$  and  $\Delta 90$  particles, were also observed. The DNase I digestion pattern within these regions did not change after treatment with RSC (Figure 5, see the regions marked by  $\phi$  in the RSC 0' time control of these particles). This indicates the RSC activity on docking domain-deficient nucleosome results in a different conformation of remodeled species.

We next determined whether the H2A-docking domain is required for RSC-induced nucleosome mobilization. In this case, centrally positioned 601 nucleosomes were incubated with increasing amounts of RSC and the reaction products were resolved on 5% native PAGE (Figure 6A). Conventional H2A-containing nucleosomes are slid efficiently by RSC (Figure 6A and B). Indeed,



**Figure 4.** Examining linker histone H1 binding on mono and dinucleosomal substrates containing canonical, H2A.Bbd or H2A.ddBbd proteins. (A) EMSA to analyze the deposition of linker histone H1 on mononucleosomes.  $^{32}$ P-body-labeled 189-bp 601 DNA sequence was used to reconstitute centrally positioned nucleosomes containing conventional H2A, H2A.Bbd or H2A.ddBbd chimeric protein. Increasing concentrations of H1/Nap1 complex (1:2 molar ratio) were added to the nucleosomes. Positions of nucleosomes with or without bound H1 are denoted by arrows on the left. (B) Hydroxyl radical footprinting to examine the binding of H1 on dinucleosomes. Lane 1, 3 and 5 show control dinucleosomes containing H2A, H2A.Bbd and H2A.ddBbd respectively in absence of H1. Lanes 2, 4 and 6; same dinucleosomes in presence of H1. Respective positions of nucleosomes and linker DNAs are denoted by cartoon drawing.  $\bullet$ OH cleavage protection at the dyad and 10-bp repeat structure in the linker are shown by asterisks and triangles, respectively. (C) Representative EC-M images of reconstituted conventional and H2A.ddBbd trinucleosomes in absence (left panels) or in presence of linker histone H1 (right panels). A DNA-fragment containing three tandem repeats of 601 positioning sequence was used for reconstitution. The nucleosome and the linker DNA are indicated by black and white arrowheads, respectively. Note that the conventional nucleosomes exhibit, in agreement with the reported data, a typical equilateral triangle shape with two nucleosomes located at each end of the trinucleosomal DNA and a middle nucleosome. In contrast, the H2A.ddBbd trinucleosome particles, show a relaxed 'beads on a string' structure (lower row), evidencing for a perturbed 3D organization and changes in the entry/exit angle of the nucleosomal DNA ends.

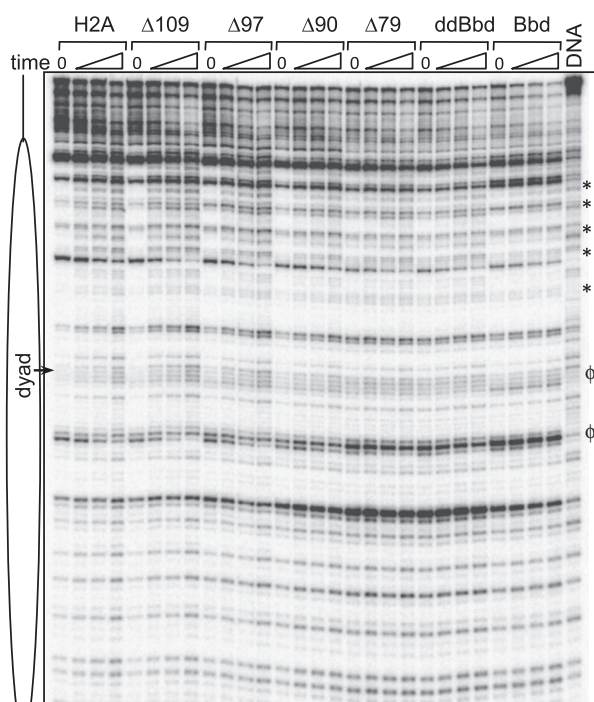
2.4U of RSC were sufficient to slide nucleosomes to saturation in 45 min. However, COOH-terminal truncations of H2A profoundly reduced the efficiency of RSC mediated nucleosome mobilization (Figure 6A and B). For example, upon incubation with 1.2U of RSC, ~60% of canonical nucleosomes, and only ~30% and ~15% of  $\Delta 97$  and  $\Delta 90$  nucleosomes were slid, respectively (Figure 6B). Even with highest amount of RSC the reduction in sliding efficiency on these nucleosomes is clearly seen (Figure 6B). Note that RSC was completely unable to mobilize  $\Delta 79$  and H2A.ddBbd nucleosomes (Figure 6A and B). We conclude that the docking domain of H2A is required for nucleosome mobilization by RSC.

## DISCUSSION

Our data indicate that the H2A-docking domain is a key structural component of nucleosomes. We show that

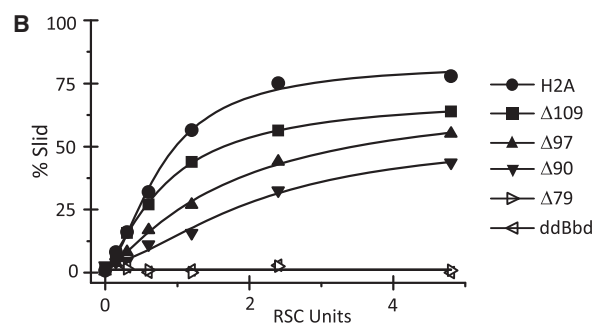
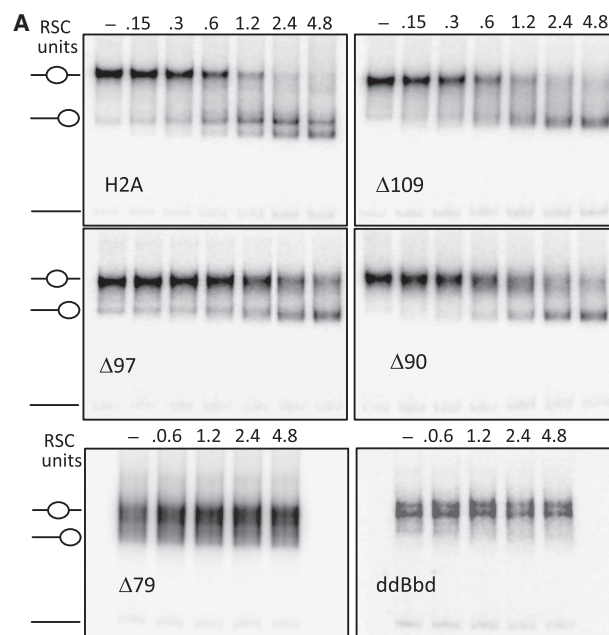
deletion of this domain or replacement with the shortened and highly variant docking domain of H2A.Bbd results in significant alterations in nucleosome structure as detected by DNase I and  $\bullet$ OH footprinting, AFM measurements and cryo-EM analyses. Indeed, due to its key role in defining canonical nucleosome structure, the docking domain is required for proper binding of linker histone to the nucleosome and for efficient ATP-dependent remodeling and nucleosome mobilization by the RSC complex. Moreover, our data suggest that a primary structural role of H2A.Bbd may be the inclusion of a 'defective' docking domain within specific nucleosomes *in vivo*.

