

JULIE MONNET SAKSOUK

**Structure tridimensionnelle du complexe histone  
acétyltransférase NuA4 (*S.cerevisiae*)**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

## **Résumé**

Chez *S.cerevisiae*, NuA4 est un complexe Histone acétyltransférase (HAT) de 1,3 MDa contenant 13 sous unités. Esa1, seule HAT essentielle chez la levure, est la sous-unité catalytique qui acétyle les histones H4 et H2A et une des six protéines essentielles du complexe. De plus, six protéines sont présentes dans d'autres complexes de modification (SAGA, Sin3/Rpd3) et de remodelage ATP- dépendant de la chromatine (Ino80 et Swr1) et deux sous-groupes ont été identifiés comme ayant une activité cellulaire indépendante et distincte de NuA4 (PiccoloNuA4 et le trimère Eaf5/7/3). Cette organisation modulaire de NuA4 correspond aux multiples besoins de recrutements et de régulation d'Esa1 par la cellule lors des événements de réparation, de transcription et de réplication de la chromatine. Chez l'humain, le complexe Tip60 est l'orthologue de NuA4 et regroupe les activités de modification de la chromatine de NuA4 et de Swr1. L'organisation spatiale de NuA4 présente donc beaucoup d'intérêt. Au sein du laboratoire du professeur Jacques Côté, je concentre mon travail sur la production et la purification du complexe NuA4. Avec nos échantillons hautement purifiés, les techniques d'analyse par microscopie électronique (EM) et de reconstitution informatique, réalisées par nos collaborateurs Johnathan Chittuluru et Francisco Asturias, permettent, avec une forte résolution, de visualiser le complexe en 3D. Les atouts majeurs associés à cette technique sont aussi de visualiser les interactions du complexe avec un nucléosome et de localiser les sous-unités dans le complexe (par délétion ou étiquetage). Dès lors, ces résultats apportent des indications pertinentes sur NuA4 et ces différents modules qui par recrutement ou interaction directe avec les histones participent à la régulation dynamique de la chromatine.

## ***Avant-propos***

Arrivée à Québec, j'ai découvert, entre autres, l'accueil et l'amabilité québécoise, mais aussi un système d'étude universitaire performant et attractif. J'ai donc entrepris de réaliser une maîtrise à l'Université Laval.

Le professeur Jacques Côté et son équipe multiculturelle m'ont apporté soutien et conseils pendant ces deux années. Nous avons aussi partagé ensemble des soirées chaleureuses. De plus, le Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec possède des locaux, des équipements et une organisation très performante et agréable.

Je remercie Michel Vincent et Jacques Landry, tous deux chargés de la direction des étudiants de deuxième et troisième cycle de la faculté de médecine. Ils ont accepté ma candidature et m'ont permis de continuer ma maîtrise malgré des diplômes français non universitaires.

Je remercie Myriam, qui a débuté sa maîtrise en même temps que moi au laboratoire et m'a permis de retrouver le rythme universitaire.

Je remercie Vassilia, Nikita et Dorine et l'ensemble des membres du laboratoire pour les discussions que nous avons partagées et les connaissances qu'ils m'ont apportées.

Je remercie Patricia, Rhéa, Olivier et Valérie pour leur aide concernant le fonctionnement du laboratoire et de manière générale, la vie à Québec.

Je remercie Altaf et Nehmé pour m'avoir aidé à réaliser ce projet aussi bien sur les techniques que sur la théorie. Ils ont toujours pris de leur temps pour répondre à mes questions et m'ont encouragée, notamment en me signalant des publications d'intérêt.

Je remercie Jacques Côté pour sa présence au sein de l'équipe, sa patience d'enseignant à nous transmettre des connaissances théoriques et pratiques et sa clairvoyance sur la réalisation du projet. Je le remercie aussi pour sa compréhension vis-à-vis de nos vies et ambitions personnelles.

