

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

Ecole doctorale : Biologie Santé

Année 2012

**Analyse des fonctions des régions
amino-terminales des histones H3 et H4 dans
le transport nucléaire et l'assemblage en
chromatine pendant la phase S du cycle
cellulaire**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Présentée

et soutenue publiquement par :

Aïda EJLASSI-LASSALLETTE

Le : 11/01/2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs:	Dr. Claude PRIGENT	Université de Rennes
	Dr. Jean-Pierre QUIVY	Institut Marie Curie, Paris
Examineurs:	Dr. Stefan DIMITROV	Université Joseph Fourier, Grenoble
	Dr. François VALLETTE	Université de Nantes
Invités:	Dr. Pierre-François CARTRON	Université de Nantes
	Pr. Anthony ANNUNZIATO	Boston College, USA

Directeur de thèse: Josiane FONTAINE-PERUS

Co-directeur de thèse: Christophe THIRIET

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Christophe THIRIET mon co-directeur de thèse pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir fait rencontrer *Physarum*, je le remercie pour ses qualités d'encadrement scientifique et pédagogique, pour sa grande disponibilité et pour la richesse et l'originalité de ses idées. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour ses encouragements continus et sa patience. Merci Christophe d'avoir été toujours là pour discuter et pour me guider sur le chemin de la découverte du monde de la recherche.

Je remercie Madame Josiane Fontaine-Pérus, Directrice de l'UMR6204, de m'avoir permis d'intégrer l'unité et d'avoir accepté d'assurer la direction de ma thèse

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'ensemble des membres de jury pour avoir bien voulu évaluer mon travail :

- Un grand merci à Stefan DIMITROV pour ses conseils judicieux lors de mes deux comités de suivi de thèse, pour ses qualités humaines et pour les discussions très enrichissantes que j'ai eues avec lui, c'est un véritable honneur pour moi d'avoir pu échanger avec l'un des spécialistes les plus brillant du monde de l'épigénétique.
- Merci à Pierre-François CARTRON et François VALLETTE pour leur gentillesse et d'avoir accepté de participer à mes comités de suivi de thèse et de faire partie des membres de jury.
- Merci à Claude PRIGENT et Jean-Pierre QUIVY les rapporteurs de ma thèse qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail.
- Merci à Anthony ANNUNZIATO de pouvoir assister à ma thèse malgré la distance, merci pour votre déplacement depuis Boston, c'est un grand plaisir pour moi de pouvoir rencontrer une personnalité aussi reconnue dans l'univers de la chromatine.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Marie-Claire ARNAUD pour les conseils précieux qu'elle m'a toujours donnés, pour son amabilité et les discours agréables et enrichissants que j'ai toujours eus avec elle, sans oublier bien sur son aide inestimable dans la culture de *Physarum*.

Un grand merci à toute l'équipe épigénétique, prolifération et différenciation pour la bonne ambiance qui règne tous les jours au laboratoire, en commençant par les filles qui ont séjourné avec moi : Tanaelle, je te remercie beaucoup pour ton soutien continu et ta

serviabilité, tu n'es plus qu'une simple collègue de bureau mais tu es une amie qui m'est très chère, tu seras la prochaine à soutenir ta thèse aussi je te souhaite bonne continuation. Eloïse, je te souhaite également beaucoup de courage pour continuer ta thèse et poursuivre l'écriture de la belle histoire des chaperones d'histones avec *Physarum*.

Merci Thierry et Gwenola pour votre bonne humeur et votre gaieté, merci aussi pour vos encouragements et votre soutien et pour l'efficacité de votre coaching sportif.

Merci à Yvonnick pour sa gentillesse et sa serviabilité, toujours présent pour sauver mon ordinateur. Je remercie aussi Vanessa qui m'a aidée dans la culture de *Physarum*, Marie-France pour ses discours enrichissants et Héloïse pour les habitudes de gourmandise qu'elle a instaurées dans le labo.

Je ne peux pas oublier de remercier Nicole pour ses discours religieux, politiques et diététiques ainsi que pour sa relecture de mon manuscrit.

Ce fut vraiment un grand plaisir de passer ces quelques années au sein de l'unité avec vous tous tant du point de vue professionnel qu'humain. Je vous souhaite à tous beaucoup de courage et de réussite.

Je tiens à remercier une personne qui m'est très chère, ma belle mère, qui a toujours été là pour me soutenir et m'encourager et qui m'a toujours fait sentir que même si j'ai laissé ma maman en Tunisie j'en ai retrouvé une deuxième ici. Merci pour tout Martine...

Je remercie toute ma famille en Tunisie, qui malgré la distance, a toujours été dans mon cœur et proche de moi. Je remercie mon papa pour tous les sacrifices qu'il a fait pour nous et ma maman qui a toujours crû en moi et a approuvé mes choix. Je remercie également ma chère sœur Neïla qui malgré nos différences d'opinion et de point de vue était toujours la grande sœur protectrice sans oublier mes deux frères Adel et Tarek qui m'ont toujours encouragé.

Finalement, je dédie cette thèse à mon rayon de soleil, mon fils Yanis, pour la force et la motivation qu'il m'a procurées chaque fois que j'ai failli baisser les bras.

TABLE DES MATIERES

Introduction

I. Un aperçu historique du gène à la chromatine.....	1
II. Structure de la chromatine et son organisation.....	10
II.1 Les histones.....	11
II.2 Le nucléosome.....	16
II.3 Les polysomes et les ordres de structure de la chromatine.....	19
II.4 Organisation nucléaire de la chromatine.....	22
III. La chromatine : le siège des activités génétiques.....	24
III.1 La transcription.....	24
III.2 La réparation.....	26
III.3 La réplication.....	27
IV. <i>Physarum polycephalum</i> : un modèle pour étudier les activités nucléaires tout au long du cycle cellulaire.....	35
IV. 1 Taxonomie.....	35
IV.2 Cycle de vie et développement de <i>Physarum</i>	38
a) Phase de reproduction.....	38
b) Phase végétative ou plasmode.....	38
c) Phase de dormance ou sclérote.....	39
IV. 2 Biologie des plasmodes de <i>Physarum</i>	41

Matériels et Méthodes

I. Matériels Biologiques.....	44
I.1 Le système procaryote : <i>Escherichia Coli</i>	44
I.2 Le système eucaryote <i>Physarum polycephalum</i>	46
a) culture liquide des microplasmodes.....	46
b) Culture sur filtre de papier des macroplasmodes.....	47
c) préparation du stock de sphérules.....	50
II. Les techniques électrophorétiques.....	50
II.1 Electrophorèse des acides nucléiques.....	51
a) Electrophorèse sur gel d'agarose.....	51
b) Electroélution de l'ADN à partir du gel d'agarose.....	51
II.2 Electrophorèse des protéines.....	52

a) Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE SDS).....	52
b) Transfert des protéines.....	53
II.3 Préparation de gel natif.....	53
III. Clonage moléculaire des mutants d'histones par mutagenèse dirigée.....	54
III.1 Préparation du stock de vecteur de clonage pET-3a.....	54
III.2 Mutagenèse dirigée pour générer les mutants.....	56
a) Amplification par PCR.....	56
b) Digestion du produit de PCR et ligation avec le plasmide digéré....	60
c) Transformation de DH5 α compétente et criblage des clones recombinants par digestion enzymatique.....	60
IV. Préparation des histones recombinantes et leur purification.....	61
IV.1 Expression des protéines recombinantes dans BL21.....	62
IV.2 Purification des histones sous forme de complexe.....	63
IV.3 Quantification des histones recombinantes avant incorporation.....	64
V. Reconstitution de nucléosomes <i>in vitro</i>	65
VI. Incorporation des histones recombinantes dans <i>Physarum polycephalum</i>	66
VII. Analyses des produits d'incorporation dans les différentes fractions cellulaires.....	70
VII.1 Analyses cellulaires en microscopie.....	70
VII.2 Fractionnement cellulaire de <i>Physarum</i> et analyse biochimique des différentes fractions.....	72
VII.2 Analyses Biochimiques des différentes Fractions.....	73

Résultats

I. Evidence de l'assemblage en chromatine couplé à la réplication d'histones exogènes incorporées pendant la phase S.....	75
I.1 Validation du fractionnement cellulaire de macroplasmodes de <i>Physarum</i>	75
I.2 Préparation de complexes des histones H3 et H4.....	79
I.3 Incorporation de complexes d'histones dans des macroplasmodes de <i>Physarum</i>	82
I.4 Les histones incorporées dans <i>Physarum</i> pendant la phase S sont assemblées en chromatine en couplage avec la réplication.....	88

II. Fonction des régions N-terminales des histones dans le transport des histones dans le noyau.....	92
II.1 Importance des queues des histones H3 et H4 dans l'import nucléaire des complexes H3/H4.....	92
II.2 Effet de la position des queues H3 et H4 dans le transport au noyau des histones.....	100
II.3 Les modifications réplication dépendantes de H4 jouent un rôle important dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau.....	109
III. Implication des régions N-terminales des histones H3 et H4 dans l'assemblage en chromatine couplé à la réplication.....	126
Discussion et Conclusions.....	135
Références Bibliographiques.....	148
Publications.....	157

I. Un aperçu historique du gène à la chromatine

Depuis l'intérêt que l'homme porte à l'étude du vivant, les philosophes et les naturalistes pressentaient qu'il devait y avoir une transmission des caractères acquis à la descendance. Mais ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle, avec les travaux de Johann Gregor Mendel (1822-1884), moine botaniste autrichien, qu'est apparue la notion d'hérédité pour la première fois. Mendel souvent décrit comme étant le fondateur de la génétique formelle a non seulement défini la terminologie de la génétique moderne en introduisant les termes de phénotype et génotype, mais aussi sur la base de ses études a énoncé les lois dites de Mendel. En dépit de certains manquements à la déontologie scientifique, les travaux de Mendel qui reposent sur différents croisements qu'il a effectués sur le petit pois et l'analyse de leurs phénotypes sont aujourd'hui connus du grand public. Ces croisements lui ont permis d'émettre l'hypothèse que la couleur (jaune ou verte) et l'aspect (lisse ou ridée) des graines chez le petit pois sont contrôlés par « un facteur » transmis aux descendants par l'intermédiaire des gamètes.

A la fin du XIX^{ème} siècle, les biologistes ont déterminé les structures qui peuvent intervenir dans la transmission des caractères héréditaires sur la base d'observations au microscope optique. Ces observations révèlent certaines structures dans le noyau cellulaire qui fixent facilement les colorants, nommées chromosomes : « corps coloré ». L'allemand Walther Flemming (1843-1905) a été le premier biologiste à examiner de façon systématique le comportement des chromosomes dans le noyau au cours de la division cellulaire. Flemming a observé que les chromosomes sont partagés en deux pendant la division cellulaire et que chaque moitié est conduite dans une direction opposée pour se localiser dans les deux cellules filles. Ces dernières vont à leur tour fabriquer une copie de la moitié des chromosomes qu'elles contenaient. Ainsi les cellules filles et les cellules mères contiennent le même nombre de chromosomes.

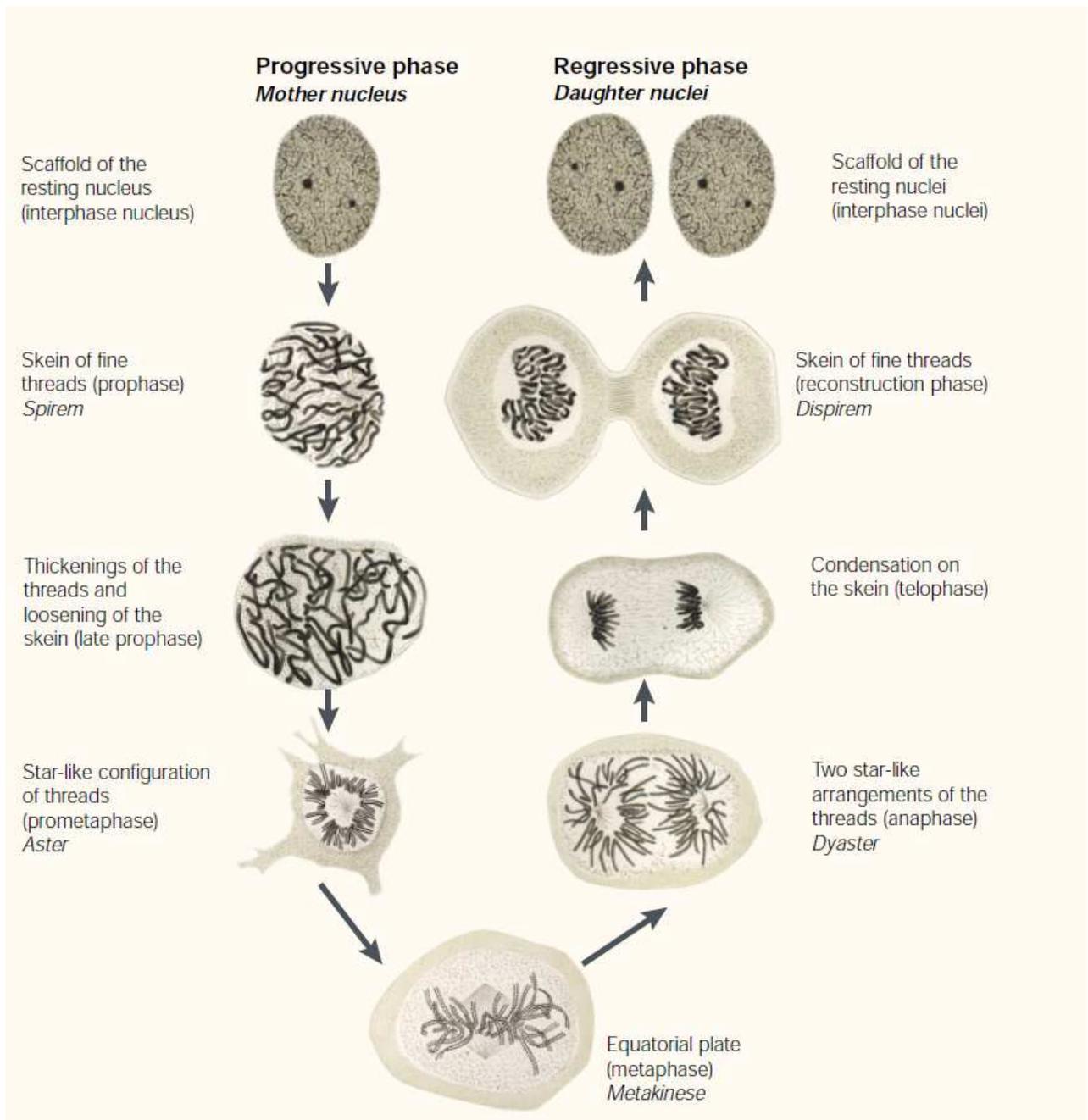


Figure 1 : Représentation selon Flemming de la division cellulaire chez les eucaryotes.

Les chromosomes sont partagés en deux copies identiques. Chaque copie est conduite dans une direction opposée pour se localiser finalement dans les deux cellules filles (Paweletz 2001).

En 1902, l'allemand Boveri et l'américain Sutton découvraient que les chromosomes sont toujours représentés par un couple de même apparence dans le noyau. Leurs travaux ont permis d'établir le lien avec la théorie de Mendel ; le caractère est contrôlé par « un facteur discret », connu aujourd'hui sous le nom de gène, transmis des parents à la descendance et présent en deux exemplaires, l'un de provenance maternelle et l'autre paternelle. La nouvelle notion de gène est définie vers les années 1909 par le biologiste danois Johannsen en conclusion de ses travaux sur les haricots dans lesquels il affirme que tous les caractères transmis au cours des générations sont véhiculés par les gènes.

Dans le but de vérifier la validité des lois de Mendel chez l'animal, Thomas Hunt Morgan (1866-1945) (prix Nobel 1933) a entrepris entre 1910 et 1915 une étude chez la drosophile ou mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*). Ses travaux ont permis de mettre en évidence le rôle du chromosome dans l'hérédité chez la drosophile qui, encore aujourd'hui, reste un organisme modèle pour les études génétiques. Morgan et son équipe, à la suite de nombreux croisements, obtiennent la première drosophile mutante dont les yeux sont dépourvus de pigments, « yeux blancs » contrairement à ceux de la drosophile normale dont les yeux possèdent une pigmentation rouge. Ces résultats mettent en évidence un des principes fondateurs de la théorie évolutionniste de Darwin, où la mutation représente un caractère original qui apparaît de façon fortuite alors qu'aucun parent ne le porte et qui peut être transmis à la descendance. Les expériences sur la drosophile révèlent que le nombre de gènes est plus élevé que celui des chromosomes, il en conclut que les chromosomes représentaient le support des gènes, que ces derniers ont une distribution linéaire, qu'ils sont situés dans un ordre constant et défini et qu'ils occupent toujours le même site dans le chromosome. Ces chromosomes peuvent être le siège d'un phénomène assez intéressant qui est le crossing-over où les gènes liés peuvent montrer une disjonction indépendante par l'intermédiaire d'échanges de segments de chromatides entre chromosomes homologues durant la méiose.

Pendant longtemps il a été admis que la substance chimique qui constituait les gènes est représentée par les protéines et ce n'est qu'en 1944 qu'Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty, en reprenant les travaux de Fred Griffith de 1928 sur la transformation bactérienne, ont réussi à purifier le facteur transformant du pneumocoque. Il s'agissait bien de la molécule d'acide désoxyribonucléique qui représente le support de l'information génétique, mieux connue sous l'acronyme d'ADN (Avery, Macleod et al. 1944).

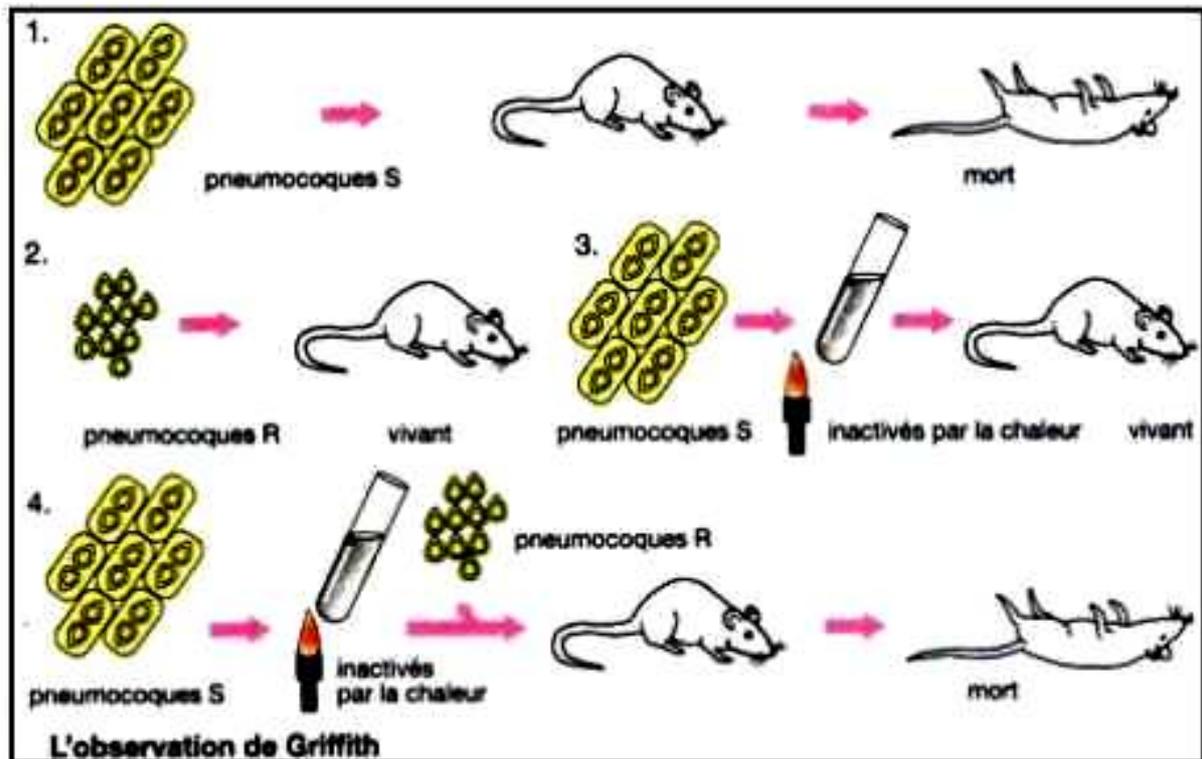


Figure 2 : Expériences de Griffith chez la souris.

Griffith décrit deux souches de pneumocoques (*Diplococcus pneumoniae*) : la souche R (rough, avec des colonies à aspect rugueux) et la souche S (smooth, avec des colonies à aspect lisse). La souche S doit son aspect à sa capsule polysaccharidique et se révèle être mortelle pour la souris lorsqu'elle lui est injectée. A l'inverse, la souche R qui ne synthétise pas une telle capsule n'est pas nocive pour la souris. L'injection de bactéries S, préalablement tuées par la chaleur, n'est plus létale. Cependant l'injection de cette dernière mélangée à des bactéries R vivantes provoque la mort de la souris. Les bactéries R, au contact des bactéries S tuées, ont donc acquis un caractère pathogène qu'elles ne possédaient pas précédemment. Ce phénomène a été appelé transformation bactérienne (d'après l'Atlas de poche de génétique).

Moins de 10 ans après cette découverte, en 1953, James Watson et Francis Crick (figure 3) publient dans le journal 'Nature' du 25 avril 1953, un article dans lequel ils font état de la cristallisation de la molécule d'ADN et en présentent la structure. Cette structure décrit les quatre bases azotées composant l'ADN : Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine (A, T, C et G) qui s'agencent avec des liens transversaux par la formation de paires entre A et T, et G et C en tournant autour de leur axe donnant ainsi à cette structure le nom de double hélice d'ADN (WATSON and CRICK 1953).

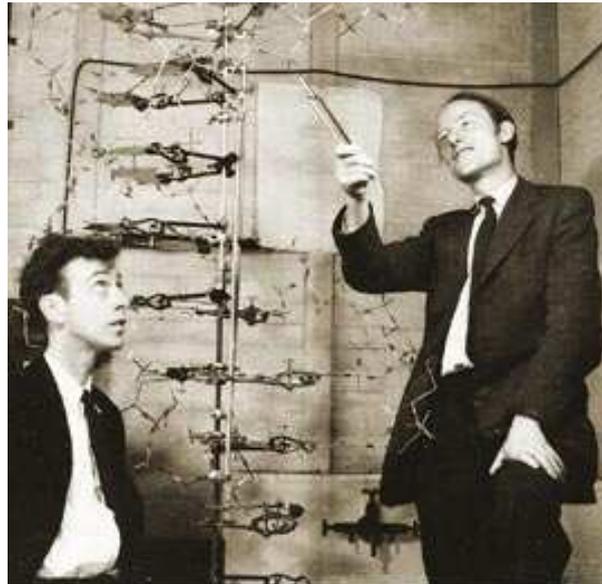


Figure 3 : Watson et Crick.

Les deux Scientifiques américains ; le biologiste James Watson (à gauche) et le physicien Francis Crick (à droite) avec un modèle représentant la structure en double hélice de l'ADN.

Si les travaux de Watson et Crick ont créé les fondations de génétique moléculaire, c'est en 1957, qu'une des pierres fondatrices de ce nouveau domaine de recherche est apparue avec le dogme central de la biologie moléculaire, qui est le transfert de l'information génétique portée par le gène à une autre entité moléculaire, la protéine. Par conséquent, il était raisonnable d'en faire la démonstration expérimentale et ainsi comprendre comment la molécule d'ADN présente uniquement dans le noyau de la cellule eucaryote peut diriger la synthèse des protéines localisées dans le cytoplasme.

La question sous-jacente au transfert de l'information génétique à la protéine est de comprendre comment les quatre bases qui composent l'ADN peuvent donner une protéine constituée de 20 acides aminés différents. C'est en 1966 que Nirenberg et ses collaborateurs

sont parvenus à faire la démonstration de l'existence d'un code qui permet la correspondance entre les bases de l'ADN et les acides aminés (tableau 1). Le décryptage du code génétique, a valu à ces auteurs, Mashall Warren WaNirenberg, Har Gobin Khorana et Robert W. Holley, d'être récompensés du prix Nobel en 1968. Le code génétique met en évidence deux caractéristiques importantes. Tout d'abord, l'utilisation de triplets de bases, ou codons, pour correspondre à un acide aminé impliquant ainsi une dégénérescence du code génétique. Ensuite, le code génétique est universel même si on peut relever quelques exceptions comme par exemple le codon CUG qui code habituellement pour la leucine et qui correspond à la sérine chez *Candida* ou encore *Tetrahymena* qu'utilise les codons UAG et UAA pour coder la glutamine au lieu de coder pour un stop.

		NUCLÉOTIDE 2 ^{ème} POSITION					
		U	C	A	G		
NUCLÉOTIDE 1 ^{ère} POSITION	U	UUU } phényl- UUC } alanine UUA } leucine UUG }	UCU } UCC } sérine UCA } UCG }	UAU } tyrosine UAC } UAA } non-sens UAG }	UGU } cystéine UGC } UGA } non-sens UGG } tryptophane	U C A G	
	C	CUU } CUC } leucine CUA } CUG }	CCU } CCC } proline CCA } CCG }	CAU } histidine CAC } CAA } glutamine CAG }	CGU } CGC } arginine CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } isoleucine AUC } AUA } AUG } méthionine	ACU } ACC } thréonine ACA } ACG }	AAU } asparagine AAC } AAA } lysine AAG }	AGU } sérine AGC } AGA } arginine AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } valine GUA } GUG }	GCU } GCC } alanine GCA } GCG }	GAU } acide GAC } aspartique GAA } acide GAG } glutamique	GGU } GGC } glycine GGA } GGG }	U C A G	

Tableau 1 : Le code génétique.

Correspondance entre la séquence nucléotidique de l'ARN messager (et donc dérivant de l'ADN) et la séquence en acides aminés de la protéine.

Si la compréhension de la mécanistique qui permet de passer du gène à la protéine a explosé depuis les travaux de Watson et Crick, l'étude des gènes a également bénéficié d'un décloisonnement de la science. En effet, la chimie a contribué de façon très significative avec des chimistes comme Allan Maxam et Walter Gilbert, ou encore Frederick Sanger à développer des méthodes permettant de décrypter l'enchaînement des bases qui constitue l'ADN et par le fait, introduire le séquençage de l'ADN. Aujourd'hui ce domaine de recherche a vu un essor extraordinaire avec la génération de projets très ambitieux comme celui de séquencer des génomes entiers. C'est en 2003 que la fin du séquençage complet du génome humain a été annoncée.

Dans l'élan que la génétique a engendré, il semble important de souligner les travaux de François Jacob et Jacques Monod, dans lesquels ils montrent, qu'outre la séquence des gènes, l'organisation du génome est fonctionnellement importante et introduisent alors la notion d'opéron. Par ces travaux chez la bactérie, Jacob et Monod montrent également que la régulation de l'expression de gènes fait appel à des protéines et qu'il existe des séquences non traduites qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes.

Comme nous l'enseigne la génétique formelle, les gènes s'expriment pour donner le phénotype, qui doit également être transmis à la descendance. La mise en évidence de l'ADN comme support de l'information génétique questionne donc sur la transmission et la pérennité de l'information génétique au fil des générations. Dans le milieu du XXème siècle, Meselson et Stahl montrent grâce à des expériences d'incorporation d'isotope lourd ^{15}N que l'ADN passe les générations en se copiant suivant le modèle de la réplication semi-conservative. Ces résultats confirmaient l'intuition de Watson et Crick qui suggéraient que pendant la réplication les deux brins d'ADN se séparaient et chacun jouait le rôle de matrice pour deux molécules filles. A la même époque Arthur Kornberg, prix Nobel en 1959, isolait à partir d'*E. Coli* une enzyme capable de répliquer la molécule d'ADN *in vitro* qu'il dénomme ADN polymérase.

Alors qu'un grand nombre d'expériences visant à mettre en évidence les mécanismes moléculaires de l'expression et de la pérennité de l'information génétique ont utilisé des modèles procaryotes, le questionnement trouvait sa légitimité concernant les cellules eucaryotes. En effet, contrairement aux procaryotes, le génome des cellules eucaryotes est enfermé dans le noyau. C'est dans le laboratoire d'Aaron Klug dans le milieu des années 70,

que Roger Kornberg, fils d'Arthur Kornberg, étudie l'association entre le matériel génétique eucaryote et de petites protéines basiques appelées histones. Ce complexe nucléoprotéique, aujourd'hui connu sous le nom de chromatine, a valu à Aaron Klug d'être récompensé par le prix Nobel en 1982. A la même époque que celle des travaux de Kornberg et Klug, le groupe de Pierre Chambon montre que la chromatine est constituée d'une succession de sous-unités qu'il appelle nucléosomes. C'est sans doute sur la base de ces découvertes que l'étude du matériel génétique de la cellule eucaryote est devenue aujourd'hui un domaine de recherche à part entière. Le gigantesque essor de l'étude de la chromatine durant la dernière décennie est sans doute associé au désenchantement du séquençage des génomes qui montrait que les génomes de la drosophile et de l'homme présentent un nombre de gènes similaire. Aussi, pour donner une interprétation à l'absence de cohérence entre la complexité du génome et la position dans la classification phylogénétique, il a été proposé qu'une nouvelle information contenue dans la chromatine et différente de la séquence d'ADN ait une fonction importante. Cette nouvelle information porte aujourd'hui le nom d'information épigénétique. Comme son nom l'indique ce nouveau volet de la science est héritier de la théorie de l'épigénèse qui représente la construction progressive des organismes au cours du développement embryonnaire. Cette définition est donnée initialement par le généticien Conrad H. Waddington en 1942 qui l'énonçait comme étant une branche de la biologie étudiant les implications entre les systèmes 'gènes + environnement' et leur 'produits' donnant naissance au phénotype d'un individu. Cette nouvelle branche avait pour but de compléter la génétique pour s'éloigner de la simple énumération des gènes et leur positionnement sur les chromosomes.

Waddington visait à partir de sa nouvelle notion d'épigénétique à souligner l'incapacité de la génétique Mendélienne à expliquer la progression du développement embryonnaire. Selon ce premier concept d'épigénétique les gènes dessinent un paysage que les cellules parcourent lorsqu'elles se différencient, comme les rivières qui coulent le long d'une vallée. C'est dans cette opposition à la génétique que l'épigénétique a trouvé, et trouve aujourd'hui encore, son fondement et son pouvoir de séduction. La définition de l'épigénétique a évolué aujourd'hui pour être considérée comme l'étude de caractères, généralement réversibles, comme les changements des états de transcription des gènes, qui sont héréditaires au cours des divisions cellulaires et qui n'impliquent pas de changements de la séquence d'ADN.

Ce n'est sûrement pas un hasard si l'essentiel des travaux d'épigénétique se focalise aujourd'hui sur le rôle de la chromatine dans le contrôle de l'expression des gènes. En effet, la structure précise de la chromatine dans le noyau cellulaire et les mécanismes qui en assurent la reproduction lors des divisions cellulaires restent, malgré tous ces efforts, obscurs.

II. Structure de la chromatine et son organisation

Si on prend l'exemple du génome humain, il contient plus que 3.4 milliards de paires de bases et entre 20 000 et 25 000 gènes contenus dans environ 1m d'ADN. Toute cette masse de matériel héréditaire arrive à être enfermée dans un noyau dont le diamètre est d'environ 10 à 20 micromètres. La question qui se pose est comment l'ADN est empaqueté dans le chromosome pour l'être par la suite dans le noyau ? La réponse réside en partie dans les histones, ces protéines à faible poids moléculaire, qui en s'associant à l'ADN vont former un complexe nucléoprotéique appelé nucléosome et dont l'enchaînement forme la chromatine (figure 4).

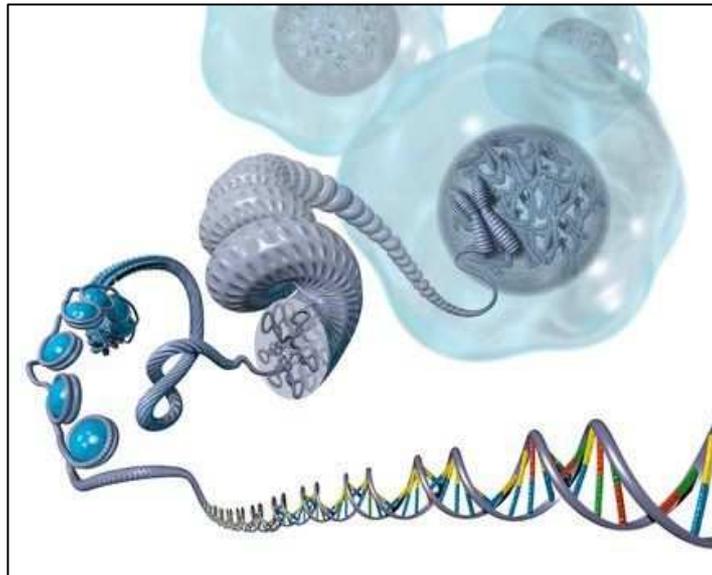


Figure 4 : Compactage de l'ADN.

Représentation schématique montrant comment l'ADN est empaqueté dans le noyau des cellules eucaryotes. La double hélice d'ADN s'enroule autour des histones pour former des pelotes ou nucléosomes. L'ensemble se condense de plus en plus pour former les chromosomes capables d'être logés dans le noyau (d'après « science photo library »)

La chromatine renferme donc le matériel génétique et elle correspond à un complexe nucléoprotéique. Si l'idée de la compaction de l'ADN dans le noyau grâce aux histones est généralement admise, la question qui reste ouverte au débat est comment la cellule arrive à accomplir ses activités dans ce contexte de chromatine où l'ADN n'est plus accessible ? Il s'avère que ce complexe subit des changements structuraux qui se trouvent corrélés au déroulement des activités de la cellule. Cette corrélation est aussi évoquée entre l'état de condensation de la chromatine à l'intérieur du noyau et la position de la cellule dans le cycle cellulaire.

II.1 Les histones

Les protéines impliquées dans l'édifice chromatinien sont réparties en deux groupes majeurs : les histones et les protéines non histones. Les histones qui sont des protéines basiques et acido-solubles se trouvent associées à l'ADN dans les chromosomes et sont directement impliquées dans l'enroulement de l'ADN. Quant aux protéines non-histones, elles sont très hétérogènes, elles varient selon le tissu et elles présentent des fonctions cellulaires très diversifiées : enzymes, protéines de structure...

Bien que les protéines non-histones présentent un grand intérêt pour la cellule eucaryote, notre attention se focalisera sur les histones.

Les histones dont les masses moléculaires sont comprises entre 11 et 22 kDa sont des protéines conservées au cours de l'évolution. Cette conservation suggère qu'elles ont un rôle important dans l'activité des gènes et dans le métabolisme cellulaire. On distingue cinq types d'histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4 représentant les histones du cœur et une dernière classe H1 : histone de liaison ou histone « linker ».

Les histones provenant de différents organismes ont été purifiées par chromatographie. Par cette approche il a été possible de séparer des fractions qui ont donné lieu à la première nomenclature des histones : F1, F2C, F2a2, F2a1, F2b et F3 (JOHNS, PHILLIPS et al. 1960; Kornberg and Thomas 1974; van der Westhuyzen, Böhm et al. 1974). Cette nomenclature proposée par Johns et Butler en 1962 avec la lettre « F » pour désigner fraction a été

remplacée par celle proposée par Bradbury en 1975 à l'IUPAC (Union Internationale de chimie pure et appliquée) (tableau 2).

Nomenclature des Fractions		Poids moléculaire (k Da)
Bradbury (1975)	Johns et Bulter (1962)	
H1	f1	21,5
H2A	f2a2	14,004
H2B	f2b	13,774
H3	f3	15,324
H4	f2a1	11,282

Tableau 2 : Nomenclature des histones.

Les histones sont particulièrement riches en résidus lysines et arginines et possèdent une structure appelée « histone fold » qui est impliquée dans les interactions avec l'ADN et dans l'hétérodimérisation permettant aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B et H3-H4). Ces interactions sont appelées « poignée de main » (« Handshake »). La structure des histones est composée de trois hélices α reliées les unes aux autres par une boucle (Arents, Burlingame et al. 1991). En plus de « l'histone fold », les histones possèdent une autre région non structurée, correspondant à la région N-terminale (figure 5). Dans le cas de l'histone H2A, une seconde région non structurée est également présente dans la partie C-terminale de la protéine.

Ces régions terminales peuvent être le siège de modifications post-traductionnelles. Ces modifications comprennent l'acétylation, la phosphorylation ou encore la méthylation, pour ne citer que les plus étudiées. Il a été proposé que ces modifications pourraient former un code (code des histones ou code épigénétique) lequel serait directement ou indirectement impliqué

dans les activités de la chromatine (Strahl and Allis 2000). Ces modifications sont ciblées sur des résidus spécifiques pour chaque histone et sont catalysées généralement de manière réversible par des enzymes également spécifiques. Cette réversibilité met en évidence la plasticité de l'information épigénétique à l'inverse du code génétique qui est défini par la séquence d'ADN. Toutefois, il est à noter que les modifications des histones ne représentent pas les seules marques épigénétiques impliquées dans les régulations des activités du matériel génétique. En effet, la cellule dispose également d'autres stratégies comme la méthylation de l'ADN ou encore l'utilisation de variants d'histones, mais ces dernières ne sont pas trouvées dans l'ensemble des eucaryotes et pourraient être le fruit de l'évolution.

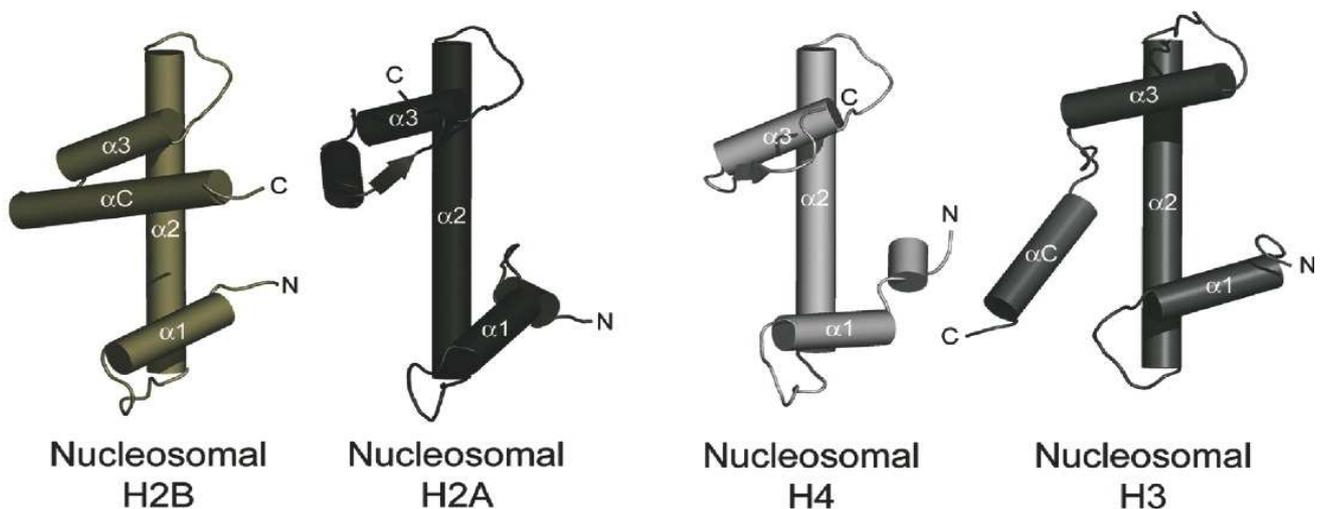


Figure 5 : Histones fold.

Les histones présentent une structure secondaire qui est l'histone 'fold' représentée par une succession de trois hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$). (Sondermann, Soisson et al. 2003).

Dans la chromatine, une cinquième classe d'histone (histone linker ou H1) vient s'ajouter pour favoriser la stabilisation des nucléosomes et leur organisation en structures ordonnées (Wolffe and Dimitrov 1993; Carruthers, Bednar et al. 1998). Si les analyses génétiques de l'histone linker n'ont pas permis de mettre en évidence une fonction dans les activités transcriptionnelles, les analyses pendant la phase S montrent que cette histone aurait une fonction dans la régulation de la réplication (Thiriet and Hayes 2009). D'un point de vue

structural, l'histone H1 présente trois domaines. Le premier est représenté par la région N-terminale avec une longueur d'environ 45 acides aminés, une partie centrale d'environ 75 acides aminés formant 3 hélices et finalement la région C-terminale qui est la plus étendue avec environ 100 acides aminés. Cette dernière est non structurée dans les solutions aqueuses, cependant elle présente une structure secondaire une fois qu'elle est associée à l'ADN (Roque, Iloro et al. 2005). La liaison de H1 à la chromatine semble être assurée par cette région C-terminale (Hendzel, Lever et al. 2004).

La principale modification post-traductionnelle de H1 est la phosphorylation qui augmente progressivement tout au long du cycle cellulaire pour atteindre un maximum en phase G2 et en mitose. Ensuite, elle diminue brusquement à la fin de la mitose en télophase (Bradbury, Inglis et al. 1973; Boggs, Allis et al. 2000). Toutefois, ces résultats souffrent de biais expérimentaux qui pourraient affecter l'interprétation comme l'analyse sur des cellules fixées par immunocytochimie (Boggs, Allis et al. 2000) ou encore l'absence de la phase G1 chez *Physarum* qui implique que l'organisme doit préparer la phase de réplication de son génome lors du cycle précédent (Bradbury, Inglis et al. 1973). Cette spécificité de *Physarum* a été mise en évidence avec la transcription du gène de l'histone H4 qui se produit dès la fin de la phase G2 pour que les messagers soient traduits pendant la phase S qui suit la mitose (Wilhelm, Toublan et al. 1988). Il a en effet été montré que la phosphorylation de l'histone H1 chez *Physarum* favorise le déplacement de l'histone 'linker' pendant la phase S pour permettre le « firing » des origines de réplication (Thiriet et Hayes, 2009). Ces résultats sont en accord avec des analyses de réplication de chromatines reconstituées *in vitro* en présence d'histone 'linker' prélevée à différents stades du cycle cellulaire, lors desquels il a été montré que la présence d'histone 'linker' phosphorylée prélevée pendant la phase S permet une meilleure efficacité de la réplication. (Halmer and Gruss 1996).

En plus des histones canoniques, les cellules expriment des variants d'histones en quantités plus faibles, ces variants s'avèrent ne pas être sous le même contrôle du cycle cellulaire. Bien que ces variants d'histones ne soient pas en nombre fixe dans tous les organismes, leur présence dans le nucléosome est proposée se faire en coordination avec certains processus cellulaires intéressant l'ADN et impliquant des activités chromatiniennes comme la transcription, la réparation des dommages de l'ADN, les divisions cellulaires, ou

encore une fonction spécifique de certaines régions des chromosomes. A ce jour, on connaît des variants de toutes les histones à l'exception de l'histone H4.

Pour l'histone H1, il s'agit de la classe la plus divergente avec plus de 11 variants chez la souris. Ces variants interviennent dans la formation et la condensation de la chromatine d'ordre supérieur ainsi que pour moduler son accessibilité aux protéines régulatrices, aux facteurs de remodelage et aussi aux enzymes (Zlatanova, Caiafa et al. 2000).

L'ensemble de ces variants semble avoir un rôle dans la transcription et particulièrement dans la répression de la transcription pendant la différenciation. Des expériences effectuées chez *Physarum* suite à une incorporation des trois variants H1, H1° et H5 montrent que ces variants sont transportés dans les noyaux de la cellule pendant la phase S ou G2. Par contre leur assemblage en chromatine s'effectue uniquement en début de G2. Cet assemblage en chromatine de l'histone linker pendant la phase G2 inhibe la transcription ; en mesurant l'activité transcriptionnelle de ces trois variants, il s'avère que H1 réduit la transcription à 60% par rapport au contrôle et à environ 30% pour H5 ou H1° (Thiriet and Hayes 2001). Cette inhibition est en corrélation avec le rôle suggéré de l'histone linker dans l'activité transcriptionnelle, mais pas confirmé par les analyses génétiques (Shen and Gorovsky 1996).

Le variant H5 est déposé en chromatine pendant les derniers stades de différenciation d'érythrocytes, sa déposition coïncide avec une répression globale de la transcription. Pour ce variant la différence majeure entre l'histone et son variant réside dans la partie C- ou N-terminale mais pas dans la partie globulaire (Happel and Doenecke 2009).

Les variants de H2A sont H2A.Z, MacroH2A, H2A-Bbd, H2AvD et H2AX (Kamakaka and Biggins 2005). Le variant H2A.Z est un variant assez conservé à travers l'évolution (Jackson, Falciano et al. 1996) alors que les variants MacroH2A et H2ABbd sont restreints aux vertébrés. Le variant H2A.Z plutôt présent dans les régions promotrices des gènes est impliqué à la fois dans l'activation et l'inactivation transcriptionnelle. Le variant macroH2A se localise sur le chromosome X inactivé et semble aussi être impliqué dans la répression transcriptionnelle par l'intermédiaire de sa partie C-terminale (Ladurner 2003). En ce qui concerne le variant H2ABbd, il se localise sur le chromosome X activé. Ce variant est dépourvu d'une partie de sa région N-terminale et il semblerait que c'est cette délétion qui favorise la déstabilisation du nucléosome et qui aurait pour conséquence le dégagement du

nucléosome pendant la transcription (Gautier, Abbott et al. 2004). Récemment deux nouveaux variants d'histones ont été découverts dans l'hétérochromatine péricentrique dans les spermatides en élongation chez la souris ; H2AL1 et H2AL2 (Govin, Escoffier et al. 2007). Ces deux variants semblent avoir un rôle spécifique durant la spermatogenèse (Syed, Boulard et al. 2009).

Les variants de l'histone H2B sont spécifiques de certains stades de développement mais leur rôle n'est toujours pas clairement défini.

L'histone H3 par exemple possède trois variants différents ; H3.3, CenH3 et le variant spécifique des tissus testiculaires H3.4. Bien que H3.3 et H3.1 (H3 canonique) soient identiques à 96%, ces deux protéines sont utilisées à des moments différents du cycle cellulaire. H3.3 qui est synthétisée tout au long du cycle cellulaire et incorporée pendant toutes les phases de celui-ci (Ahmad and Henikoff 2002) alors que l'histone canonique n'est synthétisée que pendant la phase S. Un autre variant de H3, CenH3 est un variant centromérique. Ce variant est nécessaire dans la ségrégation des chromosomes chez différents organismes (Stoler, Keith et al. 1995; Goshima, Kiyomitsu et al. 2003). CenH3 est un variant conservé chez différentes espèces et présente des modifications qui spécifient le site de formation du kinétochore (Warburton, Cooke et al. 1997).