X-ray crystal structures of nucleosomes suggests that the docking domain (82–119 AA) of H2A is involved in organizing the last turn of nucleosomal DNA through guiding the H3 $\alpha$ N helix (1). In addition, the short  $\alpha$ -C helix (amino acids 92–96) of the H2A-docking domain forms a short  $\beta$  sheet interaction with COOH-terminal



**Figure 5.** RSC-induced remodeling of conventional, truncated H2A mutants, H2A.ddBbd (ddBbd) and H2A.Bbd nucleosomes. The indicated end-positioned nucleosomes were reconstituted on a <sup>32</sup>P-3'-labeled 205-bp 601 DNA fragment and incubated for increasing times (from 0 to 62 min) at 29°C with 2.4 units of RSC. The reactions were arrested and, after digestion of the samples with DNase I, the cleaved DNA was extracted and run on an 8% PAGE under denaturing conditions. DNA, the DNase I digestion pattern of free DNA; the asterisks show the major changes in the DNase I digestion profile. Alterations specific RSC untreated Δ79, H2A.ddBbd and H2A.Bbd nucleosomes are marked by φ. Position of the dyad is indicated.

region of H4 (amino acids 95–102), suggesting this interaction contributes to (H2A–H2B)<sub>2</sub> dimer-(H3–H4)<sub>4</sub> tetramer stability within the nucleosome. Thus lack of a docking domain or the presence of a ‘defective’ docking domain is thus expected to strongly affect the structural organization of the nucleosome (1). Our data show that this is the case. Indeed, a progressive appearance of specific bands in DNase I profile concomitant with the progressive deletion of COOH-terminal region of H2A was observed. The chimeric H2A.ddBbd nucleosome, containing the ‘defective’ docking domain of H2A.Bbd, exhibited a DNase I digestion pattern very similar to the Δ79 H2A nucleosome, which completely lacks the docking domain of H2A. Importantly, the H2A.ddBbd particle is associated with only ~130 bp of DNA, in contrast to the conventional particle, which organizes 147bp of DNA. The AFM data show that within the H2A.ddBbd ~10 bp of each end of the nucleosomal DNA are unwrapped. In agreement with this, the EC-M imaging demonstrated that the entry–exit angle of the H2A.ddBbd nucleosomal DNA is strongly altered and the H2A.ddBbd trinucleosomes have a ‘relaxed’ beads-on-a string structure in contrast to the equilateral triangle shape of the conventional trinucleosome (Figure 4 C).



**Figure 6.** The docking domain of H2A is essential for the mobilization of the nucleosomes by RSC. (A) Centrally positioned conventional H2A (upper row, left panel), Δ109 (upper row, middle panel), Δ97 (upper row, right panel), Δ90 (lower row, left panel), Δ79 (lower row, middle panel) and H2A.ddBbd (lower row, right panel) reconstituted on a 255-bp 601 DNA were incubated with increasing amounts of RSC (as indicated) in presence of 1 mM ATP for 45 min at 29°C. Reactions were stopped by addition of 0.01 units of apyrase. Samples were resolved on 5% native PAGE. Gels were dried and visualized by exposure on a PhosphorImager. Positions of unmobilized and slid nucleosomes in the gel are shown by cartoon drawing. (B) Quantification of gel data for conventional H2A, Δ109, Δ97 and Δ90, Δ79 and H2A.ddBbd nucleosomes presented in A.

The structural perturbations brought about by deletion of the docking domain or the ‘defective’ H2A.Bbd-docking domains are associated with the inability of RSC to both remodel and mobilize the nucleosomes. Interestingly, similar effects on RSC induced sliding were observed when mutations were incorporated in the histone H3 αN region (44). Note that the (H3–H4)<sub>2</sub> tetramer-DNA particle is also not mobilized by the SWI/SNF chromatin remodeling complex (M. S. Shukla, D. Angelov and S. Dimitrov, unpublished data), providing further evidence that the presence of (H2A–H2B) dimers with a canonical docking domain interacting in a native fashion with the (H3–H4)<sub>2</sub> tetramer are required for the mobilization process. However, it has

been shown that SWI/SNF, an ATP-dependent remodeler of the same family, was able to remodel H3-H4 tetramer arrays resulting in increased accessibility to restriction enzyme although with considerably less efficiency (45). These results are consistent with our remodeling data where weak remodeling by RSC was detected in the DNase I assay for  $\Delta 79$ , H2A.ddBbd and H2A.Bbd, while RSC was unable to mobilize nucleosomes containing these proteins.

A current model of nucleosome mobilization by ATP-dependent chromatin remodelers involves DNA-bulge propagation within the nucleosome perhaps initiated via a 'loop recapture' mechanism (46–48). Considering this view, the weaker interactions between DNA at the periphery of the nucleosome core due to a presence of a truncated or defective docking domain may reduce the probability of loop recapture and thus hamper the ability of the ATP-dependent remodelers to mobilize the nucleosomes, consistent with our observations (Figure 6). Alternatively, the distorted conformation due to the altered docking domain may negatively impact recognition and binding of the nucleosome substrate by the RSC-remodeling complex. We note that although we have used RSC as a model chromatin remodeler in this study, one should expect a similar structural dependence by remodelers belonging to other families. Indeed, H2A.Bbd nucleosomes are also refractory to ACF induced mobilization (16).

We also found that the docking domain of H2A appears to be critically important for proper binding of linker histone H1. Linker histones preferentially bind to four-way junction (4WJ) DNA compared to linear DNA. This preferential binding of linker histones to 4WJ DNA was attributed to the particular angle formed between the two DNA arms (49). Bearing this in mind, one could expect that the specific 3D organization of the incoming–outgoing linkers would be critical for binding of H1. In H2A.ddBbd containing nucleosomes, where the H2A-docking domain is 'defective', one of the major structural effects was on the entry–exit angle of linker DNAs. Consistent with this, a complete abrogation of H1 proper binding was observed (Figure 4 and Supplementary Figure S3) emphasizing the role of H2A-docking domain in H1-mediated condensation of chromatin.

Interestingly, the incorporation of the histone variant H2B.FWT, which shows a highly divergent (45% identity) primary structure compared to this of the conventional H2B, did not interfere with chromatin remodeler-mediated nucleosome mobilization (50). This reinforces the notion for the unique role of H2A and its docking domain in the mobilization of the nucleosomes. This specific property of H2A allows the creation of nucleosomes with specific structural and functional properties upon the incorporation of variants such as H2A.Bbd and perhaps H2AL2 (16,17,21). Nucleosomes containing either protein cannot be mobilized and the reported data indicate that transcription and repair are more facile on H2A.Bbd nucleosomal templates (12,16,51). In addition, H2A.Bbd nucleosomal arrays exhibit 'beads on a string' structure, in contrast to the conventional H2A arrays, which show specific local organization (11). Moreover,

H2A.Bbd arrays were unable to fold properly upon raising the ionic strength of the solution (12). H2A.Bbd seems to be associated with transcriptionally active chromatin (31) and, as well as H2AL2 (21) in the processes taking place during spermatogenesis (52). Therefore, this histone H2A variant structure–function relationship and, in particular the peculiar structural role of the H2A-docking domain, appears to be exploited by the cell to regulate such vital processes as transcription and spermatogenesis.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## FUNDING