À Nehmé, Mahdi et Soukaïna

## **Table des matières**

Résumé.....	p.I
Avant-propos .....	p.II
Dédicace.....	p.III
Table des matières.....	p.IV
Liste des abréviations.....	p.VII
Liste des tableaux.....	p.XI
Liste des figures.....	p.XII
Chapitre1 : Introduction.....	p.1
1.1 La chromatine.....	p.2
1.1.1 Structure et fonction.....	p.2
1.1.2 Les histones canoniques, variants et chaperones d’histones chez la Levure.....	p.3
1.1.2.1 Histones et variants.....	p.3
1.1.2.2 Les chaperons d’histones.....	p.5
1.1.3 Dynamique et modifications des histones au sein de la chromatine.....	p.5
1.1.3.1 Le remodelage de la chromatine.....	p.5
1.1.3.2 Les modifications post-traductionnelles d’histones.....	p.7
a. Acétylation des histones.....	p.8
b. Méthylation des histones.....	p.11
c. Phosphorylation des histones.....	p.11
d. Ubiquitination des histones.....	p.11
1.2 Le complexe histone acétyltransférase NuA4.....	p.12
1.2.1 Organisation en modules de NuA4 et fonctions associées.....	p.13
1.2.1.1 Eaf1 (Esa1 associated factor 1), la plateforme du complexe.....	p.15
1.2.1.2 Tra1, membre de la famille des (PI3K)K.....	p.15
1.2.1.3 PiccoloNuA4.....	p.16
1.2.1.4 Le module commun aux complexes de remodelage de la famille INO80.....	p.17
- Act1/Arp4.....	p.17
- Eaf2/Yaf9.....	p.17
1.2.1.5 Le trimère.....	p.18
1.2.2 Fonctions de NuA4.....	p.20
1.2.2.1 Transcription.....	p.20
1.2.2.2 Réparation.....	p.20
1.2.2.3 Autres fonctions.....	p.21
1.2.3 Le complexe Tip60, orthologue de NuA4 chez l’humain.....	p.21

1.3 Intérêt de la structure tridimensionnelle de NuA4	p.23
Chapitre2 : Matériel et méthodes	p.24
2.1 Souches de levures	p.25
2.2 Techniques de purification de complexe protéique	p.25
2.3 Techniques d'analyse des protéines	p.28
2.3.1 Essais HAT	p.28
2.3.2 Coloration à l'argent	p.28
2.4 Cryo-microscopie électronique	p.29
Chapitre 3 : Résultats	p.32
3.1 Structure tridimensionnelle de NuA4 précédemment obtenue	p.33
3.2 Résultats obtenus sur la structure de NuA4 et la localisation des modules	p.38
3.2.1 Analyse de la structure bidimensionnelle de NuA4	p.39
3.2.2 Analyse de la localisation du trimère Eaf5/7/3	p.42
3.2.3 Localisation des sous-unités Tra1, Eaf1 et du module piccoloNuA4 (Epl1)	p.43
3.2.4 Localisation du module commun au complexe de remodelage de la famille INO80 (Eaf2/Yaf9/Arp4/Act1)	p.44
Chapitre 4 : Discussion, conclusion et perspective	p.45
4.1 Discussion	p.46
4.2 Conclusion et perspective	p.49
Bibliographie	p.51

## Liste des abréviations

$\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  : microcuries par microlitres  
 $\mu\text{g}$  : microgrammes  
 $\mu\text{l}$  : microlitres  
 $\mu\text{M}$  : micromolaire  
 $^3\text{H}$  : Tritium  
Ac: acétylation  
Acétyl CoA: Acétyl Co enzyme A  
Act1: actin 1  
ADN: acide désoxyribonucléique  
ADP: adénosine diphosphate  
AF-9: ALL1 fused gene from chromosome 9  
 $\text{AgNO}_3$  : nitrate d'argent  
ARN : acide ribonucléique  
Arp: actin related protein  
Asf1: anti-silencing function  
ASTRA: assembly of Tel, Rvb and Atm-like kinase  
ATM: ataxia telangiectasia mutated  
ATP: adénosine triphosphate  
ATR: ATM related  
CAF1: chromatin assembly factor 1  
CenH3: l'histone variant centromérique H3  
Chd1: chromodomain helicase DNA binding 1  
ChIP: chromatin immunoprécipitation  
CK2: casein kinase 2  
CPT: camptothécine  
Cryo-EM: microscopie électronique cryogénique  
CSE4: chromosome segregation 4  
CTD: C terminal domain  
Ctk1: C terminal domain kinase 1  
DMAP1: DNMT1 assoiated protein 1  
DNA.R: réparation d'ADN  
DNMT1: DNA methyltransférase 1  
Dot1: disruptor of telomeric silencing 1  
DTT: dithiothréitol  
E(Pc): enhancer of polycomb  
Eaf: Esa1 assoiated factor  
Elp3: Elongator protein 3  
EM: microscopie électronique  
Epl1: Enhancer of polycomb like 1  
Esa1: essential SAS2-related acetyltransférase 1  
FPLC: Fast Flow Purification Liquide Chromatography  
Gcn5: general control nonderepressible 5  
GNAT : Gcn5 N acetyltransférase related