II.2 Le nucléosome

Il a été bien établi que la structure de la chromatine implique une série de sous-unités nucléoprotéiques (nucléosomes). Ces nucléosomes ont été décrits comme formant un « chapelet de billes » ou encore « les corps μ ». La mise en évidence de cette structure a été obtenue pour la première fois par microscopie électronique (Olins and Olins 1974). Différentes endonucléases (DNase I, DNase II, Staphylocoque nucléase capables de digérer préférentiellement l'ADN nu entre ces nucléosomes) ou encore des protéases telle que la trypsine ont été utilisées pour mettre en évidence cet aspect de « perles sur fil » des nucléosomes (Kornberg and Thomas 1974; Camerini-Otero, Sollner-Webb et al. 1976; Sollner-Webb, Camerini-Otero et al. 1976) (figure 6). De même, l'utilisation de l'ADN relaxé du virus simien 40 (SV40) qui peut s'associer *in vitro* aux histones H2A, H2B, H3, et H4 a permis cette observation des nucléosomes agencés successivement tout au long de l'ADN (Germond, Hirt et al. 1975).

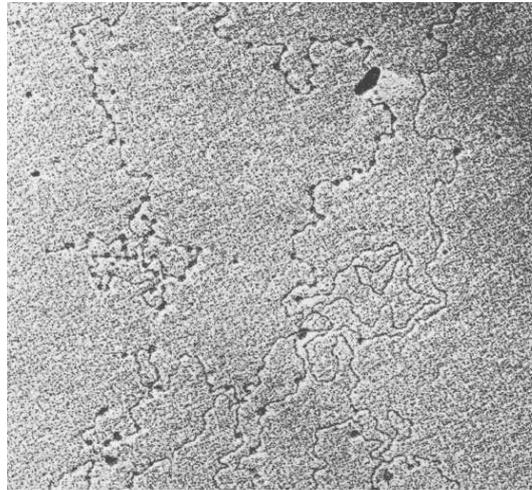


Figure 6 : Chromatine sous forme de « chapelet de billes ».

Microscopie électronique de la chromatine du foie de poulet après digestion de l'histone F1(H1) par trypsine (Oudet, Gross-Bellard et al. 1975).

En 1984, une analyse cristallographique du nucléosome a permis d'obtenir une image de diffraction à 7Å de résolution à partir du complexe natif dont la longueur d'ADN s'associant aux histones est de 146 ± 2 pb. Bien que la résolution soit faible et ne permette d'obtenir qu'une modélisation de la topologie du nucléosome, certaines informations importantes ont pu être tirées. Le nucléosome est composé d'environ 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère protéique faisant environ 1.65 tours, cet octamère contient deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Richmond, Finch et al. 1984). L'aspect de l'organisation des histones les unes avec les autres n'a été mis en évidence que presque 10 ans plus tard avec les travaux de cristallographie du groupe de Moudrianakis. L'octamère de protéines forme une structure tripartite composée d'un tétramère central des histones 2 (H3/H4) auquel deux hétérodimères des histones H2A/H2B sont ajoutés de chaque côté (Arents, Burlingame et al. 1991). De plus, chacun des hétérocomplexes d'histones correspond à l'association entre elles des 3 hélices de chaque histone en 'poignée de main' ou 'handshake' (Arents, Burlingame et al. 1991). Des cristaux diffractant à plus haute résolution ont pu être obtenus en utilisant des protéines recombinantes et un ADN synthétique. Par cette

méthodologie, le groupe de Richmond a été en mesure de décrire la structure cristallographique du nucléosome avec une résolution de 2.8 Å (Luger, Mader et al. 1997). Cette structure cristallographique a permis de montrer les interactions histones/ ADN (figure 7).



Figure 7 : Structure cristallographique du nucléosome à 2.8Å.

146 paires de bases d'ADN (marron et vert) enroulées autour de deux exemplaires des histones (H3, bleu ; H4, vert; H2A, jaune; H2B, rouge) formant l'octamère d'histones. Les régions N-terminales des histones sont de part et d'autre de la particule interagissant avec le sillon mineur de l'ADN. A gauche est représenté le nucléosome vu de dessus et celui de droite est observé depuis le côté, perpendiculairement à celui de gauche (Luger, Mader et al. 1997).

Plus récemment, la résolution de cette structure a été descendue à 1.9 Å, suite à l'utilisation d'ADN à 147 pb permettant une meilleure « symétrisation » de la particule cœur. Cette nouvelle résolution a permis de mettre en évidence une multitude de molécules d'eau qui semblent intervenir pour créer des ponts entre les histones et l'ADN via des liaisons hydrogènes (Richmond and Davey 2003). Les implications de cette découverte sont importantes car en montrant que les interactions histones/ADN sont intercalées par des molécules d'eau, on peut supposer que la structure nucléosomique est dynamique.

Si les études cristallographiques ont permis d'avoir des informations précieuses sur la structure du nucléosome, il n'a pas été possible par cette approche d'avoir une vision précise

des régions terminales des histones. Ce manquement tient au fait que ces régions des histones n'adoptent pas une configuration unique et qu'il n'est pas possible d'avoir une image de diffraction précise.

II.3 Les polysomes et les ordres de structure de la chromatine

La condensation de l'ADN en chromatine s'organise de manière séquentielle et ordonnée et commence par l'enroulement des 146 pb d'ADN autour de l'octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). L'arrangement des nucléosomes en « chapelet de billes » dont le diamètre est de 11 nm représente le premier niveau d'organisation de la chromatine (Luger, Mader et al. 1997).

Deux nucléosomes sont séparés l'un de l'autre par une cinquantaine de paires de bases d'ADN. L'association de l'histone linker H1 aux régions reliant les nucléosomes est nécessaire à l'empilement des nucléosomes et conduit à une organisation plus condensée. Les digestions de la chromatine à la micrococcale ont permis de montrer que l'histone linker protège environ 20 pb d'ADN. Le nucléosome en présence de l'histone linker forme ce qu'on appelle le chromatosome, défini pour la première fois par Simpson (Simpson 1978). H1 entre en contact avec l'ADN au niveau des sites d'entrée et de sortie du nucléosome (Travers 1999). L'enchaînement des chromatosomes conduit à la formation de la fibre de chromatine de 30 nm de diamètre représentant le deuxième niveau d'organisation de la chromatine (Robinson and Rhodes 2006).

Les observations de la chromatine par microscopie électronique ont permis de proposer deux modèles pour la fibre de 30 nm. Le premier est le modèle de l'hélice solénoïde dans lequel les nucléosomes adjacents sont connectés en formant une hélice contenant 6 nucléosomes par tour (Finch and Klug 1976; Thoma, Koller et al. 1979). Ce modèle de condensation de la chromatine a été également décrit en l'absence de l'histone H1 à des forces ioniques très importantes. Dans ce modèle solénoïde, la fibre à 30 nm se présente sous forme d'une hélice dans laquelle les nucléosomes consécutifs se succèdent les uns les autres et l'ADN linker est orienté vers le centre de la fibre solénoïdale (Robinson, Fairall et al. 2006; Robinson and Rhodes 2006).

Un deuxième modèle a été décrit dans lequel les nucléosomes s'arrangeraient en "zig zag" et où l'ADN de liaison est rigide et s'entrecroise à l'intérieur de la fibre de telle façon que deux nucléosomes adjacents sur le nucléofilament se retrouvent à des positions diamétralement opposées le long de la fibre de 30 nm (Bednar, Horowitz et al. 1998). La résolution cristallographique à 9 Å de la structure du tétra nucléosome (en l'absence de H1) révèle que l'ADN de liaison s'entrecroise sans se courber, organisant le positionnement des nucléosomes selon le modèle « zig zag » (Schalch, Duda et al. 2005). La conformation en "zig zag" est également supportée par des études *in vitro* de « cross-linking » de polynucléosomes reconstitués (Dorigo, Schalch et al. 2004). Néanmoins les résultats d'expériences de cryo-microscopie électronique réalisées à partir de longues fibres contenant jusqu'à 70 nucléosomes en présence de l'histone de liaison H1, sont en faveur du modèle solénoïde (Robinson, Fairall et al. 2006). Ces études montrent que l'augmentation de la taille de l'ADN de liaison n'induit pas d'augmentation du diamètre de la fibre comme le suppose le modèle "zig zag" (figure 8).

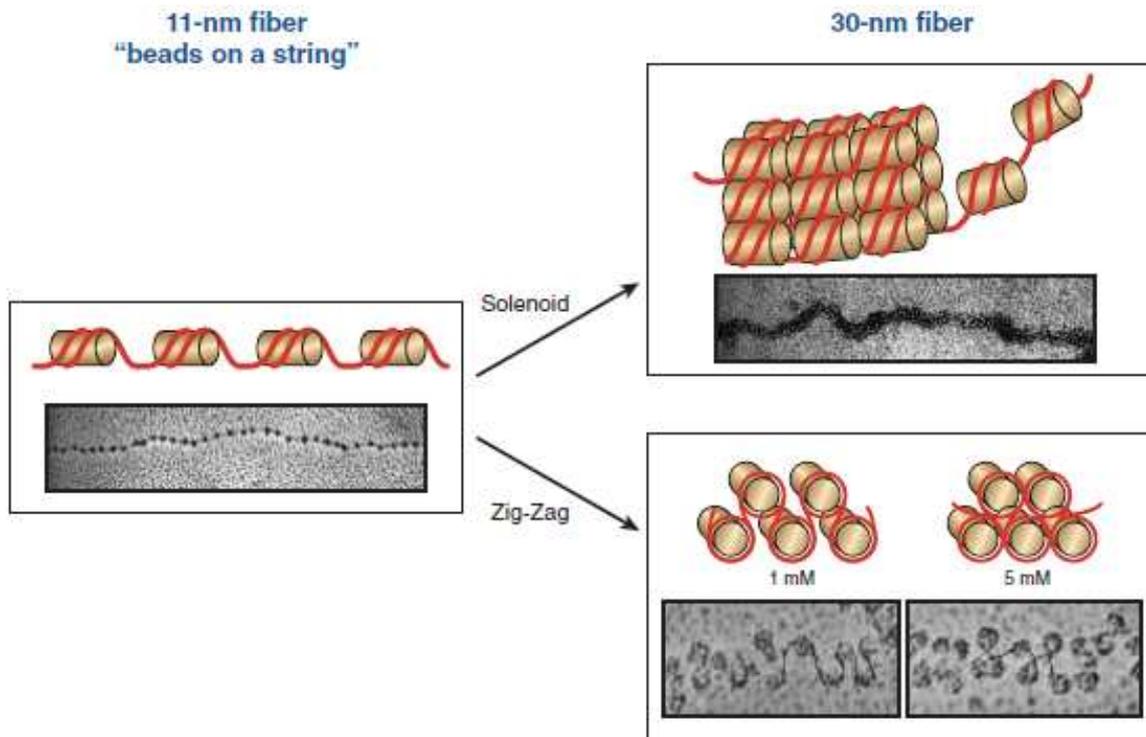


Figure 8 : Modèle de la fibre 30 nm.

Représentations schématiques et observations en microscopie électronique des deux modèles qui ont été proposés pour expliquer la fibre à 30 nm. Deux concentrations de TEACl (triéthanolamine-HCl) sont montrées, 1 et 5 mM, pour insister sur l'importance de la concentration en sel dans la compaction de la succession des nucléosomes (Vaquero, Loyola et al. 2003).

II.4 Organisation nucléaire de la chromatine

Au cours du cycle cellulaire les chromosomes passent par différents degrés de condensation. Pendant la mitose, ils sont fortement condensés et inactifs. Durant l'interphase, certaines portions des chromosomes sont décondensées et assurent entre autres la synthèse d'ARN. D'autres régions au contraire restent condensées et inactives. La chromatine peut être visualisée comme une succession de domaines condensés et de domaines plus diffus, avec des passages réversibles d'un état à l'autre suivant la phase du cycle cellulaire. On distingue alors deux types de chromatine : l'hétérochromatine et l'euchromatine. L'hétérochromatine est généralement localisée à la périphérie du noyau et accolée à l'enveloppe nucléaire alors que l'euchromatine occupe une position centrale (figure 9).

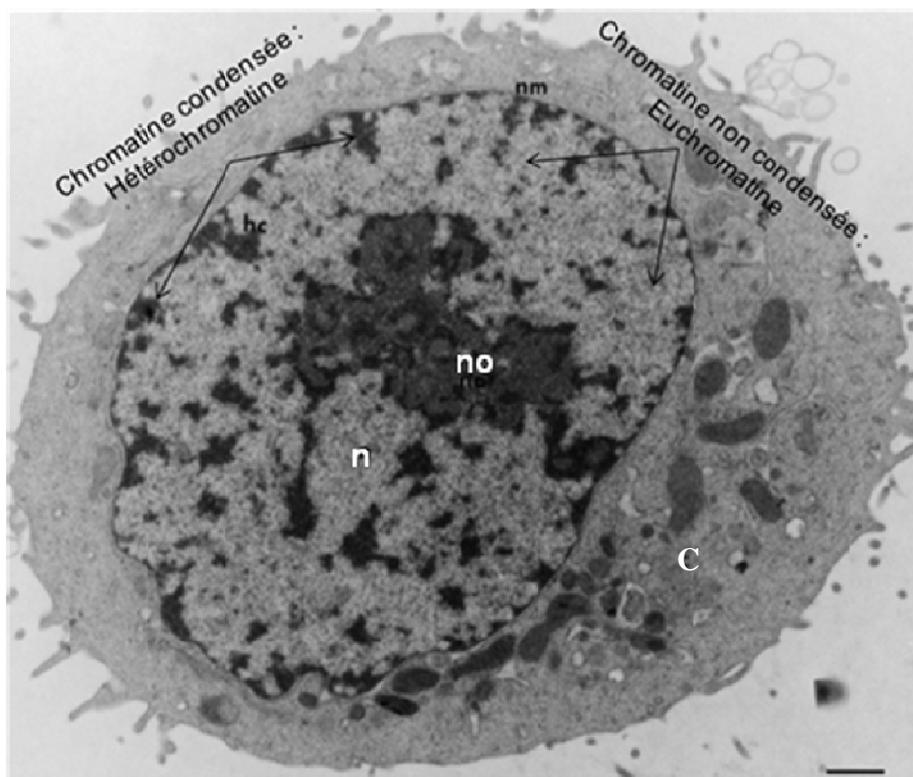


Figure 9 : Morphologie d'un noyau de cellule de mammifère.

Observation au microscope électronique d'un noyau de cellule HeLa montrant les deux formes de chromatine ; condensée et relâchée (n : noyau, no : nucléole, hc : chromatine condensée, c : cytoplasme, nm : membrane nucléaire) (Jackson 1997).

D'un point de vue fonctionnel l'euchromatine représente les régions dites actives, alors que l'hétérochromatine correspond aux régions du chromosome qui sont transcriptionnellement inactives ou « silenced ». Il a été proposé que la présence de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) marque les régions d'hétérochromatine. Cette dernière agit en maintenant la chromatine dans un état condensé en rapprochant des nucléosomes qui portent des marques de méthylation sur les lysines 9 et 27 de H3. Des analyses d'immunofluorescence dans des cellules de mammifères suggèrent que ces interactions pourraient faire intervenir le variant H2A.Z, puisque sa déplétion est accompagnée de la perte de HP1 α (Rangasamy, Berven et al. 2003; Fan, Rangasamy et al. 2004). Toutefois, ces observations n'ont pas été confirmées chez la drosophile où le variant est présent à la fois dans l'euchromatine et l'hétérochromatine (Leach, Mazzeo et al. 2000). D'autres travaux encore ont identifié H2A.Z comme étant un suppresseur de « silencing » de chromatine (Dhillon and Kamakaka 2000). Dans cette même optique, il a été proposé que les régions adjacentes aux domaines de chromatine inactive soient enrichies en H2A.Z qui pourrait fonctionner en parallèle avec les éléments barrières pour bloquer la propagation du « silencing » (Meneghini, Wu et al. 2003).

Il faut aussi noter que l'hétérochromatine peut aussi se répartir en deux formes : une hétérochromatine constitutive et une hétérochromatine facultative. En effet, l'hétérochromatine constitutive est stable tout au long du développement et garde ses propriétés d'hétérochromatine. Elle représente des régions du génome hautement condensées, ces régions contiennent généralement de l'ADN répétitif comme les séquences satellites entourant le centromère. Quant à l'hétérochromatine facultative, il s'agit d'un état réversible dépendant du stade de développement ou encore du type cellulaire.

III. La chromatine : le siège des activités génétiques

III. 1 La transcription

Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que le nucléosome joue un rôle dans l'activation et la répression de l'activité des gènes (Grunstein 1997). Une question toujours débattue aujourd'hui concerne les mécanismes qui conduisent à la transcription de l'ADN dans le contexte nucléosomique. Des études utilisant des reconstitutions de mononucléosome ont montré que les interactions histones/ADN pouvaient être rompues et permettre ainsi l'accessibilité de séquences d'ADN protégées par le nucléosome (Polach and Widom 1995; Polach and Widom 1996). De ces expériences il a été suggéré que le phénomène pourrait s'appliquer à la transcription pour permettre la fixation de facteurs de transcription sur les éléments génétiques. Néanmoins, les expériences utilisant le gène 5S et le facteur de transcription TFIIA n'ont pas permis de mettre en évidence que la perte transitoire d'interactions entre l'ADN et les histones était suffisante pour observer une fixation stable du facteur de transcription (Hayes and Wolffe 1992). Par contre, la perte des dimères H2A/H2B ou encore l'élimination des régions terminales des histones du nucléosome permettent la fixation du TFIIA sur son site de reconnaissance même si celui-ci présente une protection (Hayes and Wolffe 1992). Il a été montré que l'inhibition du nucléosome s'étendait à environ 30 paires de bases au-delà des interactions histones/ADN définies par le footprint (Thiriet and Hayes 1998). De plus, les expériences de fixation du TFIIA sur le gène 5S ont permis d'observer que l'obstruction du site de fixation était exclusivement rempli par les régions terminales de H3 et de H4 (Vitolo, Thiriet et al. 2000) en interférant avec la région C-terminale du facteur de transcription (Yang, Zheng et al. 2005).

Si les régions terminales des histones sont capables d'inhiber la fixation de facteur de transcription, il est important pour la cellule de lever cette inhibition. Dès le début des années 60, alors que le nucléosome n'avait pas encore été défini, Allfrey et collaborateurs ont rapporté que la chromatine active présentait une augmentation du nombre de groupements acétyl sur les histones (ALLFREY, FAULKNER et al. 1964). De fait, il a été proposé que l'acétylation des histones pourrait avoir pour fonction de neutraliser les charges des régions

terminales et diminuer ainsi les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN permettant l'accessibilité d'éléments génétiques (Lee, Hayes et al. 1993).

Outre la fonction du nucléosome dans la transcription, il semblerait que les variants d'histones pourraient aussi avoir un rôle crucial dans ce processus cellulaire. Des analyses d'accumulation du variant H3.3 chez la drosophile présentent un enrichissement dans les régions correspondantes à l'ADN ribosomique transcrit (Ahmad and Henikoff 2002; Schwartz and Ahmad 2005). En utilisant des stratégies similaires d'expression de transgènes dans différents types cellulaires, il a été montré que l'accumulation de H3.3 n'était pas limitée aux gènes ribosomiques (Chow, Georgiou et al. 2005; Mito, Henikoff et al. 2005; Wirbelauer, Bell et al. 2005). Dans le but de comprendre par quel mécanisme le variant H3.3 pourrait faciliter la transcription, des analyses de stabilité des nucléosomes reconstitués *in vitro* ont été effectuées (Jin and Felsenfeld 2007). Il en ressort que les nucléosomes renfermant le variant H3.3 et le variant H2A Z sont moins stables que les nucléosomes contenant les histones canoniques. Il a donc été proposé que l'histone H3.3 pourrait faciliter la transcription en réduisant l'énergie nécessaire pour expulser les nucléosomes présents sur les gènes actifs

Néanmoins, les analyses chez *Physarum* qui utilisent non pas l'expression de transgènes de l'histone H3.3 mais l'incorporation d'histones canoniques exogènes en vue d'analyser leur échange par le variant cellulaire n'ont pas permis de confirmer les observations d'échange de nucléosome associé à la transcription par l'ARN polymérase II. Par contre un déplacement des dimères des histones H2A/H2B associé au passage de l'ARN polymérase a été mis en évidence. Ces résultats sont en accord avec les analyses de la transcription au travers du nucléosome effectuées par le groupe de Studitsky (Kireeva, 2002 ; Belotserkovskaya, 2003) Toutefois, chez *Physarum* comme chez la drosophile des échanges limités aux gènes ribosomiques ont été observés (Thiriet and Hayes 2005). Il est possible que ces échanges de nucléosomes aux gènes ribosomiques résultent de la vélocité avec laquelle les gènes sont transcrits ou alors matérialisent un mécanisme spécifique de transcription par l'ARN polymérase I.

III.2 La réparation

De nombreux agents chimiques et/ou physiques sont susceptibles d'engendrer des lésions au matériel génétique. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN nécessaire au maintien de l'information génétique au fil des générations se conçoit non seulement au niveau de l'ADN mais aussi au niveau de son environnement et donc de son organisation en chromatine. Cette réponse ou encore réparation doit être la plus fidèle possible afin de garantir le maintien de l'intégrité du génome.

Comment les lésions de l'ADN peuvent-elles être réparées dans le contexte de la chromatine et comment les informations épigénétiques peuvent-elles être maintenues dans ces conditions de dommage ? Il a été proposé que la réparation de la chromatine se ferait en plusieurs étapes « Accès, Réparation et Restore ». Cette proposition intuitive a été initialement décrite dans les réparations par excision de nucléotides (NER) (Smerdon and Lieberman 1978) intervenant dans les réponses aux dommages induits par les rayonnements aux ultra-violets. Par la suite, le modèle s'est étendu aux autres types de dommages (Green and Almouzni 2002). Il a été proposé que suite à un dommage d'ADN, la structure chromatinienne se trouve déstabilisée de manière à ce que la machinerie de réparation puisse accéder aux lésions, les réparer et restaurer la structure de la chromatine.

Lors des étapes qui permettent l'accès au matériel génétique et la restauration de la structure de la chromatine, un nombre grandissant de facteurs semblent être impliqués (Green and Almouzni 2002). Bien que différents types de dommages aient été étudiés dans le contexte de la chromatine, celui dont le mécanisme est le plus détaillé est sans doute la cassure double brin. Ceci tient probablement à la possibilité d'induire dans les cellules ce type de dommage en utilisant un site de restriction et l'expression par un transgène de l'enzyme capable de couper le site. Une telle méthodologie a permis de mettre en évidence de nombreux facteurs impliqués dans les différentes étapes de la réparation (Thiriet and Hayes 2005). Outre le mécanisme de réparation, si la réparation des dommages est importante pour la cellule, leur détection au sein du génome est essentielle. Là encore, le modèle de la cassure double brin est le plus avancé. En effet, il a été montré que suite à une cassure double brin, le variant de l'histone H2AX était phosphorylé sur sa région C-terminale. La phosphorylation de

H2AX, notée γ H2AX, n'est toutefois pas restreinte aux nucléosomes adjacents au dommage, mais s'étend sur des régions de chromosomes de plusieurs kilo-bases. Suite à des cassures double brin, il est donc possible de détecter, en utilisant des anticorps spécifiques de γ H2AX, ces régions chromosomiques qui se matérialisent sous forme de foci en immunocytochimie (Rogakou, Boon et al. 1999).

III. 3 La réplication

L'hérédité et le maintien de la séquence d'ADN sont expliqués par le mécanisme de réplication semi-conservative ; au cours de ce processus, les nouveaux brins d'ADN sont synthétisés à partir des brins parentaux. Il en résulte une molécule double brin d'ADN contenant un brin nouvellement synthétisé et un brin parental.

Si la réplication de l'ADN est bien décrite, les mécanismes qui conduisent à la formation de la chromatine en conjonction à cette réaction sont toujours sous investigations. Néanmoins, alors que tous les détails de la réplication de la chromatine ne sont complètement pas élucidés, certains mécanismes ont été mis en évidence. Ainsi, lors du passage de la fourche de réplication, il a été montré que les nucléosomes situés au-devant sont déplacés pour la progression de l'ADN polymérase. Les histones ainsi déstabilisées sont ensuite redéposées sur l'ADN après le passage de la polymérase. De ce seul processus plusieurs questions se posent. En effet, on peut se demander si les histones d'un même nucléosome sont réassociées ensemble pour former un nouveau nucléosome, ou encore est-ce que la position occupée par un nucléosome avant la réplication est reprise par les mêmes histones après la réplication. La réponse à ces questions est essentielle pour comprendre comment les marques des histones sont transmises au travers de la réplication. D'autre part, lors de la déstabilisation du nucléosome, les complexes des histones H3/H4 sont-ils sous forme de tétramères ou bien de deux dimères. Alors que le modèle de la conservation du message épigénétique suggère que les histones reprennent leur position initiale après le passage de la fourche de réplication, les mécanismes permettant de repositionner les histones sur la même séquence d'ADN ne sont toujours pas élucidés. De plus, la dissymétrie de réplication des deux brins d'ADN ajoute de la complexité aux réponses à donner ces différents questionnements. En effet, le caractère unidirectionnel de la réplication implique des mécanismes différents de réplication des deux brins, avec un brin répliqué de façon continue et un brin répliqué de façon discontinue. Par

conséquent, l'achèvement de la réplication des deux brins d'ADN n'est pas concomitant. Si les interrogations sur la réplication de la chromatine font toujours l'objet de recherches, il est évident que le doublement de la quantité de matériel génétique oblige la formation de nouveaux nucléosomes et la synthèse d'histones.

Les études de la synthèse des histones ont montré qu'elles sont principalement synthétisées pendant la phase S du cycle cellulaire (Hereford, Osley et al. 1981; Wu and Bonner 1981; Hereford, Bromley et al. 1982). Des observations similaires ont également été faites chez *Physarum* (Loidl and Gröbner 1987). Toutefois, si les quatre histones du nucléosome de cet organisme sont synthétisées pendant la phase S, les auteurs ont montré que seule la synthèse de H3 et H4 est restreinte à cette phase du cycle cellulaire. En effet, les pulses à la lysine tritiée en phase G2 démontrent une incorporation du précurseur radioactif dans les histones H2A et H2B pendant la phase G2. De plus, il semblerait que chez *Physarum* les histones H3/H4 et H2A/H2B ne soient pas sous le même contrôle puisque le traitement des cellules à l'hydroxyurée (inhibiteur de la réplication) pendant la phase S met en évidence une inhibition de la synthèse de H3/H4 mais pas de H2A/H2B.

La concomitance entre la réplication de l'ADN et la déposition de nucléosomes a été mise en évidence *in vitro* en incubant un plasmide simple brin dans un extrait d'œuf de xénope (Almouzni and Mechali 1988). Par ces expériences, en conjonction avec la synthèse d'ADN, les auteurs ont également observé la formation de nucléosomes. Cependant, lorsque dans le milieu réactionnel est ajouté de l'aphidicoline (inhibiteur de la réplication), la formation de nucléosomes sur l'ADN simple brin est inhibée. Il semble donc que l'assemblage de nucléosomes soit couplé à la réplication.

Alors qu'il a été montré que pendant la phase S les histones sont acétylées (Waterborg and Matthews 1984), des analyses de l'acétylation chez *Tetrahymena* ont permis de mettre en évidence que de telles modifications se produisaient sur les histones nouvellement synthétisées (Chicoine, Schulman et al. 1986). L'identification des sites d'acétylation de l'histone H4 révèle une diacétylation sur les lysines 4 et 11. Des études effectuées chez d'autres organismes appartenant à différents embranchements phylogénétiques (*Tetrahymena*, drosophile et homme) ont permis d'observer la conservation du profil d'acétylation de l'histone H4 nouvellement synthétisée (Sobel, Cook et al. 1995; Chang, Loranger et al. 1997; Benson, Gu et al. 2006). Toutefois, il faut noter une légère variation entre l'histone H4 de

Tetrahymena et celle d'autres organismes, puisque le protozoaire ne présente pas d'arginine en position 3. Par conséquent, la diacétylation sur les lysines 4 et 11 de *Tetrahymena* correspond à celle de 5 et 12 des autres organismes. Pour l'histone H3 des marques d'acétylation ont aussi été mises en évidence. Néanmoins celles-ci touchent des sites moins conservés selon l'espèce, elle concerne les lysines 9 et 14 pour *Tetrahymena* et les sites 14 et 23 pour la drosophile.

Les enzymes responsables de l'acétylation des histones sont les histones acétyltransférases (HAT/KAT). Elles sont classées en deux groupes A et B, initialement distinguées en fonction de leur localisation cellulaire et leur spécificité vis-à-vis du substrat. Ainsi, le type A des HAT regroupe les enzymes nucléaires comme Gcn5, Pca, Essai, Tip60... et est capable d'acétyler les histones dans le nucléosome. Au contraire, le groupe B dont Hat1 est la seule histone acétyltransferase connue, est capable d'acétyler de façon spécifique les lysines 5 et 12 de H4 non-nucléosomique (Garcea and Alberts 1980; Verreault, Kaufman et al. 1998). La conservation de ces deux marques d'acétylation ainsi que de l'enzyme qui en est à l'origine, suggère un rôle principal de cette modification post-traductionnelle dans le processus d'assemblage en chromatine. Toutefois, il a été démontré que Hat1 n'est pas essentielle chez la levure et les cellules de vertébrés, même si la délétion de Hat1 révèle une plus grande sensibilité des cellules aux agents capables de générer des lésions à l'ADN (Barman, Takami et al. 2006).

L'étude cristallographique de Hat1 révèle la présence de deux patchs acides à la surface de l'enzyme. Il a été proposé que les deux patchs pourraient servir à guider l'histone H4 au site catalytique en se servant des charges des lysines 8 et 16, et de l'arginine 3 et de la lysine 8 (figure 10) (Dutnall, Tafrov et al. 1998). Des expériences de substitution de ces derniers résidus dans des peptides ont effectivement montré que la perte des charges induisait une diminution de l'acétylation *in vitro* (Benson, Phillips et al. 2007).

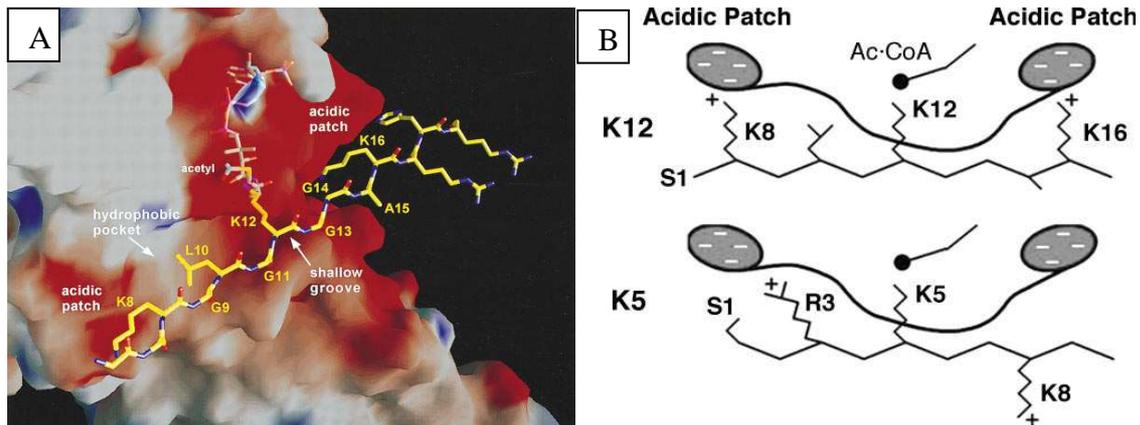


Figure 10 : Modèle de l'association de Hat1 à la région N-terminale de H4.

Grâce à ses patches acides Hat1 crée des interactions électrostatiques avec les acides aminés chargés positivement sur les résidus K16 et K8 permettant ainsi à l'acétyl CoA d'acétyler K12 (figure A et B). De la même manière l'acétylation de K5 a lieu grâce aux résidus basiques K8 et R3 sur lesquels les patches acides de Hat1 viennent se poser (Benson, Phillips et al. 2007).

Si l'acétylation des histones H3 et H4 dans le cytoplasme est assez bien décrite, les modifications associées aux histones H2A et H2B le sont moins. Néanmoins, dans tous les cas, les histones doivent passer après leur traduction du cytoplasme au compartiment nucléaire pour être assemblées en nucléosomes. Ce transport des histones fait toujours l'objet de recherches pour en comprendre tous les mécanismes. Les méthodes utilisées pour ces travaux sont généralement basées sur les techniques d'immunoprécipitation en utilisant des histones possédant une étiquette. Si des immunoprécipitations d'histones incubées dans des extraits cellulaires ont permis d'obtenir des indications sur les protéines interagissant avec les histones (Mosammaparast, Jackson et al. 2001; Mosammaparast, Ewart et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007), ce n'est que très récemment que le groupe de Dany Reinberg a publié une analyse détaillée des différents complexes de pré-déposition des histones H3 et H4 permettant le transport des histones dans les différents compartiments des cellules humaines et la levure (Campos, Fillingham et al. 2010). De cette étude, il ressort que pendant la phase S du cycle cellulaire, les complexes des histones H3/H4 sont véhiculés dans le noyau en passant par une succession de cargos comprenant différents facteurs protéiques (Figure 11).

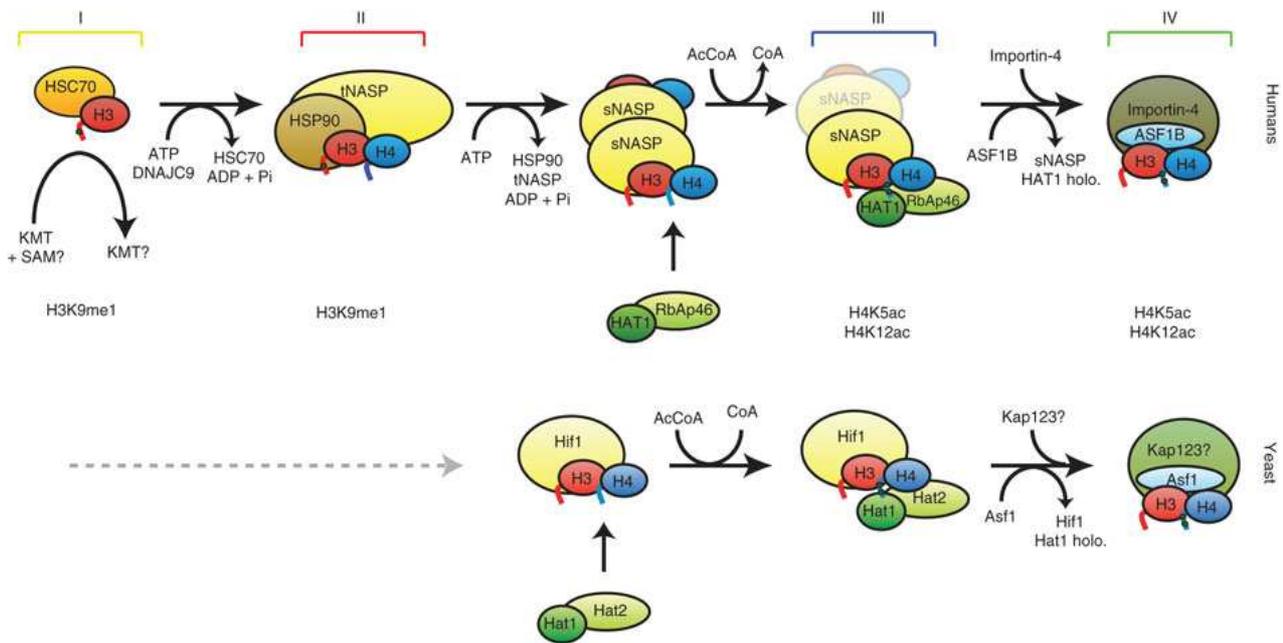


Figure 11 : Modèle du transport et de la déposition des histones H3 et H4 pendant la réplication.

H3 est assistée en premier par la chaperonne HSC70 et s'associe par la suite à HSP90 qui en présence de tNASP assure son assemblage avec H4. La chaperonne sNASP se fixe alors à l'hétérodimère H3-H4 et présente H4 à RbAp46 recrutant ainsi HAT1. Après l'acétylation de H4, les histones sont transférées à ASF1 B. L'association d'ASF1 B avec l'Importin-4 permet le transport des histones dans le noyau. Chez la levure Hif1 s'associe à H3-H4 et le transfert des histones acétylées à Asf1 semble être assuré par Kap123 (Campos, Fillingham et al. 2010).

Dans le cas des histones H2A et H2B, leur cheminement dans le noyau n'est pas aussi bien connu et n'a fait l'objet d'études que chez la levure (Mosammaparast, Jackson et al. 2001). Pour ces expériences les auteurs ont utilisé les techniques d'immunoprécipitation d'extraits cellulaires pour identifier les facteurs protéiques capables de s'associer à des protéines exprimées par un transgène. Plusieurs facteurs ont ainsi pu être mis en évidence, parmi lesquels des membres de la famille des karyopherines et Nap1. Néanmoins,

l'asynchronie des cultures cellulaires et l'absence de séparation des complexes dans un état natif ne permettent pas d'assurer que les facteurs isolés soient issus d'un même complexe multifactoriel ni même que ceux-ci soient associés à la phase S du cycle cellulaire.

Alors que les mécanismes de transport des histones dans le noyau ne sont toujours pas complètement résolus, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à identifier les régions des histones importantes pour les cellules. Les travaux pionniers dans ces analyses ont largement exploité les méthodes de génétique de la levure. Il a été montré que les histones sont essentielles pour la viabilité cellulaire (Rykowski, Wallis et al. 1981). De fait, il était important, lors de ces expériences, que les histones soient synthétisées pour obtenir une masse cellulaire indispensable pour effectuer les diverses analyses. Pour cela la stratégie consistait à éteindre les gènes cellulaires et à les remplacer par des transgènes portant les mutations désirées et d'être capable d'induire leur expression à un moment précis (Wallis, Rykowski et al. 1983; Lenfant, Mann et al. 1996; Ling, Harkness et al. 1996; Ma, Lu et al. 1996; Ma, Wu et al. 1998). Les résultats ont parfois été inattendus, voire contradictoires. En effet, alors qu'il a été montré que la délétion de la région terminale de l'histone H4 n'affectait pas la viabilité des cellules (Kayne, Kim et al. 1988), la substitution des lysines acétylables de cette même région conduit à la létalité (Megee, Morgan et al. 1990). Dans le but de mieux comprendre la fonction des régions terminales des histones dans la cellule, le groupe de Pemberton a utilisé une autre stratégie qui consiste à générer chez la levure des protéines chimériques comprenant une moitié GFP associée à la région terminale de l'histone. Ces constructions transfectées dans les cellules de levure permettent, par observation au microscope à fluorescence, de déterminer la localisation de la protéine de fusion (Mosammaparast, Jackson et al. 2001; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). Les auteurs ont donc pu montrer que les régions terminales des histones avaient une fonction dans l'adressage des protéines de fusion dans le noyau et décrire des séquences de localisation nucléaire comprises dans ces régions.

Cependant, il est à noter que si les expériences de génétique chez la levure ont démontré que les régions terminales des histones sont importantes pour la viabilité cellulaire, ces travaux ne permettent pas de déterminer la phase du cycle cellulaire au cours duquel les phénotypes sont observés. Dans le but de répondre à ce défaut, le groupe de Wolffe a examiné la fonction des différents domaines des histones H3 et H4 dans l'embryon de Xénope (Freeman, Kurumizaka et al. 1996). Les auteurs ont généré des plasmides contenant les

mutations désirées suivies d'une transcription *in vitro*. Les transcrits sont ensuite microinjectés dans des embryons de Xénope pendant la première division et incubés pendant plusieurs heures au cours desquelles les blastomères prolifèrent en passant uniquement par les phases M et S du cycle cellulaire. Les protéines traduites dans les embryons ainsi microinjectés sont ensuite analysées et leur capacité à être assemblées en chromatine est déterminée. De façon surprenante, les expériences ont montré que les régions terminales des histones H3 et H4 ainsi qu'une partie des régions globulaires de ces mêmes histones ne sont pas nécessaires à l'assemblage en chromatine. Cependant, lors de ces expériences chez le Xénope, il n'est possible de muter qu'une seule histone et les déficiences en assemblage en chromatine peuvent résulter d'une hétérodimérisation défectueuse entre les histones.

Des différentes expériences, tant de génétique que de microinjection, il ressort clairement que les stratégies expérimentales utilisées ne permettent pas de dessiner des conclusions incontestables concernant la fonction des régions des histones dans l'assemblage en chromatine. Aussi, pour répondre à ces défauts, Thiriet et Hayes ont développé une nouvelle stratégie qui exploite des caractéristiques du myxomycète *Physarum polycephalum* (Thiriet and Hayes 2001). En effet, l'organisme est capable de former des cellules contenant plusieurs millions de noyaux synchrones et d'incorporer des protéines exogènes. Par conséquent, les auteurs ont été en mesure d'incorporer des complexes d'histones présentant une délétion de la région terminale de H2A et/ou H2B et d'étudier l'assemblage en chromatine pendant la phase S du cycle cellulaire. Ils ont ainsi montré que les régions terminales de ces histones ne sont pas nécessaires pour adresser les histones dans le noyau, mais qu'il faut au moins une de ces régions sur les complexes H2A/H2B pour être assemblés en chromatine.

Outre les analyses *in vivo* qui ne sont pas toujours aisées à interpréter, les expériences *in vitro* ne donnent pas toujours des conclusions claires. Ainsi, la purification du complexe CAC (chromatin assembly complex) constitué de CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) et des histones H3/H4 à partir de lysats cellulaires a permis la mise en évidence de la présence de la di-acétylation de H4 sur les lysines 5 et 12 (Verreault, Kaufman et al. 1996). Ce constat qui vient agrémente une fonction importante de la di-acétylation de H4 conservée dans le règne eucaryote lors de l'assemblage en chromatine se révèle être superflu dans des expériences d'assemblage *in vitro* (Shibahara, Verreault et al. 2000). En effet, dans cette dernière étude il

est montré que l'efficacité de l'assemblage en chromatine n'est pas affectée par la présence ou l'absence de l'une et/ou l'autre des queues de H3/H4.

Lors de la réplication, comme nous l'avons signalé précédemment, la chromatine doit se reformer derrière la fourche de réplication. Les travaux élégants entrepris par le groupe de Stillman ont permis la purification et la caractérisation d'un facteur (CAF-1) capable de déposer des nucléosomes sur l'ADN répliatif (Stillman 1986; Smith and Stillman 1989; Smith and Stillman 1991; Kaufman, Kobayashi et al. 1995; Verreault, Kaufman et al. 1996). L'affinité du complexe CAF-1 pour les histones H3/H4 suggère que le complexe serait impliqué dans l'assemblage du tétramère central du nucléosome. Pour l'intégration des histones H2A/H2B dans le nucléosome, même si les mécanismes sont moins bien connus, il est proposé que la chaperonne NAP-1 pourrait être impliquée (Annunziato and Hansen 2000). Cette proposition tient au fait que NAP-1 est une protéine abondante, conservée dans l'évolution, et s'associe à H2A et peut-être H2B dans des extraits cytosoliques (Chang, Loranger et al. 1997) (figure 11). Bien que nos connaissances actuelles permettent de modéliser l'assemblage de l'octamère d'histones du nucléosome, il n'en est pas de même pour ce qui est de l'intégration de l'histone linker dans la chromatine. En effet, à ce jour on ne connaît toujours pas de protéine(s) chaperonne(s) de cette histone pouvant remplir cette fonction. Il n'en reste pas moins qu'il a été montré que cette histone est importante dans la maturation de la chromatine (Annunziato, Schindler et al. 1981). La maturation de la chromatine pendant la réplication comprend plusieurs étapes comme l'espacement régulier des nucléosomes, l'incorporation de l'histone H1 et la perte des marques de réplication des histones (Annunziato and Hansen 2000). Ces différentes étapes, qui font toujours l'objet de recherches intensives, font intervenir un nombre grandissant de facteurs dont les fonctions sont aussi diverses que l'association aux histones, la modification des histones ou encore le remodelage de la chromatine, ceci dans le but de comprendre tous les détails de la réplication de l'information génétique dans la cellule eucaryote (Poot, Bozhenok et al. 2005; Polo and Almouzni 2006; Jasencakova and Groth 2010).

IV. *Physarum polycephalum* : un modèle pour étudier les activités nucléaires tout au long du cycle cellulaire

Physarum polycephalum est un organisme eucaryote généralement de couleur jaune et appartenant à la classe des myxomycètes (du grec : myxo = mucus, mycetes = fungi= champignon). *Physarum* est caractérisé par une masse gélatineuse au cours du stade plasmode de son cycle de vie d'où l'appellation « slime mold ». Cette masse correspond à une seule cellule non segmentée dans laquelle baignent de nombreux noyaux synchrones. Les myxomycètes représentent un système modèle pour les études des cycles mitotiques, de la différenciation ou encore de la croissance cellulaire chez les eucaryotes. Leurs avantages sont liés à différentes caractéristiques qui vont être citées ultérieurement. Toutefois, leur taxonomie a toujours été un débat pour trancher sur leur appartenance aux règnes ; animal, végétal ou fungi (champignon ou mycètes).

IV.1 Taxonomie

L'appartenance au règne animal ou végétal des myxomycètes a été discutée pendant longtemps. En effet, certaines caractéristiques comme l'absence de paroi cellulaire ainsi que leur mode de nutrition qui se fait par ingestion et phagocytose les rapprochent des animaux. Cependant, le fait qu'ils produisent des spores et qu'ils possèdent une membrane de cellulose autour de leurs spores les rapproche plus du règne végétal (Alexopoulos 1969). D'autre part, comme les myxomycètes présentent typiquement le même habitat que les Fungi, ils sont traités comme un taxon du règne des champignons mais contrairement aux Fungi, les Myxomycètes ne secrètent pas d'enzymes digestives extracellulaires. Toutefois, le rôle des Myxomycètes dans la nature n'est pas de décomposer des matières organiques ou des pathogènes.

En 1997 Bauldauf et Doolittle montrent, suite à des analyses effectuées sur la séquence du gène du facteur d'élongation alpha 1(EF-1 α) qui est hautement conservé, que les Myxomycètes ne sont pas des Fungi. D'autre part, la physiologie, la morphologie, l'histoire de vie ou encore les analyses génétiques confirment l'appartenance des Myxomycètes au règne des protistes (figure 12). Néanmoins, si cette étude place *Physarum* assez loin dans l'évolution, le classement n'est sans nul doute qu'indicatif et relatif au facteur de référence.