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique; L'Agence Nationale de la Recherche 'EPIVAR' N 08-BLAN-0320-02 (to S.D.); ANR-09-BLAN-NT09-485720 'CHROREMBER' (to D.A., S.D. and J.B.); The Association pour la Recherche sur le Cancer (grant N 4821 to D.A.); Région Rhône-Alpes (Convention CIBLE 2008 to D.A. and S.D.); La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée La Ligue, to S.D.); Grant Agency of the Czech Republic (grant #304/05/2168); Ministry of Education, Youth and Sports (grants MSM0021620806 and LC535); Academy of Sciences of the Czech Republic (grant 34AV0Z50110509). Funding for open access charge: Association pour la Recherche sur le Cancer.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Luger,K., Mäder,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F. and Richmond,T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251–260.
- van Holde,K. (1988) *Chromatin*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Sivolob,A. and Prunell,A. (2003) Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. *J. Mol. Biol.*, **331**, 1025–1040.
- Fan,Y., Nikitina,T., Zhao,J., Fleury,T.J., Bhattacharyya,R., Bouhassira,E.E., Stein,A., Woodcock,C.L. and Skoultschi,A.I. (2005) Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, **123**, 1199–1212.
- Arents,G. and Moudrianakis,E.N. (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 11170–11174.
- Smirnov,I.V., Dimitrov,S.I. and Makarov,V.L. (1988) NaCl-induced chromatin condensation. Application of static light scattering at 90 degrees and stopped flow technique. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **5**, 1127–1134.
- Makarov,V.L., Dimitrov,S.I., Tsaneva,I.R. and Pashev,I.G. (1984) The role of histone H1 and non-structured domains of core histones in maintaining the orientation of nucleosomes within the chromatin fiber. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1021–1027.
- de la Barre,A.E., Angelov,D., Molla,A. and Dimitrov,S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or

- its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J.*, **20**, 6383–6393.
9. Scrittore, L., Hans, F., Angelov, D., Charra, M., Prigent, C. and Dimitrov, S. (2001) pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30002–30010.
  10. Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707–719.
  11. Montel, F., Menoni, H., Castelnovo, M., Bednar, J., Dimitrov, S., Angelov, D. and Faivre-Moskalenko, C. (2009) The dynamics of individual nucleosomes controls the chromatin condensation pathway: direct atomic force microscopy visualization of variant chromatin. *Biophys. J.*, **97**, 544–553.
  12. Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D. and Tremethick, D.J. (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1070–1076.
  13. Becker, P.B. (2002) Nucleosome sliding: facts and fiction. *EMBO J.*, **21**, 4749–4753.
  14. Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K. and Dimitrov, S. (2007) Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell. Biochem.*, **41**, 71–89.
  15. Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
  16. Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. *et al.* (2004) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J.*, **23**, 3815–3824.
  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. Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K. and Tremethick, D.J. (2004) H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 $\alpha$ -mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell*, **16**, 655–661.
  19. Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C. *et al.* (2006) Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J.*, **25**, 4234–4244.
  20. 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.
  21. Syed, S.H., Boulard, M., Shukla, M.S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S. and Angelov, D. (2009) The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4684–4695.
  22. Jin, C. and Felsenfeld, G. (2007) Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.*, **21**, 1519–1529.
  23. Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M. and Ausio, J. (2001) Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles. Implications for transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41945–41949.
  24. 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.
  25. Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1121–1124.
  26. Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. and Felsenfeld, G. (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.*, **41**, 941–945.
  27. Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 162–169.
  28. Ausio, J. and Abbott, D.W. (2002) The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry*, **41**, 5945–5949.
  29. Ausio, J. (2006) Histone variants—the structure behind the function. *Brief. Funct. Genom. Proteom.*, **5**, 228–243.
  30. Eickbush, T.H., Godfrey, J.E., Elia, M.C. and Moudrianakis, E.N. (1988) H2a-specific proteolysis as a unique probe in the analysis of the histone octamer. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18972–18978.
  31. 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.
  32. Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Becker, N., Meyer, S., Shukla, M.S., Hayes, J.J., Everaers, R., Angelov, D., Bednar, J. and Dimitrov, S. (2010) Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 9620–9625.
  33. Luger, K., Rechsteiner, T.J. and Richmond, T.J. (1999) Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.*, **119**, 1–16.
  34. Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. and Kornberg, R.D. (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **87**, 1249–1260.
  35. Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J. and Dimitrov, S. (1998) Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6293–6304.
  36. Hayes, J.J. and Lee, K.M. (1997) In vitro reconstitution and analysis of mononucleosomes containing defined DNAs and proteins. *Methods*, **12**, 2–9.
  37. Montel, F., Fontaine, E., St-Jean, P., Castelnovo, M. and Faivre-Moskalenko, C. (2007) Atomic force microscopy imaging of SWI/SNF action: mapping the nucleosome remodeling and sliding. *Biophys. J.*, **93**, 566–578.
  38. Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S. *et al.* (2006) Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.*, **25**, 1669–1679.
  39. Wu, C. and Travers, A. (2004) A 'one-pot' assay for the accessibility of DNA in a nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e122.
  40. Shukla, M.S., Syed, S.H., Montel, F., Faivre-Moskalenko, C., Bednar, J., Travers, A., Angelov, D. and Dimitrov, S. (2010) Remosomes: RSC generated non-mobilized particles with approximately 180 bp DNA loosely associated with the histone octamer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 1936–1941.
  41. Shintomi, K., Iwabuchi, M., Saeki, H., Ura, K., Kishimoto, T. and Ohsumi, K. (2005) Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 8210–8215.
  42. Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 14173–14178.
  43. 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.
  44. Somers, J. and Owen-Hughes, T. (2009) Mutations to the histone H3 alpha N region selectively alter the outcome of ATP-dependent nucleosome-remodelling reactions. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2504–2513.
  45. Boyer, L.A., Shao, X., Ebright, R.H. and Peterson, C.L. (2000) Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer in nucleosome remodeling by the SWI-SNF complex. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11545–11552.
  46. Kassabov, S.R., Zhang, B., Persinger, J. and Bartholomew, B. (2003) SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol. Cell*, **11**, 391–403.
  47. Zhang, Y., Smith, C.L., Saha, A., Grill, S.W., Mihardja, S., Smith, S.B., Cairns, B.R., Peterson, C.L. and Bustamante, C. (2006)

- DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol. Cell*, **24**, 559–568.
48. Strohner, R., Wachsmuth, M., Dachauer, K., Mazurkiewicz, J., Hochstatter, J., Rippe, K. and Langst, G. (2005) A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 683–690.
49. Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S.H., Schroth, G.P. and van Holde, K. (1994) Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four-way junction DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 3525–3529.
50. Boulard, M., Gautier, T., Mbele, G.O., Gerson, V., Hamiche, A., Angelov, D., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (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**, 1518–1526.
51. Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., Bouvet, P. and Angelov, D. (2007) ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A.Bbd nucleosomes. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 5949–5956.
52. Ishibashi, T., Li, A., Eirin-Lopez, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J. and Ausio, J. (2009) H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1780–1789.