GS : stabilité du génome  
 H: déposition d'histones  
 HAT: histone acetyltransferase  
 Hat1: histone acetyltransferase 1  
 HDAC: histone désacétylase  
 HIRA: histone cell cycle regulation defective homolog A  
 HML: homothallic left  
 HMR: homothallic right  
 HMT: histone methyltransferase  
 Hos: Hda one similarity  
 HP1: heterochromatin protein 1  
 Hpa2: histone and other protein acetyltransferase 2  
 HPC: histone periodic control  
 HPLC: high pressure liquid chromagraphy  
 HSA: helicase SANT associated  
 Hst2: homolog of sir two 2  
 HU: hydroxyurée  
 IgG: immunoglobulines G  
 ING: inhibitor of growth  
 Ino80: inositol 80  
 ISWI: imitation SWI/SNF  
 K : lysine  
 KMT : lysines méthyltransferase  
 MDa : méga dalton  
 Me : groupement méthyl  
 Mec : mitosis entry checkpoint  
 mg/ml : milligrammes par millilitres  
 ml : millilitres  
 mM : millimolaire  
 MMS : methyl methane sulfonate  
 MYST : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et TIP60  
 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium  
 NaCl : chlorure de sodium  
 NAD: nicotinamide adenine dinucleotide  
 NAP1: nucleosome assembly protein 1  
 NCP: nucléosome core particle  
 NuA3: nucleosome acetyltransferase of H3  
 NuA4: nucleosome acetyltransferase of H4  
 P: phosphorylation  
 pH: potentiel hydrogène  
 PHD: plant homeodomain  
 (PI3K)K: phosphatidyinositol 3 kinase related kinase  
 PMSF : phénylméthylsulfonyl fluoride  
 PRMT : protéines arginine méthyltransferase  
 R: arginine  
 Rad: radiation

Rpm: rotation par minutes  
 RSC: remodel the structure of chromatin  
 S : sérine  
 SAGA : Spt, Ada, Gcn5 et acetyltransférase  
 SANT : Swi3, Ada2, N-Cor et TFIIB  
 Sas: something about silencing  
 Set: su(var), enhancer of zeste, trithorax  
 Sin3: swi-independent 3  
 Sir: silent information regulator protein  
 SNF: sucrose non fermentation  
 Spt: suppressor of Ty  
 Sth1: Snf2 (two) homolog 1  
 Swc4: swr complex 4  
 SWI: mating type switching  
 Swr1: Swi2/Snf2-related ATPase 1  
 T : thréonine  
 TA : activation de la transcription  
 TAF: TBP associated factor  
 TAP: tandem affinity purification  
 TBP : TATA box binding protein  
 TE : élongation de transcription  
 Tell : telomere maintenance 1  
 TEV : tobacco etch virus  
 TIP60 : Tat interacting protein (60kDa)  
 TR : régulation de la transcription  
 Tra1 : yeast homolog of TRRAP1  
 TS : mise en silence de la transcription  
 Ts : thermosensible  
 TSA : trichostatine A  
 U/ml : unités par millilitres  
 Ub: groupement ubiquitin  
 Ubp8: ubiquitin specific protease 8  
 WT: wild type  
 Yaf9: yeast AF-9  
 Yng: yeast homolog of mammalian ING1  
 ZnCl<sub>2</sub> : chlorure de zinc

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: HAT et HDAC	p.10
Tableau 2 : les sous-unités de NuA4	p.14
Tableau 3 : Souches de levures	p.25