Pour nos travaux qui s'intéressent à la chromatine et aux mécanismes des activités nucléaires, cet organisme est possiblement plus évolué qu'il n'y paraît sur la classification de Bauldauf et Doolittle. En effet, *Physarum* tout comme les métazoaires possède un certain nombre de variants d'histones dont le variant H3.3 qui n'existe pas *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, si on considère la conservation de l'histone H4, chez *Physarum* elle ne diffère de l'histone humaine que de deux acides aminés alors qu'on n'en compte pas loin d'une dizaine chez d'autres protozoaires comme la levure ou *Tetrahymena*. Il est donc important de prendre les résultats des classifications phylogénétiques avec parcimonie en ne perdant pas de vue la place qu'occupe l'organisme et l'objet qui a permis de lui donner cette place

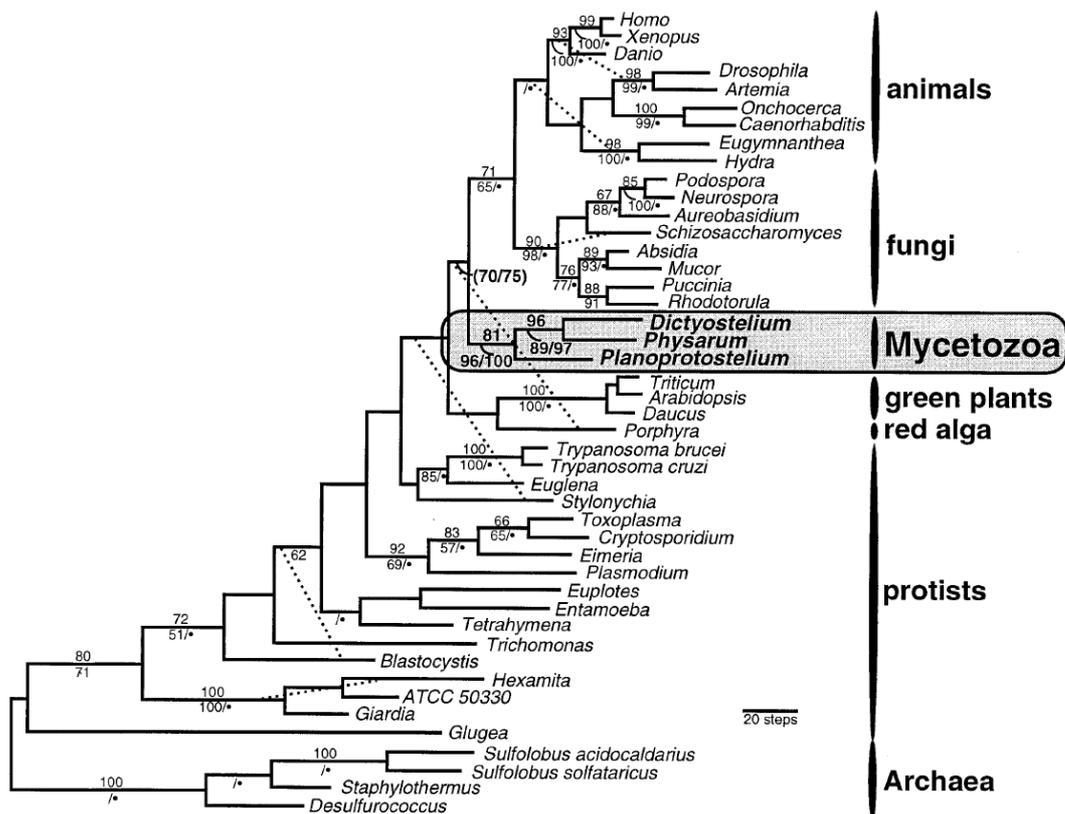


Figure 12 : Analyse phylogénétique des séquences en acides aminés du facteur d'élongation EF-1a montrant l'appartenance de *Physarum polycephalum* au règne des protistes (Bauldauf and Doolittle 1997).

La taxonomie retenue de *Physarum polycephalum* est la suivante :

Domaine : Eucaryotes

Règne : protistes

Embranchement : Myxomycota

Classe : Myxomycètes

Ordre : Physarales

Famille : Physaraceae

Genre : *Physarum*

Espèces : *Physarum polycephalum*

Il existe cinq ordres reconnus dans la classe des Myxomycètes : *Echinosteliales*, *Liceales*, *Trichiales*, *Physarales*, et *Stemonitales*, le nombre d'espèces de Myxomycètes est variable selon l'ordre (Figure 13).

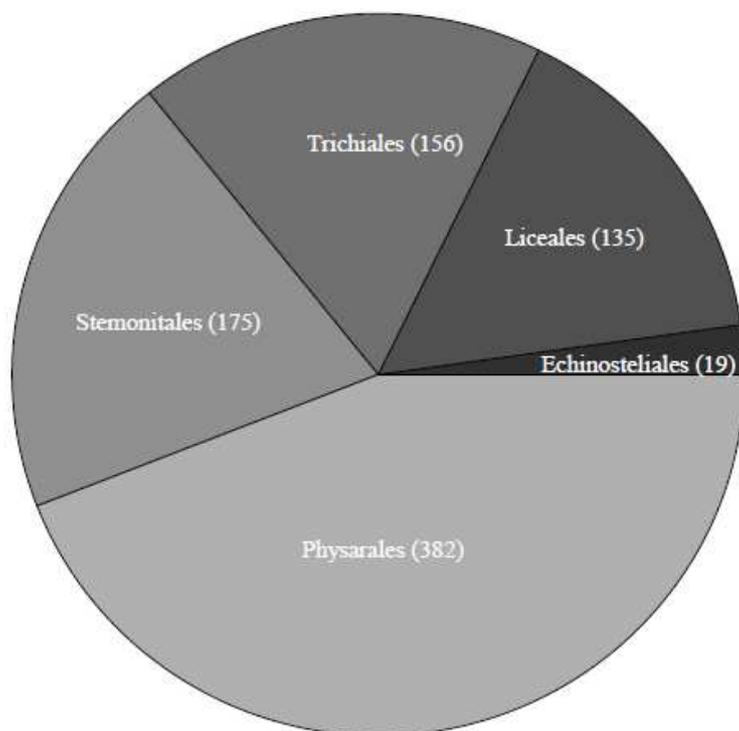


Figure 13 : Différents ordres de la classe des myxomycètes.

Entre parenthèses est représenté le nombre des espèces dans chaque ordre (Everhart, Keller et al. 2008).

IV.2 Cycle de vie et développement de *Physarum*

Physarum polycephalum existe sous trois formes de vie :

a) Phase de reproduction :

La reproduction se fait par spores qui se trouvent logées dans des masses sphériques ou ovoïdes appelées sporocarpes (figure 14). Le sporocarpe ou « fruiting bodies » est très semblable aux sporanges d'où le nom *polycephalum*. A maturité, le sporange s'ouvre et favorise la dissémination des spores (figure 15A). La spore germe en laissant échapper le protoplasme qu'elle contient (figure 15B). La germination des spores produit de un à quatre myxamibes unicellulaires haploïdes (figure 15C) ou des cellules flagellées (figure 15D). Ces deux formes de cellules sont dépourvues de paroi cellulaire et présentent uniquement une membrane plasmique. Les cellules flagellées sont munies d'un cil vibratile au moyen duquel elles se déplacent en utilisant des mouvements amiboïdes, elles sont aussi nommées zoospores. La myxamibe est une cellule amorphe qui se divise par mitose (figure 15E). Contrairement à la cellule flagellée qui ne se divise pas par mitose, typiquement elle a deux flagelles avec des longueurs inégales à la partie antérieure et fusionnent uniquement sur les parties supérieures (figure 15H). Deux myxamibes ou deux cellules flagellées à n chromosomes fusionnent comme des gamètes pour former un zygote diploïde qui va alors croître et seuls ses noyaux vont se diviser. Le zygote donne ainsi naissance à une masse visqueuse de protoplasme nommée plasmode (figure 15G, H, I) (Clark, 2000). Cette masse est appelée Plasmode, connue également sous le nom « plasmodial slime molds » (Fig. 1, J, L). Le plasmode varie en taille, forme, couleur et en caractéristiques morphologiques (Gray and Alexopolous, 1968).

b) Phase végétative ou plasmode :

Le plasmode se développe généralement à l'obscurité, il est capable de sentir les sources de nourriture, migrer vers les microorganismes et les digérer par phagocytose. Le plasmode représente une unique cellule géante constituée de réseaux de veines protoplasmiques qui peut croître et atteindre des dimensions considérables. Les observations microscopiques de l'organisme montrent que cette unique cellule géante contient des millions

de noyaux qui se divisent naturellement de manière synchrone tous les 8 à 10 heures. Cette organisation cellulaire offre la principale opportunité pour faire des analyses expérimentales du cycle cellulaire. Le mouvement de *P. polycephalum* est caractérisé par un flux de cytoplasme avec un changement de direction se faisant environ toutes les deux minutes. A l'intérieur des plasmodes, la force motrice est générée par la contraction suivie de la relaxation de couches membranaires constituées de filaments d'actine créant ainsi un gradient de pression à l'intérieur du plasmode. Il est important de noter que c'est cette forme plasmodiale de *Physarum* qui a été exploitée tout au long de nos expériences.

c) Phase de dormance ou sclérote :

Quand les conditions sont défavorables (faible température, manque de nourriture, faible humidité), le plasmode se rétracte et peut se replier. Le plasmode va alors soit migrer vers un autre milieu afin de trouver des conditions meilleures soit se déshydrater et entrer dans une phase de dormance lui permettant de survivre jusqu'à plusieurs années (Alexopoulos, 1960; Gray and Alexopoulos, 1968). La phase de dormance est appelé sclérote (Fig. 1, K). Le sclérote est composé de sphérules enfermant plusieurs noyaux. Une fois les conditions favorables de retour, le sclérote s'hydrate et le plasmode actif commence à s'étaler et recommence à se nourrir. Le plasmode s'élève alors sur son support et se renfle en certains points pour former les sporanges renfermant les spores et le cycle reprendra. Ce dernier stade du cycle de vie de *Physarum* est utilisé au laboratoire pour générer des stocks de la souche de *Physarum*.



Figure 14: Sporangies de *Physarum polycephalum* observés sous loupe.

(Photo de M-C Arnaud).

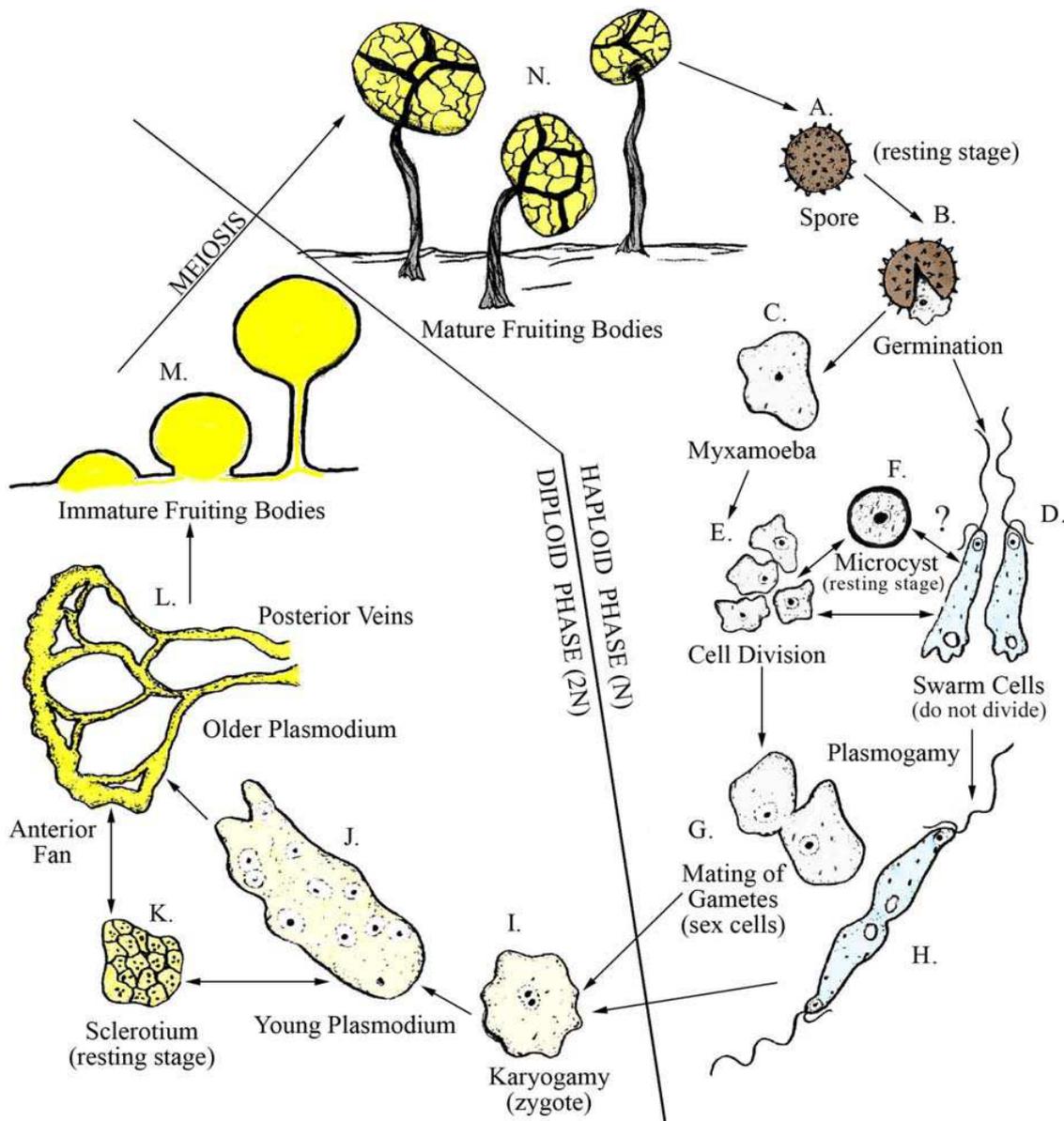


Figure 15 : Cycle cellulaire de *Physarum polycephalum*

A : spore, B : germination des spores, C : myxamibe, D : cellules flagellées, D : regroupement de deux cellules flagellées, E : division des myxamibes, G : fusion des myxamibes, H : fusion des cellules flagellées, I : formation de zygote, J : plasmode, K : sclérote, L : plasmode mature, M : sporange immature, N : sporange mature (Keller et al., 2008).

IV.2 Biologie des plasmodes de *Physarum*

La synchronie chez *Physarum polycephalum* est décrite pour la première fois par Howard en 1932. Le plasmode est une cellule multinucléée qui résulte d'une multiplication des noyaux par des mitoses intranucléaires. La synchronie des noyaux et leur nombre élevé font de *Physarum* un organisme modèle pour étudier le cycle mitotique et les activités nucléaires. De manière générale, on considère qu'un macroplasmode contient environ 5.10^8 noyaux dans une cellule dont la taille varie de 5 à 10 centimètres (Daniel and Baldwin, 1964). L'induction des macroplasmodes au laboratoire se fait par coalescence de plasmodes de petite taille, appelés microplasmodes.

La détermination de la chronologie du cycle cellulaire se base sur l'observation de la mitose au microscope à contraste de phase. Communément au laboratoire, la détermination du moment de la mitose se fait par l'observation d'événements pré-mitotiques qui affectent le noyau à des moments très précis du cycle cellulaire, comme par exemple la migration du nucléole, sa disparition ou encore la condensation de la chromatine en chromosomes (GUTTES, GUTTES et al. 1961). La mitose qui dure environ 20 minutes chez *Physarum* se fait sans disruption de l'enveloppe nucléaire. Elle est suivie d'une phase S dont la durée est de 3 heures et d'une phase G2 de 6 à 7 heures (NYGAARD, GUTTES et al. 1960; Braun, Mittermayer et al. 1965). De fait, on note que le cycle cellulaire de *Physarum* est dépourvu de la phase G1.

Si le stade plasmodial de *Physarum* en fait un organisme de choix pour étudier les événements nucléaires, son intérêt ne réside pas uniquement dans son aptitude à former des syncytia de grandes tailles ou dans l'abondance de son matériel nucléaire. En effet, *Physarum* est aussi le seul connu à ce jour à être capable d'internaliser des facteurs solubles et à les utiliser. Cette caractéristique unique de *Physarum*, que nous exploitons, a été rapportée pour la première fois par Oppenheim et Katzir (1971). Leurs travaux ont montré une avancée de la mitose d'un macroplasmode en appliquant sur sa surface des extraits préparés à partir d'autres macroplasmodes plus avancés dans le cycle cellulaire.

Cette caractéristique de *Physarum* a, plusieurs années après la publication originale de Oppenheim et Katzir, été reprise par Bradbury et collaborateurs pour étudier l'effet de la phosphorylation de l'histone H1 sur la progression du cycle cellulaire (Bradbury, Inglis et al. 1974). Les auteurs ont incorporé dans des macroplasmodes de *Physarum*, à des moments précis du cycle cellulaire, une enzyme H1 phosphokinase de thymus de veau et ont montré que l'incorporation de l'enzyme permettait une avancée de la mitose par rapport aux plasmodes contrôles. Bien que les auteurs aient conclu que la phosphorylation de H1 était nécessaire à la mitose, on peut se demander si l'absence de G1 du cycle cellulaire de *Physarum* permet de tirer une telle conclusion. En effet, dans leurs expériences les auteurs n'ont pas examiné la phosphorylation de H1 pendant la phase S qui suit la mitose. Il ne peut donc pas être exclu que l'activité H1 kinase rapportée dans ce travail soit associée à la préparation de la réplication du cycle suivant plutôt qu'à la mitose. Même si les conclusions sont discutables, il n'en reste pas moins que la démarche expérimentale de l'incorporation de protéines natives dans *Physarum* n'est pas à remettre en cause.

Alors que les tentatives initiales d'incorporation de protéines exogènes dans *Physarum* se sont attachées à examiner l'influence d'activités sur le cycle cellulaire, il faudra attendre le début des années 80 avec les travaux du groupe de Vincent Allfrey pour voir cette approche exploitée dans le cas de protéines structurales comme les histones. Dans une première étude, Allfrey et collaborateurs ont incorporé dans des microplasmodes asynchrones l'histone H3 préalablement marquée au pyrène (Prior, Cantor et al. 1980). Les auteurs ont suivi l'évolution de la fluorescence du pyrène qui présente une émission dans le bleu sous sa forme monomérique et dans le vert sous la forme d'excimère. Grâce à cette caractéristique du pyrène, il est possible de détecter des changements de distance entre deux molécules de H3 marquées. Il a été observé que la prolongation des cultures de microplasmodes ne permettait pas le passage d'une fluorescence verte à une fluorescence bleue ce qui a permis aux auteurs de proposer que les tétramères des histones H3/H4 ne sont pas déstabilisés pendant la réplication. On peut toutefois s'interroger sur la sensibilité de la détection des monomères et des excimères du pyrène et sur l'utilisation de microplasmodes asynchrones plutôt que des macroplasmodes synchrones pour ces expériences.

La méthode d'incorporation de protéines exogènes dans *Physarum* a longtemps été délaissée au profit d'approches génétiques. Ce n'est qu'à la fin des années 90 que Thiriet et

Hayes l'ont remis au goût du jour en tirant bénéfice des techniques de biologie moléculaire pour entreprendre des études de la chromatine et de sa dynamique. C'est dans cette continuité que s'inscrivent les travaux décrits dans mon mémoire.

I. Matériels biologiques :

Au cours de nos travaux nous avons utilisé deux systèmes biologiques. Le premier système est procaryote : *Escherichia coli* qui nous a permis de cloner les histones mutantes et de les exprimer. Le deuxième système est un modèle eucaryote, *Physarum polycephalum*, qui nous a permis d'effectuer notre étude de la fonction des régions terminales des histones au cours de la réplication.

I.1 Le système procaryote : *Escherichia Coli*

Nous avons utilisé deux souches d'*E. Coli* :

- ❖ DH5 α qui nous a servi pour le clonage de nos mutants.
- ❖ BL21 qui a été utilisée pour l'expression des histones mutantes.

Dans les deux cas les bactéries sont rendues compétentes avant leur utilisation afin de fragiliser leur membrane les rendant ainsi capables d'être transformées.

La capacité de transformer *E. coli* par un plasmide est devenue une partie du répertoire des outils appliqués en biologie moléculaire. Cette transformation a été démontrée pour la première fois par Cohen et ses collaborateurs (Cohen, Chang et al. 1972) en appliquant une observation de Mandel et Higa (Mandel and Higa 1970) qui ont montré que la combinaison d'*E. coli* avec le bactériophage λ dans une solution de CaCl_2 à 0°C produit une infection (actuellement appelée transformation). Depuis ces travaux, un nombre considérable d'études s'est adressé à ce processus de transformation bactérienne dans le but d'améliorer la fréquence de transformation.

Les différentes investigations se sont mises en accord sur le fait que les cellules d'*E. coli* et l'ADN interagissent dans un environnement contenant des cations divalents et à basse température. Toutefois, d'autres facteurs interviennent dans l'amélioration de la fréquence de transformation, ceci inclut un traitement bref du mix (ADN/bactérie) par un choc thermique, l'ajout de cations, chlorure, magnésium...

Pour nos expériences de transformations bactériennes, les souches sont rendues compétentes par le protocole classique au CaCl_2 qui est le suivant :

Préparation de BL21 et DH5 α compétentes par la méthode chimique

On ensemence une boîte de milieu de culture gélosé contenant du milieu LB (pour *Lysogeny broth*) sans antibiotique par des stries de bactéries DH5 α (souche de clonage) ou BL21 (souche d'expression) et on incube toute la nuit dans l'étuve à 37°C. Après 12 à 16 h d'incubation on repique une colonie dans 3 ml du milieu LB et on incube à 37°C avec agitation à 170 rpm pendant 16 h. A partir de cette culture on fait une dilution au 1/100^{ème} et on incube à 37°C avec agitation à 170 rpm pendant environ 1 h 30 à 2 h 30 tout en suivant sa turbidité ($\lambda = 600 \text{ nm}$) qui doit être comprise entre 0.4 et 0.6. Les bactéries sont ensuite culottées par centrifugation à 3000 rpm à 4°C pendant 15 min. On récupère le culot bactérien et on le resuspend dans une solution RFI (100mM RbCl ; 50mM MnCl₂, 4H₂O ; 30mM potassium acétate ; 10mM CaCl₂, 2H₂O et 15% glycérol ; le pH est ajusté à 5,8 avec 0,2 M d'acide acétique) correspondant au 1/3 du volume de la culture initiale. Cette solution contient du CaCl₂ et du glycérol en tant qu'agent stabilisateur. On laisse agir 15 min sur glace puis on centrifuge à 10.000 rpm à + 4°C pendant 15 min. Au culot récupéré on ajoute 1/20^{ème} du volume de la solution RF2 (10 mM MOPS ; 10 mM RbCl₂ ; 75 mM CaCl₂, 2H₂O et 15% glycérol) qu'on incube 15 min sur glace. La suspension bactérienne obtenue est alicotée et conservée à -80°C pour un usage ultérieur.

Le degré de compétence des bactéries DH5 α et BL21 est estimé par le nombre de bactéries transformées par 1 μg de plasmide.

I.2 Le système eucaryote : *Physarum polycephalum*

La souche de *Physarum polycephalum* qu'on a utilisée est la souche TU291. Cette souche provient de la fusion de deux clones d'amibes RSD4 et RSD8. Pour nos travaux, nous avons fait le choix de cette souche vu que, contrairement à d'autres, elle ne possède qu'une seule population homogène de noyaux (Kubbies and Pierron 1983).

I.2.1 Culture liquide des microplasmodes

Les cultures de *Physarum* sont maintenues par la culture des microplasmodes. Pour avoir des suspensions de culture de microplasmodes homogènes on utilise des flacons d'Erlen-Meyer contenant 3 chicanes pour éviter l'agglutination des microplasmodes au fur et à mesure de l'agitation et de la production de mucus. Le temps pour obtenir un développement maximal de culture est variable selon le volume d'ensemencement. Il est d'environ 4 jours pour un volume d'ensemencement de 0.2 ml ajouté dans 50 ml de milieu de culture semi-défini (SDM) (acide citrique 3.54 g/l ; FeCl₂, 4H₂O 0.06 g/l ; KH₂PO₄ 0.2 g/l ; MgSO₄, 7H₂O 0.6 g/l ; MnCl₂, 4H₂O 0.08 4g/l ; ZnSO₄, 7H₂O 0.034 g/l ; CaCl₂ 2H₂O 0.6 g/l ; bacto tryptone 10 g/l ; glucose 10 g/l ; extrait de levure 1.5 g/l. Le pH du SDM est ajusté entre 4.4 et 4.6 avec 30% KOH suivi par une stérilisation pendant 20 min à 120°C, le milieu contenant 0.5 ml d'une solution d'Hémimine (0.5 g/l d'Hémimine dans du NaOH 1%) est stocké à l'obscurité et à température ambiante. Le maintien des cultures se fait par des repiquages successifs et les cultures sont incubées à 26°C avec une agitation de 110 rpm (**figure 1**).

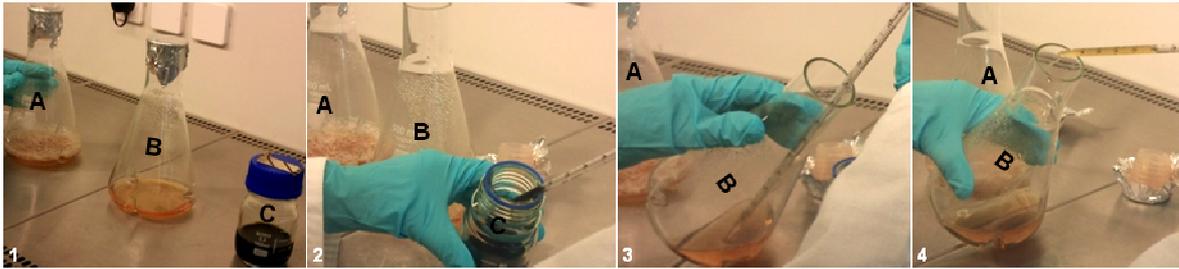


Figure 1 : Culture de microplasmodes de *Physarum* par repiquages successifs.

Pour conserver une culture de microplasmodes de *Physarum* on dispose : (1) d'une culture de microplasmodes en phase exponentielle (A), du milieu de culture SDM (B) et de la solution de l'Hémine (C). (2) et (3) 0.5 ml de la solution d'Hémine (C) est ajouté à 50 ml du milieu SDM (B). (4) Finalement : 1 ml de culture de microplasmodes (A) est ensemencé dans le nouveau milieu de culture (SDM +Hémine). La culture est placée à 26°C à l'obscurité avec une agitation de 110 rpm.

I.2.2 Culture de macroplasmodes sur filtre de papier

Les cultures de macroplasmodes sont faites à partir des cultures de microplasmodes prélevées pendant leur phase exponentielle de croissance.

Une suspension de 15 ml de culture de *Physarum polycephalum* est centrifugée 2 min à 50 g, le culot est remis en suspension dans de l'eau distillée de manière à avoir un volume final de ~15ml pour éliminer le mucus. Une seconde centrifugation dans les mêmes conditions permet de récupérer le culot qui est resuspendu par la suite dans un volume d'eau distillée par rapport au volume cellulaire.

De cette suspension, on va prélever 2 ml qu'on dépose délicatement et de manière uniforme en cercle sur la surface d'un disque de papier filtre (Wathman n°2) posé sur un lit de billes en verre dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Le tapis cellulaire forme ainsi un disque d'environ 4 cm de diamètre sur la surface du papier filtre. La boîte de Pétri est incubée à 26°C pendant 1 h 30 à l'obscurité sans milieu de culture, cette étape permet la

coalescence des microplasmodes pour former un seul macroplasmode avec une multitude de noyaux qui vont se synchroniser au cours du premier cycle cellulaire.

Après 1 h 30 d'incubation on va pouvoir ajouter délicatement 10.5 ml de milieu de culture au-dessous du filtre, ce volume permet d'amener le milieu nutritif jusqu'au niveau du papier, puis jusqu'au plasmode par capillarité. Il est important d'éviter la formation de bulles d'air sous le papier filtre ce qui aurait pour conséquence une croissance non homogène du plasmode.

Les boîtes de Pétri sont incubées à 26°C à l'obscurité. La première mitose synchrone se produit environ 5 à 7 heures après l'ajout du milieu nutritif (SDM+Hémine), les mitoses suivantes sont séparées par des intervalles de 9 à 10 heures (**figure 2**).

Pour notre étude, nous avons travaillé entre la deuxième et la troisième mitose synchrone du macroplasmode. De manière générale, on considère que la synchronie de la population de noyaux n'est pas perturbée jusqu'à trois cycles cellulaires. Au-delà, la croissance du macroplasmode et l'appauvrissement du milieu de culture peuvent conduire à une perte d'intégrité cellulaire.



Figure2 : Culture de macroplasmode de Physarum.

Un volume de 15 ml de culture de microplasmodes est récupéré (A) suivi d'une centrifugation. Le culot récupéré (B) est lavé avec de l'eau distillée, un volume de 2 ml est étalé sur un cylindre de papier Whatman sous forme circulaire(C).La boîte de Pétri contenant le filtre déposé sur les billes de verre est incubé à 26°C sans milieu de culture (D). Après 1h30 d'incubation la boîte est récupérée et un volume de 10.5 ml de milieu SDM+Hémine est ajouté (E et F). De nouveau on incube à 26°C (G) et au bout de 5 à 7 h la mitose a lieu.

I.2.3 Préparation du stock de sphérules

Outre le maintien des cultures, il est important de pouvoir disposer de stocks de *Physarum*. Ceux-ci sont utilisés pour redémarrer des cultures lorsque les cultures de microplasmodes atteignent la sénescence. Ces stocks sont constitués de sphérules obtenues à partir de microplasmodes. La sphérolation des microplasmodes est induite par culture en milieu salin (Acide citrique 3.54 g/l ; FeCl₂, 4H₂O 0.06 g/l ; KH₂PO₄ 0.2 g/l ; MgSO₄, 7H₂O 0.6 g/l ; MnCl₂, 4H₂O 0.084 g/l ; ZnSO₄, 7H₂O 0.034 g/l ; CaCl₂ 2H₂O 0.6 g/l. le pH est réglé entre 4.4 à 4.6 avec du KOH, la solution est stockée à température ambiante et à l'obscurité). Les sphérules sont ensuite déposées sur des fragments de filtre de papier stérile avant d'être déshydratées et stockées à 4°C. Dans cet état les stocks de sphérules peuvent être conservés plusieurs années.

Pour faire repartir de nouvelles cultures, on dépose dans un Erlen-Meyer contenant du milieu de culture un ou deux fragments de papier filtre contenant des sphérules qu'on dépose à la surface du milieu de culture. Après une incubation de 3-4 jours à 26°C sans agitation et à l'obscurité, on commence à voir des filaments qui se développent à la surface du milieu de culture. La fiole est alors mise sous agitation aux mêmes conditions et ainsi on aboutit à la croissance des microplasmodes qu'on peut repiquer au fur et à mesure selon les besoins.

II. Les techniques électrophorétiques

Au cours de nos travaux nous avons été amenés à utiliser différentes techniques électrophorétiques. Ces techniques permettent la résolution des molécules chargées dans une matrice grâce à l'application d'un champ électrique continu.

II.1 Electrophorèse des acides nucléiques

II.1.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique d'électrophorèse a été utilisée pour séparer des molécules d'ADN selon leurs tailles moléculaires. L'agarose est une molécule extraite d'algue rouge se présentant sous forme d'un polymère de galactose. Tout au long de nos expériences on a utilisé une concentration de 1% en agarose solubilisé par chauffage dans un tampon de 1xTBE (8,9 mM Tris base, 8,9 mM d'acide borique et 0,2 mM EDTA). Du BET (Bromure d'Ethidium) est ensuite ajouté à une concentration finale de 0.5 µg/l. le BET en s'intercalant entre ces bases permet la visualisation de l'ADN par fluorescence. Une fois le gel polymérisé, on procède au dépôt des échantillons mélangés avec un tampon de charge concentré (6 X) (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol, 30% glycérol). Un champ électrique est ensuite appliqué et l'ADN de charge négative va migrer de la borne négative à la borne positive du dispositif d'électrophorèse à un voltage de 140 pendant environ 20 min. Les deux colorants présents dans le tampon de charge permettent de suivre la migration de l'ADN. La taille de l'ADN des échantillons est estimée grâce à un marqueur de taille moléculaire par exposition du gel aux UV.

II.1.2 Electroélution de l'ADN à partir du gel d'agarose

La technique d'electroélution est utilisée pour extraire des échantillons d'ADN préalablement séparés dans un gel d'agarose. Après la migration des échantillons en gel d'agarose 1%, la bande d'ADN d'intérêt est visualisée aux UV et coupée avec un « cutter ». Le fragment d'agarose est placé dans un boudin de dialyse contenant environ 500 µl de TBE 1X. Le boudin de dialyse fermé est mis en migration dans la cuve horizontale d'électrophorèse et un champ électrique de 100 V est appliqué pendant 30 min afin de libérer l'ADN du gel.

II.2 Electrophorèse des protéines

II.2.1 Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS)

Les PAGE-SDS sont généralement utilisés pour séparer les protéines. Cette technique communément appliquée dans les laboratoires fut initialement décrite par Ulrich Laemmli pour séparer les protéines de la tête du phage T4 ce qui lui a valu d'être cité plus de 200 000 fois dans la littérature (Laemmli 1970).

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre en deux étapes. La première étape consiste à préparer le gel de séparation (resolving gel) contenant de l'acrylamide/bis-acrylamide commerciale (40% ; 29/1) à 13, 5% final ; 0.37M Tris-HCl (pH 8.8) ; 0.1% SDS ; 0.1% APS (persulfate d'ammonium) ; et 0.05% TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine). Après polymérisation du gel de séparation on coule un gel de concentration (stacking gel) à 5% où sera placé un peigne qui formera les puits de dépôts. Le gel de concentration est composé de : Solution commerciale d'acrylamide/bis-acrylamide (40% ; 29/1) 5% final ; 0.12 mM Tris (pH6.8) ; 0.1% SDS ; 0.1% APS et TEMED 0.1%). Le tampon d'électrophorèse (TGS) dans lequel les électrodes baignent est composé de Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1% (pH 8.3). Pour préparer les échantillons, les protéines sont solubilisées dans un tampon de 50 mM Tris-Cl (pH6.8), 100 mM DTT (dithiothreitol), 2% SDS, 10% glycérol, 0.1% bleu de bromophénol avant d'être dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont déposés et la migration est poursuivie pendant 50 min à 180 V. Par cette méthode il est possible de séparer les biomolécules de l'échantillon suivant leur masse moléculaire apparente.

Après migration, les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie (acide acétique 10% ; méthanol 20% et 0.5% de bleu de Coomassie) suivie d'une décoloration dans une solution contenant les mêmes proportions d'acide acétique et de méthanol.

II.2.2 Transfert des protéines

Après migration des protéines en PAGE-SDS, il est possible de les analyser en utilisant des anticorps spécifiques. Pour cela, il est nécessaire de transférer les protéines du gel d'acrylamide à la surface d'une membrane. Cette technique porte le nom de Western blot initialement décrite par Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al. 1979).

Pour ce faire, un « sandwich » de 3 feuilles de papier filtre (Whatman), le gel d'acrylamide, une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) et 3 autres feuilles de papier filtre est fait et maintenu en place dans un appareil approprié (Bio-Rad). L'ensemble est ensuite placé dans une cuve contenant du tampon 1xTGS dans 20% de méthanol. Un champ électrique est appliqué perpendiculairement pour faire migrer les protéines du gel vers la membrane. Les conditions de transfert que nous avons utilisées sont celles décrites par Thiriet et Albert (Thiriet and Albert 1995) en appliquant un champ électrique de 100 V pendant 10 min puis 60 V pendant 20 min. De manière générale, l'efficacité du transfert est vérifiée par la coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau (5% d'acide acétique et 0,1% de rouge ponceau) puis décolorée par lavage à l'eau. De cette façon il est possible de visualiser les protéines transférées. La coloration au rouge ponceau n'interfère pas avec les traitements subséquents puisqu'il s'agit d'une coloration transitoire.

II.3 Préparation de gel natif

Lors de nos expériences, nous avons été amenés à devoir séparer des complexes nucléoprotéiques. Ceci est possible en faisant migrer les complexes dans des gels natifs de nucléoprotéines.

Pour ce type d'électrophorèse, la matrice est un gel d'agarose à 0.7% solubilisé dans du 0,5X TBE et du tampon de migration 0.5X TBE. Les échantillons de nucléoprotéines sont préparés en présence de 5% de glycérol sans aucun colorant permettant de visualiser la migration. La migration est poursuivie pendant 45 min à 120 V. Les complexes

nucléoprotéiques sont visualisés par coloration de l'ADN au BET dans un bain 0,5X TBE, 0.1% SDS et 0.5 µg/l de BET pendant 15 min sous agitation.

III. Clonage moléculaire des mutants d'histones par mutagenèse dirigée

III.1 Préparation du stock de vecteur de clonage pET-3a digéré

Le vecteur de clonage utilisé pour générer tous les mutants d'histones est le plasmide pET-3a. Il s'agit d'un plasmide de 4.6 kb codant pour le gène de résistance à l'ampicilline, les sites de restriction utilisés sont *BamHI* et *NdeI* (**figure3**). Afin de ne pas avoir à chaque fois à digérer ce plasmide un stock de vecteur digéré a été préparé.

Un clone de bactérie DH5α transformée par pET-3a provenant du stock conservé à -80°C est cultivé à 37°C dans 500 ml de LB en présence d'ampicilline. L'extraction du plasmide est faite en utilisant un kit QIAGEN conformément aux instructions du fournisseur. Brièvement, après récolte du culot bactérien, les cellules sont suspendues, lysées avec une solution alcaline et neutralisées. Une centrifugation permet de séparer les acides nucléiques (plasmide) du reste des débris cellulaires qui sont liés à l'ADN chromosomique. Une étape de purification du plasmide à travers une colonne est faite. Après lavage et élution, l'ADN du plasmide sera précipité en utilisant de l'alcool isoamélique, et finalement resuspendu dans un volume adéquat du tampon TE (10 mM Tris-HCl (pH.8) ; 1 mM EDTA).

La quantité d'ADN obtenue est déterminée par spectrophotométrie ; la concentration en acides nucléiques se mesure à 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à 50 µg d'ADN double brin ou à 25 µg d'ADN ou d'ARN simple brin. La pureté de l'échantillon est testée par comparaison des densités optiques à 260 nm et à

280 nm afin de détecter une éventuelle contamination protéique. La préparation est dite pure si elle présente un rapport de DO 260/280 compris entre 1.8 et 2.

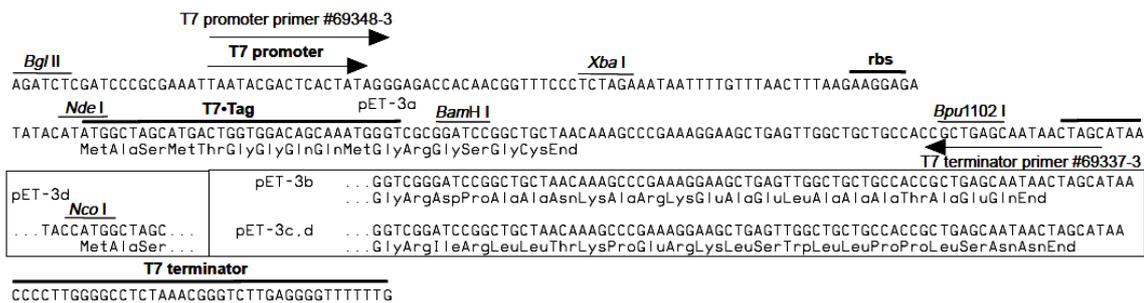
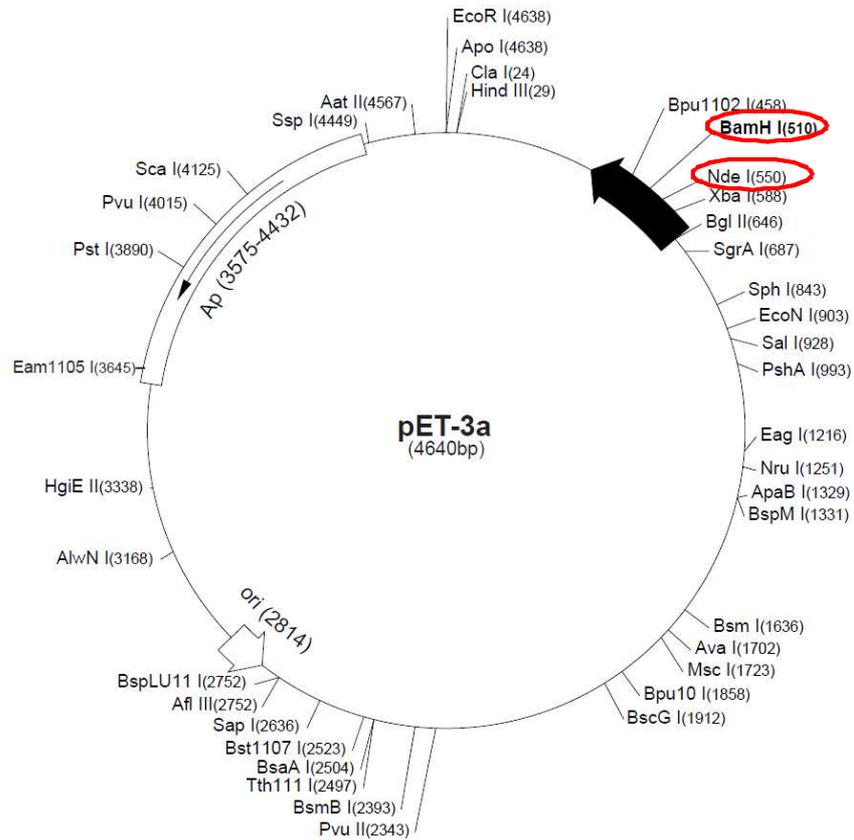


Figure 3 : Carte de restriction du vecteur de clonage utilisé pET-3a, vecteur ayant servi à générer les différents mutants d’histones entre les sites de restriction NdeI et BamHI

L'ADN préparé est ensuite digéré plusieurs heures par *BamHI* et *NdeI* pour servir comme vecteur de clonage. Les produits de digestion sont séparés, migrés par électrophorèse et la bande correspondant au vecteur digéré est électro-éluée.

La solution contenant l'ADN électroélué est ensuite transférée dans un tube dans lequel un volume égal de phénol/chloroforme/isoamélique est ajouté, suivi par une centrifugation à 25 000 g pendant 10 min. La phase supérieure (phase aqueuse) est récupérée puis précipitée par centrifugation à 25 000g pendant 30 min en présence de 1/10^{ème} volume d'acétate de sodium (3M) et 2,5 volume d'éthanol. Le culot d'ADN est finalement lavé avec de l'alcool 70%, séché au speed-vac et resuspendu dans du TE (10 mM Tris-HCl (pH.8) ; 1 mM EDTA). L'ADN obtenu est quantifié, aliquoté et stocké à -80°C.

III.2 Mutagenèse dirigée pour générer les mutants

III.2.1 Amplification par PCR

Les mutations des histones ont été obtenues par des mutagenèses dirigées en utilisant différentes stratégies de PCR.

Cette technique, décrite en 1985 (Saiki, Scharf et al. 1985), permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences servent à synthétiser des amorces d'oligonucléotides complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides). Une ADN polymérase thermorésistante se sert de ces amorces pour synthétiser le brin complémentaire. Cette technique comporte des cycles successifs et chaque cycle comprend une succession de trois phases :

- * Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C).
- * Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire.

* Une phase d'extension par l'ADN polymérase à 72°C.

Dans notre cas des amorces sont désignées de part et d'autre du cadre de lecture de chaque histone mutante à générer, l'enzyme utilisée est la Vent polymérase caractérisée par une haute fidélité. Les deux techniques de mutagenèse dirigée utilisées lors de la génération des mutants sont décrites schématiquement ci-après (**figure 4**).

Pratiquement, les mix réactionnels sont composés de : 10 µl de tampon 10X, 2,5 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de chaque amorce (100 nM), 1 µl de matrice (un plasmide contenant le gène d'intérêt) et 1µl de Vent polymérase dans un volume final de 100 µl. L'amplification se fait sur 25 cycles avec une phase de dénaturation à 95°C, hybridation 52°C et élongation à 72°C.

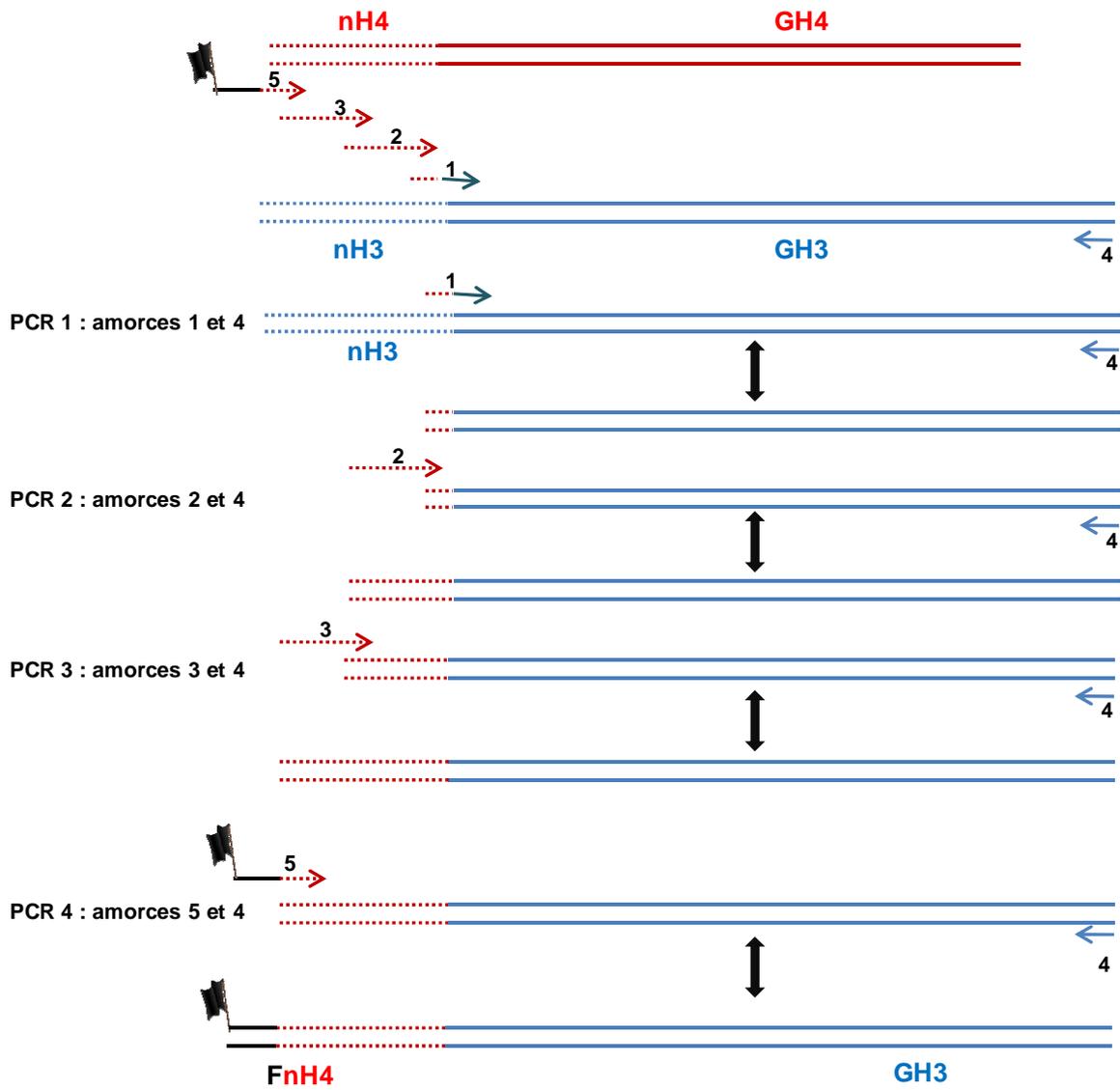


Figure 4: Technique 1 de mutagénèse par extension.