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

— Paul VALÉRY

## Annexe B

### Bibliographie

- Abbott, D. W., V. S. Ivanova, X. Wang, W. M. Bonner, and J. Ausió (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, **276**:41945–41949.
- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell*, **9**:1191–1200.
- Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin. Cancer Biol.*, **16**:162–172.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, and A. E. Mirsky (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**:786–794.
- Allshire, R. C. and G. H. Karpen (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.*, **9**:923–937.
- Almagro, S., D. Rivelino, T. Hirano, B. Houchmandzadeh, and S. Dimitrov (2004). The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope. *J. Biol. Chem.*, **279**:5118–5126.
- Amato, A., T. Schillaci, L. Lentini, and A. Di Leonardo (2009). CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells. *Mol. Cancer*, **8**:119.
- Andrews, P. D., E. Knatko, W. J. Moore, and J. R. Swedlow (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**:672–683.
- Angelov, D., A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C.-M. Doyen, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, and P. Bouvet (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J.*, **23**:3815–3824.
- Angelov, D., A. Molla, P.-Y. Perche, F. Hans, J. Côté, 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.

- Arents, G. and E. N. Moudrianakis (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:11170–11174.
- 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.
- Arents, G. and E. N. Moudrianakis (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:10489–10493.
- Bahe, S., Y.-D. Stierhof, C. J. Wilkinson, F. Leiss, and E. A. Nigg (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.*, **171**:27–33.
- Bahmanyar, S., D. D. Kaplan, J. G. Deluca, T. H. Giddings, E. T. O’Toole, M. Winey, E. D. Salmon, P. J. Casey, W. J. Nelson, and A. I. M. Barth (2008). beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev.*, **22**:91–105.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, and T. Kouzarides (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**:120–124.
- Bao, Y. and X. Shen (2007). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat. Res.*, **618**:18–29.
- Bao, Y., K. Konesky, Y.-J. Park, S. Rosu, P. N. Dyer, D. Rangasamy, D. J. Tremethick, P. J. Laybourn, and K. Luger (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.*, **23**:3314–3324.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster, and C. L. Woodcock (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:14173–14178.
- Belmont, A. S., J. W. Sedat, and D. A. Agard (1987). A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *J. Cell Biol.*, **105**:77–92.
- Belmont, A. S. (2002). Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**:15855–15857.
- Belmont, A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**:632–638.
- Bergmann, J. H., M. G. Rodríguez, N. M. C. Martins, H. Kimura, D. A. Kelly, H. Masumoto, V. Larionov, L. E. T. Jansen, and W. C. Earnshaw (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J.*, **30**:328–340.
- Biermann, K., L. C. Heukamp, K. Steger, H. Zhou, F. E. Franke, I. Guetgemann, V. Sonnack, R. Brehm, J. Berg, and P. J. Bastian (2007). Gene expression profiling identifies new biological markers of neoplastic germ cells. *Anticancer Res.*, **27**:3091–3100.



- Black, B. E., M. A. Brock, S. Bédard, V. L. Woods, and D. W. Cleveland (2007a). An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:5008–5013.
- Black, B. E., L. E. T. Jansen, P. S. Maddox, D. R. Foltz, A. B. Desai, J. V. Shah, and D. W. Cleveland (2007b). Centromere Identity Maintained by Nucleosomes Assembled with Histone H3 Containing the CENP-A Targeting Domain. *Mol. Cell*, **25**:309–322.
- Black, B. E. and D. W. Cleveland (2011). Epigenetic Centromere Propagation and the Nature of CENP-A Nucleosomes. *Cell*, **144**:471–479.
- Black, B. E., D. R. Foltz, S. Chakravarthy, K. Luger, V. L. Woods, and D. W. Cleveland (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature*, **430**:578–582.
- Blower, M. D. and G. H. Karpen (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.*, **3**:730–739.
- Blower, M. D., B. A. Sullivan, and G. H. Karpen (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell*, **2**:319–330.
- Boulard, M., P. Bouvet, T. K. Kundu, and S. Dimitrov (2007). Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell. Biochem.*, **41**:71–89.
- Boulard, M., T. Gautier, G. O. Mbele, V. Gerson, A. Hamiche, D. Angelov, P. Bouvet, and S. Dimitrov (2006). The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **26**:1518–1526.
- Bouzinba-Segard, H., A. Guais, and C. Francastel (2006). Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**:8709–8714.
- Brittle, A. L. and H. Ohkura (2005). Centrosome maturation: Aurora lights the way to the poles. *Curr. Biol.*, **15**:R880–R882.
- Brust-Mascher, I., G. Civelekoglu-Scholey, M. Kwon, A. Mogilner, and J. M. Scholey (2004). Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**:15938–15943.
- Brust-Mascher, I. and J. M. Scholey (2002). Microtubule flux and sliding in mitotic spindles of *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell*, **13**:3967–3975.
- Buscaino, A., R. Allshire, and A. Pidoux (2010). Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **20**:118–126.
- Buvelot, S., S. Y. Tatsutani, D. Vermaak, and S. Biggins (2003). The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J. Cell Biol.*, **160**:329–339.
- Camahort, R., B. Li, L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn, and J. L. Gerton (2007). Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol. Cell*, **26**:853–865.

- Carroll, C. W., M. C. C. Silva, K. M. Godek, L. E. T. Jansen, and A. F. Straight (2009). Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat. Cell Biol.*, **11**:896–902.
- Carroll, C. W., K. J. Milks, and A. F. Straight (2010). Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J. Cell Biol.*, **189**:1143–1155.
- 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.
- Chan, E. H. Y., A. Santamaria, H. H. W. Silljé, and E. A. Nigg (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma*, **117**:457–469.
- Cheeseman, I. M. and A. Desai (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**:33–46.
- Cheeseman, I. M., J. S. Chappie, E. M. Wilson-Kubalek, and A. Desai (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, **127**:983–997.
- Chen, E. S., K. Zhang, E. Nicolas, H. P. Cam, M. Zofall, and S. I. S. Grewal (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature*, **451**:734–737.
- Chen, Y., R. E. Baker, K. C. Keith, K. Harris, S. Stoler, and M. Fitzgerald-Hayes (2000). The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol. Cell. Biol.*, **20**:7037–7048.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, **1**:581–585.
- Churikov, D., J. Siino, M. Svetlova, K. Zhang, A. Gineitis, E. Morton Bradbury, and A. Zalensky (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics*, **84**:745–756.
- Ciferri, C., A. Musacchio, and A. Petrovic (2007). The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. *FEBS Lett.*, **581**:2862–2869.
- Cimini, D., X. Wan, C. B. Hirel, and E. D. Salmon (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr. Biol.*, **16**:1711–1718.
- Collins, K. A., S. Furuyama, and S. Biggins (2004). Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr. Biol.*, **14**:1968–1972.
- Corona, D. F. V. and J. W. Tamkun (2004). Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**:113–119.
- Daal, A. and S. C. Elgin (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell*, **3**:593–602.

- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier (1999). Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*, **342**:249–268.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**:83–117.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal, and M. M. Zhou (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**:491–496.
- Dorigo, B., T. Schalch, K. Bystricky, and T. J. Richmond (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.*, **327**:85–96.
- Dorigo, B., T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R. R. Schroeder, and T. J. Richmond (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, **306**:1571–1573.
- Doxsey, S., W. Zimmerman, and K. Mikule (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol.*, **15**:303–311.
- Doyen, C.-M., F. Montel, T. Gautier, H. Menoni, C. Claudet, M. Delacour-Larose, D. Angelov, A. Hamiche, J. Bednar, and C. Faivre-Moskalenko (2006a). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J.*, **25**:4234–4244.
- Doyen, C.-M., W. An, D. Angelov, V. Bondarenko, F. Mietton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov (2006b). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.*, **26**:1156–1164.
- Dunleavy, E. M., D. Roche, H. Tagami, N. Lacoste, D. Ray-Gallet, Y. Nakamura, Y. Daigo, Y. Nakatani, and G. Almouzni-Pettinotti (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*, **137**:485–497.
- Dutertre, S., S. Descamps, and C. Prigent (2002). On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene*, **21**:6175–6183.
- Dutertre, S., M. Cazales, M. Quaranta, C. Froment, V. Trabut, C. Dozier, G. Mirey, J.-P. Bouché, N. Theis-Febvre, and E. Schmitt (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J. Cell Sci.*, **117**:2523–2531.
- Eirín-López, J. M., T. Ishibashi, and J. Ausió (2008). H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *FASEB J.*, **22**:316–326.
- Eissenberg, J. C. and S. C. Elgin (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**:204–210.
- Faast, R., V. Thonglairoam, T. C. Schulz, J. Beall, J. R. Wells, H. Taylor, K. Matthaei, P. D. Rathjen, D. J. Tremethick, and I. Lyons (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.*, **11**:1183–1187.
- Fan, J. Y., D. Rangasamy, K. Luger, and D. J. Tremethick (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 $\alpha$ -mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell*, **16**:655–661.

- Fan, Y., T. Nikitina, J. Zhao, T. J. Fleury, R. Bhattacharyya, E. E. Bouhassira, A. Stein, C. L. Woodcock, and A. I. Skoultchi (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, **123**:1199–1212.
- Foltz, D. R., L. E. T. Jansen, A. O. Bailey, J. R. Yates, E. A. Bassett, S. Wood, B. E. Black, and D. W. Cleveland (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell*, **137**:472–484.
- Foltz, D. R., L. E. T. Jansen, B. E. Black, A. O. Bailey, J. R. Yates, and D. W. Cleveland (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.*, **8**:458–469.
- Francis, N. J., R. E. Kingston, and C. L. Woodcock (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*, **306**:1574–1577.
- Fujita, Y., T. Hayashi, T. Kiyomitsu, Y. Toyoda, A. Kokubu, C. Obuse, and M. Yanagida (2007). Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev. Cell*, **12**:17–30.
- Furuyama, S. and S. Biggins (2007). Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:14706–14711.
- Furuyama, T. and S. Henikoff (2009). Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell*, **138**:104–113.
- Gaetz, J. and T. M. Kapoor (2004). Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.*, **166**:465–471.
- Ganem, N. J. and D. A. Compton (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J. Cell Biol.*, **166**:473–478.
- Gascoigne, K. E., K. Takeuchi, A. Suzuki, T. Hori, T. Fukagawa, and I. M. Cheeseman (2011a). Induced Ectopic Kinetochore Assembly Bypasses the Requirement for CENP-A Nucleosomes. *Cell*, **145**:410–422.
- Gascoigne, K. E. and I. M. Cheeseman (2011b). Kinetochore assembly: if you build it, they will come. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**:102–108.
- Ge, S., J. R. Skaar, and M. Pagano (2009). APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell Cycle*, **8**:167–171.
- Georgel, P. T., R. A. Horowitz-Scherer, N. Adkins, C. L. Woodcock, P. A. Wade, and J. C. Hansen (2003). Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J. Biol. Chem.*, **278**:32181–32188.
- Giet, R. and D. M. Glover (2001). Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **152**:669–682.
- Giménez-Abián, J. F., I. Sumara, T. Hirota, S. Hauf, D. Gerlich, C. Torre, J. Ellenberg, and J.-M. Peters (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.*, **14**:1187–1193.

- Gkikopoulos, T., V. Singh, K. Tsui, S. Awad, M. J. Renshaw, P. Scholfield, G. J. Barton, C. Nislow, T. U. Tanaka, and T. Owen-Hughes (2011). The SWI/SNF complex acts to constrain distribution of the centromeric histone variant Cse4. *EMBO J.*, **30**:1919–1927.
- Golan, A., Y. Yudkovsky, and A. Hershko (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.*, **277**:15552–15557.
- Gorbsky, G. J., P. J. Sammak, and G. G. Borisy (1987). Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends. *J. Cell Biol.*, **104**:9–18.
- Gorbsky, G. J., P. J. Sammak, and G. G. Borisy (1988). Microtubule dynamics and chromosome motion visualized in living anaphase cells. *J. Cell Biol.*, **106**:1185–1192.
- Greaves, I. K., D. Rangasamy, P. Ridgway, and D. J. Tremethick (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:525–530.
- Grewal, S. I. S. and S. C. R. Elgin (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**:399–406.
- Grigoryev, S. A., J. Bednar, and C. L. Woodcock (1999). MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member. *J. Biol. Chem.*, **274**:5626–5636.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**:349–352.
- Günesdogan, U., H. Jäckle, and A. Herzig (2010). A genetic system to assess in vivo the functions of histones and histone modifications in higher eukaryotes. *EMBO Rep.*, **11**:772–776.
- Haering, C. H. and K. Nasmyth (2003). Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays*, **25**:1178–1191.
- 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. USA*, **103**:6428–6435.
- Hamiche, A., P. Schultz, V. Ramakrishnan, P. Oudet, and A. Prunell (1996). Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J. Mol. Biol.*, **257**:30–42.
- Hannak, E., M. Kirkham, A. A. Hyman, and K. Oegema (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.*, **155**:1109–1116.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, **20**:3021–3027.
- Hans, F., D. A. Skoufias, S. Dimitrov, and R. L. Margolis (2009). Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B. *Mol. Biol. Cell*, **20**:3491–3502.
- Hansen, J. C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**:361–392.

- Happel, N. and D. Doenecke (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, **431**:1–12.
- Harp, J. M., B. L. Hanson, D. E. Timm, and G. J. Bunick (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56**:1513–1534.
- Henikoff, S. and Y. Dalal (2005). Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**:177–184.
- Henikoff, S. and A. Shilatifard (2011). Histone modification: cause or cog? *Trends Genet.*, **27**:389–396.
- Hermeking, H. and A. Benzinger (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.*, **16**:183–192.
- Herzog, F., I. Primorac, P. Dube, P. Lenart, B. Sander, K. Mechtler, H. Stark, and J.-M. Peters (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science*, **323**:1477–1481.
- Holde, K. and J. Zlatanova (1999). The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance? *BioEssays*, **21**:776–780.
- Hori, T., M. Amano, A. Suzuki, C. B. Backer, J. P. Welburn, Y. Dong, B. F. McEwen, W.-H. Shang, E. Suzuki, and K. Okawa (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*, **135**:1039–1052.
- Houchmandzadeh, B. and S. Dimitrov (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.*, **145**:215–223.
- Howell, B. J., B. Moree, E. M. Farrar, S. Stewart, G. Fang, and E. D. Salmon (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol.*, **14**:953–964.
- Jabs, E. W., C. M. Tuck-Muller, G. J. Anhalt, W. Earnshaw, R. A. Wise, and F. Wigley (1993). Cytogenetic survey in systemic sclerosis: correlation of aneuploidy with the presence of anticentromere antibodies. *Cytogenet. Cell Genet.*, **63**:169–175.
- Jacobson, R. H., A. G. Ladurner, D. S. King, and R. Tjian (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*, **288**:1422–1425.
- Jansen, L. E. T., B. E. Black, D. R. Foltz, and D. W. Cleveland (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.*, **176**:795–805.
- Jason, L. J. M., S. C. Moore, J. D. Lewis, G. Lindsey, and J. Ausió (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays*, **24**:166–174.
- Joglekar, A. P., D. C. Bouck, J. N. Molk, K. S. Bloom, and E. D. Salmon (2006). Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site. *Nat. Cell Biol.*, **8**:581–585.
- Joglekar, A. P., D. Bouck, K. Finley, X. Liu, Y. Wan, J. Berman, X. He, E. D. Salmon, and K. S. Bloom (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule attachment site is conserved between point and regional centromeres. *J. Cell Biol.*, **181**:587–594.
- Kapoor, T. M., M. A. Lampson, P. Hergert, L. Cameron, D. Cimini, E. D. Salmon, B. F. McEwen, and A. Khodjakov (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science*, **311**:388–391.