## **Liste des figures**

Figure1 : Structure d'un nucléosome (tiré de (Luger et al., 1997))	p.2
Figure2: Mode de remodelage des nucléosomes. Les complexes de remodelages permettent l'accès à la chromatine par des déplacements d'histones (sliding), leur éviction (ejection) et l'échange de dimères (dimer replacements) (tiré de(Cairns, 2007)).	p.6
Figure3 : Présentation schématique des domaines conservés des différentes classes des ATPases de la famille SF2 (modifié de(Tsukiyama, 2002)).	p.6
Figure4 : Modifications d'histones chez la levure. Les parties globulaires des histones sont représentées par des hexagones. Les séquences N-terminales et C-terminales sont montrées. Les nombres en- dessous des résidus indiquent leur position dans la séquence. Les sites de modifications connus sont indiqués avec le code couleur suivant : violet/Ac, bleu/Me, rouge/P, vert/Ub. Plusieurs enzymes responsables des modifications (ovale)/ dé modifications (rectangle) sont présentes (Krebs, 2007).	p.8
Figure 5 : Représentation schématique de NuA4 à partir de données biochimiques.	p.13
Figure 6: Résumé schématique des fonctions connues associées aux modules du complexe NuA4.	p.19
Figure 7: Schéma des trois complexes NuA4, SWR1 et Tip60 (Auger et al., 2008)	p.22
Figure 8: Représentation schématique de la technique de purification TAP classique et avec séparation de taille; ainsi qu'un de mes résultats sur gel des fractions purifiées par taille contenant le complexe NuA4.	p.26

Figure 9 : a. Exemple de moyennage d'image bidimensionnelle. b. Micrographe obtenu avec un échantillon de complexe NuA4 par EM. c. Images moyennes obtenues par cryo-EM avec un échantillon de complexe NuA4. p.30

Figure 10 : Schéma de la technique de backprojection et un exemple comprenant 3 points dans l'espace. p.31

Figure 11: a. Gel SDS-PAGE 10% de la purification de NuA4 (M.C.) et b. Micrographe de NuA4 Epl1-TAP (M.C.). La majorité des particules ont la même forme et taille, plusieurs ont été soulignées avec des flèches rouges. p.33

Figure 12: (a) Particules individuelles de NuA4 Epl1-TAP (M.C.) et (b) Exemple d'image moyenne. p.34

Figure 13: Reconstitution tridimensionnelle de NuA4. p.35

Figure 14 : Interactions de NuA4 avec un nucléosome et localisation de piccoloNuA4. (a) Image moyenne de NuA4 Epl1 marqué par un anticorps. (b) Image moyenne de NuA4 lié à un nucléosome (NCP). (c) Image moyenne de NuA4 seul. (d) Projection de la structure 3D de NuA4 qui semble la plus proche de l'orientation majoritaire de NuA4 en microscopie. (e) Vue du volume de NuA4 sous le même angle de projection. p.36

Figure 15 : Localisation possible de Piccolo dans la structure de NuA4. (a) Deux protrusions de la structure de NuA4 dans la zone identifiée par interaction avec un NCP et un marquage AC-Epl1. (b) Schéma de piccoloNuA4 obtenu à partir de données biochimiques. (c) et (d) Localisations possibles de la structure au rayon X de Esa1 dans la reconstitution tridimensionnelle de NuA4 par cryo-EM. p.37

Figure 16 : Analyse par cryo-EM du complexe piccoloNuA4-NCP. La structure au rayon X du NCP (solide et multicolore) est localisée dans le volume de la structure 3D piccoloNuA4-NCP obtenue de l'analyse de 7500 particules. Vues dans l'axe dyad du NCP (a) et à une rotation 90° dans le plan de la page (b). p.37

Figure 17 : Analyse sur gel SDS-PAGE coloré à l'argent (a) et par microscopie électronique (b) du complexe NuA4 (Eaf1-TAP) purifié par la méthode TAP. p.38

Figure 18 : Gels SDS-PAGE 10% (a) et 18% (b) colorés à l'argent de l'échantillon purifié (fractions 20, 21 et 22) et concentré NuA4 Epl1-TAP et de l'élution TEV déposée sur colonne de séparation par taille. Les sous-unités Eaf7 et Eaf6 ne sont pas visibles. Le gel 15% permet de mettre en évidence l'absence de nucléosome lié au complexe après purification. p.39

Figure 19 : Image moyenne obtenue à partir de l'analyse par microscopie électronique de la purification NuA4 Epl1-TAP après séparation de taille. Les trois orientations majoritaires A, B et C sont ici représentées. Elles ont toutes une forme pyramidale. L'orientation A présente la structure caractéristique en fourche retrouvée dans les

complexes de l'échantillon NuA4 précédemment analysé. L'orientation B présente aussi une structure caractéristique en fleur. p.40