Exemple de mutant d'histone généré H3FnH4 où la partie N-terminale de H4 (n H4) avec la séquence du Flag (F) sont placées sur la partie globulaire de H3 (G H3).

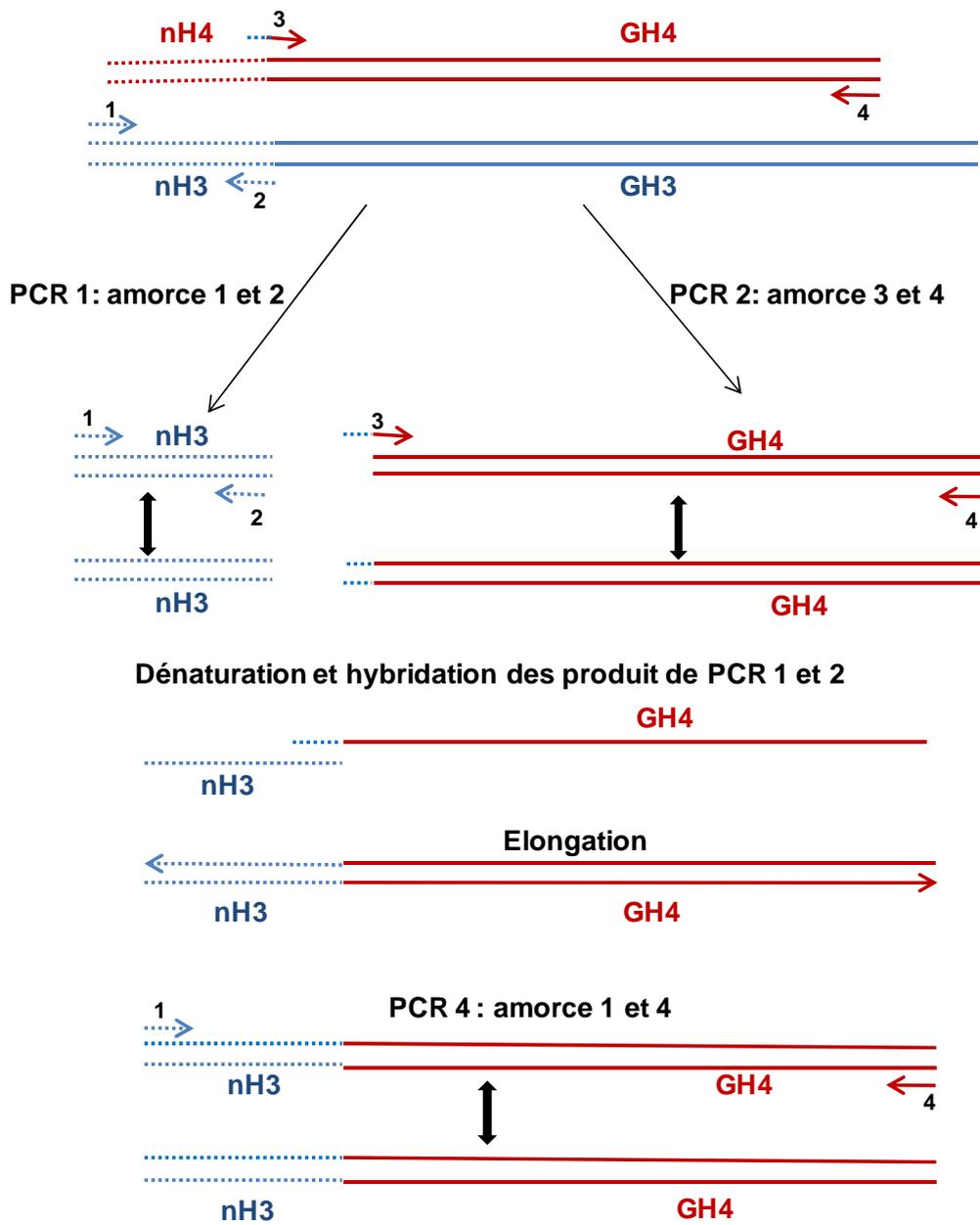


Figure 5: Technique 2 de mutagénèse

Exemple de mutant d'histone généré H4nH3 où la partie N-terminale de H3 (n H3) est placée sur la partie globulaire de H4 (G H4).

III.2.2 Digestion du produit de PCR et ligation avec le plasmide digéré

Le produit de PCR est séparé dans un gel d'agarose. La bande correspondant à l'amplicon est découpée du gel et l'ADN contenu dans le fragment d'agarose est isolé en utilisant un kit d'extraction (Fermentas). L'ADN ainsi extrait est précipité à l'éthanol puis solubilisé dans du TE pour être digéré par *NdeI* et *BamHI* dans un volume réactionnel de 60 µl. La réaction enzymatique est poursuivie durant la nuit.

La digestion du vecteur pET3a ainsi que de l'insert d'ADN par les deux enzymes *BamHI* et *NdeI* génère des fragments d'ADN à bouts cohésifs qui en présence de l'enzyme T4 DNA ligase sont reliés par complémentarité de base. L'enzyme DNA ligase utilisée est extraite du bactériophage T4, elle catalyse la liaison de l'extrémité 5'-phosphate terminale d'un brin d'ADN avec l'extrémité 3'-OH terminale d'un autre brin. La réaction de ligation se fait à 16°C pendant 16 h dans un volume total de 25 µl et dont la composition est la suivante : 2,5 µl de tampon (T4 DNA ligase) 10X, 20 µl d'insert, 1.5 µl de pET-3a digéré, et 1µl de T4 DNA ligase.

III.2.3 Transformation de DH5α compétente et criblage des clones recombinants par digestion enzymatique

A un volume de 20 µl de bactéries compétentes DH5α, on ajoute le volume de 5 µl du produit de ligation. Le mix est incubé pendant 15 min sur glace suivi de 2 min à 42°C. Cette étape est à son tour suivie d'une incubation sur glace pendant 5 min, ce qui va permettre la pénétration du plasmide à l'intérieur des bactéries par choc thermique. A ce mélange on ajoute 200 µl du milieu LB et on incube pendant 20 min à 37°C. Le produit de transformation est incubé sur milieu LB gélosé contenant de l'ampicilline pendant 16 h à 37°C.

Pour déterminer les clones recombinants on a recours à la sélection par l'antibiotique et à une extraction du plasmide à partir de clones choisis au hasard. L'extraction de l'ADN est faite par une série de minipréparations (kit Fermentas). Des colonies sont repiquées et

placées dans 3 ml de milieu LB /Amp et sont incubées toute la nuit à 37°C avec une agitation modérée de 170 rpm.

Pour déterminer les clones recombinants qui contiennent l'insert on fait un criblage par digestion :

L'ADN de l'insert est libéré du plasmide par une digestion enzymatique par *NdeI* et *BamHI* dans un volume final de 20 µl. Les produits de digestion sont séparés dans un gel d'agarose contenant du BET et visualisés aux UV.

Les plasmides des clones permettant de visualiser un insert en gel d'agarose sont séquencés afin de confirmer le cadre de lecture et l'exactitude de la séquence

L'ADN des clones recombinants obtenus est soumis à un séquençage automatique selon la technique de Sanger. Cette étape de nos travaux est sous-traitée sur la plateforme de séquençage de l'IFR 26. La détermination des séquences se fait en ajoutant l'amorce universelle T7 promoteur. La réaction de séquençage se prépare dans un volume final de 6 µl et une quantité d'ADN variant entre 200 et 300 ng.

Les séquences obtenues sont soumises à une analyse par le logiciel Bio-Edit. Ce dernier permet par alignement des séquences, d'une part, de déduire si ces dernières sont celles attendues ; d'autre part, il nous permet de déterminer toutes les caractéristiques des séquences obtenues à savoir : pourcentage en bases puriques ou pyrimidiques, différents sites de restriction...

IV. Préparation des histones recombinantes et leur purification

Pour nos expériences, nous avons utilisé différents mutants des histones H3 et H4. Les méthodes de préparation des histones H2A et H2B présentent quelques différences qui seront indiquées dans cette partie du mémoire.

IV.1 Expression des protéines recombinantes dans BL21

Après obtention des plasmides contenant les gènes mutés d'histones, les protéines recombinantes sont exprimées dans *E. coli*. Pour cela, les plasmides vont servir pour transformer des cellules compétentes BL21.

A un volume de 20 µl de bactéries compétentes BL21, on ajoute 0.5 à 1 µl de plasmide. Ensuite, on incube pendant 20 min sur glace et 2 min à 42°C. Cette étape est à son tour suivie d'une incubation sur glace pendant 5 min, ce qui va permettre la pénétration de l'ADN à l'intérieur des bactéries par choc thermique. A ce mélange on ajoute 200 µl du milieu LB et on incube pendant 30 min à 37°C avec agitation. On étale un volume de 100 µl du produit de transformation sur une boîte gélosée de LB/Amp et on incube pendant 16 h à 37°C.

Typiquement, on obtient plusieurs dizaines de colonies par boîte. Des clones pris au hasard sont ensuite testés pour leur aptitude à exprimer l'histone recombinante. Cette étape de « test d'expression » se fait de la façon suivante :

Des colonies sont repiquées dans 2 ml de milieu LB /Amp et incubées environ 5 h avec une agitation modérée de 170 rpm jusqu'à une D.O d'environ 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm. Les cultures sont ensuite induites avec de l'IPTG (Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 1 mM. La présence d'IPTG permet d'induire l'activité du gène Lac Z, codant pour la β-galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose (Gal + Glu). Lorsqu'un gène d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur du gène lac Z, la présence d'IPTG permet à ce gène d'être exprimé. Les cultures sont ensuite maintenues sous agitation pendant 1 h à 3 h. Après cette période, 200 µl de culture induite sont transférés dans un tube et les culots cellulaires sont récupérés par centrifugation avant d'être analysés en PAGE-SDS.

Les clones qui présentent une expression importante d'histone sont ensuite sélectionnés et conservés à -80°C en ajoutant 5% de glycérol dans le milieu de culture. Ces stocks de clones recombinants serviront à la production des quantités de protéines nécessaires à nos expériences. Typiquement, les histones sont produites à partir de 200 à 500 ml de culture.

IV.2 Purification des histones sous forme de complexes

La purification des histones recombinantes se fait en exploitant non seulement les caractéristiques d'expression des histones dans les bactéries, mais aussi leurs propriétés physico-chimiques.

De manière générale, les histones sont purifiées sous forme de complexes fonctionnels en ne prenant en considération que les régions globulaires des histones sans se préoccuper des régions terminales. Ceci se justifie par le fait que les complexes d'histones résultent de l'association des régions globulaires de H3 avec H4 et de H2A avec H2B. De fait, pour préparer des complexes d'histones, on doit disposer d'un culot bactérien de chacune des histones.

Pour la purification des histones H3/H4, nous avons utilisé la méthode décrite par Thiriet (Thiriet 2004). Nous avons constaté que tous les mutants de ces deux histones sont produits dans les bactéries sous forme insoluble dans des corps d'inclusion. Par conséquent, le protocole n'a à aucun moment été modifié par rapport au protocole initial. Les culots bactériens provenant de 200 ml de cultures sont suspendus dans 10 ml d'H₂O en présence de 200 µl de Triton X-100 et de 10 µl de lysozyme. La lyse des cellules est poursuivie pendant environ 30 min à température ambiante. La solution devient alors visqueuse, cette viscosité est due à la libération des acides nucléiques dans la solution. Le lysat est ensuite acidifié en ajoutant du HCl pour atteindre une concentration finale de 0,4 M. Cette étape favorise la solubilisation des protéines acido-solubles bactériennes. La solution est alors laissée dans la glace pendant 15 à 30 min en agitant de temps en temps. Le matériel insoluble comprenant les acides nucléiques, les protéines bactériennes acido-précipitables et les corps d'inclusion contenant les histones recombinantes, est récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 5 min. Les culots sont ensuite solubilisés dans 10 ml d'urée 8M. Ce traitement permet la libération des histones des corps d'inclusion. La solution d'urée est ensuite acidifiée comme précédemment en ajustant la concentration de HCl à 0,4 M final. Le matériel acido-précipitable est séparé des histones acido-solubles par centrifugation à 12 000 g pendant 10 min. La solution d'urée acidifiée contenant les histones est neutralisée avec 0,4 M de NaOH final et centrifugée pendant 15 min à

20 000 g. Les solutions contenant H3 et H4 sont ensuite mélangées et mises à dialyser contre de l'eau toute la nuit.

Le lendemain, le contenu du boudin de dialyse est transféré dans un bécher et environ un volume égal de tampon 10 mM Tris-HCl (pH.8) 0,1 mM EDTA et 600 mM NaCl, et 2-3 ml de suspension de billes Biorex 70 (V/V) sont ajoutés. Le mélange est ensuite mis sous agitation modérée pendant 30 min à 1 h avant d'être mis dans une colonne de chromatographie. Les billes retenues dans la colonne sont lavées extensivement avec un tampon 10 mM Tris-HCl (pH.8) 0,1 mM EDTA, 600 mM NaCl. Les complexes d'histones sont ensuite élués avec le même tampon que le tampon de lavage contenant 2 M de NaCl.

Dans le cas des histones H2A/H2B, les protéines produites par les bactéries ne sont pas renfermées dans des corps d'inclusion. Aussi, la lyse des bactéries conduit à leur solubilisation. Par conséquent, l'acidification du lysat bactérien permet d'avoir les histones dans la fraction acido-soluble. La fraction est ensuite neutralisée et la purification sur Biorex 70 peut se poursuivre directement.

IV.3 Quantification des histones recombinantes avant incorporation

La quantification des complexes d'histones recombinantes a été effectuée par la méthode de Bradford. Ceci afin d'ajuster les concentrations en protéines de nos différents complexes d'histones.

A 2 ml d'eau on ajoute 0,5 ml de réactif de Bradford, de cette solution on prélève 200 µl auxquels on ajoute 5 µl de l'échantillon à doser et on mesure la D.O à une longueur d'onde de 595 nm. Selon la méthode de Bradford (Bradford 1976), la fixation du réactif (bleu brillant de Coomassie G-250) aux protéines se manifeste par un changement de coloration dont l'intensité est dépendante de la concentration en protéines. La mesure de l'absorbance du complexe réactif-protéines permet d'établir une courbe standard d'étalonnage. En se référant à la courbe standard d'étalonnage de BSA (Bovine Sérum

Albumine), on peut estimer la concentration en protéine dans notre échantillon relative à la BSA.

V. Reconstitution de nucléosomes *in vitro*.

Les histones recombinantes sont testées pour leur aptitude à former des nucléosomes en effectuant des reconstitutions *in vitro*. Les reconstitutions utilisent un fragment d'ADN issu du plasmide XP10 contenant le gène 5S de *Xenopus borealis*. Ce gène a largement été exploité dans la littérature pour sa capacité à positionner un nucléosome (Vitolo, Thiriet et al. 2000). Le fragment d'ADN est un fragment de 215 paires de bases qui a été préalablement purifié par électroélution. Dans un tube on place un mix de 200 μ l contenant 2 M NaCl, \sim 5 μ g d'ADN, des histones H3/H4 recombinantes et des H2A/H2B d'érythrocyte de poulet. Les quantités d'histones sont déterminées empiriquement par des titrations des différents complexes d'histones. Le mix est laissé 10 min à 37°C avant d'être transféré dans un boudin de dialyse, lui-même placé dans un bain de TE contenant 1,2 M NaCl. Toutes les 2 h environ, le tampon est dilué successivement avec du TE pour apporter la concentration en NaCl à 1 M, 0,8 M, et 0,6 M, respectivement. Après 2 h d'incubation dans le dernier bain, le tampon de dialyse est remplacé par du TE. Le lendemain, les contenus des boudins de dialyse sont analysés par électrophorèse en gel natif (**figure 6**).

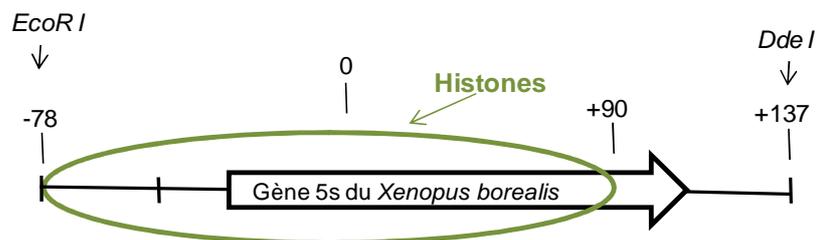


Figure 6 : Interaction entre les histones et l'ADN contenant le gène 5S de xénope. Le fragment d'ADN est de 215 pb contenant le gène 5S isolé de *Xenopus borealis*. Cet ADN est utilisé pour la reconstitution de nucléosome *in vitro*. Ce fragment est obtenu à partir du plasmide XP-10 par digestion avec les enzymes *EcoRI* et *DdeI*.

VI. Incorporation des histones recombinantes dans *Physarum polycephalum*

Pour nos travaux nous nous sommes focalisés sur la fonction des régions terminales des histones pendant la phase de réplication de la chromatine. Par conséquent, toutes nos expériences ont été effectuées pendant la phase S du cycle cellulaire.

Il était donc indispensable de déterminer précisément la progression du cycle cellulaire. Ceci est fait par la détermination du moment de la mitose en observant au microscope à contraste de phase de petits explants de *Physarum* étalés et fixés à l'éthanol comme montré sur la figure ci-dessous (**figure 4**).

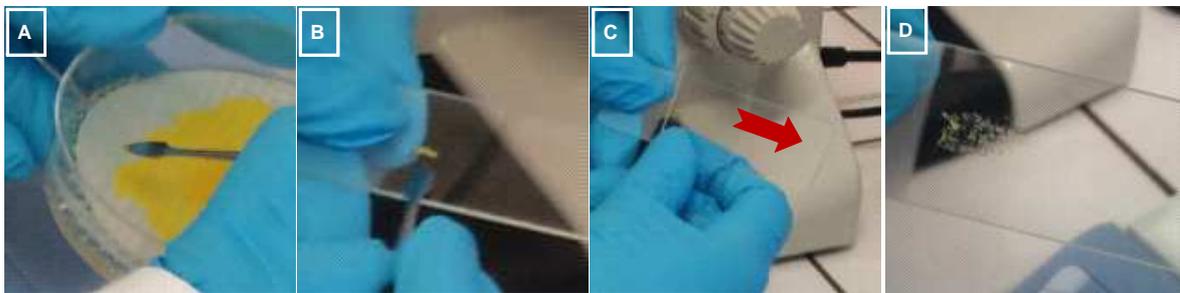


Figure 4 : Préparation de « squashes » de petits échantillons de macroplasmode pour l'observation au microscope. A partir du macroplasmode on prélève un petit explant avec une spatule (A). L'explant est déposé sur une lame (B) et étalé délicatement avec une deuxième (C). On obtient ainsi un étalement (D). Une étape de fixation à l'éthanol suivie du dépôt de la lamelle et une goutte d'huile d'immersion permettra l'observation des noyaux au microscope à contraste de phase.

Le cycle cellulaire de *Physarum* se décompose en différentes phases : une mitose dont la durée est de 20 à 30 min, une phase S de 3 h et une phase G2 de 6 h. Cette progression du cycle cellulaire se réfère à l'observation de la mitose au microscope à contraste de phase. Cette observation est facilitée grâce aux noyaux qui subissent des modifications morphologiques à partir d'une heure avant la métaphase. Ces changements morphologiques consistent en une migration du nucléole à la périphérie du noyau, une condensation de la chromatine et une disparition du nucléole (**figure 5**).

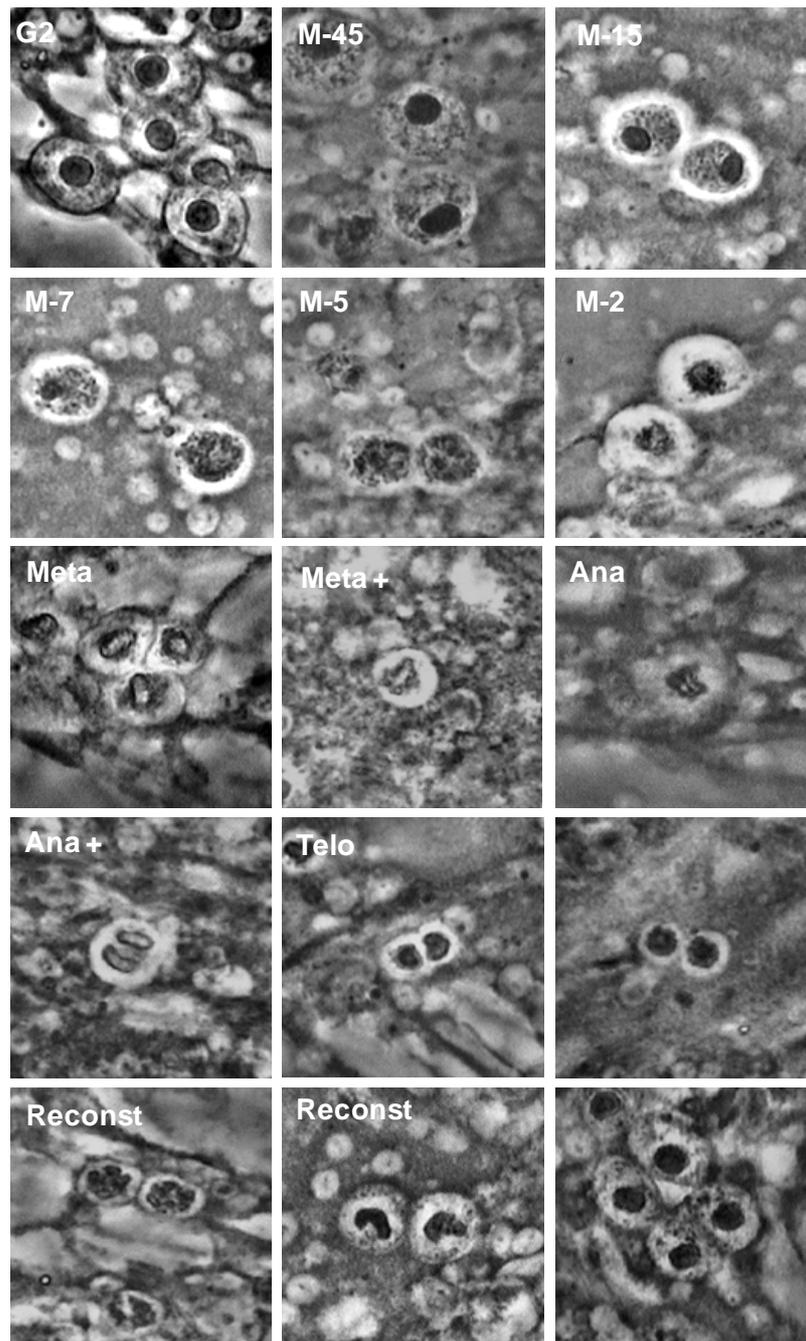


Figure 5 : Observation au microscope à contraste de phase de « squashes » de macroplasmode de Physarum montrant le changement de la morphologie des noyaux avant, pendant et après la mitose. Les moments des prélèvements sont indiqués en minutes avant (-) ou après (+) la métaphase. M : mitose, Meta : métaphase, Ana : anaphase, Telo : Télaphase, Reconst : reconstitution, G2 : phase G2, (Photos de M-C Arnaud).

L'incorporation des protéines dans *Physarum* est un phénomène unique caractéristique de l'organisme. Expérimentalement nous procédons de la façon suivante :

Le filtre de papier sur lequel le macroplasmode est cultivé est retiré de la boîte de Pétri pour être découpé en suivant le contour de la cellule. Le macroplasmode est ensuite coupé en deux fragments égaux. Il est important de noter que les deux fragments qui proviennent d'un même macroplasmode poursuivent leur avancée de façon parfaitement synchrone l'un par rapport à l'autre pendant au moins un cycle cellulaire. Les fragments cellulaires sont ensuite remis sur le milieu nutritif et l'incorporation de protéines proprement dite peut alors être effectuée.

Notre expérience dans cette méthodologie d'incorporation de protéines dans *Physarum* montre que les protéines n'entrent dans la cellule sans être dégradées que lorsque celles-ci pénètrent dans le milieu intracellulaire par la face supérieure du macroplasmode. Le protocole initial d'incorporation de facteurs dans des macroplasmodes rapporté par Oppenheim et Katzir (Oppenheim and Katzir 1971) utilisait un tampon Tris-HCl pH7,5 et un jeûne de 90 min après le dépôt du tampon. Il a été montré que le jeûne de 90 min n'améliorait pas l'incorporation des protéines dans le milieu intracellulaire, mais perturbait le cycle cellulaire (Thiriet, 2004). De plus, bien que les mécanismes permettant l'introduction de protéines, même de grande taille, dans *Physarum* n'ont pas été décrits dans la littérature, l'ajout d'ATP améliore l'incorporation.

Aussi, pour incorporer les protéines nous procédons comme suit, 200 µl d'une solution contenant 10 mM de tampon phosphate pH 7,5, 5 mM d'ATP et le complexe d'histone d'intérêt sont déposés délicatement à la surface d'une demi-cellule sous forme de gouttelettes. A l'aide d'une pipette pasteur en verre qui aura été au préalable pliée à la flamme, les gouttelettes de solution de protéines sont étalées sur toute la surface du fragment cellulaire sans léser la cellule. Il est important d'aller au plus proche des bords du fragment cellulaire en s'assurant que la totalité du liquide reste bien sur la surface cellulaire sans entrer en contact avec le milieu de culture. Les boîtes contenant les fragments cellulaires sont ensuite remises dans un incubateur à 26°C à l'obscurité jusqu'aux analyses biochimiques ou cellulaires (**figure 6**).

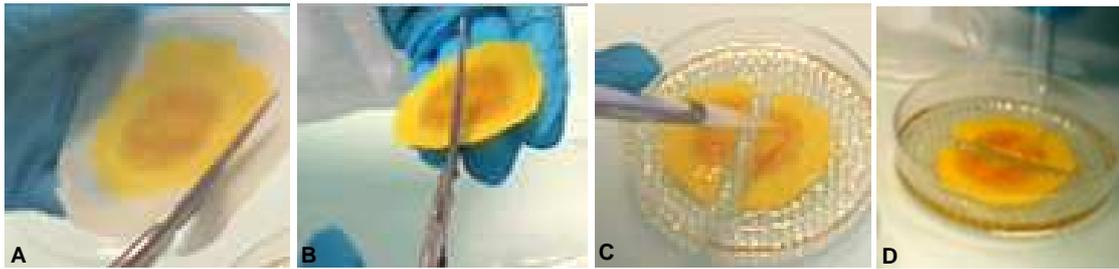


Figure 6 : Incorporation des protéines dans *Physarum*.

Le filtre de papier Whatman est découpé tout autour de la cellule (A), le macroplasmode est découpé par la suite en deux fragments égaux (B). La solution contenant les protéines est déposée sur la surface du macroplasmode (C). Finalement, à l'aide d'une pipette pasteur, la solution de protéine est étalée sur toute la surface de la cellule.

VII. Analyses des produits d'incorporation dans les différentes fractions cellulaires

Pour les analyses des fragments de macroplasmodes traités avec des protéines exogènes, nous avons mis en œuvre des techniques de biologie cellulaire et de biochimie. Ceci dans le but d'avoir des approches complémentaires qui permettent d'obtenir un meilleur rendu de nos expériences d'incorporation.

VII.1 Analyses cellulaires en microscopie

Les analyses cellulaires ont été effectuées par immunocytochimie en utilisant comme cible l'étiquette des complexes d'histones. Des explants des fragments de macroplasmodes sont prélevés et étalés entre deux lames avant d'être fixés à l'éthanol. Les lames sont ensuite placées dans un Borel contenant 0,1% de Triton X-100 dans du PBS (KH_2PO_4 0.17 Mm, Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM, NaCl 13.4 mM, Azide 0.04 g/l) pendant

10 min. Ce traitement permet de perméabiliser les différentes structures parmi lesquelles les noyaux et ainsi avoir une meilleure accessibilité aux anticorps. Les lames sont ensuite transférées dans un Borel contenant une solution de saturation composée de 5% de lait dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Après ce traitement, les lames sont lavées par passages successifs dans différents bains de PBS afin d'enlever tout excès de Triton et de lait qui pourrait interférer avec les traitements anticorps. A ce stade les lames sont placées en chambre humide pour les différents traitements anticorps. Le premier anticorps utilisé est dirigé contre l'étiquette des complexes exogènes. Typiquement, nous utilisons une dilution de 1/500^e pour détecter les complexes contenant la séquence Flag. Ce traitement est poursuivi toute la nuit à 4°C. Le lendemain les lames sont lavées au moins 3 fois avec du PBS pour retirer les anticorps qui pourraient ne pas être associés de façon spécifique à leur cible. Suite à ces lavages, on dépose sur la surface des lames l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore et qui permettra la visualisation des complexes anticorps primaire/anticorps secondaire par épifluorescence. Ce traitement avec l'anticorps secondaire est poursuivi pendant 1 h à température ambiante et est suivi de plusieurs lavages dans du PBS comme précédemment.

Après les traitements aux anticorps qui permettront la détection des protéines exogènes, nous effectuons un traitement de coloration au DAPI qui, en s'intercalant dans la double hélice d'ADN, rend les organites comme les noyaux et les mitochondries fluorescents lorsqu'ils sont excités avec la longueur d'onde adéquate.

Les lames sont ensuite montées en présence de 50% de glycérol avec une lamelle avant d'être observées au microscope à fluorescence de type Leica. Pour ces expériences d'observation *in situ*, nous avons utilisé comme contrôle des explants de macroplasmodes non traités avec des protéines exogènes. Ceci nous permet de nous rendre compte de la spécificité des signaux de fluorescence et d'évaluer l'autofluorescence de *Physarum*.

Si les analyses en microscopie permettent de rendre compte de l'incorporation des histones exogènes dans *Physarum*, les quantifications qui pourraient découler de ces analyses sont plus difficiles à mettre en œuvre. Aussi, pour avoir des quantifications précises nous avons choisi d'avoir recours à des analyses biochimiques. De telles approches sont effectuées sur les fragments de macroplasmodes individuellement.

VII.2 Fractionnement cellulaire de *Physarum* et analyse biochimique des différentes fractions

Pour nos approches biochimiques, il est nécessaire de pouvoir séparer les différents compartiments cellulaires. Ceci a été effectué par fractionnement cellulaire en utilisant une méthode inspirée du protocole de Nothacker et Hildebrant développé pour isoler les noyaux de *Physarum* et modifié par Thiriet (Thiriet 2004). Après incorporation des protéines exogènes dans *Physarum* les demi-cellules sont lavées dans 5 mM EDTA pour retirer de la surface cellulaire les protéines qui pourraient ne pas être internalisées. Les fragments cellulaires sont ensuite individuellement récupérés et placés dans un potter pour être homogénéisés dans 5 ml de tampon de noyaux (MgCl₂ 15 mM, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl (pH 8) 15 mM, Hexylène glycol 0.25 M, EGTA (pH8) 5 mM, Surfinol 0.6%, DTE 3 mM). L'homogénéisation est effectuée par 20 allers et retours du piston en verre (loss). L'homogénat est transféré dans un tube de 12 ml et le potter est rincé avec 5 ml de tampon de noyaux. Le tube contenant ~10 ml d'homogénat est centrifugé à 700 g pendant 5 min à 4°C. Un aliquot du surnageant est récupéré et correspond à la fraction cytoplasmique. Le culot est suspendu dans un tampon de noyaux contenant 25% de percoll. La suspension est transférée dans des tubes de 2 ml et centrifugée à 25 000 g pendant 35 min à 4°C. Au cours de la centrifugation, un gradient de percoll se forme et permet ainsi de séparer les noyaux des débris cellulaires et du mucus contenu dans les plasmodes de *Physarum*. Les noyaux qui forment un disque dans le fond du tube sont délicatement récupérés et transférés dans un nouveau tube. Les noyaux sont ensuite lavés avec le tampon de noyaux pour retirer le percoll par centrifugation à 700 g pendant 5 min à 4°C. Le culot est repris dans 400 µl de tampon de micrococcale et un aliquot de 50 µl est prélevé et correspond à la fraction nucléaire.

Après avoir préparé les fractions cytoplasmiques et nucléaires, nous préparons la fraction chromatinienne. Celle-ci est obtenue par solubilisation de la chromatine des noyaux par digestion à la micrococcale. La digestion est effectuée de la façon suivante :

La solution stock de micrococcale à 15 U/µl est diluée à raison de 2 µl d'enzyme pour 98 µl de tampon de micrococcale. On ajoute à la suspension de noyaux 1/10 du

volume de la dilution d'enzyme qu'on laisse agir en agitant occasionnellement. La digestion est poursuivie pendant des durées précises avant d'être stoppée par l'ajout d'un tampon de stop contenant un excès d'EDTA pour chélater le Ca^{2+} indispensable à l'activité de la micrococcale (Tris 10 mM et EDTA 5 mM). De façon générale, nous poursuivons pendant 5 min la digestion pour préparer la chromatine soluble. Cette dernière est ensuite récupérée par centrifugation à 10 000 g pendant 5 min à 4°C. A ce stade, nous avons non seulement la chromatine soluble dans le surnageant, mais aussi toutes les protéines qui pourraient restées solubles dans le noyau. Par conséquent pour s'assurer que nos analyses sont effectuées sur la chromatine et non sur la fraction soluble, nous avons séparé la chromatine des protéines solubles en utilisant des billes d'hydroxyapatite.

Au tube contenant environ 400 μl de matériel nucléaire soluble, on ajoute 20 μl d'une suspension de billes d'hydroxyapatite avant de placer le tube sur un agitateur pendant 1 h. Les billes sont ensuite récupérées par centrifugation à 100 g pendant 1 min puis lavées en présence d'un tampon phosphate (pH 7) contenant 600 mM de NaCl. Cette étape de lavage est répétée plusieurs fois, puis les billes sont comme précédemment récupérées par centrifugation. Les protéines de la chromatine associées aux billes d'hydroxyapatite sont ensuite solubilisées par l'ajout du tampon de charge d'électrophorèse qui contient du SDS et sont chauffés à 95°C pendant 5 min.

Ce n'est qu'après ces différentes étapes de fractionnement et de purification que nous avons en notre possession la fraction cytoplasmique, la fraction nucléaire et la chromatine de nos fragments de macroplasmodes.

VII.2 Analyses biochimiques des différentes fractions

Pour analyser nos différentes fractions, les protéines sont séparées en PAGE-SDS pour être soit colorées au bleu de Coomassie, soit transférées sur une membrane de nitrocellulose pour des études par immunochimie.

Après vérification de l'efficacité du transfert au rouge ponceau, les membranes sont alors saturées dans un bain de tampon PBS-T (PBS et 0,04% de Tween 20) contenant

5% de lait sous agitation pendant 30 min. Cette étape permet de saturer de façon non spécifique la surface de nitrocellulose. L'excès de lait est ensuite lavé en incubant les membranes de nitrocellulose en présence de PBS-T. Il s'ensuit une incubation d'une heure sous agitation dans l'anticorps primaire dirigé contre l'étiquette du complexe d'histone dilué au 1/5 000^e. Les membranes sont ensuite lavées à nouveau dans 3 bains de PBS-T de 5 min chacun avant d'être incubées pendant 1 h en présence d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dirigé contre les anticorps primaires. L'excédent d'anticorps secondaire est lavé comme précédemment avec du PBS-T avant de faire la réaction de chimiluminescence (ECL).

Alors que plusieurs compagnies commercialisent des produits d'ECL, nous utilisons pour nos expériences des produits 'maison'. Dans un tube contenant 20 ml de Tris-HCl, pH 8,5 à 10 mM, on ajoute 100 µl de fluorescéine (250 mM dans du DMSO), 44 µl d'acide coumarique (90 mM dans du DMSO) et 6 µl d'H₂O₂ 30%. Le contenu du tube est ensuite versé sur la membrane de nitrocellulose pendant 2 min. La membrane est placée sur une plaque et l'excès de liquide est soigneusement éliminé avec un papier absorbant avant d'être enveloppée dans un film transparent. La visualisation de la réaction enzymatique se fait par exposition de la membrane sur un film. Plusieurs expositions sont généralement effectuées avec des durées allant de 5 sec à 1 min, ce qui permet d'avoir une exposition correcte.

Au cours de nos expériences, nous avons été amenés à examiner d'autres protéines que les protéines exogènes ou encore à détecter des modifications post-traductionnelles des histones. Dans ces cas, la démarche est similaire à celle décrite ci-dessus, mais les anticorps primaires utilisés sont spécifiques de la protéine à étudier ou des modifications des histones.

I. Evidence de l'assemblage en chromatine couplé à la réplication d'histones exogènes incorporées pendant la phase S

Pour notre étude de la fonction des régions terminales des histones H3 et H4 lors de la réplication, nous avons choisi comme matériel biologique le myxomycète *Physarum polycephalum*. La méthodologie que nous projetons de mettre en œuvre se base sur des techniques de biochimie. Aussi, avant d'examiner proprement dit le rôle des régions terminales des histones, il nous semble important de vérifier que les différentes techniques de biochimie que nous exploiterons tout au long de notre travail donnent bien les résultats escomptés.

I.1 Validation du fractionnement cellulaire de macroplasmodes de *Physarum*

Dans notre étude nous devons être en mesure de pouvoir distinguer le cytoplasme du noyau. Pour cela, nous avons procédé à un fractionnement cellulaire de macroplasmodes de *Physarum* (**figure 1**). Différents protocoles ont été mis au point pour tenir compte des caractéristiques de notre modèle biologique. On notera que la méthode la plus souvent exploitée est celle développée par Mohberg et Rusch (Mohberg and Rusch 1969). Lors de cette méthode, les noyaux sont préparés par homogénéisation de la cellule et passage de la fraction nucléaire à travers un coussin de sucrose. Bien que rapide et facile à mettre en œuvre, nous n'avons pas opté pour cette méthode. En effet, nos essais à partir de cette méthode nous ont montré que les noyaux ainsi isolés contenaient une quantité importante de débris cellulaires et surtout semblaient ne pas être débarrassés du mucus. Par conséquent, pour les fractionnements cellulaires, nous nous sommes inspirés d'une méthode plus récente développée par Nothacker et Hildebrandt (Nothacker and Hildebrandt 1988). Dans cette dernière, suite à une homogénéisation la fraction cytoplasmique est séparée de la fraction qui contient le matériel insoluble. A ce stade, il est évident que les noyaux sont en présence d'un grand nombre de contaminants. Pour obtenir une fraction nucléaire propre, le matériel insoluble est remis en suspension dans un tampon contenant du Percoll. Par centrifugation, le Percoll du tampon va former un gradient isopycnique qui va permettre la séparation des différents débris cellulaires et du mucus qui

vont rester dans la partie supérieure du tube alors que les noyaux vont se loger dans le fond du tube sous forme d'un disque.

Bien que le protocole initial ait permis d'isoler des noyaux contenant des ARN non dégradés, en dépit de la forte activité RNase renfermé dans les plasmodes de *Physarum*, nous avons été amenés à faire quelques modifications mineures. En effet, le tampon de Nothacker et Hildebrandt, tout comme dans la méthode Mohberg, utilisait le CaCl_2 comme divalent, nous avons remarqué que cette source de divalents posait quelques problèmes dans nos étapes subséquentes. Il a été montré qu'il existait chez *Physarum* une transglutaminase capable de générer des cross-links dans la cellule (Mottahedeh and Marsh 1998). Les analyses détaillées de cette enzyme ont montré qu'elle était calcium dépendante, mais que son activité était inhibée par le magnésium ainsi que par l'ATP. Il a été proposé que la transglutaminase ait une fonction dans le maintien de l'intégrité cellulaire chez *Physarum*. En effet, dans la nature, les plasmodes subissent des agressions diverses qui peuvent engendrer des dommages de la cellule. Afin de ne pas exposer le milieu intracellulaire, la transglutaminase serait utilisée pour générer des cross-links et cloisonner la région endommagée. Aussi, pour notre protocole de fractionnement cellulaire, nous avons remplacé le CaCl_2 par du MgCl_2 ce qui permet l'inhibition de l'activité de cross-link de la transglutaminase. Il nous est donc possible par fractionnement cellulaire, de séparer une fraction cytoplasmique de la fraction nucléaire. On notera que notre procédure n'entraîne pas la lyse des noyaux, comme on atteste l'absence de détection d'histone dans la fraction cytoplasmique en dehors de la période de synthèse précédemment décrite (Loidl and Grobner 1987).

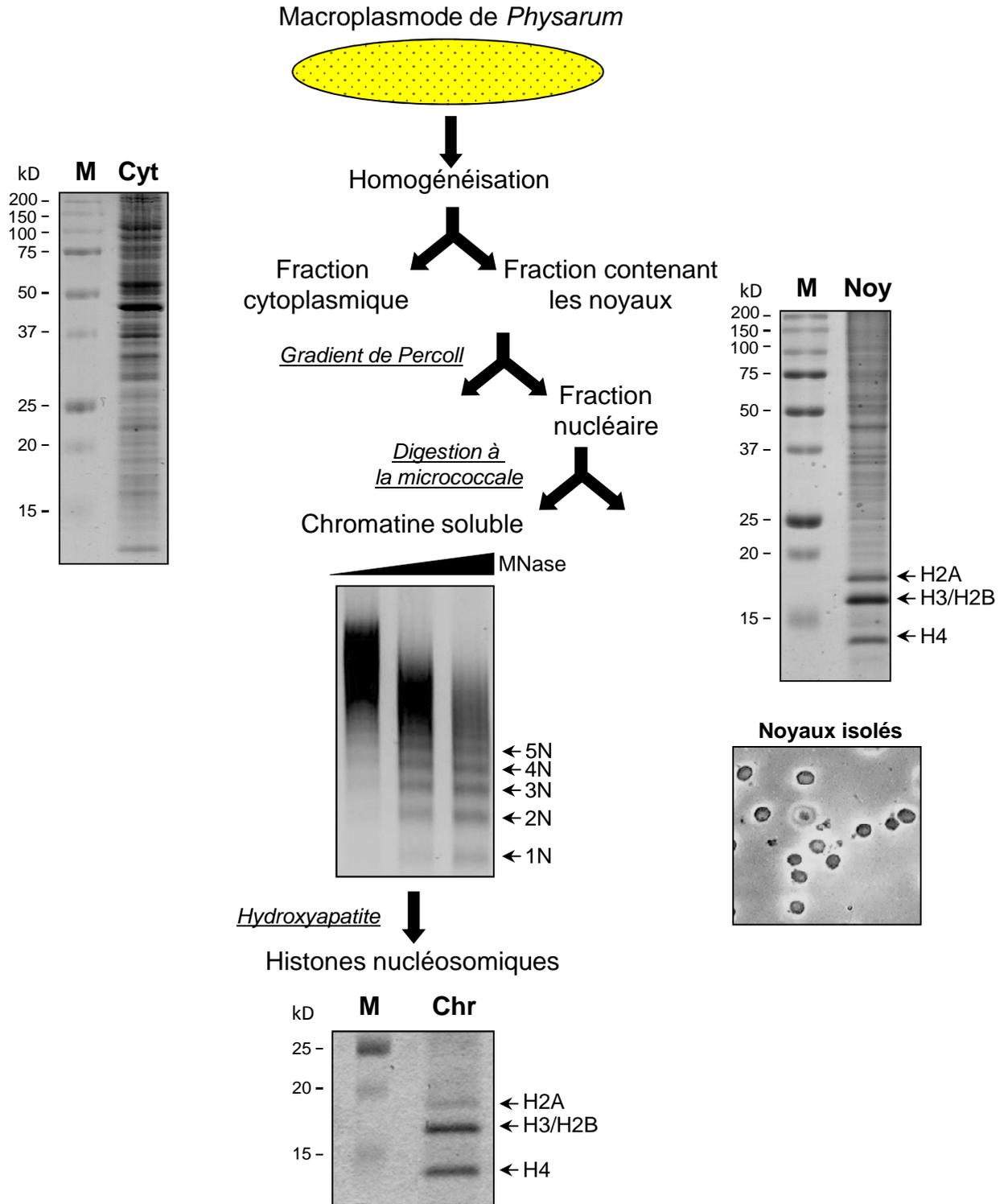


Figure 1 : Fractionnement cellulaire et préparation de la chromatine de *Physarum*. Après homogénéisation du macroplasmode, la fraction cytoplasmique (Cyt) est séparée de la fraction contenant les débris cellulaires et les noyaux. Les noyaux (Noy) sont ensuite isolés par centrifugation sur un gradient de Percoll. La chromatine est solubilisée par digestion de la suspension de noyaux avec la micrococcale (MNase) et les histones de la chromatine (Chr) sont purifiées avec des billes d'hydroxyapatite.

Alors que par le fractionnement cellulaire, il nous sera possible d'examiner la localisation cellulaire des histones, il sera tout aussi important lors de notre travail de pouvoir déterminer si les histones nucléaires sont ou non assemblées en chromatine. Pour cela, il faut être en mesure de séparer les histones de la chromatine de celles qui sont solubles dans le nucléosol. En effet, il n'est pas possible par la seule localisation nucléaire des histones de pouvoir conclure que ces protéines sont associées à la chromatine. Lors de l'analyse de la fonction des régions terminales des histones H2A et H2B, Thiriet et Hayes ont montré que des histones pouvaient être transportées dans le noyau sans pour autant être assemblées en chromatine (Thiriet and Hayes 2001). Pour vérifier l'intégration des histones dans la chromatine, la chromatine de la fraction nucléaire est solubilisée par digestion avec la micrococcale (**figure 1**). Cette enzyme communément utilisée est capable de couper l'ADN lorsque le matériel génétique est accessible. En général, on considère que la micrococcale digère l'ADN qui n'est pas protégé par interaction histones/ADN du nucléosome. Ainsi, des digestions ménagées de la chromatine conduisent à une succession de bandes qui correspondent aux monomères et polymères des nucléosomes. Par cette étape de digestion de la chromatine des noyaux, les fragments de chromatine qui en résultent sont solubles et libérés des noyaux. Pour purifier les histones assemblées en chromatine des histones qui pourraient rester solubles dans le noyau, nous utilisons une résine d'hydroxyapatite qui, en s'associant avec les acides nucléiques, permet de purifier les histones associées à l'ADN (Brand, Rampalli et al. 2008). Toutefois, pour prévenir de possibles interactions non spécifiques dues aux charges électrostatiques des histones et de l'ADN, les billes d'hydroxyapatite sont lavées en présence de sel. Les histones associées à l'ADN peuvent par cette approche être analysées par des techniques électrophorétiques.