- Karpen, G. H. and R. C. Allshire (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.*, **13**:489–496.
- Katan-Khaykovich, Y. and K. Struhl (2002). Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev.*, **16**:743–752.
- Kelly, A. E. and H. Funabiki (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**:51–58.
- Khodjakov, A. and C. L. Rieder (1996). Kinetochores moving away from their associated pole do not exert a significant pushing force on the chromosome. *J. Cell Biol.*, **135**:315–327.
- Khodjakov, A. and C. L. Rieder (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J. Cell Biol.*, **146**:585–596.
- Khodjakov, A. and T. Kapoor (2005). Microtubule flux: what is it good for? *Curr. Biol.*, **15**:R966–R968.
- Kireeva, N., M. Lakonishok, I. Kireev, T. Hirano, and A. S. Belmont (2004). Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J. Cell Biol.*, **166**:775–785.
- Knowlton, A. L., W. Lan, and P. T. Stukenberg (2006). Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr. Biol.*, **16**:1705–1710.
- Kunitoku, N., T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, S. Honda, O. Kobayashi, K. Hatakeyama, Y. Ushio, H. Saya, and T. Hirota (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell*, **5**:853–864.
- Kwok, B. H. and T. M. Kapoor (2007). Microtubule flux: drivers wanted. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**:36–42.
- Lachner, M., R. J. O’Sullivan, and T. Jenuwein (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell. Sci.*, **116**:2117–2124.
- Lachner, M. and T. Jenuwein (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**:286–298.
- Lagana, A., J. F. Dorn, V. De Rop, A.-M. Ladouceur, A. S. Maddox, and P. S. Maddox (2010). A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A. *Nat. Cell Biol.*, **12**:1186–1193.
- Lampson, M. A., K. Renduchitala, A. Khodjakov, and T. M. Kapoor (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.*, **6**:232–237.
- Lavelle, C., P. Recouvreux, H. Wong, A. Bancaud, J.-L. Viovy, A. Prunell, and J.-M. Victor (2009). Right-handed nucleosome: myth or reality? *Cell*, **139**:1216–7; author reply 1217–8.
- Lee, S.-H., P. Itkin-Ansari, and F. Levine (2010). CENP-A, a protein required for chromosome segregation in mitosis, declines with age in islet but not exocrine cells. *Aging (Albany NY)*, **2**:785–790.

- Lipp, J. J., T. Hirota, I. Poser, and J.-M. Peters (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell. Sci.*, **120**:1245–1255.
- Liu, D. and M. A. Lampson (2009). Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase. *Biochem. Soc. Trans.*, **37**:976–980.
- Liu, S.-T., J. B. Rattner, S. A. Jablonski, and T. J. Yen (2006). Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J. Cell Biol.*, **175**:41–53.
- Luger, K., A. W. Mäder, 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.
- Macûrek, L., A. Lindqvist, D. Lim, M. A. Lampson, R. Klompmaker, R. Freire, C. Clouin, S. S. Taylor, M. B. Yaffe, and R. H. Medema (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, **455**:119–123.
- Maehara, K., K. Takahashi, and S. Saitoh (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol. Cell. Biol.*, **30**:2090–2104.
- Mahoney, N. M., G. Goshima, A. D. Douglass, and R. D. Vale (2006). Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr. Biol.*, **16**:564–569.
- Makarov, V. L., S. I. Dimitrov, and P. T. Petrov (1983). Salt-induced conformational transitions in chromatin. A flow linear dichroism study. *Eur. J. Biochem.*, **133**:491–497.
- Marfella, C. G. A. and A. N. Imbalzano (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat. Res.*, **618**:30–40.
- Margolis, R. L. and L. Wilson (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays*, **20**:830–836.
- Marko, J. F. (2008). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.*, **16**:469–497.
- Marsden, M. P. and U. K. Laemmli (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, **17**:849–858.
- Marshall, O. J., A. C. Chueh, L. H. Wong, and K. H. A. Choo (2008). Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am. J. Hum. Genet.*, **82**:261–282.
- Marzluff, W. F., P. Gongidi, K. R. Woods, J. Jin, and L. J. Maltais (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, **80**:487–498.
- McAinsh, A. D., J. D. Tytell, and P. K. Sorger (2003). Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**:519–539.
- McEwen, B. F., Y. Dong, and K. J. VandenBeldt (2007). Using electron microscopy to understand functional mechanisms of chromosome alignment on the mitotic spindle. *Methods Cell Biol.*, **79**:259–293.
- McIntosh, J. R., E. L. Grishchuk, and R. R. West (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**:193–219.



- McKim, K. S. and R. S. Hawley (1995). Chromosomal control of meiotic cell division. *Science*, **270**:1595–1601.
- McKittrick, E., P. R. Gafken, K. Ahmad, and S. Henikoff (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**:1525–1530.
- Meistrich, M. L., L. R. Bucci, P. K. Trostle-Weige, and W. A. Brock (1985). Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev. Biol.*, **112**:230–240.
- Mellone, B. G., W. Zhang, and G. H. Karpen (2009). Frodos found: Behold the CENP-a "Ring" bearers. *Cell*, **137**:409–412.
- Meneghini, M. D., M. Wu, and H. D. Madhani (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, **112**:725–736.
- Mietton, F., A. K. Sengupta, A. Molla, G. Picchi, S. Barral, L. Heliot, T. Grange, A. Wutz, and S. Dimitrov (2009). Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. *Mol. Cell. Biol.*, **29**:150–156.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, K. Hirose, Y. Tonzuka, A. Kawajiri, Y. C. Bao, X. Deng, M. Tatsuka, S. Narumiya, and W. S. May (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev. Cell*, **4**:549–560.
- Mizuguchi, G., H. Xiao, J. Wisniewski, M. M. Smith, and C. Wu (2007). Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell*, **129**:1153–1164.
- Mohrmann, L. and C. P. Verrijzer (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1681**:59–73.
- Morey, L., K. Barnes, Y. Chen, M. Fitzgerald-Hayes, and R. E. Baker (2004). The histone fold domain of Cse4 is sufficient for CEN targeting and propagation of active centromeres in budding yeast. *Eukaryotic Cell*, **3**:1533–1543.
- Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**:379–393.
- Mutskov, V., D. Gerber, D. Angelov, J. Ausio, J. Workman, and S. Dimitrov (1998). Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.*, **18**:6293–6304.
- Neumann, P., H. Yan, and J. Jiang (2007). The centromeric retrotransposons of rice are transcribed and differentially processed by RNA interference. *Genetics*, **176**:749–761.
- Nilsson, J., M. Yekezare, J. Minshull, and J. Pines (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.*, **10**:1411–1420.
- Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**:397–420.
- O'Connell, M. J., M. J. E. Krien, and T. Hunter (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.*, **13**:221–228.
- Olins, D. E. and A. L. Olins (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**:809–814.