Figure 20 : Deux gels SDS-PAGE 10% colorés à l'argent. Le gel A contient les fractions purifiées (19 à 23) par séparation de taille de NuA4 Eaf1-TAP. Le gel B contient un échantillon du complexe NuA4 purifié par Mike Carrozza. La figure C représente la forme schématique de NuA4 obtenues par analyses biochimiques du complexe. p.41

Figure 21 : Localisation du trimère Eaf5/7/3. a. Gels SDS-PAGE 10% des complexes NuA4 purifiés avec séparation de taille sans le trimère (Tap Epl1 $\Delta$ eaf5) et NuA4 avec la sous-unité Eaf5-TAP. b. Gel SDS-PAGE 10% du complexe NuA4 sans le trimère (Tap Epl1 $\Delta$ eaf5) sans séparation de taille et image moyenne obtenue par cryo-EM c. Images moyennes obtenues par cryo-EM du complexe NuA4 (a) sans le trimère Eaf5/7/3. p.42

Figure 22 : a. Gels SDS-PAGE 10% et gradient 4%-12% des complexes NuA4 purifiés avec séparation de taille. b. La représentation schématique de NuA4 obtenues par analyses biochimiques du complexe. c. Structure tridimensionnelle annotée. p.43

Figure 23 : Images moyennes des orientations majoritaires du complexe NuA4 Tra1-myc (a. et b. Orientation « structure en fourche ». c. et d. Orientation « structure en fleur »). p.44

Figure 24 : Gel SDS-PAGE colorés à l'argent des complexes Swr1 et NuA4 Arp4-HA purifiés. p.44

Figure 25 : Comparaison des images de microscopie électroniques obtenues avec les complexes NuA4 (1,3 MDa, images b. et c.) et SAGA (1,8 MDa, image a.), contenant tous deux la sous-unité Tra1. p.47

# **Chapitre 1 : INTRODUCTION**

## 1.1 La chromatine

### 1.1.1 Structure et fonction

L'unité de base du compactage de la chromatine est le nucléosome (Figure 1). Le nucléosome est composé d'un hétérotétramère d'histones (H3-H4)<sub>2</sub> central (en rouge et jaune dans la figure 1) et de deux hétérodimères d'histones H2A- H2B (en bleu et vert) venant s'associer de chaque côté du tétramère, et de l'ADN s'enroulant autour de ces 8 protéines sur 146pb, en réalisant 1,7 fois le tour de l'octamère (Luger et al., 1997).

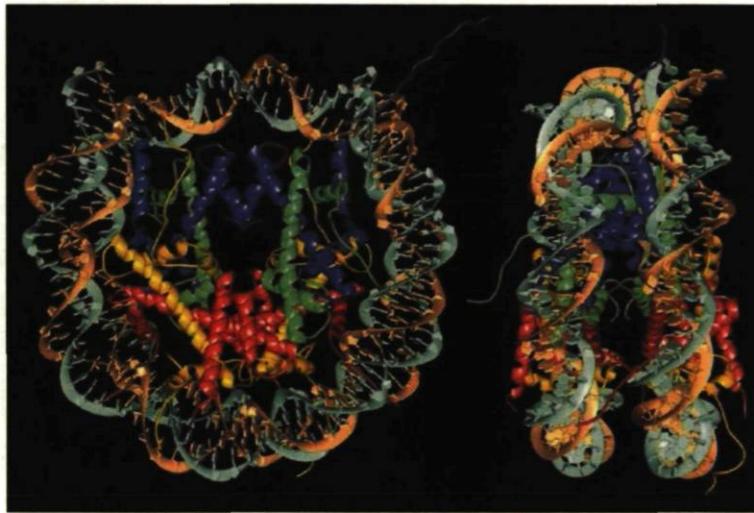


Figure1 : Structure d'un nucléosome (tiré de (Luger et al., 1997)).

L'histone H1 interagit avec le fragment d'ADN situé entre chaque nucléosome et apporte un niveau de compaction supplémentaire. Les autres niveaux de compaction de l'ADN menant les chromosomes à l'état métaphasique sont moins bien définis et plus sujets à controverses. Les complexes cohésines et condensines (SMC : structural maintenance of chromosome) sont essentielles au niveau de compaction maximale ou métaphasique des chromosomes, pour la cohésion des chromatides sœurs (Gondor and Ohlsson, 2008)

Globalement, la chromatine est divisée en trois niveaux de condensations en dehors de la phase M :

-L'euchromatine, qui correspond aux régions transcriptionnellement actives

-L'hétérochromatine constitutive, qui correspond aux régions transcriptionnellement inactives (les télomères et centromères).