I.2 Préparation de complexes des histones H3 et H4

Il est maintenant bien établi que les histones H3 et H4 forment des hétérocomplexes. Alors que les analyses structurales montrent la présence d'un tétramère de ces histones dans l'octamère qui compose le nucléosome (Arents, Burlingame et al. 1991; Luger, Mader et al. 1997), des études *in vivo* révèlent que les histones H3 et H4 sont déposées dans la chromatine sous forme d'hétérodimère (Tagami, Ray-Gallet et al. 2004; Benson, Gu et al. 2006).

Pour nos expériences, il est nécessaire de pouvoir disposer de complexes d'histones capables non seulement de former des nucléosomes, mais aussi d'être pris en charge par les machineries cellulaires. Par conséquent, les complexes d'histones qui seront étudiés dans notre travail seront produits en utilisant la stratégie suivante. De par leur conservation dans le règne eucaryote, il n'a pas semblé important de travailler exclusivement avec les séquences des histones de *Physarum*. Plus précisément, les séquences que nous avons utilisées dérivent de celle du Xénope. Dans le cas de l'histone H4, les difficultés d'obtention de cette histone ont conduit à l'utilisation d'un gène synthétique préparé par le groupe de Richmond pour obtenir la structure du nucléosome par diffraction des rayons X (Luger, Mader et al. 1997; Luger, Rechsteiner et al. 1997). Pour ce qui est de l'histone H3, le gène utilisé est un gène naturel. Les gènes des histones H3 et H4 sont amplifiés par PCR avant d'être insérés dans un vecteur d'expression (**figure 2**). Du fait qu'il nous sera nécessaire de pouvoir localiser les complexes des histones H3/H4 dans la cellule, nous avons introduit sur tous les complexes que nous étions amenés à préparer une étiquette qui pourra être soit la séquence Flag, soit la séquence de l'hémagglutinine (HA).

Par cette approche il est donc possible d'exprimer les histones recombinantes dans des cellules d'*E. coli* de façon individuelle. Pour purifier les complexes d'histones, le protocole utilisé tient compte des caractéristiques d'expression des histones dans les bactéries, ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques (Thiriet 2004). Les hétérocomplexes des histones H3/H4 sont finalement purifiés en utilisant une chromatographie échangeuse d'ions de type Bio-Rex 70. Dans l'exemple que nous avons imagé dans la **figure 2**, nous pouvons distinguer la succession des étapes de l'amplification des inserts par PCR à la purification d'un complexe caractéristique des histones H3/H4. Il est à noter que dans nos différents complexes les étiquettes sont avec une seule représentation de la séquence de l'étiquette. Ceci ne permet pas l'amplification du signal

de détection de l'étiquette, mais offre l'avantage de minimiser les encombrements stériques que la multiplication d'une séquence pourrait présenter. La vérification que la présence de l'étiquette Flag en position N-terminale de l'histone H4 n'affecte pas la formation de nucléosomes a précédemment été effectuée par reconstitution de nucléosome *in vitro*. Comme pressenti, les résultats de ces expériences ont permis de montrer que l'étiquette n'affecte pas la formation du nucléosome *in vitro*, et que la procédure de purification des complexes H3/H4 permet d'obtenir des hétérocomplexes fonctionnels (Thiriet and Hayes 2005).

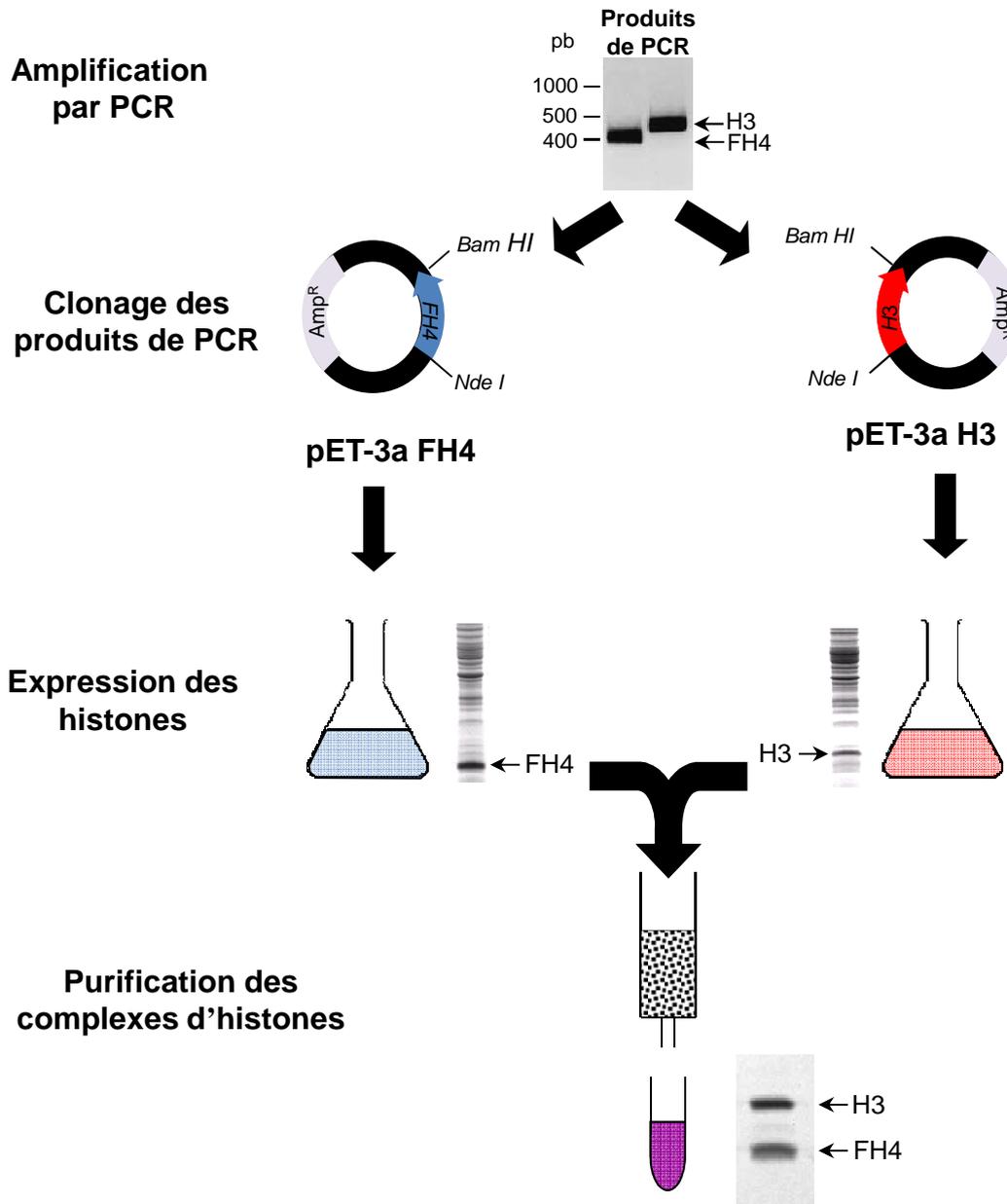


Figure 2 : Stratégie de préparation des complexes des histones H3 et H4.

L'ADN codant pour les histones H4 et H3 est amplifié par PCR, visualisé sur gel d'agarose et cloné dans le plasmide pET-3a entre les sites de restriction BamHI et NdeI. L'expression des protéines recombinantes est effectuée dans *E.coli* B121. Les lysats sont combinés et le mélange est passé sur une résine échangeuse d'ions (Bio-Rex 70). Après lavages à 0.6 M NaCl, les complexes H3/H4 sont élués avec 2 M NaCl.

I.3 Incorporation des complexes d'histones dans des macroplasmodes de *Physarum*

Disposant de complexes fonctionnels des histones H3/H4, nous avons voulu vérifier que ces protéines pouvaient être utilisées par la cellule. Cette démarche quelque peu originale est permise grâce à une caractéristique de notre modèle biologique *Physarum* qui est d'incorporer des protéines exogènes. Ce myxomycète est à ce jour le seul organisme rapporté dans la littérature capable d'internaliser spontanément des protéines exogènes. Outre le passage du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire, les protéines incorporées sembleraient être utilisées par la cellule dans son propre métabolisme (Oppenheim and Katzir 1971; Bradbury, Inglis et al. 1974; Prior, Cantor et al. 1980; Thiriet and Hayes 2001; Thiriet and Hayes 2005). Dans le but de vérifier que nous étions en mesure d'observer une incorporation des complexes d'histones dans *Physarum* et d'examiner l'utilisation des protéines par la cellule, nous avons entrepris des expériences d'incorporation.

Pour ces expériences de contrôle de l'incorporation des histones dans *Physarum*, nous avons utilisé les complexes des histones H3 et H4 que nous avons précédemment préparés (**Figure 2**). D'un point de vue expérimental, nous avons utilisé la procédure décrite par Thiriet (Thiriet 2004). Pour s'assurer qu'il nous sera possible d'observer l'utilisation des histones exogènes par la cellule, nous avons choisi comme période d'incorporation la phase S du cycle cellulaire au cours de laquelle les histones sont synthétisées (Loidl and Grobner 1987) (**figure 3**). Par conséquent, par des observations d'explants de cellule nous avons d'abord déterminé le moment de la mitose. Environ 30 min après son observation, les macroplasmodes sont coupés en deux moitiés de surface égale. Par ce découpage des macroplasmodes, il est possible avec une cellule unique de faire l'expérience d'incorporation et d'avoir aussi le contrôle négatif de l'expérience. Il est à noter que les fragments provenant d'un même macroplasmode conservent non seulement la synchronie à l'intérieur d'un fragment, mais que chaque fragment cellulaire est synchrone par rapport aux autres. Nous n'avons pas estimé la durée maximale de la synchronie entre les fragments, mais nous n'avons jamais observé une désynchronisation des fragments à l'intérieur du cycle dans lequel les plasmodes ont été coupés. L'incorporation des histones se fait en déposant sur la surface d'une moitié de

macroplasmode une solution contenant un tampon phosphate avec 10 mM d'ATP. L'autre moitié est utilisée comme contrôle traité avec le tampon sans protéines. L'addition d'ATP dans le tampon rend l'incorporation des protéines exogènes plus efficace (Thiriet 2004). Bien que nous ne connaissions pas les mécanismes qui permettent l'internalisation des protéines dans la cellule, nous savons que celle-ci ne peut se faire sans dégradation que lorsque les protéines sont présentées par la surface supérieure. L'utilisation de l'ATP dans ce processus n'est pas connue. Alors, qu'on pourrait penser que le mécanisme implique des pompes qui auraient besoin d'énergie pour fonctionner, on ne peut pas exclure non plus que l'ATP puisse être utilisée dans ce cas comme inhibiteur de la transglutaminase qui pourrait par cross-link rendre une partie des protéines exogènes inutilisables par la cellule, voire même les rendre insolubles. Dans ces expériences, la quantité de complexe d'histones déposée sur le fragment de macroplasmode correspond à des traces puisque nous estimons que cette quantité est inférieure à 1/1000^e de la quantité d'histones que renferme un demi-macroplasmode.

Les moitiés de macroplasmodes traitées avec les protéines H3/F-H4 exogènes et avec le tampon de contrôle sont ensuite remises à incuber dans les conditions optimales de croissance de *Physarum* (26°C à l'obscurité). Pour nos expériences de vérification de l'incorporation des protéines exogènes, nous avons laissé la phase S progresser pendant 1 h. Alors que cette durée ne représente que le tiers de la phase de réplication du génome, les études d'incorporation d'un précurseur radioactif de l'ADN montrent que pendant la première heure de réplication, une majorité du génome est déjà répliquée (Braun, Mittermayer et al. 1965; Thiriet and Hayes 2009). Nous pouvons souligner que contrairement au protocole initial rapporté par Oppenheim et Katzir (Oppenheim and Katzir 1971), les fragments de macroplasmodes de *Physarum* sont laissés sur le milieu de culture. En effet, dans leurs expériences Oppenheim et Katzir mettaient à jeûner les macroplasmodes, sans doute en supposant que dans ces conditions la membrane plasmique de la cellule pourrait être plus perméable. Ces conditions de jeûne qui sont utilisées pour la formation des macroplasmodes favorisent la coalescence des plasmodes (Guttes, Guttes et al. 1961; Guttes and Guttes 1968; Guttes, Devi et al. 1969). Toutefois, dans des conditions de privation de nutriments, la progression du cycle cellulaire se trouve perturbé et il est difficile de considérer que la phase du cycle ou alors les réactions biologiques qui y sont associées se déroulent dans de bonnes conditions. Par conséquent pour nos expériences d'incorporation, le jeûne des cellules est éradiqué en laissant les cellules sur le milieu de

culture. Ces conditions expérimentales ne nous ont pas permis d'observer de diminution de l'incorporation ni même de perturbations flagrantes de la progression du cycle cellulaire.

Les fragments de macroplasmodes sont alors lavés en présence d'EDTA pour retirer de la surface cellulaire les excédents de tampon et de protéines qui pourraient ne pas être internalisés. Finalement, le matériel biologique est récupéré et un fractionnement cellulaire est effectué suivant la méthode décrite dans la **figure 1**.

Les différentes fractions issues des demi-cellules sont d'abord analysées en PAGE-SDS (**figure 3**). La coloration du gel au bleu de Coomassie révèle que les fractions issues du fragment de macroplasmode témoin et de celui traité avec les histones exogènes présentent des profils très similaires. Tant dans la fraction cytoplasmique que dans la fraction nucléaire, il n'est pas possible de détecter de bandes qui pourraient correspondre aux histones exogènes ou encore à une protéine endogène qui pourrait suggérer une perturbation de la cellule imputable au traitement. Afin de gagner en sensibilité dans la détection des protéines exogènes, nous avons utilisé l'étiquette Flag placée sur l'histone H4. Les différentes fractions sont alors analysées en Western blot et révélées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence de l'étiquette. Les résultats de ces analyses montrent la présence d'une bande immunodétectée dans la fraction nucléaire provenant du fragment de macroplasmode traité avec les histones exogènes. Par contre dans les fractions provenant du contrôle et de la fraction cytoplasmique de la cellule traitée, aucun signal significatif n'a été détecté. De façon intéressante, la bande détectée dans la fraction nucléaire présente la même migration électrophorétique que l'histone F-H4. Nous avons donc conclu de ces expériences que l'incorporation d'histones exogènes dans *Physarum* n'induit pas de perturbation dans la cellule et que les histones sont capables de se rendre dans le noyau après leur internalisation dans le milieu intracellulaire pendant la phase S.

Afin de confirmer la localisation des protéines exogènes dans les noyaux, nous avons également effectué des expériences d'immunolocalisation des protéines exogènes sur des étalements d'explants de macroplasmodes de *Physarum*. Les analyses au microscope à fluorescence de nos lames révèlent que dans la cellule servant de contrôle le signal de la rhodamine associée à l'anticorps secondaire est presque imperceptible (**figure 3**). Nous visualisons difficilement quelques ponctuations rouges sur la lame qui semblent correspondre à un bruit de fond et qui ne co-localisent pas avec les noyaux dont l'ADN a été coloré au DAPI.

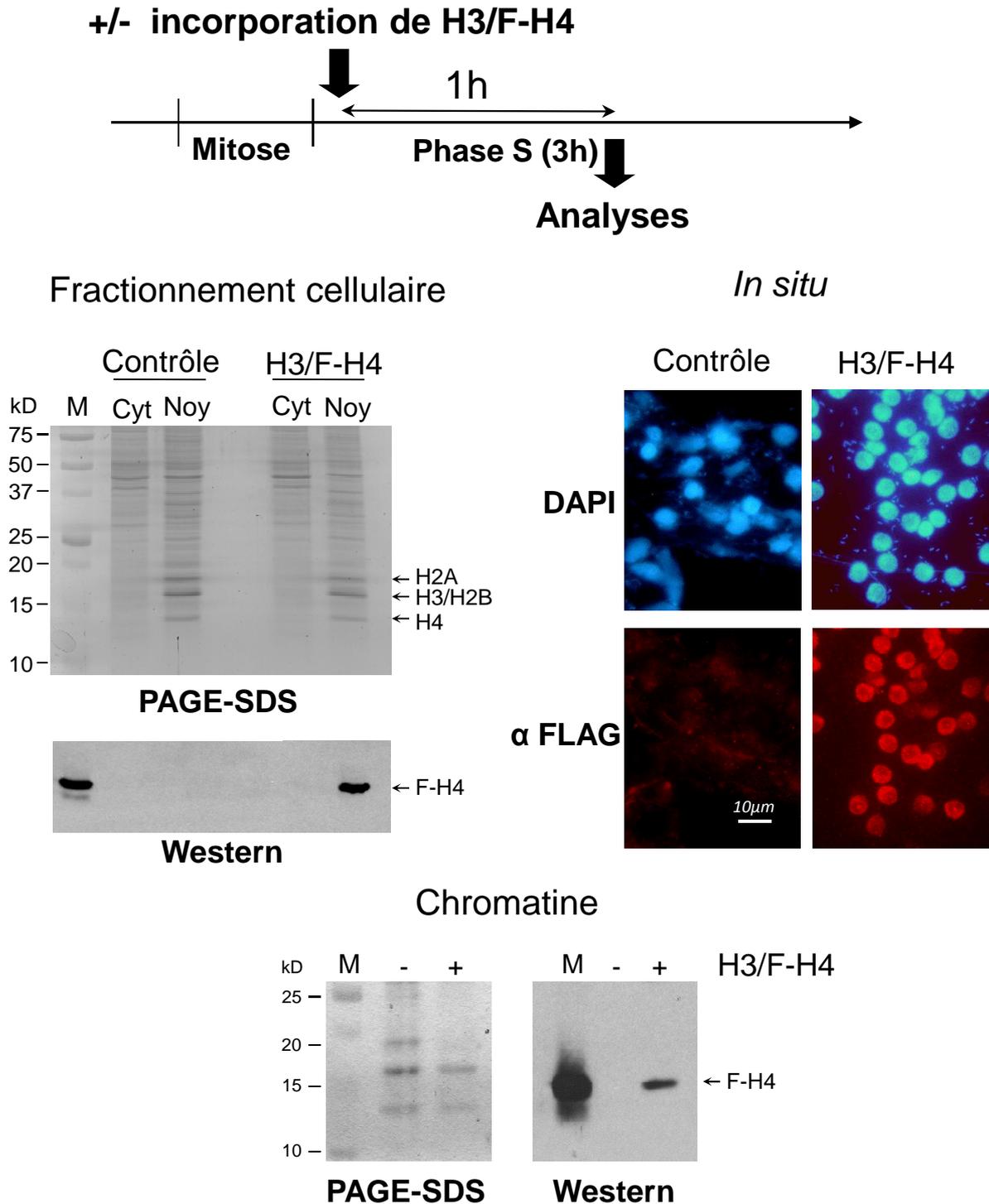


Figure 3 : Les histones exogènes sont internalisées dans *Physarum* pour être transportées dans les noyaux et assemblées en chromatine pendant la phase S.

Le complexe H3/F-H4 est incorporé en début de phase S pendant 1 h sur une moitié de cellule, la deuxième moitié est utilisée comme contrôle négatif. Les fragments de macroplasmode sont ensuite analysés par des techniques biochimique et cytologique. Les histones exogènes sont détectées dans les différentes approches avec un anticorps monoclonal anti-Flag (α FLAG).

Par contre les observations de la cellule traitée avec les protéines exogènes montrent clairement une émission de fluorescence causée par la rhodamine. La comparaison entre les signaux provenant de la rhodamine et ceux issus de la coloration au DAPI montre sans ambiguïté une parfaite co-localisation. Par conséquent, en accord avec les analyses de fractionnement cellulaire, ces dernières expériences nous permettent de conclure que les histones exogènes sont localisées dans les noyaux de *Physarum*. Cependant nous pouvons également noter que la détection de l'histone F-H4 n'est pas homogène dans l'ensemble des noyaux comme en témoigne des densités de coloration différentes. Cette observation nous donne deux indications intéressantes. D'abord, malgré un contenu en matériel génétique identique dans tous les noyaux, et des besoins en histones comparables pour tous les noyaux pendant la réplication, les protéines exogènes sont distribuées de façon aléatoire dans les noyaux. Ainsi certains noyaux vont recevoir plus de protéines exogènes que d'autres. D'autre part, le fait d'avoir une coloration hétérogène par la rhodamine montre que les complexes exogènes ne saturent pas les machineries cellulaires impliquées dans le transport nucléaire et que les histones exogènes ne représentent qu'une petite fraction des histones cellulaires pendant la période d'incorporation.

Alors que nos expériences d'incorporation du complexe H3/F-H4 montrent que les histones exogènes sont capables d'être transportées dans les noyaux de *Physarum* pendant la phase S, il n'est toujours pas déterminé si ces protéines peuvent être utilisées par la cellule pour être assemblées en chromatine. En effet, une localisation nucléaire des protéines n'implique pas leur déposition dans la chromatine. Plusieurs études ont montré que des histones peuvent être associées à des facteurs nucléaires qui sont impliqués dans divers processus cellulaires (Verreault, Kaufman et al. 1996; Tagami, Ray-Gallet et al. 2004; Drane, Ouararhni et al. 2010; Lewis, Elsaesser et al. 2010). Par conséquent, afin de vérifier si les histones exogènes sont assemblées en chromatine, les histones de la chromatine sont séparées de celles qui pourraient ne pas être dans la chromatine en utilisant des billes d'hydroxyapatite lavées en présence de sel pour éliminer les protéines associées à la chromatine de façon non spécifique. Comme pour les fractions cellulaires, les histones de la chromatine sont ensuite analysées en PAGE-SDS et en Western blot (**figure 3**). Alors que la coloration du gel au bleu de Coomassie met en évidence la présence d'histones dans la chromatine issue de chaque fragment de macroplasmode, on relève que nous avons un peu plus de matériel déposé dans la piste correspondant au

contrôle. Néanmoins, en dépit de cette différence de dépôt dans le gel, la révélation du Western blot avec l'anticorps anti-Flag ne permet pas de visualiser de signal. Par contre dans la chromatine issue de la cellule traitée avec des protéines exogènes on voit très clairement un signal correspondant à l'histone F-H4 en Western blot (**figure 3**). Nous pouvons donc conclure que les histones exogènes incorporées dans *Physarum* pendant la phase S sont non seulement transportées dans les noyaux, mais en plus elles sont capables d'être assemblées en chromatine.

I.4 Les histones incorporées dans *Physarum* pendant la phase S sont assemblées en chromatine en couplage avec la réplication

Si nos résultats montrent que les histones exogènes sont internalisées dans *Physarum* et transportées dans les noyaux pour être assemblées en chromatine, nos expériences n'ont pas permis d'identifier les mécanismes impliqués. En effet, même si pendant la phase S le génome doit se répliquer, il a été montré que cette activité n'est pas exclusive pendant cette phase du cycle cellulaire puisqu'on y détecte également une activité de transcription qui n'est pas négligeable (Zellweger and Braun 1971; Wilhelm, Toublan et al. 1984). Outre l'abondance des activités transcriptionnelles, il a également été mis en évidence l'existence d'un couplage entre les activités de transcription et de réplication chez *Physarum* (Fouquet, Bohme et al. 1975; Pierron and Sauer 1980; Pierron, Sauer et al. 1982). Alors qu'il est généralement admis que la chromatine se forme pendant la réplication en concomitance avec la synthèse d'ADN, il nous semblait donc important de vérifier si l'assemblage en chromatine des histones exogènes était couplé à la réplication.

La méthodologie que nous avons mise en œuvre pour effectuer cette vérification est très similaire à celle utilisée pour démontrer l'incorporation des histones exogènes. Toutefois pour déterminer le mécanisme d'assemblage des histones dans la chromatine, nous avons examiné l'efficacité d'incorporation des histones lorsque la réplication est inhibée. Dans ces expériences afin de pouvoir évaluer les différences occasionnées par l'inhibition de la réplication, nous avons utilisé comme contrôle des fragments de macroplasmodes traités avec les histones H3/F-H4 comme décrit précédemment. Pour inhiber la réplication de *Physarum* pendant la phase S, nous avons utilisé l'hydroxyurée dans les conditions précédemment décrites (Thiriet and Hayes 2001). D'un point de vue expérimental, les macroplasmodes sont examinés au microscope à contraste de phase pour déterminer le moment de la mitose. Dès la télophase les fragments de macroplasmode destinés à être inhibés sont transférés sur un milieu nutritif contenant l'hydroxyurée (**figure 4**). Les fragments de cellules sont ainsi laissés ~15min avant d'être traités avec les protéines exogènes pour s'assurer que la drogue agisse bien sur le processus biologique visé. Dans ces conditions, il a été montré que la réplication était inhibée à plus de 90% (Thiriet and Hayes 2001).

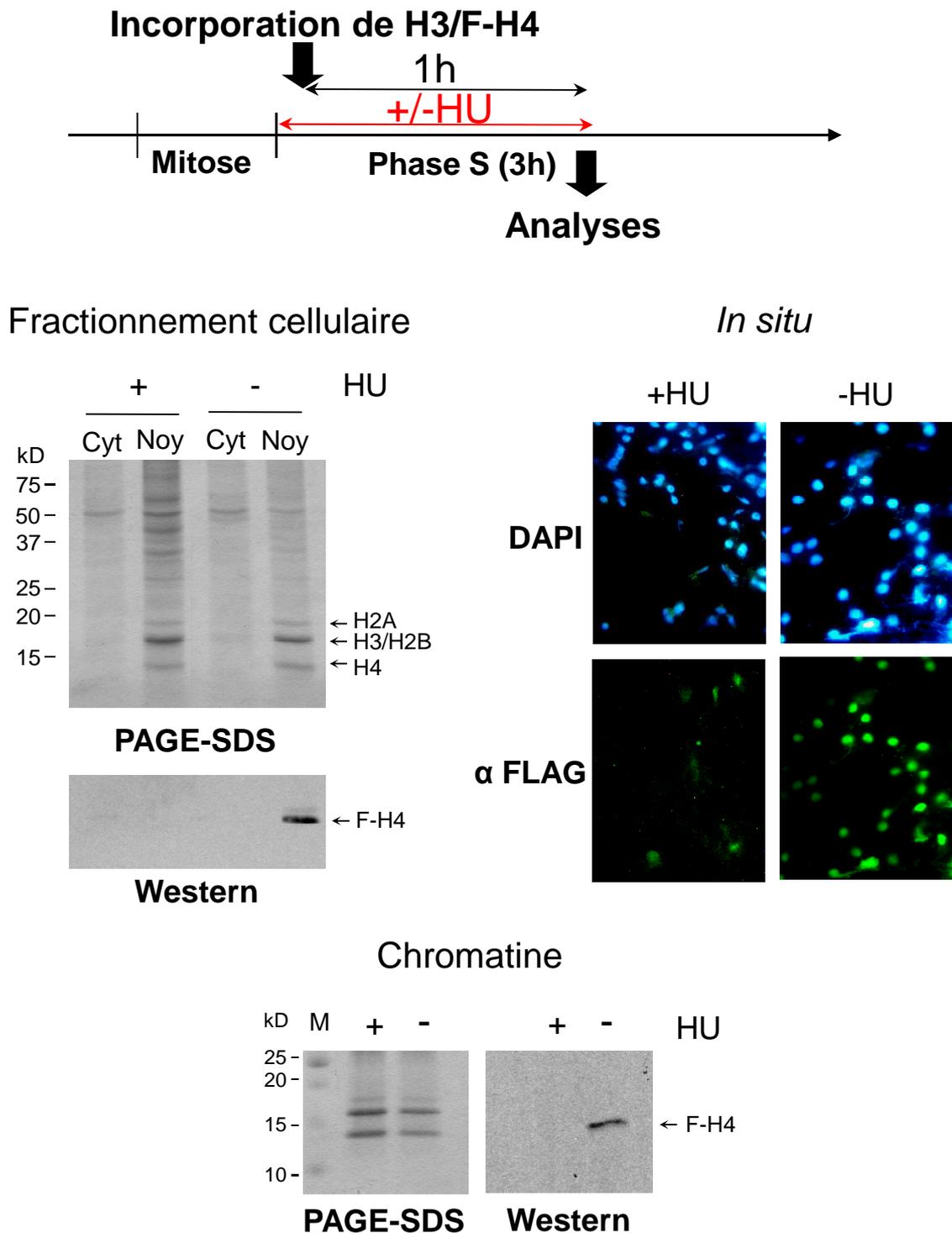


Figure 4 : Le transport nucléaire et l'assemblage en chromatine des histones exogènes sont sous le contrôle de la réplication.

Dès la fin de la mitose un demi-macropylasmode est placé sur un milieu contenant 80 mM d'hydroxyurée (HU) et au début de phase S les histones exogènes H3/F-H4 sont incorporées dans les deux demi-macropylasmodes. Après une heure, les fragments de cellules sont récoltés et analysés par des méthodes biochimiques et cytologiques. Les histones exogènes sont détectées avec un anticorps anti-Flag (α Flag).

Les fragments de macroplasmode sont ensuite traités avec les protéines exogènes exactement dans les mêmes conditions pour le fragment en présence d'hydroxyurée et pour le fragment placé sur le milieu nutritif seul. Comme dans les expériences précédentes, après une heure de traitement avec les protéines exogènes, les fragments de cellule sont récoltés et fractionnés avant d'être analysés.

Conformément aux résultats décrits précédemment, l'analyse en PAGE-SDS et en Western des différents échantillons issus du fractionnement cellulaire révèle la présence de l'histone exogène dans la fraction nucléaire pour le fragment de macroplasmode contrôle. Au contraire, pour le fragment traité avec l'inhibiteur de la réplication et avec les histones exogènes H3/F-H4, on ne détecte pas de signal avec l'anticorps anti-Flag dans la fraction nucléaire (**figure 4**). Néanmoins, on peut détecter un faible signal dans la fraction cytoplasmique. La quantification du signal de l'étiquette Flag associé à l'histone H4 montre que la quantité de signal est ~7 fois plus forte dans la fraction cytoplasmique de la cellule traitée avec l'hydroxyurée que la fraction cytoplasmique provenant du fragment de macroplasmode contrôle. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la réplication n'affecte pas l'internalisation des histones dans le milieu intracellulaire. Toutefois, l'absence de l'accumulation des histones exogènes dans la fraction nucléaire de la cellule traitée avec la drogue met en évidence un couplage entre les activités de réplication du génome et de transport des histones H3/H4 dans le noyau. Cette caractéristique n'est pas générale à toutes les histones. En effet, des expériences similaires effectuées avec les complexes des histones H2A/H2B n'ont pas mis en évidence d'inhibition du transport nucléaire des complexes en dépit de l'inhibition de la réplication par l'hydroxyurée (Thiriet and Hayes 2001). Par conséquent, il semblerait que les mécanismes cellulaires de transport des histones dans le noyau soient différents pour les histones H3/H4 et pour les histones H2A/H2B. Ce constat est en accord avec les analyses de la synthèse des histones chez *Physarum* où une inhibition de la réplication montre une inhibition de la synthèse des histones H3/H4 mais pas de celle des histones H2A/H2B (Loidl and Grobner 1987). La forte similitude entre les résultats obtenus avec les histones exogènes et ceux provenant d'analyses des histones endogènes suggère que les histones exogènes seraient sous les mêmes contrôles que les histones produites par l'organisme.

Les analyses en immunocytochimie d'explants des fragments de *Physarum* confirment les résultats obtenus en PAGE SDS et en Western. En effet, les observations des cellules servant pour contrôle révèle une accumulation nucléaire des histones exogènes

pendant la période d'incorporation. Au contraire, lorsque le fragment cellulaire est traité avec l'hydroxyurée, alors qu'on ne détecte pas de signaux nucléaires imputables aux histones exogènes, on détecte une émission de fluorescence qui ponctue la zone d'observation (**figure 4**). Ces signaux fluorescents pourraient correspondre à des agrégats de protéines qui resteraient dans le cytoplasme.

Les résultats issus des analyses des histones de la chromatine sont une fois encore en accord avec nos résultats précédents. Nous détectons un assemblage dans la chromatine de nos protéines exogènes uniquement lorsque la réplication de l'ADN n'est pas inhibée. Nous pouvons donc conclure que les mécanismes impliqués dans le transport des histones exogènes dans le noyau et leur assemblage en chromatine sont couplés à la réplication du matériel génétique.

II. Fonction des régions N-terminales des histones dans le transport des histones dans le noyau

II.1 Importance des queues des histones H3 et H4 dans l'import nucléaire des complexes H3/H4

Les histones sont souvent présentées comme de petites protéines basiques qui en s'associant à l'ADN forment le nucléosome. Néanmoins, dès le début des années 80, les analyses des produits de digestion à la trypsine ont permis de mettre en évidence deux domaines (Bohm, Briand et al. 1981; Bohm, Briand et al. 1982). Un domaine accessible à la digestion par la peptidase et un domaine qui gardait son intégrité en présence de l'enzyme. Ces domaines furent respectivement identifiés comme étant les régions amino-terminales des histones et les régions globulaires de ces mêmes protéines. Toutefois, on peut noter l'exception de l'histone H2A qui, en plus de sa queue amino-terminale, possède également une région non structurée en position C-terminale (van Holde 1989).

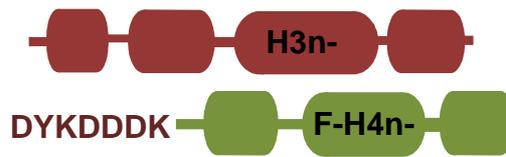
Outre la conservation des domaines des histones, la comparaison des séquences des histones provenant d'une variété d'organismes dans tout le règne eucaryote montre aussi que les régions amino-terminales des histones sont étonnamment préservées au cours de l'évolution. Ce constat a conduit à penser que les queues terminales des histones pourraient avoir des fonctions importantes dans la cellule. Aussi, pour comprendre plus précisément les rôles biologiques de ces régions des histones, un nombre impressionnant d'études a été mené. Ces différents travaux qui intéressent tant la biologie structurale, que la biochimie ou encore la biologie cellulaire ont permis de mettre en évidence certaines fonctions. Ainsi, il a été montré que dans l'organisation de la chromatine en domaines plus ou moins compactés dans le noyau, les queues des histones pourraient avoir un rôle important. En effet, en l'absence des régions N-terminales des histones il a été montré qu'un oligo-nucléosome présentait un degré de compaction moindre (Hansen, Tse et al. 1998; Gordon, Luger et al. 2005). D'autres analyses ont également montré que les régions terminales des histones pourraient avoir une fonction dans la régulation de la transcription (Hayes and Wolffe 1992; Lee, Hayes et al. 1993; Vettese-Dadey, Grant et al. 1996; Vitolo, Thiriet et al. 2000). En effet, dans le système modèle utilisant le gène 5S, il a été observé que des nucléosomes reconstitués *in vitro* ne permettent pas la reconnaissance de l'élément génétique reconnu par le facteur de transcription. Par contre, lorsque les nucléosomes sont

reconstitués avec des histones privées de leur queue terminale, le facteur de transcription est alors capable non seulement de reconnaître la séquence d'ADN, mais aussi de s'y associer (Vitolo, Thiriet et al. 2000). Si les études *in vitro* montrent effectivement des fonctions importantes des régions terminales des histones, elles vont dans le sens des études *in vivo* de la génétique (Lenfant, Mann et al. 1996).

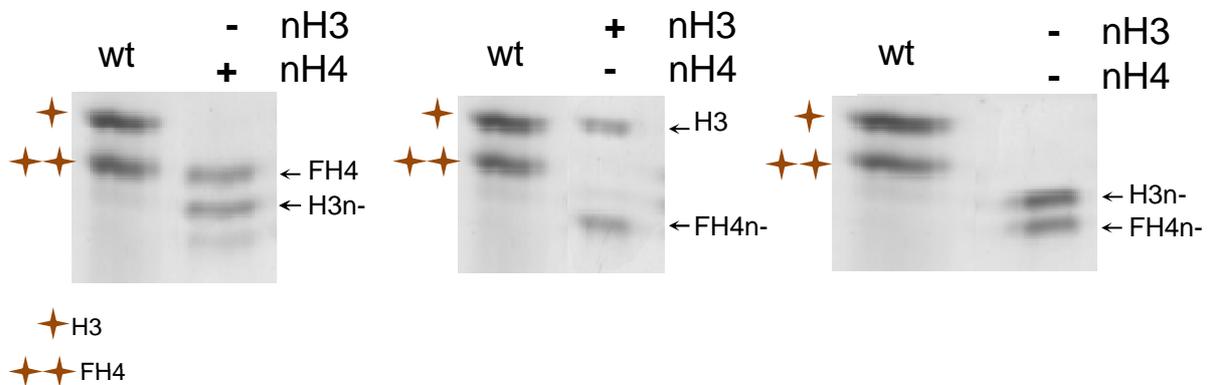
Les travaux exploitant des méthodologies de la génétique chez la levure ont vu leur essor dans les années 80-90. L'étude de la chromatine et le questionnement de la fonction biologique des régions terminales des histones n'ont pas fait exception à ce courant. Avec pour objectif de définir le rôle des queues des histones dans la cellule, les généticiens ont dû redoubler d'ingéniosité car si la construction de souches mutantes de levure bénéficie de stratégies éprouvées pour leur obtention, le caractère essentiel des histones pour la cellule ne rend pas leur étude anodine. En effet, la perte de fonctionnalité d'une des histones du nucléosome compromet la viabilité cellulaire (Rykowski, Wallis et al. 1981). Par conséquent, les généticiens ont développé des méthodologies dans lesquelles les cellules sont cultivées dans des conditions spécifiques en utilisant des histones ne portant pas de mutations. Grâce à un changement de milieu de culture, les cellules expriment alors une protéine mutée tandis que la protéine sauvage est éteinte (Schuster, Han et al. 1986; Ling, Harkness et al. 1996). Par de telles méthodes, il a été montré que les régions terminales des histones avaient des fonctions essentielles pour la viabilité cellulaire, qui cependant pouvaient être redondantes. Alors que les résultats ont été obtenus par le seul examen de la viabilité cellulaire, il semblait important de pouvoir déterminer avec précision les réactions biologiques dans lesquelles les queues des histones étaient si importantes. Pour faire de telles analyses il était important de ne pas mettre en péril les cellules à aucun moment de l'expérimentation. Une fois encore, la génétique de la levure a été pionnière dans cette approche avec l'utilisation de protéines chimères où la région terminale des histones était juxtaposée à une protéine capable d'être tracée dans la cellule (Mosammaparast, Jackson et al. 2001). Dans ces conditions, il a été possible d'établir un lien entre la localisation cellulaire du traceur et la région terminale des histones (Mosammaparast, Jackson et al. 2001; Mosammaparast, Ewart et al. 2002; Mosammaparast, Guo et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). Si les résultats obtenus sont sans ambiguïté quant à l'implication de la séquence ajoutée au traceur dans son accumulation dans un compartiment cellulaire, il est peut-être inapproprié d'en conclure une fonction d'une séquence dans l'histone et/ou les complexes d'histones.

De l'ensemble de ces travaux il ressort que les régions terminales des histones présentent des fonctions cellulaires importantes qui pourraient se manifester dans différentes activités nucléaires. En effet, si les séquences de ces régions d'histones révèlent une aptitude à transférer des protéines qui les portent dans le noyau, un nombre grandissant d'études montrent aussi que ces régions sont le siège de modifications post-traductionnelles qui présentent des implications dans les activités de la chromatine (Kouzarides 2007). Dans le but d'avoir une meilleure compréhension de la fonction des régions terminales des histones dans la réplication, nous avons mis à profit notre stratégie d'incorporation d'histones exogènes dans *Physarum*. Nous avons précédemment fait la démonstration que nous étions, avec ce modèle, capable d'appréhender les mécanismes d'assemblage en chromatine couplé à la réplication. Par conséquent, c'est donc dans ce processus cellulaire que notre attention s'est focalisée. Pour cela, nous avons dans un premier temps généré des mutants des histones H3 et H4 dans lesquels les régions terminales ont été supprimées. Parce que notre méthodologie implique l'expression des protéines individuelles dans des bactéries, il nous a été possible par de simples combinaisons de purifier des complexes des histones H3/H4 dans lesquels l'une et/ou l'autre des régions terminales de ces histones avaient été retirées (**Figure 5**).

Avant d'examiner l'influence des régions terminales des histones H3 et H4 dans la compartimentation cellulaire, il nous a semblé important de vérifier que les différents complexes préparés puissent être fonctionnels. Pour cela nous avons effectué des reconstitutions *in vitro* de nucléosomes par la méthode de dialyse en utilisant le gène 5S de Xénope. la méthode consiste par des dialyses successives à diminuer graduellement la concentration en sel, de sorte que les histones viennent s'associer sur l'ADN par des étapes qui pourraient rappeler celles utilisées par la cellule. Ainsi, les histones H3/H4 sont dans une première étape associées au fragment d'ADN, puis viennent s'ajouter les histones H2A/H2B. De cette façon les nucléosomes formés présentent toutes les caractéristiques structurales d'un *bina fide* nucléosome. Dans nos expériences les nucléosomes issus de la reconstitution de nos différents complexes mutants sont ensuite analysés dans un gel de nucléoprotéine où l'ADN associé aux histones présente une migration différente de l'ADN nu (**Figure 5**).



Purification des différents complexes H3/H4



Reconstitution de nucléosomes *in vitro*

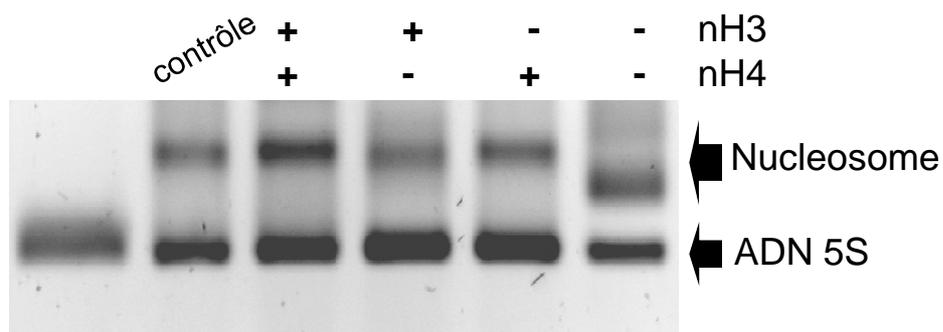


Figure 5 : Les histones H3 et H4 privées des régions N-terminales sont capables d'être purifiées sous forme de complexes et d'être reconstituées en nucléosomes *in vitro*.

Les mutants d'histones H3 et H4 dépourvus de leurs parties N-terminales sont préparés. Les complexes H3/H4 privés de l'une et/ou de l'autre partie N-terminale sont purifiés. La fonctionnalité des complexes est évaluée *in vitro* par reconstitution de nucléosome.

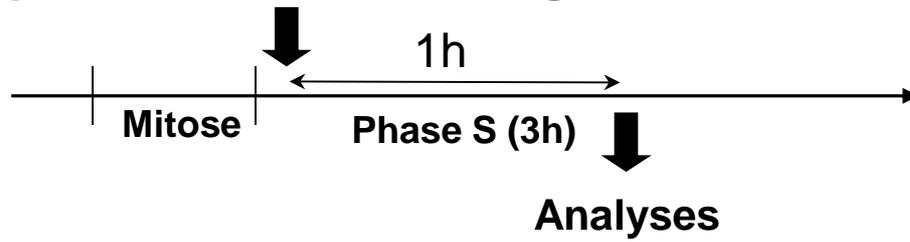
Clairement, nous pouvons voir après coloration de l'ADN de notre gel la présence d'une bande ayant la même migration électrophorétique que l'ADN 5S utilisé dans nos reconstitutions. Par ailleurs, dans les pistes où des histones ont été ajoutées à l'ADN, on note l'existence d'une seconde bande avec une migration retardée par rapport au gène 5S. Alors que tous les complexes des histones H3/H4 que nous avons purifiés à partir des histones bactériennes sont capables de former des complexes nucléoprotéiques, on remarque cependant quelques variations dans la migration. Ainsi, le complexe H3/H4 présentant une étiquette révèle une migration très proche des complexes formés à partir d'histones d'érythrocytes de poulet. Par contre les complexes formés à partir des histones où une des queues a été supprimée montrent une migration légèrement plus rapide que les précédents. L'augmentation de la rapidité de migration est même accentuée dans le cas du complexe où les deux régions terminales de H3 et H4 ont été retirées. Il semble donc que nos différents complexes des histones H3/H4 sont capables de former des nucléosomes *in vitro*, mais que la migration électrophorétique des nucléosomes est affectée par l'absence de l'une et/ou l'autre des queues des histones H3/H4. Nos résultats sont parfaitement concordants avec les analyses électrophorétiques effectuées par d'autres groupes (Vitolo, Thiriet et al. 2000).

Après avoir vérifié que les complexes de H3/H4 sont capables de s'associer à l'ADN en nucléosome, nous avons voulu examiner la fonctionnalité des différents complexes H3/H4 *in vivo*. Pour cela nous nous sommes en premier lieu attachés à vérifier leur aptitude à être transportés dans le noyau.

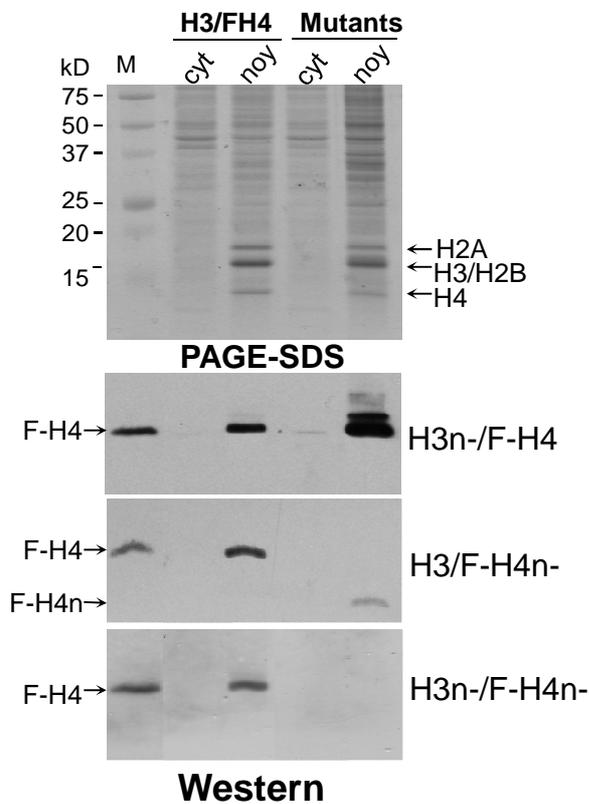
Des fragments de macroplasmodes sont alors traités en début de phase S avec les différents complexes d'histones que nous avons préparés. Afin de pouvoir obtenir une estimation quantitative de l'efficacité de transport des complexes d'histones, nous avons, pour chaque complexe des histones H3/H4, incorporé comme contrôle positif la même quantité d'histones dont les queues étaient présentes. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué, afin de pouvoir suivre précisément les histones exogènes dans *Physarum*, les différents complexes purifiés présentent une étiquette en position amino-terminale de l'histone H4. Après une heure d'incorporation dans les fragments de *Physarum*, les cellules sont récoltées et subissent un fractionnement. Les différentes fractions cytoplasmiques et nucléaires sont ensuite résolues en PAGE-SDS et analysées en Western blot (**figure 6**). Alors que les colorations des gels ne présentent aucune variation dans les profils électrophorétiques tant dans les fractions cytoplasmiques que nucléaires, les analyses en

Western blot révèlent des différences notables. En effet, on observe que le complexe qui ne présente que la queue de H4 présente une efficacité d'incorporation dans le noyau nettement supérieure à celle de notre contrôle dans la période de notre expérience. Au contraire, les complexes dans lesquels la région terminale de H4 a été supprimée révèlent une diminution de l'accumulation des histones exogènes dans la fraction nucléaire, voire une complète absence lorsque les deux régions terminales des histones H3 et H4 ont été supprimées. Il semble donc que le passage du cytoplasme au compartiment nucléaire nécessite la présence de la région terminale de H4. Toutefois, même si on note une certaine redondance dans la fonction des queues de H3 et H4, il semblerait que la queue de H4 soit prépondérante car son absence seule ne permet pas une complète compensation par la queue de H3 alors que dans le cas inverse (absence de la queue de H3 et présence de celle de H4) on observe une accumulation nucléaire plus forte que dans le cas des histones entières.