- Osley, M. A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**:827–861.
- Ouararhni, K., R. Hadj-Slimane, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, F. Mietton, A. Harel-Bellan, S. Dimitrov, and A. Hamiche (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev.*, **20**:3324–3336.
- Palmer, D. K., K. O'Day, M. H. Wener, B. S. Andrews, and R. L. Margolis (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.*, **104**:805–815.
- Palmer, D. K., K. O'Day, H. L. Trong, H. Charbonneau, and R. L. Margolis (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:3734–3738.
- Pan, J. and R.-H. Chen (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **18**:1439–1451.
- Pavri, R., B. Zhu, G. Li, P. Trojer, S. Mandal, A. Shilatifard, and D. Reinberg (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell*, **125**:703–717.
- Perpelescu, M., N. Nozaki, C. Obuse, H. Yang, and K. Yoda (2009). Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J. Cell Biol.*, **185**:397–407.
- Perpelescu, M. and T. Fukagawa (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma*, **120**:425–446.
- Petronczki, M., P. Lénárt, and J.-M. Peters (2008). Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell*, **14**:646–659.
- Pfarr, C. M., M. Coue, P. M. Grissom, T. S. Hays, M. E. Porter, and J. R. McIntosh (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature*, **345**:263–265.
- Piehl, M., U. S. Tulu, P. Wadsworth, and L. Cassimeris (2004). Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**:1584–1588.
- Przewlaka, M. R., Z. Venkei, V. M. Bolanos-Garcia, J. Debski, M. Dadlez, and D. M. Glover (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr. Biol.*, **21**:399–405.
- 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.
- Ravi, M. and S. W. L. Chan (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, **464**:615–618.
- Ravi, M., F. Shibata, J. S. Ramahi, K. Nagaki, C. Chen, M. Murata, and S. W. L. Chan (2011). Meiosis-Specific Loading of the Centromere-Specific Histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.*, **7**:e1002121.
- Rieder, C. L., A. Schultz, R. Cole, and G. Sluder (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.*, **127**:1301–1310.

- Ringrose, L. and R. Paro (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **38**:413–443.
- Robinson, P. J. J. and D. Rhodes (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**:336–343.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, **273**:5858–5868.
- Roque, A., I. Iloro, I. Ponte, J. L. R. Arrondo, and P. Suañ (2005). DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1. *J. Biol. Chem.*, **280**:32141–32147.
- Rosenblatt, J. (2005). Spindle assembly: asters part their separate ways. *Nat. Cell Biol.*, **7**:219–222.
- Roshak, A. K., E. A. Capper, C. Imburgia, J. Fornwald, G. Scott, and L. A. Marshall (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates *cdc2*/cyclin B through phosphorylation and activation of the *cdc25C* phosphatase. *Cell. Signal.*, **12**:405–411.
- Régnier, V., P. Vagnarelli, T. Fukagawa, T. Zerjal, E. Burns, D. Trouche, W. Earnshaw, and W. Brown (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.*, **25**:3967–3981.
- Saffery, R., H. Sumer, S. Hassan, L. H. Wong, J. M. Craig, K. Todokoro, M. Anderson, A. Stafford, and K. H. A. Choo (2003). Transcription within a functional human centromere. *Mol. Cell*, **12**:509–516.
- Schalch, T., S. Duda, D. F. Sargent, and T. J. Richmond (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, **436**:138–141.
- Screpanti, E., A. De Antoni, G. M. Alushin, A. Petrovic, T. Melis, E. Nogales, and A. Musacchio (2011). Direct binding of cenp-C to the mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr. Biol.*, **21**:391–398.
- Scrittore, L., D. A. Skoufias, F. Hans, V. Gerson, P. Sassone-Corsi, S. Dimitrov, and R. L. Margolis (2005). A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function. *Mol. Biol. Cell*, **16**:292–305.
- Seki, A., J. A. Coppinger, C.-Y. Jang, J. R. Yates, and G. Fang (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*, **320**:1655–1658.
- Sekulic, N., E. A. Bassett, D. J. Rogers, and B. E. Black (2010). The structure of (CENP-A-H4)<sub>2</sub> reveals physical features that mark centromeres. *Nature*, **467**:347–351.
- Shah, J. V., E. Botvinick, Z. Bonday, F. Furnari, M. Berns, and D. W. Cleveland (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr. Biol.*, **14**:942–952.
- Shang, C., T. R. Hazbun, I. M. Cheeseman, J. Aranda, S. Fields, D. G. Drubin, and G. Barnes (2003). Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol. Biol. Cell*, **14**:3342–3355.
- Shelby, R. D., O. Vafa, and K. F. Sullivan (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.*, **136**:501–513.

- Shuaib, M., K. Ouararhni, S. Dimitrov, and A. Hamiche (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**:1349–1354.
- Springhetti, E. M., N. E. Istomina, J. C. Whisstock, T. Nikitina, C. L. Woodcock, and S. A. Grigoryev (2003). Role of the M-loop and reactive center loop domains in the folding and bridging of nucleosome arrays by MENT. *J. Biol. Chem.*, **278**:43384–43393.
- Stefanovsky, V. Y., S. I. Dimitrov, V. R. Russanova, D. Angelov, and I. G. Pashev (1989). Laser-induced crosslinking of histones to DNA in chromatin and core particles: implications in studying histone-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **17**:10069–10081.
- Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**:435–459.
- Steuer, E. R., L. Wordeman, T. A. Schroer, and M. P. Sheetz (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature*, **345**:266–268.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**:41–45.
- Sullivan, B. A., M. D. Blower, and G. H. Karpen (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat. Rev. Genet.*, **2**:584–596.
- Sullivan, B. A. and G. H. Karpen (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**:1076–1083.
- Sullivan, K. F., M. Hechenberger, and K. Masri (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J. Cell Biol.*, **127**:581–592.
- Sullivan, S., D. W. Sink, K. L. Trout, I. Makalowska, P. M. Taylor, A. D. Baxevanis, and D. Landsman (2002). The Histone Database. *Nucleic Acids Res.*, **30**:341–342.
- Swift, S., J. Lorens, P. Achacoso, and G. P. Nolan (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol*, **10**:17C.
- Syed, S. H., D. Goutte-Gattat, N. Becker, S. Meyer, M. S. Shukla, J. J. Hayes, R. Everaers, D. Angelov, J. Bednar, and S. Dimitrov (2010). Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**:9620–9625.
- Szenker, E., D. Ray-Gallet, and G. Almouzni (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.*, **21**:421–434.
- Tachiwana, H., W. Kagawa, T. Shiga, A. Osakabe, Y. Miya, K. Saito, Y. Hayashi-Takanaka, T. Oda, M. Sato, and S.-Y. Park (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*, **476**:232–235.
- Tachiwana, H., W. Kagawa, A. Osakabe, K. Kawaguchi, T. Shiga, Y. Hayashi-Takanaka, H. Kimura, and H. Kurumizaka (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**:10454–10459.