-L'hétérochromatine facultative, qui correspond aux régions transcriptionnellement inactive pouvant être activées, contenant des gènes susceptibles d'être exprimés.

La fonction de la chromatine est de permettre l'organisation et la régulation, spatiale et temporelle, de l'ADN nucléaire. La chromatine est donc essentielle à la stabilité génomique, à la régulation de l'expression des gènes ou à l'hyper condensation pour la mitose. Parmi les éléments de bases qui vont moduler la structure de la chromatine, les variants d'histones, les chaperones d'histones, le remodelage ATP-dépendant de la chromatine et les modifications post-traductionnelles d'histones (tel que l'acétylation des histones par le complexe NuA4) sont très étudiés.

### 1.1.2 Les histones canoniques, variants et chaperones d'histones chez la Levure

Les histones sont des composants stables de la chromatine. Ils sont présents tout au long de la fibre d'ADN. Cependant, ils sont aussi à la base de la structure dynamique de la chromatine. Les nucléosomes peuvent inclure des variants d'histones. Les nucléosomes peuvent être déplacés, désassemblés et réassemblés, recyclés ou non, espacés ou condensés. De plus, les histones subissent des modifications post-traductionnelles qui vont permettre la liaison de protéines sur la chromatine et participent à l'état plus ou moins stable de la chromatine.

#### 1.1.2.1 Histones et variants

Les histones sont de petites protéines très basiques de 12 à 16 KDa contenant plus de 20% de lysines ou arginines. Les histones sont très conservées dans les différents organismes. Chacune des histones présente des structures secondaires centrales identiques « histone fold » qui permettent le contact avec l'ADN et des extrémités C- et N-terminales sans structure secondaire définie, extérieures au nucléosome et nommées « queues histones ». La plupart des organismes eucaryotes ont plusieurs copies des gènes « majeurs », codant

pour les histones canoniques, qui sont hautement similaires. Les gènes d'histones ont aussi des variants non alléliques qui ont des différences importantes avec les séquences primaires. Ces variants sont le plus souvent présents sous une seule copie. Plusieurs protéines variantes d'histones sont échangées avec les histones canoniques au cours du développement ou de la différenciation des cellules, ce qui suggère un rôle précis de ces protéines (Jin et al., 2005). Les variants d'histones, comme les histones, subissent des modifications post-traductionnelles qui modulent localement et temporellement la chromatine.

L'histone H4, une des protéines les plus conservées, n'a pas de variants connus.

L'histone H2A possède le plus de variants parmi les organismes supérieurs. Chez la levure, H2A est plus proche en séquence du variant H2AX (eucaryotes supérieurs). Le variant H2A.Z (codé par le gène HTZ1) a une séquence protéique C-terminal différente d'H2A. H2A.Z a un rôle positif dans la transcription (Hatch and Bonner, 1996; Li et al., 2005). Il est situé aux deux nucléosomes qui entourent le premier codon des gènes transcrits (Yuan et al., 2005). H2A.Z a aussi un rôle dans la délimitation de l'hétérochromatine chez la levure aux régions subtélomériques en bloquant la propagation des protéines Sir (silent information regulator protein (Meneghini et al., 2003). H2A.Z a aussi un rôle dans la réparation de l'ADN et la stabilité génomique (Kalocsay et al., 2009; Krogan et al., 2004; Pinto and Winston, 2000; Rangasamy et al., 2004).

L'histone H3 a deux variants majeurs nommés H3.3 et H3 centromérique (cenH3) (Ahmad and Henikoff, 2002; Warburton et al., 1997). CenH3 est une protéine essentielle qui est présente uniquement au centromère et permet la formation de la structure des kinétochores. H3.3 est exprimé tout au long du cycle cellulaire et co-localise avec les régions transcriptionnellement actives. Chez la levure, H3 est plus proche en séquence de H3.3 (eucaryotes supérieurs) (Ahmad and Henikoff, 2002).

L'histone H2B a peu de variants chez les eucaryotes et aucun chez la levure.

L'histone H1 (HHO1) ou « linker histone » a un grand nombre de variants chez les eucaryotes supérieurs. La levure ne possède qu'un seul gène codant pour H1, HHO1.