Incorporation des histones exogènes



fractionnement cellulaire



Etude de la stabilité du complexe H3n-/F-H4 dans le noyau au cours de la phase S

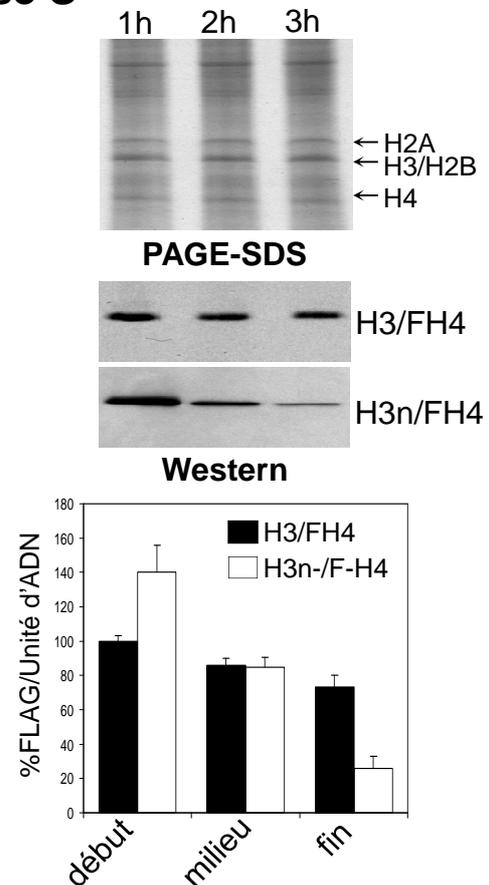


Figure 6 : Les régions N-terminales des histones H3 et H4 ont des fonctions distinctes dans le transport des histones dans le noyau.

Les complexes amputés des régions N-terminales de H3 et/ou de H4 ainsi que le contrôle H3/F-H4 sont incorporés dans *Physarum* en début de phase S suivis par fractionnement cellulaire et une analyse en PAGE-SDS et en Western blot. Des analyses similaires sont effectuées pour évaluer la stabilité du complexe privé de la région N-terminale de H3 en récoltant les fragments de macroplasmode après 1 h, 2 h et 3 h d'incorporation pendant la phase S.

Ce dernier constat sur l'efficacité de transport dans le noyau des histones H3/H4 privées de la région terminale de H3 était quelque peu déconcertant par rapport à ce que les études de génétique de la levure pouvaient nous apprendre. En effet, dans ces dernières analyses il a été montré que les régions terminales de H3 et H4 présentent dans leur séquence des NLS (signaux de localisation nucléaire) et que l'absence d'une des deux queues était compensée par l'autre (Ling, Harkness et al. 1996; Mosammaparast, Guo et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). Afin de mieux comprendre l'accumulation nucléaire que nous observions dans nos expériences chez *Physarum*, nous avons examiné la stabilité dans le noyau du complexe H3/H4 privé de la région terminale de H3. Pour cela, nous avons comme précédemment incorporé les histones dans des fragments de macroplasmodes de *Physarum* en utilisant une fois encore le complexe présentant les deux régions terminales comme contrôle. Seulement, contrairement à nos expériences antérieures, les fragments cellulaires ont été récoltés toutes les heures sur toute la durée de la phase S. De fait, nous avons prélevé nos échantillons après 1 h, 2 h et 3 h d'incorporation, respectivement. Nous avons fractionné les cellules et examiné en PAGE-SDS et en Western blot les fractions nucléaires (**figure 6**). De façon surprenante, les analyses des fragments prélevés 1h après l'incorporation des complexes dans *Physarum* montrent que les histones H3/H4 privées de la région terminale de H3 s'accumulent dans le noyau avec une efficacité presque 50% supérieure à celle du complexe entier. Par contre après 2 h et 3 h d'incorporation on voit nettement une diminution de la quantité d'histones exogènes dans les noyaux des cellules traitées avec le complexe mutant, alors que la quantité de notre complexe contrôle ne présente que des variations mineures qui s'expliquent par la réplication du matériel génétique. Par conséquent, si l'absence de la queue de H3 dans la cellule n'interfère pas sur la localisation nucléaire du complexe, nos résultats montrent que sa stabilité dans le noyau est clairement écourtée. Cette observation semble conforter des études qui ont montré la présence d'histones H3 privées de la région terminale dans le noyau chez *Tetrahymena* et qui récemment ont révélé que cette coupure de la queue pourrait avoir une fonction dans la dégradation des histones (Allis, Bowen et al. 1980; Duncan, Muratore-Schroeder et al. 2008).

II.2 Effets de la position des queues des histones H3 et H4 dans le transport des histones au noyau

Notre précédente étude montre que les régions des histones sont importantes, voire présente une redondance partielle, dans le transport des complexes des histones H3/H4 dans le noyau. Afin d'aller plus avant dans la compréhension de la fonction des régions terminales dans l'import nucléaire des histones, nous avons voulu savoir si la position de ces mêmes régions terminales était déterminante dans leur transport dans le noyau.

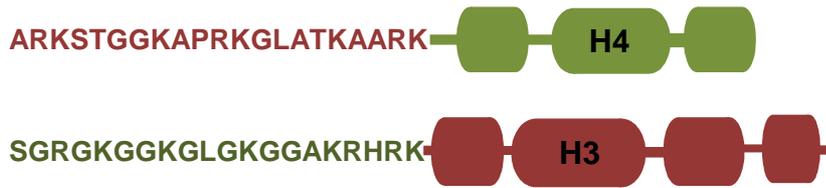
Les études chez la levure ont montré que les régions terminales des histones sont capables d'induire une accumulation nucléaire des protéines auxquelles elles sont associées. En effet, la construction de protéines chimères constituées d'une moitié GFP combinée à une queue d'histone révèle une localisation de la fluorescence dans le noyau des cellules (Mosammaparast, Jackson et al. 2001; Mosammaparast, Ewart et al. 2002; Mosammaparast, Guo et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). Ces résultats semblent en accord avec nos études chez *Physarum* puisque la perte des deux régions terminales sur le complexe H3/H4 ne permet pas la détection de protéines exogènes dans la fraction nucléaire. Toutefois, contrairement aux travaux chez la levure, nos analyses sont effectuées avec des complexes d'histones. Il nous a semblé important de vérifier si les seules régions terminales étaient impliquées dans le transport des histones H3/H4 vers le noyau ou alors si cette fonction des queues nécessitait la présence d'une région globulaire définie.

Pour répondre à ce questionnement, nous avons construit de nouveaux mutants d'histones dans lesquels la région terminale de l'histone était remplacée par celle de son partenaire. Par ces échanges, nous avons exprimé des histones chimères où la région globulaire de H3 est associée à la région terminale de H4 et inversement, la région globulaire de H4 est associée à la région terminale de H3 (**figure 7**). Ces mutants d'histones ont ensuite été purifiés avec leur partenaire désigné par la région globulaire de l'histone. En effet, les études structurales des complexes d'histones ont montré que les interactions protéine-protéine dans les hétérocomplexes sont dictées par les hélices confinées dans la région définie comme globulaire de l'histone. Ces interactions se font par l'enchevêtrement des trois hélices disposées en 'U' d'une histone avec les trois hélices de l'histone partenaire qui présente la même disposition. Cet entrelacement des histones

désigné ‘en poignée de main’ présente une grande stabilité et n’intéresse pas les régions non structurées que représentent les queues des histones (Arents, Burlingame et al. 1991; Luger, Mader et al. 1997). Ainsi, il nous a été possible avec ces deux nouveaux mutants des histones H3 et H4 de former différents complexes qui correspondent à différentes combinaisons des régions terminales, comme le montre le tableau ci-dessous.

	H3-(NH4)	H4-(NH3)
H3		H3/H4-(NH3) ²
H4	H4/H3-(NH4) ²	
H3n-		H3n-/H4-(NH3)
H4n-	H3-(NH4)/H4n-	
H3-(NH4)		H3-(NH4)/H4-(NH3)

Comme nous l’avons déjà évoqué, nos expériences chez *Physarum* nécessitent la présence d’une étiquette sur les complexes d’histones. Toutefois, malgré nos tentatives, nous n’avons pas été en mesure de produire des histones avec l’étiquette Flag sur la région terminale de H3. Par conséquent, les complexes d’histones privés de région terminale de H4 présenteront une étiquette (HA) sur la région C-terminale de l’histone H3.



Histones	H3-(NH4)	H4-(NH3)
H3		H3/H4-NH3 (A)
H4	H4/H3-NH4 (B)	
H3n-		H3n-/H4-(NH3) (C)
H4n-	H4n-/ H3-(NH4) (D)	
H3-(NH4)		H3-(NH4)/H4-(NH3) (E)

Purification des différents complexes H3/H4

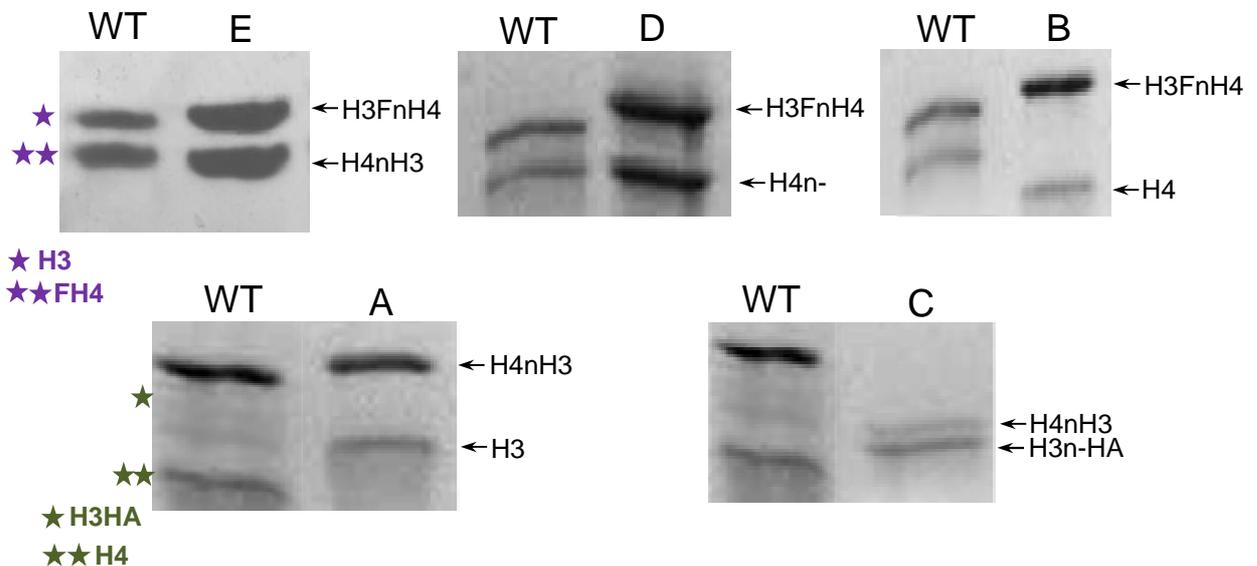


Figure 7 : La position des queues de H3 et H4 n'affecte pas la purification des complexes d'histones.

Les complexes H3/H4 échangés de l'une et/ou l'autre partie N-terminale sont purifiés sous forme de complexes H3/H4.

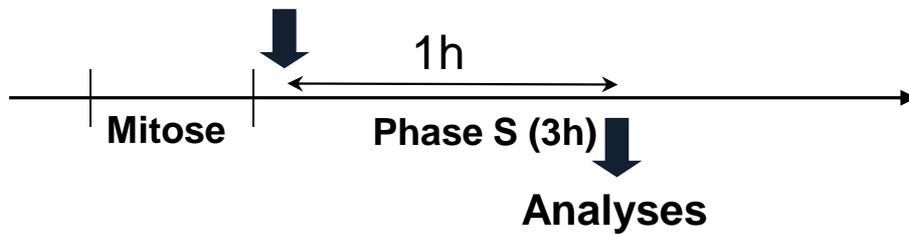
Différents travaux ont montré que la formation des nucléosomes *in vitro* n'est pas influencée par les régions terminales des histones mais seulement par la formation d'hétérocomplexes par association des régions globulaires des histones partenaires (Lee, Hayes et al. 1993; Tse and Hansen 1997; Vitolo, Thiriet et al. 2000). Aussi, nos études des mutants privés de région terminale montre bien que la délétion de l'une et/ou de l'autre des queues N-terminales des histones H3 et H4 n'affecte en rien la reconstitution de nucléosome *in vitro*. On peut donc assumer que la présence des queues à des positions différentes dans les hétérocomplexes H3/H4 n'interfère pas avec les complexes nucléoprotéines. Nous avons voulu alors examiner si la cellule était en mesure de les transporter dans le noyau. Pour cela, comme précédemment, nous avons déposé à la surface de fragments de macroplasmodes de *Physarum* un tampon dans lequel avait été ajouté le complexe d'histones d'intérêt. Une fois encore pour pouvoir comparer les résultats issus des différents complexes, nous avons utilisé comme contrôle le complexe exogène formé des histones canoniques H3 et H4. De façon similaire aux expériences qui ont permis de déterminer la fonction des queues de H3 et H4 dans le transport nucléaire pendant la phase S, les fragments de macroplasmodes sont récoltés 1 h après l'incorporation des histones exogènes pour être fractionnés en fractions cytoplasmiques et en fractions nucléaires (**figure 8**).

Les différentes fractions cellulaires ont été analysées en PAGE-SDS et Western blot (**figure 8**). Conformément aux expériences précédentes, les profils électrophorétiques des fractions ne présentent pas de différences notables quel que soit le complexe d'histones étudié. Ceci laisse présager que nos expériences d'incorporation ne perturbent pas la cellule de façon appréciable. Il faut peut-être rappeler que les histones que nous incorporons dans les fragments de macroplasmodes de *Physarum* ne sont présentes que sous forme de traces dans la cellule, et qu'à ces quantités, les compétitions entre les protéines exogènes et les protéines endogènes ne sont pas suffisantes pour induire un phénotype. En effet, nous estimons que la quantité d'histones exogènes dans nos expériences représente environ 1/2000^e de la quantité des histones endogènes. Si nos analyses ne visent pas à mettre en évidence un phénotype en altérant le métabolisme de la cellule, il faut noter que cette démarche n'est pas suscitée par des limitations de notre méthodologie qui utilise *Physarum*. Il a effectivement été montré qu'en incorporant suffisamment d'histones exogènes dans le macroplasmode, on peut observer un phénotype qu'il est possible d'analyser. Ainsi, lors d'études de la différence des sous-types de

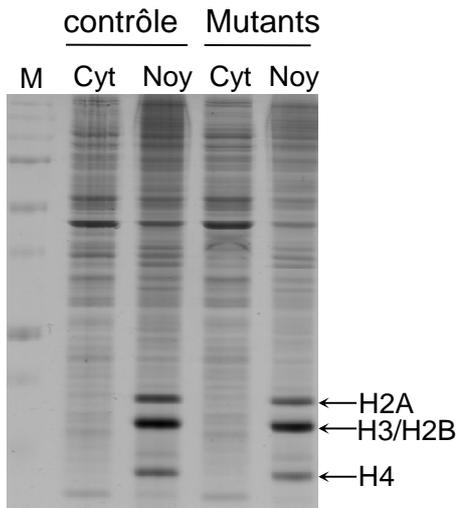
l'histone linker, l'incorporation d'histone en quantité proche de la quantité d'histone endogène a permis de mettre en évidence des défauts de croissance et une altération de la transcription (Thiriet and Hayes 2001).

Cependant, si les changements dans les profils électrophorétiques sont indécélables, les analyses en Western blot des histones exogènes montrent des changements notables de l'efficacité du transport nucléaire des différents complexes. En effet, lorsque les deux queues des histones H3 et H4 sont échangées, l'intensité du signal de l'étiquette révélée par chimiluminescence est proche de celle du complexe exogène contrôle (**figure 8**). Cette similitude entre les signaux suggère que la position des régions terminales des histones dans les complexes H3/H4 ne présente pas une importance qui pourrait affecter le transport des histones dans le noyau. Deux hypothèses peuvent être émises pour rendre compte de nos observations. En raison de cette nouvelle configuration des régions terminales et des régions globulaires, on peut supposer que les facteurs impliqués dans le transport des histones dans le noyau ne reconnaissent que les régions terminales ; ou encore, les facteurs qui interagissent avec les régions terminales et ceux qui interagissent avec les régions globulaires ne sont pas affectés par les échanges. Cette dernière possibilité suppose que les facteurs hypothétiques ne présentent pas de fortes interactions entre eux.

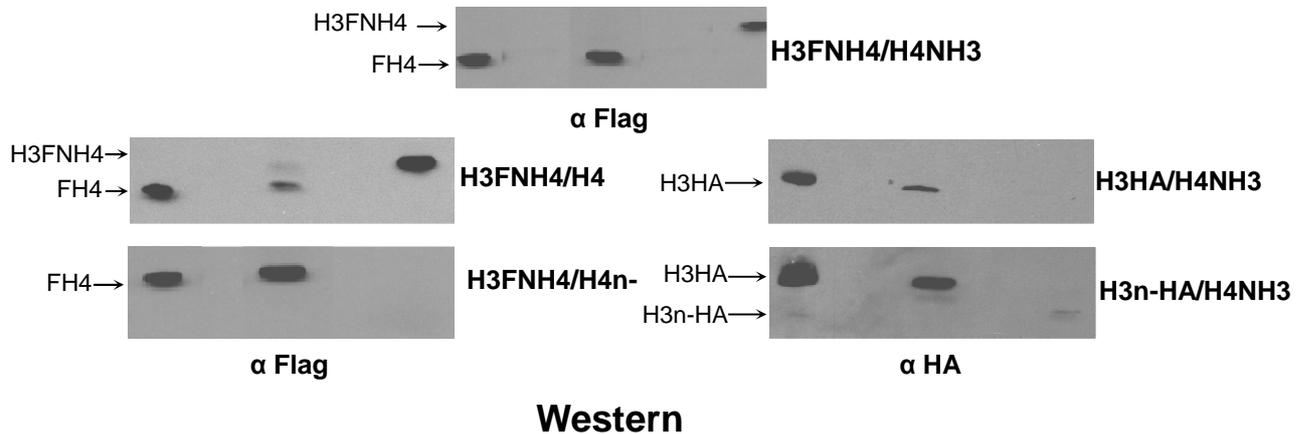
Incorporation des histones exogènes



fractionnement cellulaire



PAGE-SDS



Western

Figure 8 : Effet de la position des régions terminales de H3 et H4 dans le transport nucléaire

Les complexes de H3 et H4 présentant des positions ectopiques de leurs régions terminales sont incorporés dans *Physarum* en début de phase S. Les fractions cellulaires sont analysées en PAGE-SDS et en Western blot. Les étiquettes des complexes sont détectées avec des anticorps monoclonaux spécifiques des séquences Flag (α Flag) et HA (α HA) respectivement.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance des histones par les facteurs qui sont impliqués dans le transport du complexe H3/H4, nous avons examiné l'incorporation des complexes présentant deux régions terminales de H4 dans H3/H4 et un autre complexe présentant une seule queue de H4 placée sur la région globulaire de H3. De façon inattendue, les deux complexes présentent des comportements opposés quant à leur aptitude à être transportés dans le noyau (**figure 8**). En effet, alors que le complexe qui présente deux queues de H4 révèle une meilleure efficacité d'accumulation nucléaire que le contrôle, le complexe où la queue de H4 est en position ectopique n'est pas détecté dans la fraction nucléaire. Si les résultats obtenus sont sans ambiguïté, leur interprétation biologique n'est pas aussi évidente. Toutefois, il semble raisonnable de penser que les différences d'accumulation dans le noyau des complexes jusqu'alors analysés (H3-(NH4)/H4-(NH3) ; H3-(NH4)/H4 et H3-(NH4)/H4n-) sont associées à des changements dans les complexes. Par conséquent, étant donné que l'histone chimère H3-(NH4) est présente dans tous les complexes, il semblerait que son rôle dans le transport des complexes ne soit pas prépondérant. Par contre, si maintenant on examine les partenaires de l'histone H3-(NH4) dans les différents complexes analysés on remarque clairement que la queue portée par le partenaire affecte le transport nucléaire. Ainsi, on note une graduation dans l'efficacité du transport en fonction de la queue portée par la région globulaire de H4, où NH4 surpasse NH3, mais qu'il faut néanmoins une queue pour que le processus biologique se produise. Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus dans les expériences de délétion des régions terminales des histones, où nous avons observé un rôle critique de la queue de H4 dans le transport des complexes au noyau.

Des expériences ont également été menées pour examiner cette fois des changements sur la région globulaire de H3. Une fois encore les résultats montrent des différences notables de l'accumulation des complexes dans la fraction nucléaire en fonction de la région terminale portée par la région globulaire de H3 (**figure 8**). Ainsi, en suivant le même raisonnement que pour la région globulaire de H4 précédemment décrit, on voit que le cas de la région globulaire de H3 ne répond pas aux mêmes règles que H4. En effet, on remarque que si on a une fois encore une graduation de l'efficacité de transport des complexes dans le noyau, celle-ci ne dépend pas de la région terminale de H3. En effet, le complexe qui présente la queue de H3 sur sa région globulaire n'est pas

déecté dans le noyau alors qu'en son absence et en son remplacement par la queue de H4, les complexes sont transportés dans le noyau.

De nos expériences tant de suppression de la région terminale de H3 et H4 que des échanges des queues des histones, nous avons montré que les parties non structurées des histones H3 et H4 ne sont pas équivalentes dans la fonction de transport des complexes d'histones. Il ressort de nos analyses que la région terminale de H4 est prépondérante dans le transport des histones puisque des complexes où cette région est absente présentent une inhibition du transport et qu'un doublon de cette même séquence facilite l'import nucléaire. Au contraire de cette fonction activatrice de la région terminale de H4 dans le passage des complexes du cytoplasme au compartiment nucléaire, on a montré que la région terminale de H3 présente une fonction antagoniste à celle de H4. En effet, en l'absence de la queue de H3, nous notons une relative accentuation du transport des complexes dans le noyau et la présence de la région terminale de H3 diminue notablement l'accumulation des complexes dans le noyau. Néanmoins, penser que les seules régions terminales des histones sont impliquées dans le transport des complexes dans le noyau est sans nul doute erroné. En effet, si cette fonction de transport des histones ne tenait qu'aux queues des histones, la présence des complexes dans la fraction nucléaire ne tiendrait qu'en la présence et l'absence de ces régions. Or, nous avons vu dans les expériences d'échanges des queues que le complexe composé de H3-(NH4)/H4n- n'était pas transféré dans le noyau en dépit de la présence de la région terminale de H4 sur la région globulaire de H3. Par conséquent, il est raisonnable de penser que les facteurs impliqués dans le transport des histones puissent aussi interagir avec la région structurée du complexe. Dans ce système, les interactions entre les différents facteurs pourraient être coopératives de telle sorte que les échanges des deux queues de H3 et H4 puissent conduire à une compensation.

Si la fonction des régions terminales des histones dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau est complexe. il est clair, comme le montrent nos expériences, que ces deux queues ne sont pas redondantes comme le suggéraient les études de génétique chez la levure (Ling, Harkness et al. 1996). En effet, l'absence de l'une ou l'autre des deux queues ne conduit pas à des transports similaires des complexes, mais au contraire à des accumulations opposées dans le noyau. De plus, nos expériences révèlent que les seules queues des histones ne sont pas responsables du transport des histones dans le noyau, même s'il semblerait que la région terminale de H4 ait un rôle prépondérant dans ce processus. Par conséquent, examiner la fonction des régions terminales des histones sur la

base de la localisation cellulaire de protéines chimères composées d'une moitié GFP associée à une des queues d'histone est probablement simpliste pour rendre compte du phénomène biologique. De façon intéressante, on a été en mesure de montrer que la queue de H4 avait une fonction activatrice dans le transport vers le noyau, alors qu'au contraire la région terminale de H3 avait une fonction répressive. Ces fonctions opposées, qui doivent aboutir au transport des histones dans le noyau pendant la phase S, laissent présager d'un mécanisme hautement régulé. Cette régulation est probablement en relation avec la réplication du matériel génétique puisque son inhibition par une drogue implique un arrêt de l'importation des histones H3/H4 dans le noyau.

II.3 Les modifications répliation-dépendantes de H4 jouent un rôle important dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau

Nos différentes expériences visant à déterminer la fonction des régions terminales des histones H3 et H4 montrent que la queue de chacune des histones n'est pas équivalente dans le transport des histones vers le noyau pendant la phase S du cycle cellulaire chez *Physarum*. Toutefois, il ressort de nos résultats que la queue de H4 joue un rôle prépondérant dans ce processus. Aussi, afin d'aller plus avant dans la compréhension du rôle de la queue de H4 dans la prise en charge des complexes H3/H4 qui conduit à la délocalisation des histones du cytoplasme vers le noyau en coordination avec la répliation du matériel génétique, nous avons entrepris une analyse détaillée de la région terminale de H4.

De façon très intéressante, il a été montré, dans l'ensemble du règne eucaryote que les régions terminales des histones présentent des modifications post-traductionnelles pendant la phase S du cycle cellulaire (van Holde 1989). Les analyses de ces modifications ont permis de montrer qu'elles consistaient en l'ajout de groupements acétyl sur des résidus lysine. Cette réaction bien décrite dans la littérature sous le nom d'acétylation des histones est une réaction enzymatique dont le nom générique de la famille d'enzymes responsable de la modification est Histone Acétyl-Transférase (HAT). Il est maintenant bien connu que cette modification est réversible sous l'activation d'enzymes antagonistes aux HAT, les Histones DeAcétylases (HDAC). Depuis la mise en évidence de cette modification des histones par Allfrey et collaborateurs dans les années 60 (Allfrey, Faulkner et al. 1964), d'innombrables études se sont attachées à en comprendre la signification biologique (Cheung, Allis et al. 2000). Il en ressort que l'acétylation des histones intervient dans toutes les activités de la chromatine. Néanmoins, on peut dès à présent pointer une différence indéniable dans les acétylations des histones en distinguant les acétylations qui intéressent la chromatine, de celles qui touchent les histones avant même leur association à l'ADN. Dans notre travail c'est cette dernière acétylation qui a retenu notre attention.

Il a été clairement montré par les groupes de Allis et de Annunziato que les histones H3 et H4 nouvellement synthétisées sont acétylées (Annunziato and Seale 1983; Allis, Chicoine et al. 1985; Chicoine, Richman et al. 1987; Sobel, Cook et al. 1995; Chang, Loranger et al. 1997; Benson, Gu et al. 2006). Toutefois, si les modifications sont présentes sur les deux régions terminales des histones pendant la phase S, il ressort de ces études que seule l'histone H4 présente un profil d'acétylation conservé au cours de l'évolution. En effet, alors que les marques d'acétylations présentent des variations dans les résidus de H3 modifiés, dans les cas de l'histone H4, l'acétylation intéresse exclusivement les résidus lysine en position 5 et 12 de la région terminale de l'histone (Chang, Loranger et al. 1997; Annunziato and Hansen 2000). De fait, aux regards de nos résultats montrant l'importance de la région terminale de H4 dans le transport nucléaire des complexes H3/H4 et de nos connaissances de la conservation des marques d'acétylation de H4 nouvellement synthétisée, nous avons voulu questionner l'importance de l'acétylation des résidus lysine de la queue de H4 dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau.

Bien que la spécificité des sites d'acétylation de H4 associée à la réplication soit bien établie, nous avons dans un premier temps voulu examiner si la fonction, que la modification pouvait avoir dans l'import nucléaire des histones, tenait effectivement à la spécificité des résidus modifiés. Pour cela, nous avons généré deux nouveaux mutants de l'histone H4, un premier mutant où les 4 résidus lysine acétylables ont été substitués par des résidus glutamine (Q) et un second où ces mêmes lysines sont substituées par des résidus arginine (R) (**figure 9A**). Le choix de ces substitutions a été motivé par les homologues de structure et de charge des résidus glutamine et arginine par rapport au résidu lysine et à l'acétyl-lysine, mais aussi par le fait que ces résidus de substitution ne sont pas modifiés. Ainsi, on utilise l'arginine pour mimer la lysine et la glutamine pour mimer l'acétyl-lysine. Il est entendu que par ces mutations, les protéines mutées portent des mimes de l'absence de modification et de la présence de la modification, et que ces mimes ne sont pas parfaitement identiques à la protéine modifiée. Néanmoins, il a été montré *in vitro* que ces mimes reflètent de façon fidèle des comportements des acétylations. En effet, des analyses de l'aptitude d'un oligo-nucléosome à se replier révèlent les mêmes défauts de compaction en présence d'histones acétylées et en présence d'un mutant d'histone portant des substitutions arginine (Wang and Hayes 2008).

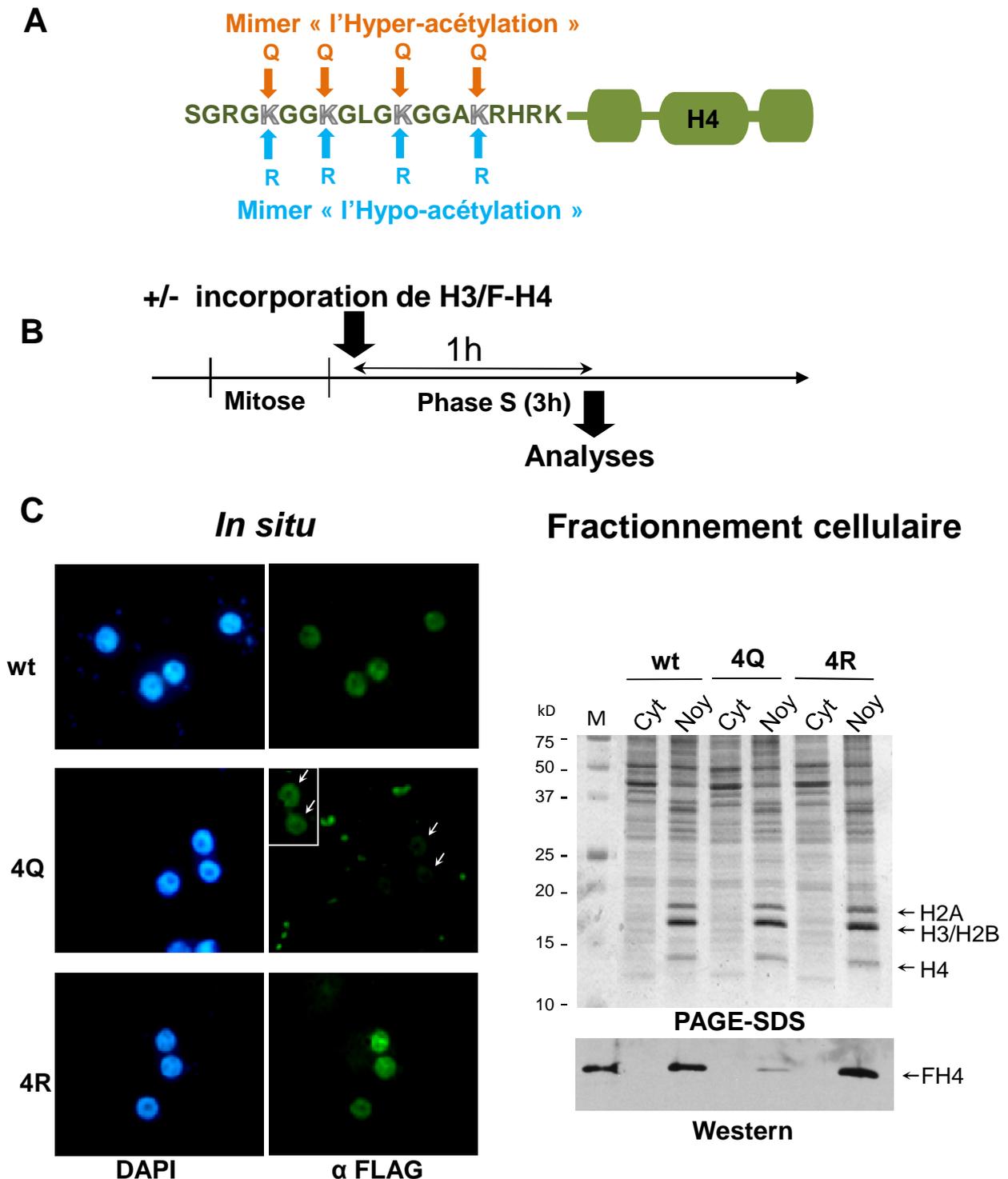
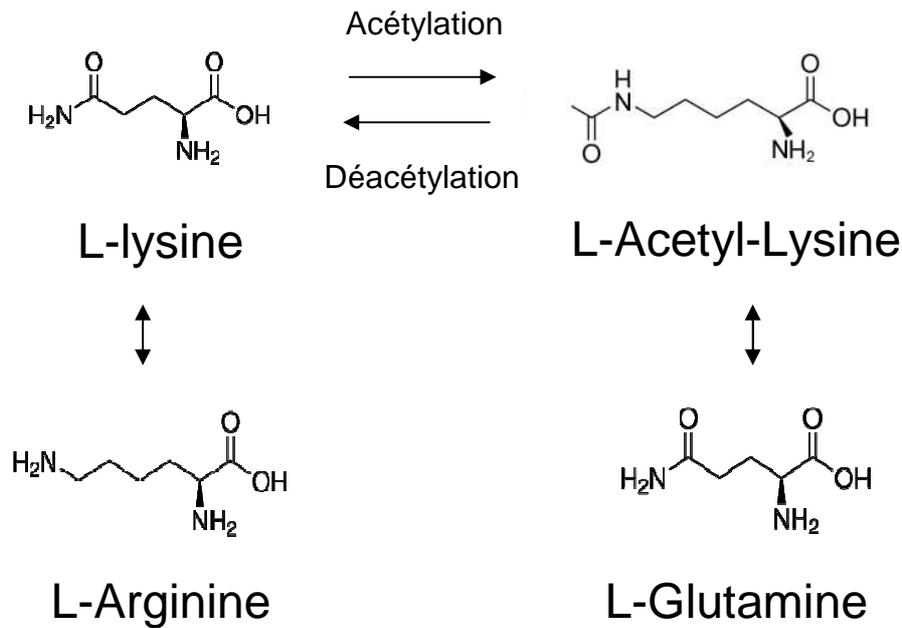


Figure 9 : Les mimes d'acétylation de la région N-terminale de H4 affecte le transport des histones dans le noyau.

A) Représentation des mutations de H4 visant à mimer l'acétylation (4Q) ou l'absence d'acétylation (4R). B) Représentation schématique du déroulé expérimental, les complexes H3/H4 sont incorporés dans *Physarum* en début de phase S. C) Analyse des fragments de macroplasmode par des techniques biochimiques et cytologiques. Les histones exogènes sont détectées avec l'anti-Flag (α FLAG).



Comme pour les autres mutants d’histones déjà étudiés, nous avons préparé les protéines sous forme de complexes. Ainsi, nous avons formé deux complexes H3/H4-4Q et H3/H4-4R qui miment respectivement l’hypoacétylation et l’hyperacétylation de H4. De plus, pour suivre les protéines dans les macroplasmodes de *Physarum*, les complexes présentent aussi une étiquette Flag à l’extrémité de la région terminale de H4. Pour analyser la fonctionnalité des différents complexes dans le transport nucléaire, les histones ont été déposées à la surface de fragments de macroplasmodes de *Physarum* en début de phase S et incorporées pendant 1 h (**figure 9B**). Les fragments cellulaires ont ensuite été analysés *in situ* et par fractionnement cellulaire (**figure 9C**). Pour ces différentes analyses nous avons utilisé comme contrôle positif de l’accumulation des histones exogènes dans le noyau des histones sauvages présentant une étiquette sur la partie terminale de la queue de H4 (H3/F-H4). Comme nous l’avons décrit antérieurement, les analyses au microscope à fluorescence d’étalements d’explants de *Physarum* traités avec le complexe H3/F-H4 révèlent une accumulation des histones dans le noyau. De façon inattendue, les analyses d’étalements d’explants de macroplasmodes dans lesquels le complexe mimant l’acétylation a été incorporé montrent des signaux fluorescents qui ponctuent le champ d’observation, mais qui ne co-localisent pas avec les noyaux colorés au DAPI. Toutefois, une surexposition du champ permet de mettre une évidence de signaux fluorescents dans le noyau. Par conséquent, bien que la quantification issue de nos observations

microscopiques ne puissent être qu'indicative, il semblerait que le complexe qui mime une hyperacétylation de l'histone H4 ne soit pas efficacement transporté au noyau. Dans les mêmes conditions, nous avons aussi fait l'analyse de fragments de macroplasmodes dans lesquels le complexe était composé de H3 et H4-4R, et donc où l'histone H4 ne pouvait être acétylée. Là encore les observations au microscope à fluorescence étaient quelque peu déconcertantes, car au contraire du mutant mimant l'acétylation, les histones exogènes se retrouvaient bien dans le noyau et la brillance des signaux de fluorescence dans les mêmes conditions d'exposition que les analyses précédentes semblait supérieure à celle du contrôle positif (**figure 9C**). Ces différentes observations *in situ* des complexes contenant des mutants de H4 révèlent que contrairement aux expectations l'acétylation de H4 inhiberait le transport dans le noyau alors qu'inversement l'absence de la modification favorise l'import nucléaire.

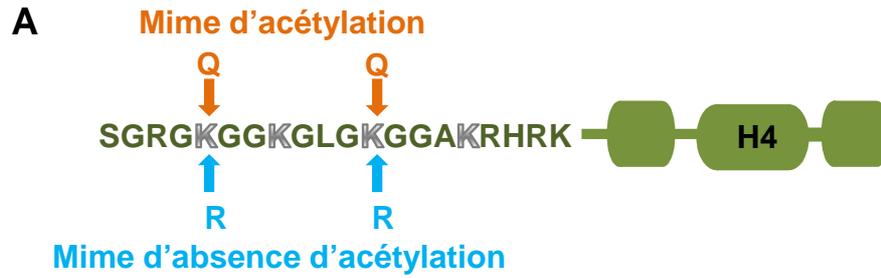
Pour s'assurer de la validité des résultats de microscopie, nous avons examiné la localisation cellulaire des complexes contenant les histones H4 par une approche biochimique de fractionnement cellulaire. Les fragments de macroplasmodes sont traités avec les différents complexes H3/H4 pendant la première heure de la phase S, récoltés, puis fractionnés pour séparer les fractions cytoplasmiques et nucléaires. Les différentes fractions sont ensuite analysées par PAGE-SDS et en Western blot. Les incorporations des différents complexes en quantités de traces ne nous permettent pas d'observer de différences dans les profils électrophorétiques des fractions issues des différents fragments de *Physarum*. Au contraire les analyses en Western blot permettent d'observer des différences dans la détection de l'étiquette des différents complexes incorporés (**figure 9C**). Alors que la présence de l'étiquette dans les différents complexes n'est détectée que dans les fractions nucléaires, on note des différences dans l'intensité des signaux. Ces différences reflètent des différences de quantité de protéines exogènes où le mutant qui mime l'absence d'acétylation est plus abondant que le complexe sauvage qui est lui-même plus abondant que le complexe qui mime l'acétylation. Ces résultats sont donc en accord avec les résultats des observations microscopiques. Toutefois, on remarque qu'au contraire des observations au microscope, nous ne détectons pas d'histones exogènes dans la fraction cytoplasmique provenant de fragments de macroplasmodes traités avec le complexe H3/H4-4Q. Cette différence entre les deux approches tient possiblement à la procédure expérimentale de fractionnement cellulaire au cours de laquelle

l'homogénéisation de la cellule est effectuée dans un volume important de tampon qui conduit à une dilution de la fraction cytoplasmique qui en résulte.

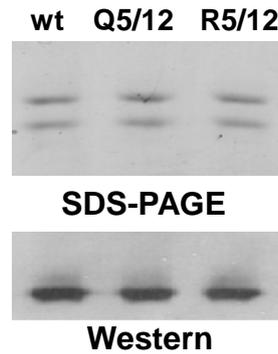
A première vue, les expériences d'incorporation de complexes d'histones présentant des mimes de l'acétylation et de l'absence d'acétylation de H4 suggèrent que l'acétylation aurait un effet négatif sur le transport des complexes H3/H4 dans le noyau. Néanmoins, cette interprétation des résultats peut être entachée d'erreurs occasionnées par l'expérimentation mise en œuvre. En effet, il faut rappeler que le profil d'acétylation de H4 associé à la réplication ne touche pas les 4 lysines acétylables, mais seulement celles en position 5 et 12. Il est possible que des mimes d'acétylation en position 8 et 16 aient un effet contraire à celui escompté pour les positions 5 et 12. Toutefois, si le nombre et/ou les positions des mimes d'acétylation ne permettent pas de tirer de conclusion claire quant à la fonction de la modification dans le transport nucléaire, on peut conclure que cette modification n'est pas indispensable pour que le transport nucléaire puisse se produire. Par conséquent, il semblerait que les marques d'acétylation de H4 pendant la réplication n'aient pas une fonction directe dans le transport. Ce constat soulève alors le questionnement de l'intérêt pour la cellule eucaryote de conserver une signature qui n'a vu aucune dérive au fil des millénaires que couvre le règne eucaryote dans l'arbre phylogénétique.

Afin de tenter d'appréhender le rôle de la diacétylation de l'histone H4 en positions 5 et 12 au cours de la réplication, nous avons construit de nouveaux mutants de l'histone H4. Comme pour les expériences précédentes, nous avons substitué des résidus lysines acétylables de H4 avec des mimes d'acétyl-lysines et de lysines non acétylables. Seulement cette fois-ci, au lieu de muter toutes les lysines, nous n'avons muté que celles qui sont impliquées dans la signature de réplication, c'est-à-dire les lysines en positions 5 et 12. De fait, les histones H4 ainsi générées sont dénommées H4-Q5/12 et H4-R5/12 qui, respectivement, mime la signature d'acétylation de la réplication et qui mime l'absence de cette signature (**figure 10A**). Comme le nécessite notre stratégie expérimentale d'analyse *in vivo*, les deux mutants présentent en leur extrémité amino-terminale une étiquette Flag qui est utilisée pour détecter le complexe exogène et le discriminer des protéines endogènes. Les histones mutantes sont exprimées dans des bactéries et purifiées sous forme de complexes en présence du partenaire, H3.

Les différents complexes des histones H3/H4 ont été incorporés dans des fragments de macroplasmodes au début de la phase S et les cellules sont remises en culture pendant 1 h avant d'être récoltées et analysées. Pour ces expériences, nous avons traité des fragments de macroplasmodes avec le complexe qui ne présente pas de mutation et qui sera utilisé comme contrôle positif. Les analyses en PAGE-SDS des fractions cytoplasmiques et nucléaires issues des différents fragments de macroplasmodes présentent des profils très similaires (**figure 10C**). Par contre les analyses en Western blot révèlent des différences dans les fractions nucléaires issues des macroplasmodes dans lesquels les différents mutants ont été incorporés. Clairement, on peut voir que même si pour les différents complexes, les quantités incorporées étaient équivalentes, les quantités retrouvées dans le noyau sont distinctes. En effet, en comparant l'intensité des signaux de chimiluminescence des blots, on note que le complexe qui porte le mime de la signature de réplication est plus intense que le contrôle qui est lui-même plus intense que le complexe non acétylable sur les résidus 5 et 12 de H4. Puisque l'intensité du signal est directement proportionnelle à la quantité de protéines, on peut donc conclure que les différents complexes sont transportés dans le noyau avec des efficacités différentes, où le complexe contenant le mime de l'acétylation en position 5 et 12 est le plus efficace et celui qui ne peut pas être acétylé sur ces positions est le moins.



B Purification et quantification des complexes



C Fractionnement cellulaire

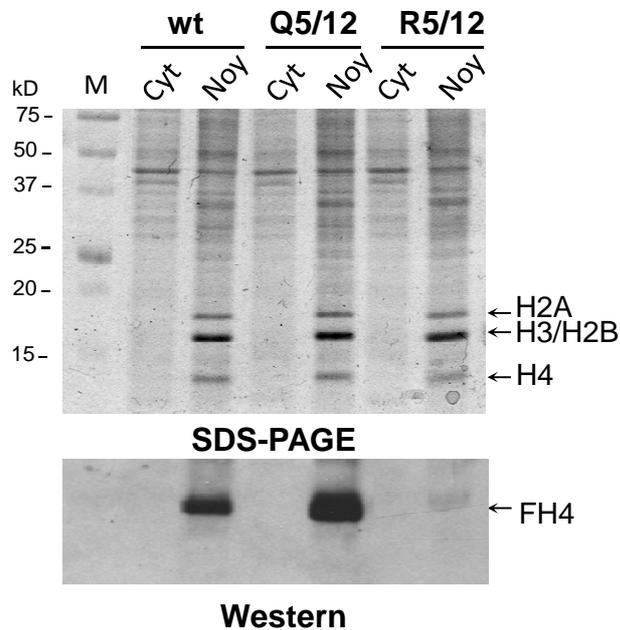


Figure 10: L'acétylation en position 5 et 12 facilite le transport des histones dans le noyau.

(A) Représentation des mutations de H4 visant à mimer l'acétylation (Q5/12) et l'absence d'acétylation (R5/12). B) Purification des différents complexes et quantification par Western blot. C) Analyse en PAGE-SDS et Western blot avec l'anti-Flag (α Flag) des différentes fractions cellulaires.

Alors que précédemment, nous avons montré que le mime d'acétylations sur les 4 positions acétylables de H4 avait un effet négatif sur le transport des complexes dans le noyau, nos résultats présents révèlent au contraire que la présence des mimes en positions 5 et 12 favorise l'import nucléaire des complexes. Une contradiction similaire, mais opposée, peut également être relevée dans les cas des mimes non-acétylables. Ces différentes données contradictoires quant à l'effet de l'acétylation sur le transport des histones H3/H4 dans le noyau exigent sans nul doute des expériences complémentaires pour comprendre leur signification biologique, mais également pour examiner dans les détails les informations de la littérature.