- Takayama, Y., H. Sato, S. Saitoh, Y. Ogiyama, F. Masuda, and K. Takahashi (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **19**:682–690.
- Tanaka, T. U., N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M. J. R. Stark, and K. Nasmyth (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, **108**:317–329.
- Tanaka, Y., M. Tawaramoto-Sasanuma, S. Kawaguchi, T. Ohta, K. Yoda, H. Kurumizaka, and S. Yokoyama (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods*, **33**:3–11.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol. Cell*, **18**:617–622.
- Tomonaga, T., K. Matsushita, S. Yamaguchi, T. Oohashi, H. Shimada, T. Ochiai, K. Yoda, and F. Nomura (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.*, **63**:3511–3516.
- Torras-Llort, M., S. Medina-Giró, O. Moreno-Moreno, and F. Azorín (2010). A conserved arginine-rich motif within the hypervariable N-domain of Drosophila centromeric histone H3 (CenH3) mediates BubR1 recruitment. *PLoS ONE*, **5**:e13747.
- Tremethick, D. J. (2007). Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 nm Fiber. *Cell*, **128**:651–654.
- Urbani, L. and T. Stearns (1999). The centrosome. *Curr. Biol.*, **9**:R315–R317.
- Van Holde, K. E., J. R. Allen, K. Tatchell, W. O. Weischet, and D. Lohr (1980). DNA-histone interactions in nucleosomes. *Biophys. J.*, **32**:271–282.
- Van Hooser, A. A., I. I. Ouspenski, H. C. Gregson, D. A. Starr, T. J. Yen, M. L. Goldberg, K. Yokomori, W. C. Earnshaw, K. F. Sullivan, and B. R. Brinkley (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.*, **114**:3529–3542.
- Vermaak, D., H. S. Hayden, and S. Henikoff (2002). Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Mol. Cell. Biol.*, **22**:7553–7561.
- Vitaliano-Prunier, A., A. Menant, M. Hobeika, V. Géli, C. Gwizdek, and C. Dargemont (2008). Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nat. Cell Biol.*, **10**:1365–1371.
- Wang, H., L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, **431**:873–878.
- Weerdt, B. C. M. and R. H. Medema (2006). Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle*, **5**:853–864.
- Wei, R. R., J. R. Schnell, N. A. Larsen, P. K. Sorger, J. J. Chou, and S. C. Harrison (2006). Structure of a central component of the yeast kinetochore: the Spc24p/Spc25p globular domain. *Structure*, **14**:1003–1009.
- Wei, R. R., J. Al-Bassam, and S. C. Harrison (2007). The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**:54–59.

- Welburn, J. P. I., M. Vleugel, D. Liu, J. R. Yates, M. A. Lampson, T. Fukagawa, and I. M. Cheeseman (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol. Cell*, **38**:383–392.
- Welburn, J. P. I. and I. M. Cheeseman (2008). Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetochore. *Dev. Cell*, **15**:645–655.
- Westermann, S., D. G. Drubin, and G. Barnes (2007). Structures and functions of yeast kinetochore complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**:563–591.
- Wieland, G., S. Orthaus, S. Ohndorf, S. Diekmann, and P. Hemmerich (2004). Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **24**:6620–6630.
- Williams, J. S., T. Hayashi, M. Yanagida, and P. Russell (2009). Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol. Cell*, **33**:287–298.
- Winter, S., E. Simboeck, W. Fischle, G. Zupkovitz, I. Dohnal, K. Mechtler, G. Ammerer, and C. Seiser (2008). 14-3-3 Proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J.*, **27**:88–99.
- Witt, O., W. Albig, and D. Doenecke (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.*, **229**:301–306.
- Wong, L. H., K. H. Brettingham-Moore, L. Chan, J. M. Quach, M. A. Anderson, E. L. Northrop, R. Hannan, R. Saffery, M. L. Shaw, and E. Williams (2007). Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res.*, **17**:1146–1160.
- Wong, O. K. and G. Fang (2005). Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores. *J. Cell Biol.*, **170**:709–719.
- Woodcock, C. L. and S. Dimitrov (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**:130–135.
- Woodcock, C. L., A. I. Skoultchi, and Y. Fan (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.*, **14**:17–25.
- Yan, H., H. Ito, K. Nobuta, S. Ouyang, W. Jin, S. Tian, C. Lu, R. C. Venu, G.-L. Wang, and P. J. Green (2006). Genomic and genetic characterization of rice Cen3 reveals extensive transcription and evolutionary implications of a complex centromere. *Plant Cell*, **18**:2123–2133.
- Yuan, J., R. Adamski, and J. Chen (2010). Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Lett.*, **584**:3717–3724.
- Zalensky, A. O., J. S. Siino, A. A. Gineitis, I. A. Zalenskaya, N. V. Tomilin, P. Yau, and E. M. Bradbury (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.*, **277**:43474–43480.
- Zeitlin, S. G., R. D. Shelby, and K. F. Sullivan (2001a). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **155**:1147–1157.
- Zeitlin, S. G., C. M. Barber, C. D. Allis, K. F. Sullivan, and K. Sullivan (2001b). Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *J. Cell Sci.*, **114**:653–661.

- Zeitlin, S. G., N. M. Baker, B. R. Chapados, E. Soutoglou, J. Y. J. Wang, M. W. Berns, and D. W. Cleveland (2009). Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**:15762–15767.
- Zhao, T., T. Heyduk, C. D. Allis, and J. C. Eissenberg (2000). Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J. Biol. Chem.*, **275**:28332–28338.
- Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*, **378**:578–583.
- Zhou, J., J. Y. Fan, D. Rangasamy, and D. J. Tremethick (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**:1070–1076.
- Zhu, C., J. Zhao, M. Bibikova, J. D. Levenson, E. Bossy-Wetzel, J.-B. Fan, R. T. Abraham, and W. Jiang (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol. Biol. Cell*, **16**:3187–3199.
- Zlatanova, J., C. Seebart, and M. Tomschik (2008). The linker-protein network: control of nucleosomal DNA accessibility. *Trends Biochem. Sci.*, **33**:247–253.

 2007–2011 Damien Goutte-Gattat

Ce document est mis à disposition selon les termes de la licence Creative Commons Paternité – Partage à l’Identique 2.0 France. Le texte complet de la licence est disponible à l’adresse <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/fr/> ou sur demande auprès de Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.

### Crédits

- Figures 1.2b, page 4 et 1.3, page 5 : données cristallographiques (PDB 1EQZ) par Harp et al., 2000, images réalisées avec PyMol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 1.0, Schrödinger, LLC)
- Figure 1.4, page 7 : d’après Chris Woodcock, clichés originaux (CIL 709 et 713) élevés dans le domaine public
- Figure 2.1, page 19 : Marina Ruiz Villarreal, illustration élevée dans le domaine public
- Figure 2.2, page 24 : d’après Hans Riz, cliché original (CIL 35558) élevé dans le domaine public