Les protéines ou complexes protéiques modifiant la chromatine en interagissant avec les histones sont de trois natures : Les chaperones d'histones, les complexes de modifications post-traductionnelles d'histones, les complexes de remodelages ATP-dépendant de la chromatine. Ces actions sont toutes nécessaires et coordonnées lors des événements majeurs de modifications de la chromatine comme la transcription, la réparation, la réplication de l'ADN.

### 1.1.2.2 Les chaperones d'histones

La formation de nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé en phase S est rapide et nécessite le transport des histones nouvellement synthétisées au noyau par des protéines chaperones ou complexes protéiques chaperones d'histone. De manière similaire, lors de la transcription des gènes, le recyclage des histones désassemblées en aval de la polymérase et réassemblées en amont est pris en charge par des chaperones d'histone. Les chaperones sont sélectivement porteuses de dimères (H2A-H2B) ou de tétramères (H3-H4)<sub>2</sub>. Le rôle de ces protéines, bien qu'essentiel à la formation de la chromatine est encore mal défini pour nombre d'entre elles (De Koning et al., 2007).

### 1.1.3 Dynamique et modifications des histones au sein de la chromatine

#### 1.1.3.1 Le remodelage de la chromatine

Les nucléosomes sont des composants dynamiques de la chromatine grâce à leur mouvement sur le long de la fibre d'ADN (figure 2) ; mouvement nécessaire à la fixation d'un complexe de polymérisation ou de réparation par exemple. Le déplacement, l'éviction des nucléosomes, ainsi que l'échange de dimère d'histones sur la chromatine sont catalysés par des complexes de remodelage ATP- dépendant de la famille SF2 (Superfamily2) (Eisen et al., 1995).

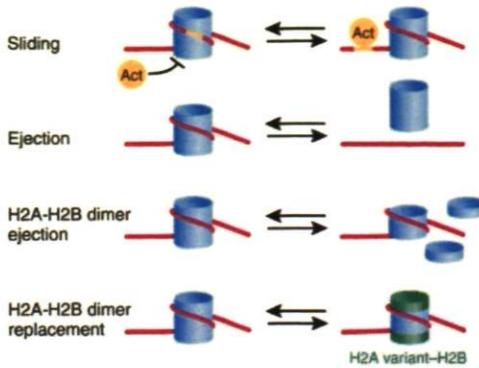


Figure2 : Mode de remodelage des nucléosomes. Les complexes de remodelages permettent l'accès à la chromatine par des déplacements d'histones (sliding), leur éviction (ejection) et l'échange de dimères (dimer remplacement) (tiré de(Cairns, 2007)).

Les complexes de remodelages ATP-dépendants ont pour sous-unité active une enzyme ATPase et se divisent en 4 sous-familles chez tous les eucaryotes suivant les 4 domaines ATPases (figure 3): SWI/SNF (mating type SWItching/Sucrose Non Fermenting), ISWI (Imitation of SWItch), INO (INOsitol) et CHD (Chromodomain Helicase/ATPase DNA binding protein). Ils vont être les acteurs de la mobilité des nucléosomes sur l'ADN (Bao and Shen, 2007b; Cairns, 2007). Ces complexes ont souvent une activité dépendante de la présence de modifications post-traductionnelles d'histones ou de chaperones d'histones. Pour certains d'entre eux, il a déjà été prouvé que la présence et l'acétylation des queues histones, notamment H4 ( acétylée par NuA4) était essentielle à leur activité (Ferreira et al., 2007).

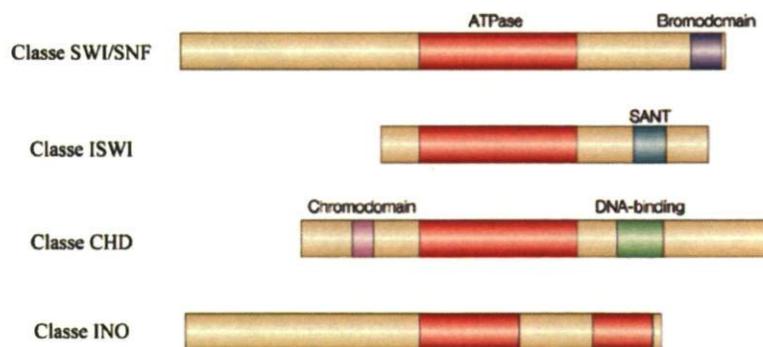


Figure3 : Présentation schématique des domaines conservés des différentes classes des ATPases de la famille SF2 (modifié de(Tsukiyama, 2002)).