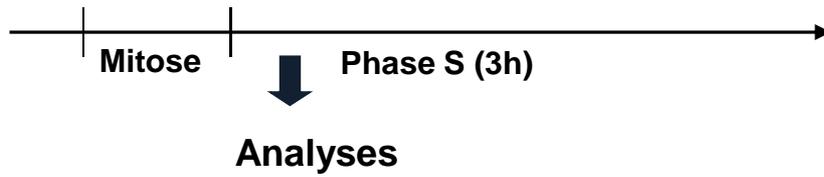
Nous savons par les travaux des groupes de Allis et de Annunziato que l'histone H4 présente une signature d'acétylation associée à la réplication (Sobel, Cook et al. 1995). Ces modifications, tout comme toutes les modifications des histones sont le résultat d'activités enzymatiques. Toutefois, contrairement aux autres marques d'acétylation des histones, celle qui intéresse la signature de la réplication n'intervient pas dans la chromatine, mais sur des histones qui ne sont pas assemblées en chromatine. De façon intrigante et contrairement aux acétylations des histones de la chromatine, l'acétylation des histones non assemblées en chromatine n'est catalysée que par une seule enzyme. Cette activité enzymatique est initialement isolée par le groupe de Sternglanz, par des approches génétiques de criblage d'une collection de mutants de levure thermo-sensibles (Kleff, Andrulis et al. 1995). Toutefois, la mutation du gène HAT1 responsable de cette activité ne présente aucun phénotype évident hormis l'absence de l'activité enzymatique. Parallèlement aux travaux de Sternglanz, le groupe de Gottschling entreprenait la purification biochimique de l'activité acetyltransférase de la fraction cytoplasmique de levure (Parthun, Widom et al. 1996). Ces travaux ont permis d'identifier une holoenzyme composée de deux sous-unités Hat1p et Hat2p capables non seulement d'acétyler l'histone H4, mais aussi de s'associer de façon stable à la queue de l'histone H4. Lors de cette étude de l'holoenzyme Hat1p/Hat2p issue de la levure, il a été montré que l'activité acetyltransférase est détenue dans la protéine Hat1p et que Hat2p serait une sous-unité régulatrice. L'analyse détaillée de cette dernière sous-unité révèle que Hat2p a une forte homologie avec une autre protéine régulatrice conservée et associée à des activités de la chromatine, Rbap48. Concernant l'activité catalytique de l'holoenzyme, il a été montré que l'enzyme issue de la levure acétylait l'histone H4 en position 12 uniquement alors que l'enzyme recombinante était capable d'acétyler non seulement la lysine 12 de H4, mais

aussi la lysine 5 de cette même histone. Cette nouvelle acétylation de la queue de H4 implique une acétylation aspécifique *in vitro* de l'histone H2A qui partage le même enchaînement des premiers acides aminés que H4. L'homologue de l'holoenzyme Hat1p/Hat2p de la levure a également été identifiée dans les cellules humaines sous la dénomination Hat1p/Rbap46 (Verreault, Kaufman et al. 1998). La conservation entre les holoenzymes de levure et humaine suggère alors une fonction importante dans la cellule. Toutefois, en dépit des efforts de plusieurs groupes de recherche, les analyses génétiques n'ont pu mettre en évidence que des fonctions qui ne compromettaient pas la viabilité cellulaire. Outre ces analyses fonctionnelles, le groupe de Ramakrishnan a entrepris une étude structurale de la sous-unité catalytique Hat1p de levure en résolvant sa structure cristalline (Dutnall, Tafrov et al. 1998). De cette étude il ressort que l'enzyme a une crypte où l'acétyl-coenzyme A vient se loger et une fissure qui court le long de l'enzyme où la région terminale de H4 pourrait se fixer. De façon fort intéressante, les auteurs notent le long de ce chenal accommodant la région terminale de H4, la présence de patches acides sur l'enzyme qui pourraient stabiliser le substrat en interagissant avec des résidus lysine de l'histone H4. Cette dernière hypothèse a été éprouvée *in vitro* avec des approches biochimiques par le groupe de Annunziato, qui, en utilisant des peptides synthétiques montre que si les résidus affectés par l'acétylation sont les lysines en positions 5 et 12, des modifications de la charge des lysines en positions 8 et 16 interfèrent avec l'activité catalytique de l'enzyme (Makowski, Dutnall et al. 2001; Benson, Phillips et al. 2007).

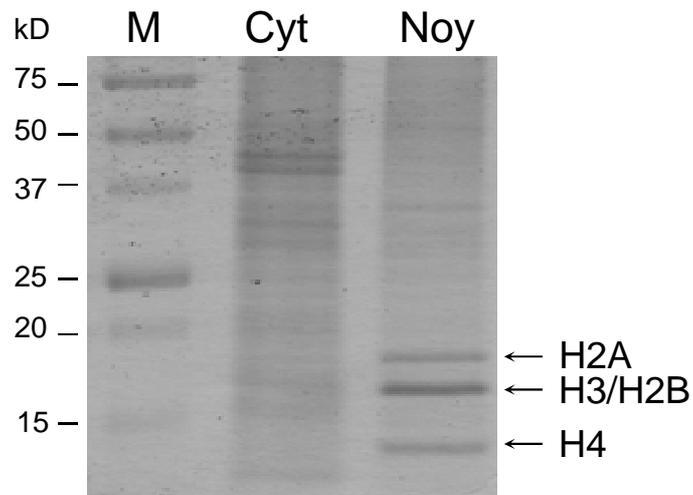
Clairement, il ressort de la littérature que l'enzyme Hat1 est non seulement responsable de la signature d'acétylation de H4 associée à la réplication, mais aussi qu'il existe une synergie entre l'enzyme et des résidus chargés présents sur la queue de H4, comme les résidus en positions 8 et 16. Alors que nos résultats d'incorporation des histones mutées sur les résidus acétylables de H4 ne nous permettaient pas de proposer un modèle qui pourrait rendre compte de la fonction directe de l'acétylation, nous nous sommes donc attachés à examiner la possible intervention de Hat1 dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau.

Dans un premier temps, il nous fallait déterminer s'il était possible d'identifier l'enzyme chez *Physarum*. Pour cela, nous avons assumé que la conservation de l'enzyme entre la levure et l'homme pourrait impliquer l'identification de l'enzyme chez *Physarum* par une approche immunochimique. Nous avons donc fractionné un macropasmode de *Physarum* en phase S de façon à séparer la fraction cytoplasmique et la fraction nucléaire

et analysé les fractions en PAGE-SDS et en Western blot (**figure 11**). A notre plus grande surprise, les analyses en Western blot permettaient de mettre en évidence une bande d'un poids moléculaire apparent proche de 50 kD conformément à celui de Hat1 de la levure et de l'homme, mais localisé principalement dans le compartiment nucléaire. Cette localisation nucléaire de Hat1 n'était toutefois pas exclusive du modèle *Physarum* puisque l'observation de la protéine de fusion Hat1-GFP dans les cellules humaines montre également une localisation dans le noyau (Verreault, Kaufman et al. 1998). Il semble donc que l'enzyme soit capable de passer d'une localisation cytoplasmique à une localisation nucléaire. Cette observation nous a amenée à poser l'hypothèse que Hat1 pourrait être directement impliquée dans le transport des complexes H3/H4 du cytoplasme vers le noyau.



Fractionnement cellulaire



SDS-PAGE



Western

Figure 11 : Localisation cellulaire de Hat1 chez *Physarum* .

Un macroplasmode de *Physarum* en phase S est fractionné pour séparer les fractions cytoplasmique et nucléaire. Les fractions sont analysées en PAGE-SDS et Western blot. La présence de Hat 1 dans les fractions est détectée avec l'anticorps anti-Hat1.

Pour tester l'hypothèse que Hat1 soit impliquée dans le transport des histones au noyau, nous avons voulu vérifier que Hat1 était capable de s'associer au complexe H3/H4 chez *Physarum*. Si l'implication de Hat1 dans le transport des histones dans le noyau suggère que le mécanisme est dynamique, le suivre *in vivo* nécessitera des périodes d'observation courtes. De fait, nous avons donc incorporé dans des macroplasmodes de *Physarum* des histones H3/H4 en début de phase S et analysé les fragments de cellule seulement 10 minutes après avoir déposé la solution de protéines sur la surface cellulaire (**figure 12**). Nous avons utilisé comme contrôle des fragments de macroplasmodes n'ayant pas reçu de protéines exogènes pour pouvoir évaluer la spécificité de nos analyses. Les analyses en PAGE-SDS et en Western blot des différentes fractions cytoplasmiques et nucléaires montrent qu'après seulement 10 minutes d'incorporation les histones exogènes sont retrouvées dans la fraction nucléaire. Le résultat conforte notre idée que le phénomène est très dynamique. Pour examiner l'association de Hat1 au complexe H3/H4, nous avons préparé à partir des fractions cytoplasmiques et nucléaires, les sous-fractions solubles des deux compartiments. Pour cela, nous avons débarrassé les fractions cytoplasmiques de ses organites et les fractions nucléaires de la chromatine. Afin de ne pas créer d'ambiguïté dans la dénomination de ces nouvelles fractions issues des fractions cytoplasmiques et nucléaires, nous appellerons ces différentes fractions solubles, fractions cytosoliques et nucléosoliques, respectivement.

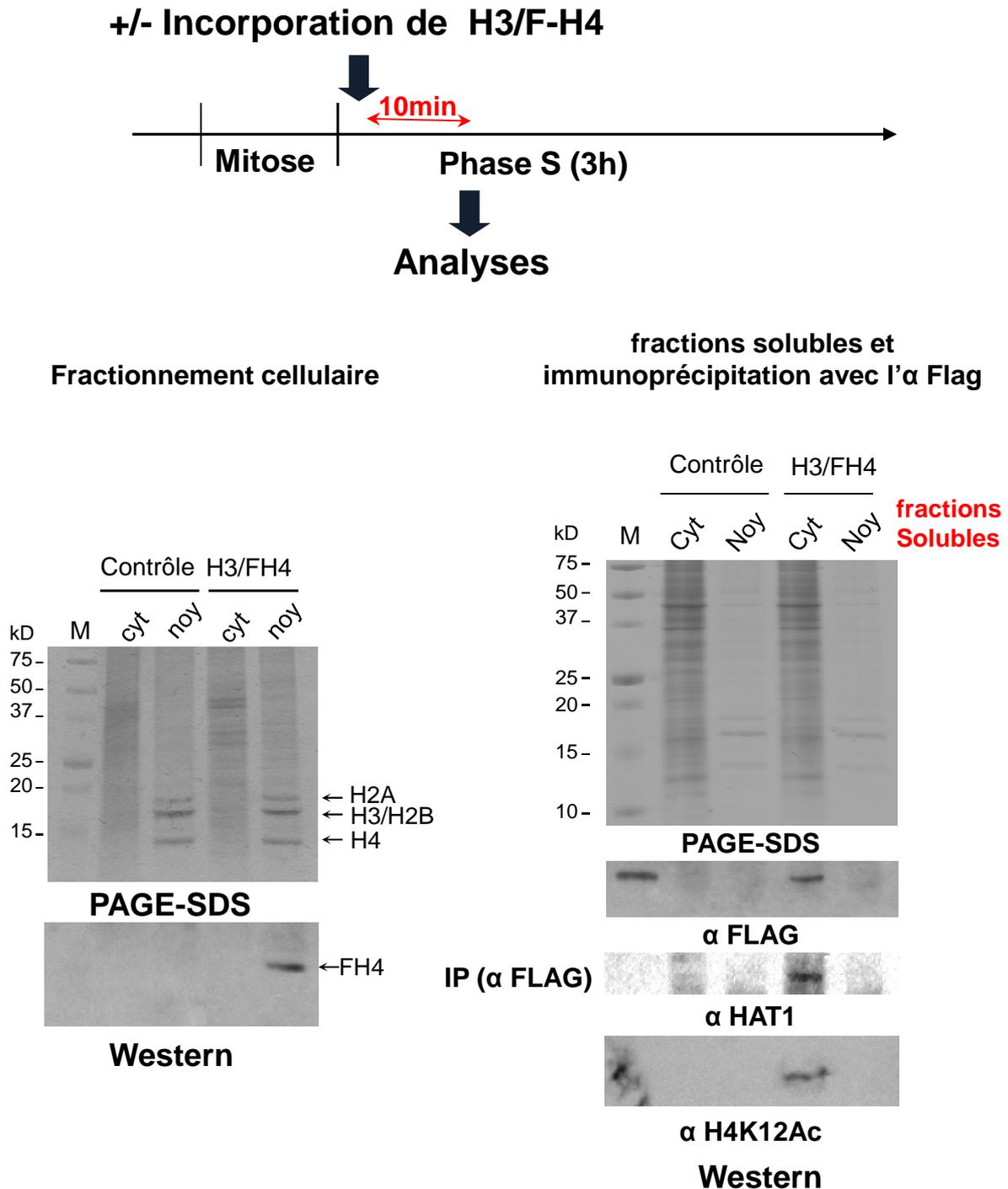


Figure 12 : Analyse de l'association de Hat1 au complexe H3/H4

Les histones H3/F-H4 sont incorporées dans *Physarum* en début de phase S pour une courte durée de 10 min. Les fractions cytoplasmique et nucléaire sont préparées et analysées en PAGES-SDS et western blot. L'histone exogène est immunodétectée avec un anticorps anti-Flag. Les fractions cytosoliques et nucléosoliques sont préparées, analysées en PAGE-SDS et immunoprécipitées (IP) avec l'anti-Flag (α Flag). Les protéines immunoprécipitées sont analysées avec des anticorps spécifiques du Flag (α Flag), de HAT1(α Hat1), et de l'acétyl lysine de H4 en position 12 (α H4K12A).

De ces différentes fractions cytosoliques et nucléosoliques, nous avons immunoprécipité les histones exogènes en utilisant l'étiquette Flag portée par l'histone H4. Nous avons ensuite par Western blot examiné la présence d'histones exogènes solubles dans les différentes fractions en utilisant un anticorps anti-Flag. Alors que le contrôle négatif ne présente pas de signal notable dans les différentes fractions, la cellule traitée avec le complexe H3/H4 exogène révélait de façon remarquable la présence de protéines exogènes dans la fraction cytosolique (**figure12**). Ces résultats suggèrent donc que les histones exogènes sont rapidement assemblées en chromatine après leur passage dans le noyau. Afin de déterminer si l'enzyme Hat1 était associée aux histones exogènes, nous avons examiné les différents produits des immunoprécipitations en Western blot avec un anticorps contre Hat1. Les résultats montrent la présence d'une bande correspond à Hat1 dans la fraction cytosolique où l'histone exogène avait également été détectée. Pour vérifier la spécificité de l'association entre H4 et Hat1, nous avons ensuite examiné en Western blot si l'histone H4 exogène présentait la signature d'acétylation associée à la réplication. Les immuno-révélation avec des anticorps spécifiques de l'acétylation en K12 et de l'acétylation en K5 présentent une réactivité de l'anticorps anti-H4K12 acétylé, mais n'ont pas permis de mettre en évidence d'acétylation sur la lysine 5 de l'histone H4. Bien que cette signature ne soit que partielle, la présence de l'acétylation en K12 suggère fortement que l'association Hat1 et H4 est spécifique. De plus, on peut noter que l'acétylation unique de l'histone H4 en position 12 corrobore parfaitement avec la réactivité de l'holoenzyme purifiée dans la fraction cytoplasmique chez la levure (Parthun, Widom et al. 1996).

Pour s'assurer que l'association de l'histone H4 avec Hat1 présentait effectivement une fonction dans le transport des complexes H3/H4 dans le noyau, il nous a semblé important de vérifier, sur la base des travaux *in vitro* du groupe de Annunziato (Makowski, Dutnall et al. 2001; Benson, Phillips et al. 2007), si une altération de la queue de H4 ne permettant pas l'association l'histone avec Hat1 affectait le transport des histones dans le noyau. Pour cette analyse, nous avons construit un nouveau mutant de l'histone H4 dans lequel les résidus utilisés par les patches acides de l'enzyme pour stabiliser les interactions H4-enzyme ont été substitués par des résidus mimant l'acétyl-lysine (**figure 13A**). Ce mutant FH4-Q8/16 a été exprimé dans des bactéries et purifié en présence de H3 avant d'être incorporé dans *Physarum* en début de phase S (**figure 13B**). Après 10 min d'incorporation, les fragments de macroplasmodes sont récoltés et

fractionnés pour être analysés en PAGE-SDS et en Western blot (**figure 13C**). Clairement, nos analyses révèlent que contrairement à notre contrôle positif le complexe contenant l'histone mutée ne présente pas une grande efficacité d'accumulation dans la fraction nucléaire. Nous avons ensuite, comme précédemment, préparé les fractions cytosoliques et nucléosoliques pour examiner l'association des histones solubles avec Hat1 par immunoprécipitation des complexes d'histones exogènes. Alors que le contrôle H3/FH4 révèle la présence d'une association entre les histones exogènes et Hat1 dans la fraction cytosolique, l'immunoprécipitation du complexe contenant l'histone FH4-Q8/16 ne met en évidence que des traces de l'enzyme Hat1 associée aux histones (**figure 13C**). Ces résultats confortent le modèle dans lequel l'enzyme Hat1 en s'associant au complexe H3/H4 permettrait le transport dans le noyau.

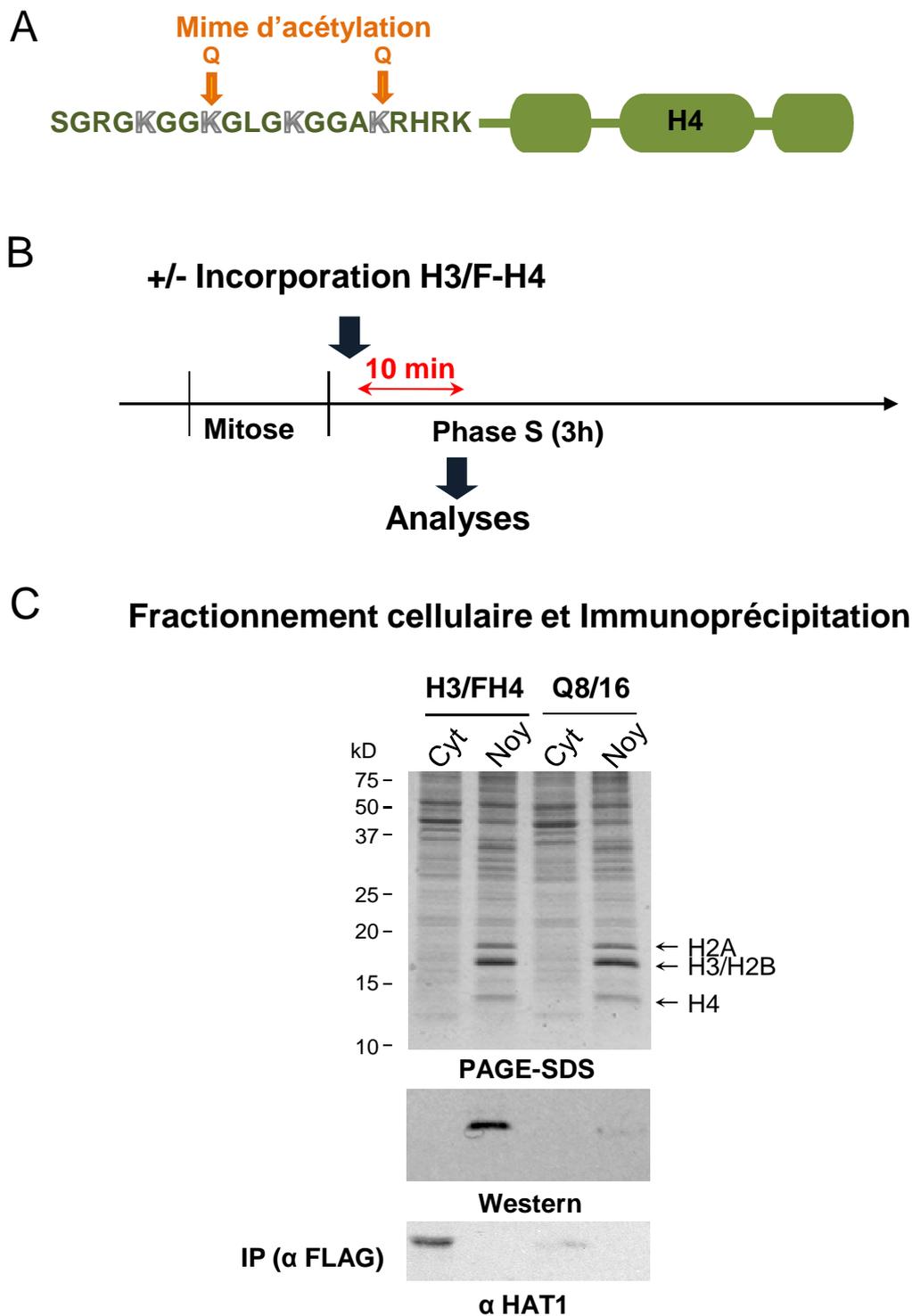


Figure 13 : L'association de HAT1 est nécessaire dans le transport des histones dans le noyau.

A) Représentation des mutations de H4 visant à mimer l'acétylation (Q8/16).
 B) Représentation schématique du déroulé expérimental. Les histones sont incorporées dans *Physarum* en début de phase S pour une courte durée de 10 min. C) Les fractions cytoplasmique et nucléaire sont préparées et analysées en PAGE-SDS et western blot. L'histone exogène est immunodétectée avec un anticorps anti-Flag (α Flag). Une immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti-Flag est effectuée suivie d'analyses avec des anticorps spécifiques anti-Flag (α Flag) et anti-HAT1 (α HAT1).

III. Implication des régions terminales des histones H3 et H4 dans l'assemblage en chromatine couplé à la réplication

Nous avons étudié jusqu'alors le rôle des régions terminales des histones H3 et H4 dans le transport des histones au cours de la phase S et montré que ces régions non structurées des histones présentaient des fonctions importantes mais non équivalentes entre la queue de H3 et celle de H4. De fait, nos résultats révèlent que la queue de H4 est prépondérante dans le transport des histones H3/H4 dans le noyau, alors que la région terminale de H3 aurait plutôt une fonction répressive sur le transport. Nous avons également été en mesure de montrer que le transport des histones impliquait l'histone acetyltransférase Hat1 et que les acétylations catalysée par l'enzyme ne sont pas directement engagées ou, ne sont pas suffisantes dans le transport des complexes H3/H4 dans le noyau. La démonstration de l'intérêt des queues des histones H3 et H4 dans l'import nucléaire de ces histones nous a amenée également à interroger leur rôle dans les mécanismes nucléaires qui conduisent à la formation de la chromatine pendant la réplication.

Pour répondre à ce questionnement, nous avons effectué des expériences d'incorporation d'histones exogènes comme dans les analyses précédentes, nous avons fractionné les cellules pour récupérer la fraction nucléaire pour en préparer la chromatine. Enfin, nous avons déterminé si les histones exogènes pouvaient être détectées dans la chromatine lavée des protéines qui pourraient s'y associer de façon non spécifique ou avec une faible affinité. Par cette approche, nous sommes en mesure d'évaluer l'assemblage en chromatine des histones exogènes lors de la réplication. Alors qu'on pourrait intuitivement penser que, si des histones sont capables d'être transportées dans le noyau, le fait de n'agir que sur les régions terminales ne devrait pas affecter l'assemblage en nucléosome. Les travaux antérieurs de Thiriet et Hayes ont montré que ce raisonnement intuitif était erroné pour les histones H2A et H2B (Thiriet and Hayes 2001). En effet, alors que les dimères sont capables d'être transportés dans le noyau aussi bien en présence qu'en l'absence des

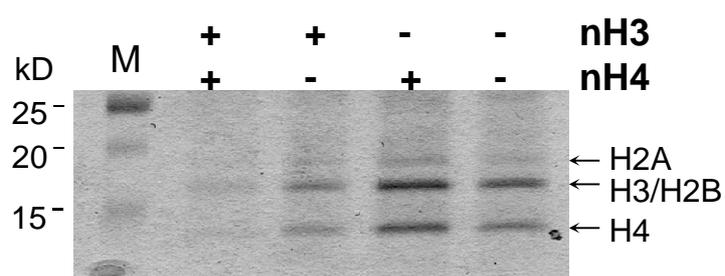
queues terminales, la déposition des histones dans la chromatine est dissemblable puisqu'il faut au moins une région terminale pour observer un assemblage de H2A/H2B dans la chromatine.

Dans une première série d'expériences, nous avons examiné l'assemblage en chromatine des histones H3/H4 privées de l'une et/ou l'autre des régions terminales du complexe. La chromatine préparée des différents fragments de macroplasmodes de *Physarum* a été analysée en PAGE-SDS et en Western blot (**figure 14**). Il ressort de ces analyses que les histones présentant les deux régions terminales et une étiquette Flag sont très efficacement assemblées en chromatine comme en atteste le signal détecté en Western blot en dépit de la faible quantité de chromatine déposée dans le gel. Par contre, les analyses de chromatine issues des différents fragments de macroplasmodes traités avec les complexes d'histones privés de l'une et/ou l'autre des régions terminales ne permettent pas de détecter d'histones exogènes dans la chromatine. De façon remarquable, la chromatine préparée à partir de fragments de cellules de *Physarum* dans lesquels le complexe H3n-/F-H4 a été incorporé ne révèle aucun signal dans la chromatine même lorsque la quantité déposée dans le gel semble suffisante pour en détecter la présence. Ceci montre non seulement que la queue de H3 est nécessaire à l'assemblage en chromatine couplé à la réplication, mais aussi que les complexes incorporés ne sont pas déstabilisés. En effet, si une déstabilisation des complexes était à noter, on devrait pouvoir retrouver l'histone exogène portant l'étiquette Flag (F-H4) associée à un partenaire endogène (H3) et ainsi former un complexe possédant les deux régions terminales. Ce dernier complexe est, contrairement à celui incorporé dans *Physarum*, capable d'être assemblé, et même en faible quantité il est possible de le détecter en Western blot.

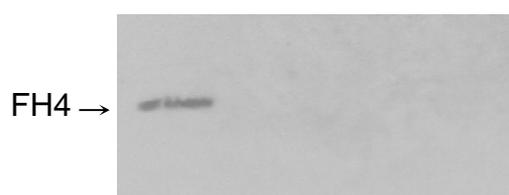
Ces résultats montrent donc que, contrairement à l'import nucléaire des histones H3/H4, où la région terminale de H4 joue un rôle prépondérant, l'assemblage nécessite la région terminale de H3, et que la région terminale de H4 ne peut pas compenser son absence.

	wt	F-H4n-/H3	F-H4/h3n-	FH4n-/H3n-
Transport dans le noyau	+	-	+++	0

Assemblage en chromatine



PAGE-SDS



Western

Figure 14 : La région N-terminale de H3 est nécessaire dans l'assemblage en chromatine.

Le tableau résume les résultats du transport des histones H3/F-H4 (WT) ainsi que les différents mutants de délétion des régions N-terminales de H3 et de H4. La chromatine est préparée à partir de la fraction nucléaire des macroplasmodes traités avec les différents complexes. Des analyses en PAGE-SDS et en Western sont poursuivies.

Nous avons également voulu examiner si la position des régions terminales des histones H3 et H4 par rapport à leurs régions globulaires respectives affectait la déposition des histones dans la chromatine en réplication. Toutefois, les résultats ne permettent pas de conclure de façon définitive quant à l'assemblage en chromatine des différents mutants et nécessite des confirmations. Néanmoins, on peut dire que le complexe où les deux queues de H3 et de H4 sont échangées est efficacement assemblé en chromatine avec une intensité comparable à celle du complexe sauvage. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus chez la levure dont les souches sont viables et l'assemblage en chromatine semble efficace.

Outre l'intérêt des régions terminales dans le transport des histones H3 et H4 ainsi que dans leur déposition dans la chromatine, nous avons été en mesure de montrer que les acétylations des résidus lysine de H4 avaient un rôle dans le devenir des complexes H3/H4 au sein de la cellule. Dans le même ordre d'idée qu'antérieurement, nous avons donc voulu déterminer si ces modifications pouvaient affecter aussi l'assemblage en chromatine. Comme dans les expériences préalables, des fragments de macroplasmodes de *Physarum* ont été traités avec les histones exogènes pendant 1 h en début de phase S, les cellules ont été fractionnées et la chromatine préparée avant d'être analysée en PAGE-SDS et en Western blot (**figure 15**). La coloration du gel d'électrophorèse révèle par la présence des histones endogènes une efficacité comparable des préparations de chromatine. Par contre les analyses en Western blot montrent que les quantités d'histones exogènes assemblées en chromatine diffèrent entre les complexes H3/H4 étudiés. Ainsi on détecte une faible quantité de l'histone H4 portant les mimes d'acétyl-lysine, alors que le mime de l'absence d'acétylation n'est pas révélé. Toutefois, il est important de regarder ces résultats simultanément avec ceux des expériences du transport nucléaire des complexes pour en tirer des conclusions. En effet, alors que les résultats de l'import nucléaire démontraient que la présence de 4 mimes d'acétylation diminuait substantiellement l'import nucléaire, on voit que l'histone est néanmoins assemblée en chromatine. Au contraire, alors que l'absence de résidus acétylables n'affectait pas le transport des histones dans le noyau, l'assemblage en chromatine du complexe est indétectable. Ces résultats suggèrent que l'acétylation de la région terminale de H4 intervient dans la déposition des histones sur l'ADN. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour rendre compte de la fonction de l'acétylation. La présence d'acétyl-lysine pourrait favoriser la réaction de déposition des histones sur l'ADN, ou inversement, l'absence de la modification pourrait inhiber

l'assemblage en chromatine, ou encore, les positions sur lesquelles les marques sont présentes ou absentes pourraient affecter l'efficacité d'assemblage.

	wt	H3/F-H4-4Q	H3/F-H4-4R
Transport dans le noyau	+	-	++

Assemblage en chromatine

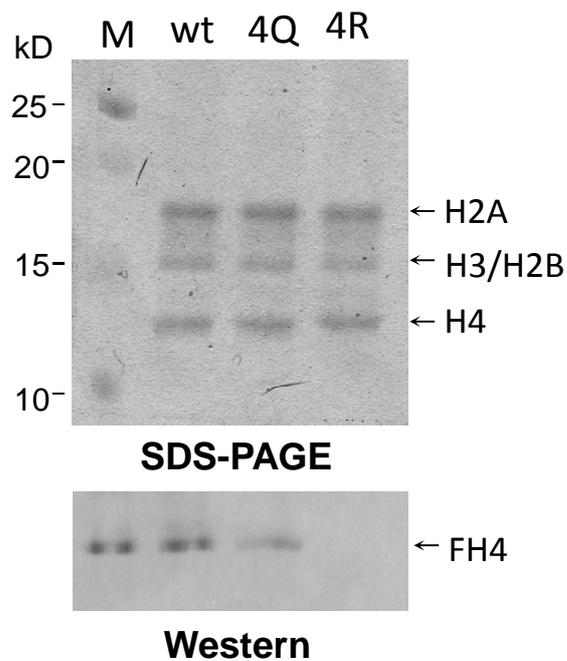


Figure 15 : L'acétylation de la région N-terminale de H4 peut intervenir dans l'assemblage en chromatine.

Tableau résumant les résultats du transport dans le noyau des complexes H3/F-H4 (wt) et ceux qui miment l'acétylation (H3/F-H4-4Q) ou son absence (H3/FH4-4R) sur les quatre lysines (5,8,12 et 16) de la région N-terminale de H4. La chromatine est préparée à partir de la fraction nucléaire des fragments de macroplasmode de *Physarum* traités avec les différents complexes et analysée en PAGE-SDS et Western blot.

Afin d'examiner cette dernière hypothèse, nous avons examiné l'assemblage en chromatine des complexes dans lesquels les lysines ont été mutées en positions 5 et 12. Une fois encore les substitutions effectuées mimaient l'acétyl-lysine ou la lysine non acétylée par l'introduction dans la séquence de H4 de résidus glutamine ou arginine. Comme pour les analyses de l'assemblage en chromatine des autres complexes d'histones, la chromatine issue de macroplasmodes dans lesquels les complexes étaient incorporés, a été préparée. Les analyses en PAGE-SDS montrent que la chromatine des différents fragments de *Physarum* est préparée avec des efficacités similaires (**figure 16**). Par ailleurs, les analyses en Western blot révèlent des quantités d'histones exogènes différentes dans la chromatine des différents fragments cellulaires. On remarque que l'histone H4 qui présente les mimes d'acétylation sur les résidus 5 et 12 est nettement plus intense que l'histone H4 dans laquelle les lysines des positions 5 et 12 sont substituées avec des résidus arginine. Ces résultats affichent une parfaite cohérence avec les expériences de transport nucléaire lors desquelles nous avons montré des efficacités des différents mutants similaires à celles observées pour l'assemblage. Alors que les résultats ne permettent pas de dessiner de conclusion irréfutable sur le rôle de la diacétylation de H4 dans l'assemblage en chromatine couplé à la réplication, il est néanmoins indiscutable que ces modifications n'affectent pas de façon négative la déposition des histones sur l'ADN.

	wt	H3/F-H4-Q5/12	H3/F-H4-R5/12
Transport dans le noyau	+	+++	-

Assemblage en chromatine

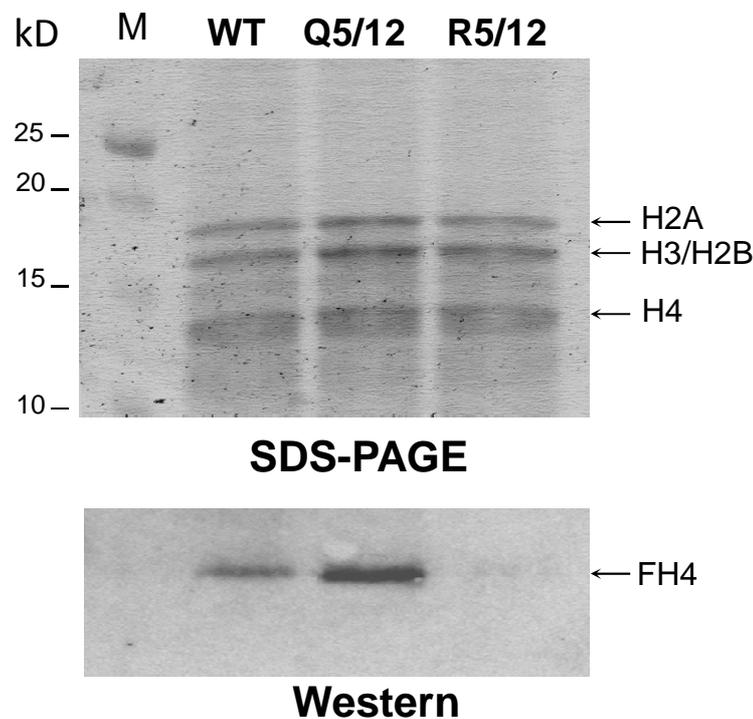


Figure 16 : l'acétylation des résidus 5 et 12 sur la région N-terminale de H4 favorise l'assemblage en chromatine.

Tableau résumant les résultats du transport dans le noyau des complexes H3/F-H4 (wt) et ceux qui miment l'acétylation ou son absence sur les lysines 5 et 12 de la partie N-terminale de H4. La chromatine est préparée à partir de la fraction nucléaire des fragments de macroplasmodes traités avec les différents complexes et analysée en PAGE- SDS et Western blot.

L'absence d'un rôle évident de la diacétylation de H4 dans la déposition des histones H3/H4 sur l'ADN pendant la réplication corrobore les résultats *in vitro* obtenus par le groupe de Stillman (Shibahara, Verreault et al. 2000). Lors de cette étude, les auteurs ont montré que le complexe d'assemblage en chromatine CAF-1 était capable d'assembler *in vitro* des nucléosomes sur de l'ADN en réplication même si les histones étaient privées de leur région terminale. Ce résultat implique que ni la diacétylation de H4, ni même une modification de la queue de H3, n'agissent directement sur l'activité d'assemblage en chromatine du complexe CAF-1. Toutefois, la purification par le même groupe du complexe CAC composé de CAF-1 et des histones H3/H4 à partir de lysats cellulaires montre que l'histone H4 présente la diacétylation caractéristique de la réplication dans le complexe cellulaire (Verreault, Kaufman et al. 1996). Ces observations laissent présager que la diacétylation de H4 pourrait avoir une fonction lors d'une étape antérieure à celle où le complexe CAC est formé.

La conjonction des résultats de nos analyses de l'acétylation de H4 lors de l'assemblage en chromatine couplé à la réplication révèle que ni la présence du mime d'acétyl-lysine sur les positions 5, 8, 12 et 16 ni celle sur les positions 5 et 12 ne montrent un effet flagrant sur la déposition des histones sur l'ADN. Par contre la substitution de la lysine en arginine en positions 5, 8, 12 et 16 révèle sans ambiguïté un effet négatif sur l'assemblage. Il nous semble raisonnable de proposer que des altérations des résidus 8 et 16 pourraient être responsables des observations. Possiblement, ces altérations intéresseraient préférentiellement la charge des résidus utilisés dans les mimes plutôt que la modification qu'ils sont sensés simuler.

Notre travail a porté sur l'analyse de la fonction des régions terminales des histones H3 et H4 pendant la réplication de la chromatine. Pour notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser le myxomycète *Physarum polycephalum* qui est justifié par la possibilité pour cet organisme de former des cellules géantes contenant plusieurs centaines de million de noyaux tous parfaitement synchrones tout au long du cycle cellulaire (Guttes and Guttes 1964; Kubbies and Pierron 1983). La synchronie naturelle d'une grande population de noyaux dans une cellule présente des avantages indéniables. En effet, il n'est pas utile d'effectuer de synchronisation de façon artificielle qui n'est pas souvent maintenue sur toute la durée du cycle cellulaire. De plus, l'induction de la synchronisation implique de manière générale l'utilisation de drogues qui peuvent affecter le processus cellulaire étudié, ou au mieux induire une réponse cellulaire. Ainsi, il a été montré chez la levure que la synchronisation des cellules par le facteur alpha, qui induit un arrêt des cellules en phase G1, affecte non seulement le positionnement des nucléosomes, mais aussi leur turn-over dans la région codante du gène *FUS1* (Dion, Kaplan et al. 2007).

Par ailleurs, le modèle *Physarum* offre l'unique possibilité d'intégrer du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire des molécules de nature protéique sans en altérer les propriétés biologiques (Oppenheim and Katzir 1971; Bradbury, Inglis et al. 1974; Prior, Cantor et al. 1980; Prior, Cantor et al. 1983; Thiriet and Hayes 1999; Thiriet 2004). Cette spécificité du modèle présente de grands intérêts : le fait de pouvoir examiner des complexes composés de plusieurs sous-unités en étant certain que les résultats ne sont pas générés par un mauvais assemblage des sous-unités, ou encore la possibilité de maîtriser parfaitement la quantité de protéines internalisées. La maîtrise de la quantité de protéines n'est pas anodine dans l'étude des histones. En effet, il a été montré chez la levure que la quantité d'histones produites par la cellule est étroitement contrôlée et que le fait d'affecter l'équilibre est délétère (Gunjan and Verreault 2003; Singh, Kabbaj et al. 2009; Singh, Liang et al. 2011). La maîtrise de la quantité des histones est sans nul doute plus difficile à obtenir par des approches génétiques où la protéine d'intérêt résulte de la transcription d'un gène dont le contrôle est souvent différent de celui utilisé par la cellule, et de la traduction des ARN messagers. Du fait que ni la transcription, ni la traduction, ne présentent une parfaite maîtrise quant aux quantités produites, il semble que l'incorporation de protéines exogènes soit une solution pertinente.

Lors de nos expériences d'incorporation des histones exogènes, nous avons utilisé des quantités de traces des protéines exogènes. L'estimation de la quantité est $\sim 1/2000^e$ de la quantité des histones endogènes. Par une valeur aussi faible, nous pouvons supposer que les histones exogènes ne vont pas perturber de façon significative le métabolisme cellulaire. D'ailleurs tout au long de nos expériences, nous avons examiné les profils électrophorétiques des fractions cellulaires et à aucun moment nous n'avons observé de variations qui laisseraient présager d'un quelconque effet de notre expérimentation. Ce point est loin d'être futile, car les histones sont des protéines vitales pour la cellule et il est raisonnable de penser que les mécanismes impliqués dans leur métabolisme soient redondants. La multiplicité des mécanismes de transport et d'assemblage en chromatine couplé à la réplication des histones n'a pas encore été pleinement élucidée. Néanmoins, une telle diversité des voies métaboliques a été mise en évidence pour le variant H3.3, pour lequel plusieurs chaperonnes ont été isolées de lignées cellulaires semblables (Tagami, Ray-Gallet et al. 2004; Drane, Ouarrhni et al. 2010; Goldberg, Banaszynski et al. 2010). Récemment, une étude a permis d'isoler 4 complexes distincts de facteurs associés aux histones H3/H4 cytoplasmiques dans les cellules humaines (Campos, Fillingham et al. 2010). Les auteurs ont rationalisé la coexistence des différents complexes en proposant qu'ils pourraient indiquer les différentes étapes entre la synthèse des histones et leur passage dans le noyau. Toutefois, il n'a pas été déterminé que les différents complexes sont présents dans une même cellule ou alors que des complexes différents soient isolés de cellules distinctes.

De plus, on peut facilement concevoir que les multiples voies métaboliques, ne sont pas toutes équivalentes et certaines sont utilisées préférentiellement à d'autres. Ainsi, la redondance permettrait de pallier un dysfonctionnement des voies principales. Lors de nos expériences, l'incorporation dans la cellule d'un quelconque complexe d'histones en quantité de traces ne révèle aucune perturbation du métabolisme de la cellule. Par conséquent, même si un complexe ne présente aucune fonctionnalité, la cellule ne voit jamais ses critères vitaux engagés puisque les protéines endogènes sont toujours présentes et sous le contrôle de la cellule. Cet aspect des expériences effectuées chez *Physarum* diffère radicalement des approches génétiques. En effet, hormis quelques exceptions, la plus grande partie des résultats issus de la génétique révèle la réaction cellulaire lorsque l'histone mutée est la source principale de protéine. Il est probable que les voies métaboliques redondantes n'aient pas exactement les mêmes contraintes que les voies primaires. Par conséquent en altérant l'histone, il est possible que l'engagement des critères vitaux induise la sollicitation de voies

métaboliques alternatives plutôt que les voies primaires. Dans ce cas, les conclusions des expériences génétiques où la protéine endogène est supprimée doivent être tirées en termes d'aptitude pour la cellule à utiliser la protéine mutée dans l'ensemble de toutes les voies métaboliques primaires et alternatives. De fait, il est difficile par ces expériences de pouvoir discriminer ce qui est réellement nécessaire dans la physiologie normale de la cellule.

Lors de notre analyse, nous avons montré que les histones exogènes H3/H4 sont transportées dans le noyau de manière concertée avec la réplication de l'ADN. Cette observation contraste avec les résultats des expériences utilisant H2A/H2B, où l'inhibition de la réplication n'affectait pas le transport nucléaire des histones (Thiriet and Hayes 2001). Il est clair de ces expériences que les mécanismes et les régulations du transport des histones dans le noyau sont distincts entre H3/H4 et H2A/H2B. Toutefois, il est parfaitement légitime de s'interroger sur la valeur physiologique de telles observations qui utilisent des histones exogènes. Par l'utilisation des méthodes de radio-marquages en conjonction à l'utilisation de drogues, le groupe de Loidl a examiné le métabolisme des histones chez *Physarum* tout au long du cycle cellulaire (Loidl and Grobner 1987). Ces analyses montrent que les synthèses des histones ne sont pas toutes sous le même contrôle puisque les histones H3 et H4 sont synthétisées pendant la phase S, alors que la synthèse des histones H2A et H2B se poursuit pendant la phase G2. Outre la différence de régulation des expressions des histones H3, H4 et H2A, H2B au cours du cycle, cette différence a également été démontrée pendant la phase S. En effet, par l'inhibition de la réplication, les auteurs ont observé la perte de précurseurs radioactifs dans les histones H3 et H4 alors que les histones H2A et H2B sont toujours radio-marquées. Ces derniers résultats sont parfaitement en accord avec les observations du transport dans le noyau des histones exogènes, où l'import nucléaire des histones H3/H4 est affecté par l'inhibition de la réplication contrairement aux histones H2A/H2B. La parfaite cohérence entre les analyses des histones endogènes et l'examen du transport nucléaire des histones incorporées dans *Physarum* laisse fortement présager que les histones exogènes sont soumises aux régulations physiologiques. Tant les résultats de Loidl et Grobner que les nôtres montrent qu'en bloquant la réplication, les histones H3/H4 ne sont plus transportées dans le noyau. Ceci implique une communication entre les différents compartiments de la cellule qui signifierait les besoins en histones pendant la réplication de la chromatine. A ce jour, nous ne connaissons pas la nature et les mécanismes des échanges entre les compartiments cellulaires, mais il est clair que ceux-ci sont déterminants et très précisément contrôlés.

Si tous les rouages qui gouvernent l'import nucléaire d'une quantité précise d'histones H3/H4 pendant la réplication sont toujours sous investigations, nos travaux dévoilent toutefois quelques pistes. Nous avons montré dans nos expériences de déplétion des régions terminales des histones H3 et H4 que les deux queues de ces histones ne sont pas équivalentes. En effet, alors que la queue de H4 est nécessaire à l'accumulation efficace des histones dans le noyau, l'absence de la queue de H3 n'affecte pas négativement le transport des complexes H3/H4. Ces résultats sont non seulement différents de ceux issus des analyses des complexes H2A/H2B chez *Physarum*, où l'absence des queues n'influe pas sur le transport des histones dans le noyau (Thiriet and Hayes 2001), mais aussi des résultats obtenus chez la levure (Lenfant, Mann et al. 1996; Ling, Harkness et al. 1996; Ma, Wu et al. 1998; Mosammaparast, Jackson et al. 2001; Mosammaparast, Guo et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). Dans de ce dernier modèle, la perte d'une des régions terminales des histones H3/H4 affecte de façon notable le temps de doublement des cultures, mais non pas la viabilité cellulaire (Ling, Harkness et al. 1996). Il est possible que les différences entre les modèles biologiques résultent des spécificités des deux approches expérimentales, où dans le cas de *Physarum*, seules les voies métaboliques primaires sont examinées alors que dans le cas de la levure, toutes les voies métaboliques, primaires et alternatives, sont superposées. Par conséquent, les expériences chez *Physarum* montrent que dans le métabolisme primaire, la queue de H4 joue un rôle prépondérant dans le transport nucléaire des histones H3/H4. Néanmoins, les expériences d'échanges des queues des histones montrent que si la queue de H4 présente bien une fonction prépondérante, celle-ci n'est pas remplie exclusivement par la queue de l'histone. En effet, lorsqu'on examine un complexe où la seule queue de H4 est placée sur la région globulaire de H3, on observe une diminution notable de l'import du complexe dans le noyau. Il semblerait donc qu'une communication existe entre la région globulaire et la queue de l'histone. On peut penser que cette communication puisse se faire par des interactions entre les facteurs associés à la région terminale et ceux associés à la région globulaire.

Nous avons été en mesure de montrer que l'association entre H4 et l'histone acétyltransférase HAT1 était nécessaire au transport des histones dans le noyau. L'holoenzyme HAT1 est composée de deux sous-unités, une sous-unité catalytique Hat1 et une sous-unité dite régulatrice p46. Par des expériences de co-précipitation, il a été démontré que la sous-unité p46 (Rbap46) s'associe avec la première hélice de l'histone H4 (Verreault, Kaufman et al. 1998). Il est possible que la communication entre la région terminale de H4 et sa région

globulaire intéresse les deux sous-unités de l'holoenzyme HAT1. Ce modèle est en accord avec les résultats où la queue de H4 est en position ectopique sur la région globulaire de H3. Dans ce complexe, les régions qui s'associent avec les sous-unités catalytique et régulatrice de HAT1 ont été dissociées, ne permettant plus par conséquent la formation d'un complexe HAT1/histones. Toutefois, les résultats où les deux régions terminales ont été échangées montrent que le complexe est transporté au noyau de façon efficace. Ceci suggère la coexistence d'un second mécanisme de transport des histones dans le noyau ou alors la possibilité pour HAT1 de s'accommoder avec la queue de H3. Cette dernière possibilité n'est pas à exclure, car il existe dans la région terminale de H3 des résidus chargés positivement qui pourraient permettre la stabilisation de la sous-unité catalytique de HAT1 en interagissant avec les patches acides de l'enzyme (Dutnall, Tafrov et al. 1998).

Lors de notre étude, nous avons été en mesure de montrer une fonction de la diacétylation de H4 dans le transport des histones H3/H4 pendant la phase S. Alors que cette signature a été mise en évidence au travers du règne eucaryote (Sobel, Cook et al. 1995), sa fonction n'avait toujours pas été élucidée. De manière générale, on peut concevoir les modifications des histones comme des marques qui favorisent le recrutement d'autres facteurs impliqués dans les activités de la chromatine. Ainsi, il a été montré que des protéines possédant des bromo-domaines sont capables de s'associer aux histones acétylées (Deng, Chen et al. 2003), ou encore des protéines possédant des chromo-domaines reconnaissent les histones méthylées (Lachner, O'Carroll et al. 2001). Sur la base de ces reconnaissances, il a été proposé que les modifications des histones pourraient constituer un code épigénétique (Strahl and Allis 2000; Jenuwein and Allis 2001). Dans le cas de la diacétylation de H4 associée à la réplication, nos analyses utilisant des mimes de la modification suggèrent que ce n'est pas tant la modification *per se* qui est importante, mais plutôt les altérations de la charge des résidus lysine qui en résultent. Des travaux du groupe de Annunziato (Benson, Gu et al. 2006; Benson, Phillips et al. 2007) et les nôtres, on peut penser que l'acétylation de H4 en position 12 favoriserait le glissement de l'enzyme HAT1 le long de l'histone et l'acétylation de la lysine 5 pourrait permettre à l'enzyme de se dissocier de l'histone. De façon intéressante, on a remarqué que dans le compartiment cytoplasmique, l'histone H4 n'est acétylée qu'en position 12. Cette marque unique a également été observée chez la levure, où il a été montré que l'holoenzyme cytoplasmique HAT1 n'est capable d'acétyler H4 qu'à cette seule position (Parthun, Widom et al. 1996). Par conséquent, de l'ensemble de nos résultats intéressant l'acétylation et HAT1, nous proposons que l'holoenzyme s'associe au complexe

H3/H4 dans le cytoplasme et acétyle H4 en position 12. De façon concomitante à cette acétylation le complexe HAT1/(H3/H4) est délocalisé dans le noyau où l'histone H4 va subir une seconde acétylation en position 5 ce qui permet la dissociation de l'holoenzyme du complexe H3/H4 (**figure1**).

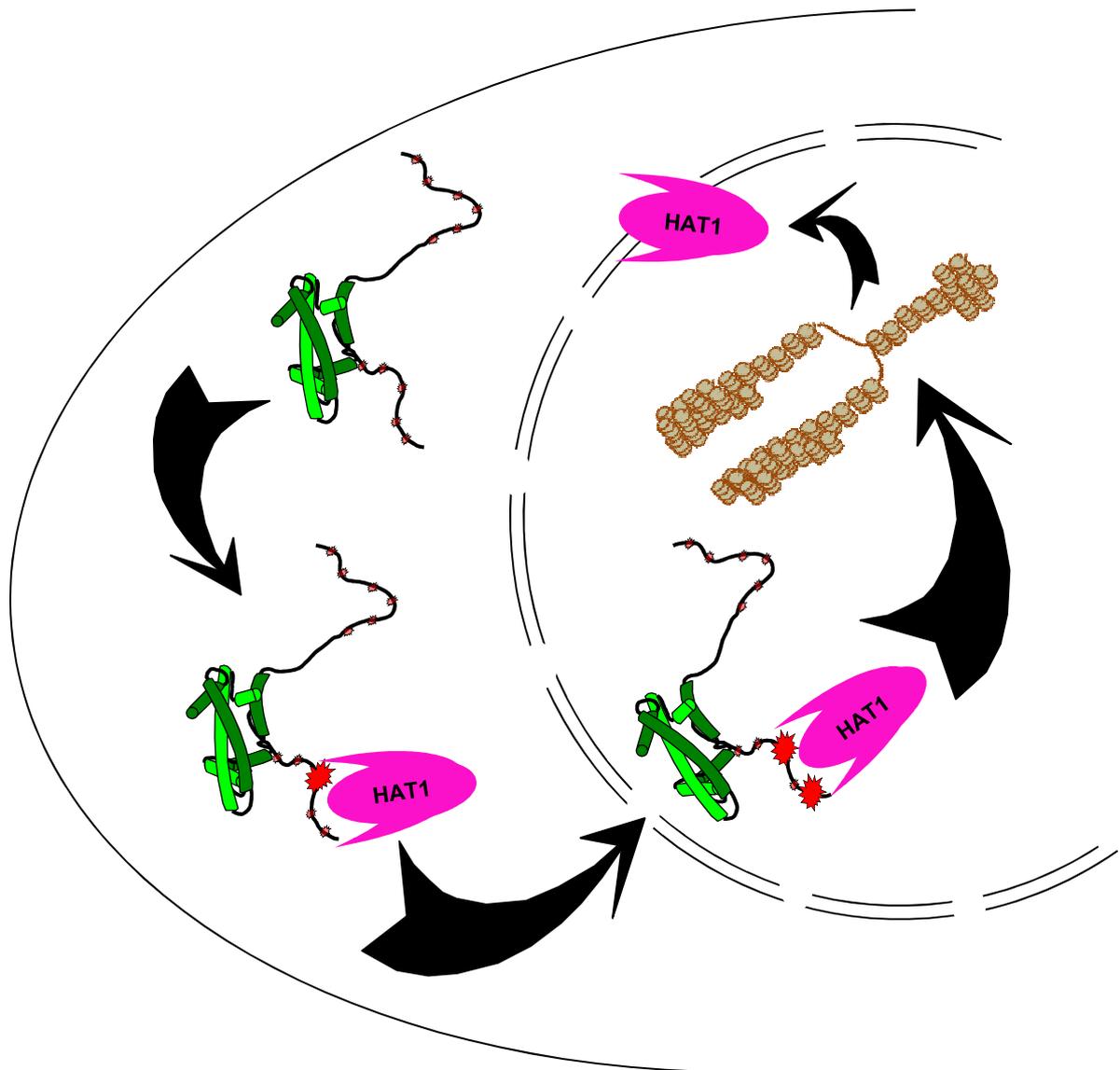


Figure 1 : Modèle résumant l'implication de la région terminale de H4 et de HAT1 dans le transport nucléaire des complexes H3/H4. Les complexes H3/H4 synthétisés dans le cytoplasme sont pris en charge par l'holoenzyme HAT1 où ils subissent une première acétylation sur la lysine 12. Les histones associées à HAT1 sont ensuite délocalisées dans le noyau pour se retrouver aux fourches de réplication. On suppose que la seconde acétylation de H4 par HAT1 en position 5 pourrait faciliter le transfert de la chaperonne de transport vers la chaperonne d'assemblage. Il est possible qu'après ce transfert, l'holoenzyme HAT1 soit relocalisée dans le cytoplasme pour prendre en charge de nouveaux complexes d'histones.

Si nos travaux révèlent une fonction prédominante de la région terminale de H4 dans le transport nucléaire des histones H3/H4, il est clair que dans ce processus hautement régulé la région N-terminale de l'histone H3 est également intéressante. Toutefois, les conclusions que nous sommes en mesure de tirer de nos analyses diffèrent significativement du modèle proposé à partir des expériences de génétique (Ling, Harkness et al. 1996). Dans ces dernières expériences effectuées chez la levure, il a été montré que la perte de la région terminale de H3 ou l'échange des deux queues H3/H4 ne compromettait pas la viabilité cellulaire. Par contre, la présence d'une seule queue terminale en position ectopique conduisait à la létalité. Il a donc de ces expériences été proposé que les régions terminales étaient redondantes et qu'elles remplissaient leur fonction indépendamment de leur position dans le complexe H3/H4. Pour notre part, nous avons vu chez *Physarum* que l'absence de la queue de H3 permettait un transport dans le noyau plus efficace que le complexe naturel. Par contre dans le noyau, un tel complexe voyait sa stabilité diminuer. Il est possible que ce défaut de stabilité dans le noyau du complexe privé de la queue terminale de H3 soit imputable à un mécanisme de dégradation des histones dans la cellule. En effet, l'existence de l'histone H3 dans laquelle la région terminale est absente a été mise en évidence dans le protozoaire *Tetrahymena* en l'absence de toute manipulation génétique (Allis, Bowen et al. 1980). L'existence de cette histone tronquée a également été montrée dans les cellules souches embryonnaires, dans lesquelles il a été démontré que la protéolyse résultait de l'activité de la Cathepsine L (Duncan, Muratore-Schroeder et al. 2008). De ces analyses, il a été proposé que la protéolyse de H3 par la Cathepsine L pourrait être un mécanisme cellulaire impliqué dans le développement et la différenciation cellulaire. Plusieurs hypothèses peuvent être posées pour rendre compte du meilleur transport des complexes H3/H4 privés de la queue de H3. La perte de la région terminale de H3 induit une diminution de la taille du complexe qui lui permet d'être plus facilement transporté. Bien que plausible cette hypothèse est peu satisfaisante, car cette seule queue ne représente qu'un peu plus de 20 résidus. De plus, si une vingtaine d'acides aminés sont en mesure de faire une telle différence dans l'import nucléaire, on ne peut pas expliquer une augmentation de l'efficacité de transport dans le noyau d'un complexe présentant un doublon de la queue de H4. De fait, on peut penser que l'effet de l'absence de la queue de H3 soit associé à un autre phénomène. Nous proposons que cet effet pourrait être la levée d'une inhibition du transport des histones dans le noyau (**figure 2**). Dans un tel modèle, la queue de l'histone H3 aurait une fonction répressive sur l'import nucléaire des histones H3/H4. Cette hypothèse est effectivement validée par les résultats des expériences d'échanges des queues des histones où la présence de la région terminale de H3 sur sa partie globulaire révèle un

moins transport des histones dans le noyau. Nos résultats de la fonction de la queue de H3 dans le transport des histones dans le noyau diffèrent des conclusions tirées des expériences de construction des chimères GFP-queue de H3 (Mosammaparast, Guo et al. 2002; Blackwell, Wilkinson et al. 2007). En effet, alors que nos expériences montrent une inhibition de l'import nucléaire par la queue de H3, les expériences utilisant les protéines chimères avec la même queue de H3 révèlent un transport des protéines dans le noyau.

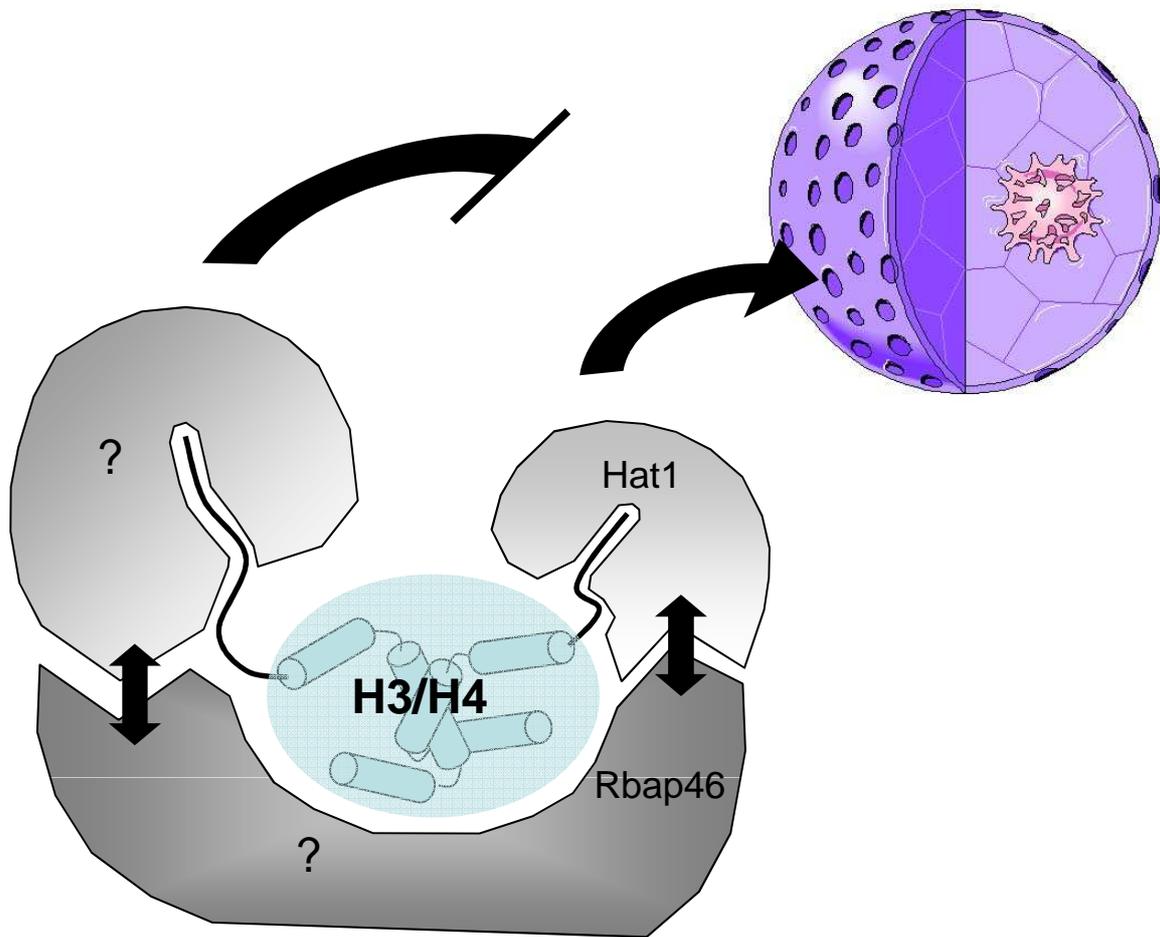


Figure 2 : Le transport nucléaire des histones H3/H4 pendant la phase S résulte d'une homéostasie de deux mécanismes opposés s'appuyant sur les régions terminales des histones H3 et H4. L'association de la région terminale de H4 avec HAT1 favorise le transport des histones dans le noyau. Au contraire, nos résultats montrent que la région terminale de H3 possiblement via des facteurs protéiques modérerait l'import nucléaire des histones H3/H4. C'est par l'équilibre de l'activation du transport et sa modération que les quantités d'histones pourraient être contrôlées pendant la réplication et permettraient une réactivité de la cellule aux contraintes extérieures et métaboliques. Nous proposons que les sous-unités de l'holoenzyme HAT1 pourraient en avoir un double rôle avec la région terminale de H4 et sa région globulaire. A ce jour nous ne connaissons toujours pas les facteurs impliqués avec l'histone H3.

Notre étude de la fonction des régions terminales des histones H3 et H4 dans le transport nucléaire des histones montre que ce processus est la résultante de deux phénomènes antagonistes. Un phénomène qui tend à favoriser le transport des histones et un phénomène qui au contraire retiendrait ces mêmes histones dans le cytoplasme. Dans la cellule en phase S, les histones sont transportées dans le noyau, les quantités de complexe qui passent d'un compartiment à l'autre sont constamment contrôlées. Ainsi, le contrôle de la quantité des histones H3/H4 délivrées aux fourches de réplication se ferait à deux niveaux, un niveau qui implique l'histone H4 et qui favorise l'import nucléaire via l'association à histone acétyltransférase HAT1 et un second niveau qui lui intéresse la région terminale de H3 et qui réprime la délocalisation des histones dans le noyau. Nous proposons que par l'homéostasie de ces mécanismes antagonistes les quantités d'histones pourraient être parfaitement contrôlées et répondre rapidement à des pressions extérieures comme l'inhibition de la réplication par une drogue, voire des dommages du matériel génétique. Il est possible que ce modèle ne soit pas utilisé par l'ensemble des eucaryotes. En effet, il a été montré qu'en réponse à un excès d'histones, la levure *S. cerevisiae* dégradait l'excédent en faisant intervenir une voie métabolique qui utilise Rad53 (Gunjan and Verreault 2003; Singh, Kabbaj et al. 2009). Néanmoins, à ce jour ce mécanisme n'a pas été mis en évidence dans d'autres organismes en dépit de l'existence d'homologues de la protéine Rad53 chez d'autres espèces. Si les régions terminales des histones jouent un rôle important dans les mécanismes de régulation du transport des histones dans le noyau, il est clair qu'il existe également une coopération entre les régions terminales et les régions globulaires du complexe H3/H4. Il est possible que dans cette coopérativité, les histones ne soient que des intermédiaires qui favoriseraient l'association d'autres facteurs comme des chaperonnes. Si nos travaux pointent l'holoenzyme HAT1 dans ce type d'interaction, ce n'est sans doute pas le seul acteur. A ce jour, nous n'avons toujours pas de candidats qui intéresseraient les interactions avec la région terminale de H3. Pour ce qui est des chaperonnes qui s'associent aux régions globulaires de H3/H4, la récente analyse du groupe de Reinberg laisse entrevoir plusieurs pistes qui pourront être examinées (Campos, Fillingham et al. 2010). On prêterait une attention particulière au facteur ASF1 dont la résolution de la structure révèle des interactions avec la région globulaire de l'histone H3 de l'hétérocomplexe H3/H4 (English, Maluf et al. 2005; English, Adkins et al. 2006)

Outre le rôle des régions terminales des histones H3 et H4 dans le transport nucléaire pendant la phase S, nous avons également examiné leur rôle dans l'assemblage en chromatine

couplé à la réplication. Si les expériences révèlent sans ambiguïté la présence ou non des histones exogènes dans la chromatine, il est évident que ces observations se placent en aval du transport nucléaire des histones. De fait, des conclusions de l'aptitude des complexes à être assemblés en chromatine ne pourront être tirées uniquement lorsque les complexes seront en mesure d'être transportés dans le noyau. Cette contrainte inhérente au système cellulaire ne nous permettra donc pas d'évaluer d'un point de vue mécanistique l'ensemble des complexes de H3/H4 que nous avons préparé. Les analyses de l'assemblage en chromatine des complexes privés de l'une et/ou l'autre des régions terminales de H3/H4 révèlent que la queue de H3 est indispensable pour déposer les histones dans la chromatine. A ce jour, le rôle exact de la région terminale de H3 dans l'assemblage en chromatine n'est pas élucidé. En effet, les analyses *in vitro* de l'assemblage en chromatine couplé à la réplication et utilisant CAF-1 ont clairement démontré que le complexe d'assemblage ne nécessite aucune des régions terminales des histones H3 et H4 pour déposer les histones sur l'ADN en réplication (Shibahara, Verreault et al. 2000).

Alors que nous n'avons pas été en mesure de faire la démonstration que la région terminale de H4 est importante dans l'assemblage en chromatine, nos expériences ont néanmoins permis d'examiner de façon détaillée l'importance de la diacétylation de H4 dans ce processus. Il a été largement montré que l'histone H4 présente une diacétylation spécifique de la réplication (Sobel, Cook et al. 1995; Annunziato and Hansen 2000; Benson, Gu et al. 2006; Benson, Phillips et al. 2007; Annunziato 2011). L'intervention de la diacétylation dans l'assemblage en chromatine n'était toujours pas établie. Ce défaut d'information tenait sans doute à l'absence d'un phénotype flagrant dans les cellules privées de l'enzyme HAT1 (Kleff, Andrulis et al. 1995; Kelly, Qin et al. 2000; Ai and Parthun 2004; Barman, Takami et al. 2006; Qin and Parthun 2006; Mersfelder and Parthun 2008). Par une élégante approche génétique où des histones présentant des mutations des sites d'acétylation et les histones sauvages étaient co-exprimées dans les cellules, le groupe de Berman a montré que la perte des sites d'acétylation de H4 conduisait à une exclusion de la protéine mutée de la chromatine en affectant les interactions entre le complexe H3/H4 et une sous-unité de CAF-1 (Cac1p chez la levure) (Glowczewski, Waterborg et al. 2004). Nos résultats chez *Physarum* montrent également une absence de l'assemblage en chromatine du complexe dans lequel les sites acétylables de H4 sont substitués à l'arginine. Par contre des mimes d'acétylation révèlent un assemblage en chromatine. Nous avons également montré qu'en restreignant les mutations aux seuls sites de la diacétylation par HAT1, les complexes H3/H4 sont efficacement

assemblés en chromatine. Nos précédentes analyses ont clairement mis en évidence une fonction de HAT1 dans l'import nucléaire. Des expériences complémentaires de co-immunoprécipitation ont également montré que l'enzyme était retrouvée au voisinage des fourches de réplication (Ejlassi-Lassalette, Mocquard et al. 2011). De façon intéressante, on peut noter que l'holoenzyme HAT1 et le complexe d'assemblage CAF-1 présentent des sous-unités semblables mais pas identiques. Nous pensons que l'exclusivité de ces sous-unités Rbap46 pour HAT1 et Rbap48 pour CAF-1 pourrait avoir une fonction dans le transfert des histones de la chaperonne de transport (HAT1) à la chaperonne d'assemblage (CAF-1). Dans ce modèle qui demande toutefois des arguments expérimentaux supplémentaires, les histones H3/H4 pourraient passer d'une chaperonne à l'autre par la simultanéité de l'acétylation des résidus lysine par la sous-unité catalytique de HAT1 pour affaiblir les interactions H4/HAT1 et la compétition entre Rbap46 (HAT1) et Rbap48 (CAF-1) pour s'associer à la première hélice de l'histone H4.

Nos travaux nous ont permis de démontrer que les régions terminales des histones H3 et H4 ont des fonctions importantes dans le transport des complexes d'histones dans le noyau et leur assemblage en chromatine. Alors que nos analyses ont été effectuées dans des conditions très similaires à celles qui visaient à déterminer le rôle des régions terminales des histones H2A/H2B dans l'assemblage en chromatine couplé à la réplication (Thiriet and Hayes 2001), nous voyons que les régions terminales des histones H2A/H2B et H3/H4 présentent des fonctions distinctes pendant la phase S du cycle cellulaire (Ejlassi-Lassalette and Thiriet *in press*). Il est généralement admis, sur la base des expériences de reconstitution de nucléosome *in vitro*, que la formation des nucléosomes se fait par une succession d'étapes où les histones H3/H4 sont associées à l'ADN puis à l'ajout des histones H2A/H2B sur le tétramère. A ce jour, nous ne connaissons toujours pas avec exactitude les mécanismes cellulaires responsables de la déposition successive des complexes d'histones sur l'ADN. Il pourrait être intéressant d'examiner si les régions terminales ont une fonction dans le déroulement séquentiel des étapes qui conduisent à la formation du nucléosome. Pour étayer cette hypothèse, nous pourrions construire des histones chimères où les régions terminales des deux complexes H2A/H2B et H3/H4 seraient échangées. En incorporant ces complexes chimères dans *Physarum* et en analysant leur transport nucléaire et leur assemblage en chromatine, nous devrions être en mesure de déterminer si la séquence des étapes d'assemblage des histones dans la chromatine est contrôlée par les régions terminales des complexes d'histones ou alors par les régions globulaires.

- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." *Mol Cell* **9**(6): 1191-1200.
- Ai, X. and M. R. Parthun (2004). "The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly." *Mol Cell* **14**(2): 195-205.
- Alexopoulos, C. J. (1969). "The experimental approach to the taxonomy of the Myxomycetes." *Mycologia* **61**(2): 219-239.
- ALLFREY, V. G., R. FAULKNER, et al. (1964). "ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.
- Allis, C. D., J. K. Bowen, et al. (1980). "Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei." *Cell* **20**(1): 55-64.
- Allis, C. D., L. G. Chicoine, et al. (1985). "Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetrahymena*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 8048-8052.
- Almouzni, G. and M. Méchali (1988). "Xenopus egg extracts: a model system for chromatin replication." *Biochim Biophys Acta* **951**(2-3): 443-450.
- Annunziato, A. T. (2011). "Assembling chromatin: The long and winding road." *Biochim Biophys Acta*.
- Annunziato, A. T. and J. C. Hansen (2000). "Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures." *Gene Expr* **9**(1-2): 37-61.
- Annunziato, A. T., R. K. Schindler, et al. (1981). "Dual nature of newly replicated chromatin. Evidence for nucleosomal and non-nucleosomal DNA at the site of native replication forks." *J Biol Chem* **256**(22): 11880-11886.
- Annunziato, A. T. and R. L. Seale (1983). "Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin." *J Biol Chem* **258**(20): 12675-12684.
- Arents, G., R. W. Burlingame, et al. (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10148-10152.
- Avery, O. T., C. M. Macleod, et al. (1944). "STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III." *J Exp Med* **79**(2): 137-158.
- Baldauf, S. L. and W. F. Doolittle (1997). "Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 12007-12012.
- Barman, H. K., Y. Takami, et al. (2006). "Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells." *Biochem Biophys Res Commun* **345**(4): 1547-1557.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, 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 U S A* **95**(24): 14173-14178.
- Belotserkovskaya, R., S. Oh, et al. (2003). "FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration." *Science* **301**(5636): 1090-1093.
- Benson, L. J., Y. Gu, et al. (2006). "Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange." *J Biol Chem* **281**(14): 9287-9296.

- Benson, L. J., J. A. Phillips, et al. (2007). "Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair." J Biol Chem **282**(2): 836-842.
- Blackwell, J. S., S. T. Wilkinson, et al. (2007). "Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import." J Biol Chem **282**(28): 20142-20150.
- Boggs, B. A., C. D. Allis, et al. (2000). "Immunofluorescent studies of human chromosomes with antibodies against phosphorylated H1 histone." Chromosoma **108**(8): 485-490.
- Bradbury, E. M., R. J. Inglis, et al. (1974). "Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation." Nature **247**(439): 257-261.
- Bradbury, E. M., R. J. Inglis, et al. (1974). "Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes." Nature **249**(457): 553-556.
- Bradbury, E. M., R. J. Inglis, et al. (1973). "Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation." Eur J Biochem **33**(1): 131-139.
- Brand, M., S. Rampalli, et al. (2008). "Analysis of epigenetic modifications of chromatin at specific gene loci by native chromatin immunoprecipitation of nucleosomes isolated using hydroxyapatite chromatography." Nat Protoc **3**(3): 398-409.
- Braun, R., C. Mittermayer, et al. (1965). "Sequential temporal replication of DNA in *Physarum polycephalum*." Proc Natl Acad Sci U S A **53**(5): 924-931.
- Böhm, L., G. Briand, et al. (1981). "Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4." Eur J Biochem **119**(1): 67-74.
- Böhm, L., G. Briand, et al. (1982). "Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of limit peptides from histone H2B." Eur J Biochem **123**(2): 299-303.
- Camerini-Otero, R. D., B. Sollner-Webb, et al. (1976). "The organization of histones and DNA in chromatin: evidence for an arginine-rich histone kernel." Cell **8**(3): 333-347.
- Campos, E. I., J. Fillingham, et al. (2010). "The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4." Nat Struct Mol Biol **17**(11): 1343-1351.
- Carruthers, L. M., J. Bednar, et al. (1998). "Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding." Biochemistry **37**(42): 14776-14787.
- Chang, L., S. S. Loranger, et al. (1997). "Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells." Biochemistry **36**(3): 469-480.
- Cheung, P., C. D. Allis, et al. (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." Cell **103**(2): 263-271.
- Chicoine, L. G., R. Richman, et al. (1987). "A single histone acetyltransferase from *Tetrahymena macronuclei* catalyzes deposition-related acetylation of free histones and transcription-related acetylation of nucleosomal histones." J Cell Biol **105**(1): 127-135.
- Chicoine, L. G., I. G. Schulman, et al. (1986). "Nonrandom utilization of acetylation sites in histones isolated from *Tetrahymena*. Evidence for functionally distinct H4 acetylation sites." J Biol Chem **261**(3): 1071-1076.
- Chow, C. M., A. Georgiou, et al. (2005). "Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division." EMBO Rep **6**(4): 354-360.
- Cohen, S. N., A. C. Chang, et al. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-2114.

- Deng, Z., C. J. Chen, et al. (2003). "The CBP bromodomain and nucleosome targeting are required for Zta-directed nucleosome acetylation and transcription activation." Mol Cell Biol **23**(8): 2633-2644.
- Dhillon, N. and R. T. Kamakaka (2000). "A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR." Mol Cell **6**(4): 769-780.
- Dion, M. F., T. Kaplan, et al. (2007). "Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast." Science **315**(5817): 1405-1408.
- Dorigo, B., T. Schalch, et al. (2004). "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber." Science **306**(5701): 1571-1573.
- Drané, P., K. Ouararhni, et al. (2010). "The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3." Genes Dev **24**(12): 1253-1265.
- Duncan, E. M., T. L. Muratore-Schroeder, et al. (2008). "Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation." Cell **135**(2): 284-294.
- Dutnall, R. N., S. T. Tafrov, et al. (1998). "Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily." Cell **94**(4): 427-438.
- Ejlassi-Lassalette, A., E. Mocquard, et al. (2011). "H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo." Mol Biol Cell **22**(2): 245-255.
- English, C. M., M. W. Adkins, et al. (2006). "Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1." Cell **127**(3): 495-508.
- English, C. M., N. K. Maluf, et al. (2005). "ASF1 binds to a heterodimer of histones H3 and H4: a two-step mechanism for the assembly of the H3-H4 heterotetramer on DNA." Biochemistry **44**(42): 13673-13682.
- Everhart, S. E., H. W. Keller, et al. (2008). "Influence of bark pH on the occurrence and distribution of tree canopy myxomycete species." Mycologia **100**(2): 191-204.
- Fan, J. Y., D. Rangasamy, et al. (2004). "H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding." Mol Cell **16**(4): 655-661.
- Finch, J. T. and A. Klug (1976). "Solenoidal model for superstructure in chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(6): 1897-1901.
- Freeman, L., H. Kurumizaka, et al. (1996). "Functional domains for assembly of histones H3 and H4 into the chromatin of *Xenopus* embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12780-12785.
- Garcea, R. L. and B. M. Alberts (1980). "Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action." J Biol Chem **255**(23): 11454-11463.
- Gautier, T., D. W. Abbott, et al. (2004). "Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome." EMBO Rep **5**(7): 715-720.
- Germond, J. E., B. Hirt, et al. (1975). "Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1843-1847.
- Glowczewski, L., J. H. Waterborg, et al. (2004). "Yeast chromatin assembly complex 1 protein excludes nonacetylatable forms of histone H4 from chromatin and the nucleus." Mol Cell Biol **24**(23): 10180-10192.
- Goldberg, A. D., L. A. Banaszynski, et al. (2010). "Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions." Cell **140**(5): 678-691.
- Gordon, F., K. Luger, et al. (2005). "The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays." J Biol Chem **280**(40): 33701-33706.

- Goshima, G., T. Kiyomitsu, et al. (2003). "Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway." J Cell Biol **160**(1): 25-39.
- Govin, J., E. Escoffier, et al. (2007). "Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis." J Cell Biol **176**(3): 283-294.
- Green, C. M. and G. Almouzni (2002). "When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics." EMBO Rep **3**(1): 28-33.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-352.
- Gunjan, A. and A. Verreault (2003). "A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*." Cell **115**(5): 537-549.
- Guttes, E., V. R. Devi, et al. (1969). "Synchronization of mitosis in *Physarum polycephalum* by coalescence of postmitotic and premitotic plasmodial fragments." Experientia **25**(6): 615-616.
- GUTTES, E., S. GUTTES, et al. (1961). "Morphological observations on growth and differentiation of *Physarum polycephalum* grown in pure culture." Dev Biol **3**: 588-614.
- Guttes, S. and E. Guttes (1968). "Regulation of DNA replication in the nuclei of the slime mold *Physarum polycephalum*. Transplantation of nuclei by plasmodial coalescence." J Cell Biol **37**(3): 761-772.
- Halmer, L. and C. Gruss (1996). "Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication." Nucleic Acids Res **24**(8): 1420-1427.
- Hansen, J. C., C. Tse, et al. (1998). "Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye." Biochemistry **37**(51): 17637-17641.
- Happel, N. and D. Doenecke (2009). "Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function." Gene **431**(1-2): 1-12.
- Hayes, J. J. and A. P. Wolffe (1992). "Histones H2A/H2B inhibit the interaction of transcription factor IIIA with the *Xenopus borealis* somatic 5S RNA gene in a nucleosome." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1229-1233.
- Hayes, J. J. and A. P. Wolffe (1992). "The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA." Bioessays **14**(9): 597-603.
- Henzel, M. J., M. A. Lever, et al. (2004). "The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo." J Biol Chem **279**(19): 20028-20034.
- Hereford, L., S. Bromley, et al. (1982). "Periodic transcription of yeast histone genes." Cell **30**(1): 305-310.
- Hereford, L. M., M. A. Osley, et al. (1981). "Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA." Cell **24**(2): 367-375.
- Jackson, D. A. (1997). "Chromatin domains and nuclear compartments: establishing sites of gene expression in eukaryotic nuclei." Mol Biol Rep **24**(3): 209-220.
- Jackson, J. D., V. T. Falciano, et al. (1996). "A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*." Trends Biochem Sci **21**(12): 466-467.
- Jasencakova, Z. and A. Groth (2010). "Restoring chromatin after replication: how new and old histone marks come together." Semin Cell Dev Biol **21**(2): 231-237.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-1080.
- Jin, C. and G. Felsenfeld (2007). "Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z." Genes Dev **21**(12): 1519-1529.
- Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). "Histone variants: deviants?" Genes Dev **19**(3): 295-310.

- Kaufman, P. D., R. Kobayashi, et al. (1995). "The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication." *Cell* **81**(7): 1105-1114.
- Kayne, P. S., U. J. Kim, et al. (1988). "Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast." *Cell* **55**(1): 27-39.
- Kelly, T. J., S. Qin, et al. (2000). "Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7051-7058.
- Kireeva, M. L., W. Walter, et al. (2002). "Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription." *Mol Cell* **9**(3): 541-552.
- Kleff, S., E. D. Andrulis, et al. (1995). "Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase." *J Biol Chem* **270**(42): 24674-24677.
- Kornberg, R. D. and J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." *Science* **184**(139): 865-868.
- Kouzarides, T. (2007). "SnapShot: Histone-modifying enzymes." *Cell* **131**(4): 822.
- Kubbies, M. and G. Pierron (1983). "Mitotic cell cycle control in Physarum. Unprecedented insights via flow-cytometry." *Exp Cell Res* **149**(1): 57-67.
- Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**(6824): 116-120.
- Ladurner, A. G. (2003). "Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription." *Mol Cell* **12**(1): 1-3.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Leach, T. J., M. Mazzeo, et al. (2000). "Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* **275**(30): 23267-23272.
- Lee, D. Y., J. J. Hayes, et al. (1993). "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." *Cell* **72**(1): 73-84.
- Lenfant, F., R. K. Mann, et al. (1996). "All four core histone N-termini contain sequences required for the repression of basal transcription in yeast." *EMBO J* **15**(15): 3974-3985.
- Lewis, P. W., S. J. Elsaesser, et al. (2010). "Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(32): 14075-14080.
- Ling, X., T. A. Harkness, et al. (1996). "Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation." *Genes Dev* **10**(6): 686-699.
- Loidl, P. and P. Gröbner (1987). "Histone synthesis during the cell cycle of *Physarum polycephalum*. Synthesis of different histone species is not under a common regulatory control." *J Biol Chem* **262**(21): 10195-10199.
- Luger, K., A. W. Mäder, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Luger, K., T. J. Rechsteiner, et al. (1997). "Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria." *J Mol Biol* **272**(3): 301-311.
- Ma, X. J., Q. Lu, et al. (1996). "A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **10**(11): 1327-1340.
- Ma, X. J., J. Wu, et al. (1998). "Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6693-6698.

- Makowski, A. M., R. N. Dutnall, et al. (2001). "Effects of acetylation of histone H4 at lysines 8 and 16 on activity of the Hat1 histone acetyltransferase." J Biol Chem **276**(47): 43499-43502.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-162.
- Megee, P. C., B. A. Morgan, et al. (1990). "Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation." Science **247**(4944): 841-845.
- Meneghini, M. D., M. Wu, et al. (2003). "Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin." Cell **112**(5): 725-736.
- Mersfelder, E. L. and M. R. Parthun (2008). "Involvement of Hat1p (Kat1p) catalytic activity and subcellular localization in telomeric silencing." J Biol Chem **283**(43): 29060-29068.
- Mito, Y., J. G. Henikoff, et al. (2005). "Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns." Nat Genet **37**(10): 1090-1097.
- Mohberg, J. and H. P. Rusch (1969). "Isolation of the nuclear histones from the Myxomycete, *Physarum polycephalum*." Arch Biochem Biophys **134**(2): 577-589.
- Mosammaparast, N., C. S. Ewart, et al. (2002). "A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B." EMBO J **21**(23): 6527-6538.
- Mosammaparast, N., Y. Guo, et al. (2002). "Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast." J Biol Chem **277**(1): 862-868.
- Mosammaparast, N., K. R. Jackson, et al. (2001). "Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins." J Cell Biol **153**(2): 251-262.
- Mottahedeh, J. and R. Marsh (1998). "Characterization of 101-kDa transglutaminase from *Physarum polycephalum* and identification of LAV1-2 as substrate." J Biol Chem **273**(45): 29888-29895.
- Nothacker, K. D. and A. Hildebrandt (1988). "A method for isolation of nuclei containing undegraded RNA from RNAase-rich plasmodia of *Physarum polycephalum*." Biochim Biophys Acta **950**(3): 403-410.
- NYGAARD, O. F., S. GUTTES, et al. (1960). "Nucleic acid metabolism in a slime mold with synchronous mitosis." Biochim Biophys Acta **38**: 298-306.
- Olins, A. L. and D. E. Olins (1974). "Spheroid chromatin units (v bodies)." Science **183**(4122): 330-332.
- Oppenheim, A. and N. Katzir (1971). "Advancing the onset of mitosis by cell free preparations of *Physarum polycephalum*." Exp Cell Res **68**(1): 224-226.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, et al. (1975). "Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit." Cell **4**(4): 281-300.
- Parthun, M. R., J. Widom, et al. (1996). "The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism." Cell **87**(1): 85-94.
- Polach, K. J. and J. Widom (1995). "Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation." J Mol Biol **254**(2): 130-149.
- Polach, K. J. and J. Widom (1996). "A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites." J Mol Biol **258**(5): 800-812.
- Polo, S. E. and G. Almouzni (2006). "Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours." Curr Opin Genet Dev **16**(2): 104-111.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, et al. (2005). "Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance?" Cell Cycle **4**(4): 543-546.

- Prior, C. P., C. R. Cantor, et al. (1980). "Incorporation of exogenous pyrene-labeled histone into Physarum chromatin: a system for studying changes in nucleosomes assembled in vivo." *Cell* **20**(3): 597-608.
- Prior, C. P., C. R. Cantor, et al. (1983). "Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin." *Cell* **34**(3): 1033-1042.
- Qin, S. and M. R. Parthun (2006). "Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks." *Mol Cell Biol* **26**(9): 3649-3658.
- Rangasamy, D., L. Berven, et al. (2003). "Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development." *EMBO J* **22**(7): 1599-1607.
- Richmond, T. J. and C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." *Nature* **423**(6936): 145-150.
- Richmond, T. J., J. T. Finch, et al. (1984). "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution." *Nature* **311**(5986): 532-537.
- Robinson, P. J., L. Fairall, et al. (2006). "EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6506-6511.
- Robinson, P. J. and D. Rhodes (2006). "Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone." *Curr Opin Struct Biol* **16**(3): 336-343.
- Rogakou, E. P., C. Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* **146**(5): 905-916.
- Roque, A., I. Iloro, et al. (2005). "DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1." *J Biol Chem* **280**(37): 32141-32147.
- Rykowski, M. C., J. W. Wallis, et al. (1981). "Histone H2B subtypes are dispensable during the yeast cell cycle." *Cell* **25**(2): 477-487.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Schalch, T., S. Duda, et al. (2005). "X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre." *Nature* **436**(7047): 138-141.
- Schuster, T., M. Han, et al. (1986). "Yeast histone H2A and H2B amino termini have interchangeable functions." *Cell* **45**(3): 445-451.
- Schwartz, B. E. and K. Ahmad (2005). "Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3." *Genes Dev* **19**(7): 804-814.
- Shen, X. and M. A. Gorovsky (1996). "Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo." *Cell* **86**(3): 475-483.
- Shibahara, K., A. Verreault, et al. (2000). "The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7766-7771.
- Simpson, R. T. (1978). "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones." *Biochemistry* **17**(25): 5524-5531.
- Singh, R. K., M. H. Kabbaj, et al. (2009). "Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis." *Nat Cell Biol* **11**(8): 925-933.
- Smerdon, M. J. and M. W. Lieberman (1978). "Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(9): 4238-4241.
- Smith, S. and B. Stillman (1989). "Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro." *Cell* **58**(1): 15-25.

- Smith, S. and B. Stillman (1991). "Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro." EMBO J **10**(4): 971-980.
- Sobel, R. E., R. G. Cook, et al. (1995). "Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1237-1241.
- Sollner-Webb, B., R. D. Camerini-Otero, et al. (1976). "Chromatin structure as probed by nucleases and proteases: evidence for the central role of histones H3 and H4." Cell **9**(1): 179-193.
- Sondermann, H., S. M. Soisson, et al. (2003). "Tandem histone folds in the structure of the N-terminal segment of the ras activator Son of Sevenless." Structure **11**(12): 1583-1593.
- Stillman, B. (1986). "Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro." Cell **45**(4): 555-565.
- Stoler, S., K. C. Keith, et al. (1995). "A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis." Genes Dev **9**(5): 573-586.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.
- Syed, S. H., M. Boulard, et al. (2009). "The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome." Nucleic Acids Res **37**(14): 4684-4695.
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, et al. (2004). "Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis." Cell **116**(1): 51-61.
- Thiriet, C. (2004). "Analysis of chromatin assembled in vivo using exogenous histones in *Physarum polycephalum*." Methods **33**(1): 86-92.
- Thiriet, C. and P. Albert (1995). "Rapid and effective western blotting of histones from acid-urea-Triton and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels: two different approaches depending on the subsequent qualitative or quantitative analysis." Electrophoresis **16**(3): 357-361.
- Thiriet, C. and J. Hayes (2001). "A novel labeling technique reveals a function for histone H2A/H2B dimer tail domains in chromatin assembly in vivo." Genes Dev **15**(16): 2048-2053.
- Thiriet, C. and J. Hayes (2001). "Assembly into chromatin and subtype-specific transcriptional effects of exogenous linker histones directly introduced into a living *Physarum* cell." J Cell Sci **114**(Pt 5): 965-973.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (1998). "Functionally relevant histone-DNA interactions extend beyond the classically defined nucleosome core region." J Biol Chem **273**(33): 21352-21358.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (1999). "Histone proteins in vivo: cell-cycle-dependent physiological effects of exogenous linker histones incorporated into *Physarum polycephalum*." Methods **17**(2): 140-150.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (2005). "Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair." Mol Cell **18**(6): 617-622.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (2005). "Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo." Genes Dev **19**(6): 677-682.
- Thiriet, C. and J. J. Hayes (2009). "Linker histone phosphorylation regulates global timing of replication origin firing." J Biol Chem **284**(5): 2823-2829.
- Thoma, F., T. Koller, et al. (1979). "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 403-427.

- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Van Holde, K. E. (1989). Chromatin. New York, N.Y., Springer.
- Vaquero, A., A. Loyola, et al. (2003). "The constantly changing face of chromatin." Sci Aging Knowledge Environ **2003**(14): RE4.
- Verreault, A., P. D. Kaufman, et al. (1996). "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4." Cell **87**(1): 95-104.
- Verreault, A., P. D. Kaufman, et al. (1998). "Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase." Curr Biol **8**(2): 96-108.
- Vettese-Dadey, M., P. A. Grant, et al. (1996). "Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro." EMBO J **15**(10): 2508-2518.
- Vitolo, J. M., C. Thiriet, et al. (2000). "The H3-H4 N-terminal tail domains are the primary mediators of transcription factor IIIA access to 5S DNA within a nucleosome." Mol Cell Biol **20**(6): 2167-2175.
- Wallis, J. W., M. Rykowski, et al. (1983). "Yeast histone H2B containing large amino terminus deletions can function in vivo." Cell **35**(3 Pt 2): 711-719.
- Wang, X. and J. J. Hayes (2008). "Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure." Mol Cell Biol **28**(1): 227-236.
- Warburton, P. E., C. A. Cooke, et al. (1997). "Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres." Curr Biol **7**(11): 901-904.
- Waterborg, J. H. and H. R. Matthews (1984). "Patterns of histone acetylation in Physarum polycephalum. H2A and H2B acetylation is functionally distinct from H3 and H4 acetylation." Eur J Biochem **142**(2): 329-335.
- Wilhelm, M. L., B. Toublan, et al. (1988). "Histone H4 mRNA is stored as a small cytoplasmic RNP during the G2 phase in Physarum polycephalum." Biochem Biophys Res Commun **153**(1): 162-171.
- Wilhelm, M. L., B. Toublan, et al. (1984). "Histone H4 gene is transcribed in S phase but also late in G(2) phase in Physarum polycephalum." EMBO J **3**(11): 2659-2662.
- Wirbelauer, C., O. Bell, et al. (2005). "Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias." Genes Dev **19**(15): 1761-1766.
- Wolffe, A. P. and S. Dimitrov (1993). "Histone-modulated gene activity: developmental implications." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **3**(3): 167-191.
- Wu, R. S. and W. M. Bonner (1981). "Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells." Cell **27**(2 Pt 1): 321-330.
- Yang, Z., C. Zheng, et al. (2005). "The core histone N-terminal tail domains negatively regulate binding of transcription factor IIIA to a nucleosome containing a 5S RNA gene via a novel mechanism." Mol Cell Biol **25**(1): 241-249.
- Zellweger, A. and R. Braun (1971). "RNA of Physarum. II. Template replication and transcription in the mitotic cycle." Exp Cell Res **65**(2): 424-432.
- Zlatanova, J., P. Caiafa, et al. (2000). "Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation." FASEB J **14**(12): 1697-1704.