Les complexes de la famille INO80, INO80 et SWR1, ont en commun un domaine de liaison aux hélicases ruvB-like, Rvb1 et Rvb2, coupant en deux leur domaine ATPase (figure3) et aussi les protéines Arp4 et Act1. Ces deux protéines (ainsi que Yaf9 et Eaf2 présents dans SWR1) sont aussi associées au complexe acétyltransférase NuA4. Leur étude et leur interaction avec NuA4 est en cours au laboratoire. INO80 et SWR1 sont impliqués dans la transcription, dans l'adaptation aux points de contrôle du cycle cellulaire et dans les processus de réparation de bris doubles brins d'ADN (Bao and Shen, 2007a; van Vugt et al., 2007). INO80 a un rôle important au niveau de la fourche de réplication de l'ADN (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2008). SWR1 est essentiel dans la déposition de l'histone variant HTZ1 (Mizuguchi et al., 2004; Wu et al., 2005; Wu et al., 2009).

#### 1.1.3.2 Les modifications post-traductionnelles d'histones

Les histones et leurs variants ont des parties globulaires (internes au nucléosome) et des queues C- terminales et N- terminales extranucléosomiques qui sont toutes soumises à des modifications post-traductionnelles. Cependant, elles sont majoritairement retrouvées au niveau des queues N-terminales extranucléosomiques (Figure 4). Acétylation (Ac), méthylation (Me), phosphorylation (P), ubiquitination (Ub), d'autres modifications et leurs opposés (déacétylation, déméthylation) sont ajoutées par des enzymes dites de modifications de la chromatine qui ont des spectres d'actions spécifiques. Ces modifications sont spécifiques aux résidus lysine (K/Ac-Me-Ub), arginine (R/Me) et serine/thréonine (S/P et T/P). Elles modulent la stabilité de la chromatine, l'accessibilité à l'ADN et procurent des surfaces d'interactions multiples pour des domaines spécifiques de facteurs nécessaires à la transcription, la réplication, la réparation ou la condensation de l'ADN. La plupart des modifications d'histones connues chez la levure sont présentées dans la figure 4. Les modifications d'histones sont combinées, dynamiques, leur addition ou soustraction suit une mesure temporelle précise. Elles forment une signature qui est appelée code des histones (Strahl and Allis, 2000).

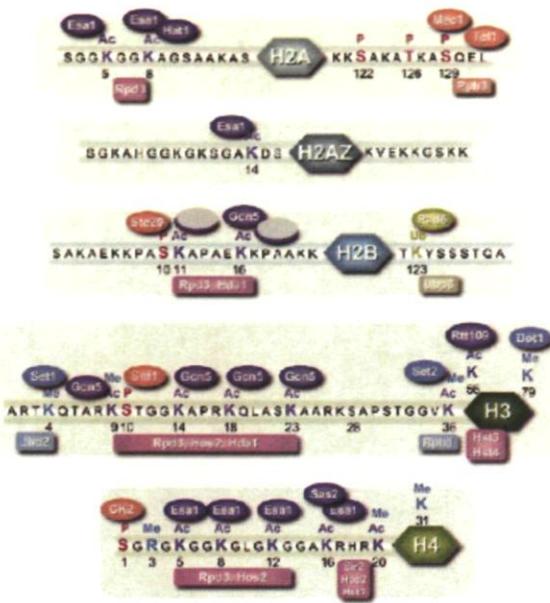


Figure4 : Modifications d’histones chez la levure. Les parties globulaires des histones sont représentées par des hexagones. Les séquences N-terminales et C-terminales sont montrées. Les nombres en- dessous des résidus indiquent leur position dans la séquence. Les sites de modifications connus sont indiqués avec le code couleur suivant : violet/Ac, bleu/Me, rouge/P, vert/Ub. Plusieurs enzymes responsables des modifications (ovale)/ dé modifications (rectangle) sont présentes (Krebs, 2007).

#### a. Acétylation des histones

L’acétylation des résidus lysines fut la première modification à être caractérisée et est la plus courante. Toutes les histones sont acétylées chez la levure. La neutralisation de la charge positive des lysines peut mener à la diminution des contacts avec l’ADN nucléosomique, avec les nucléosomes voisins, avec certaines protéines régulatrices de l’hétérochromatine et permet un état « relâché » ou « ouvert » de la chromatine. L’acétylation a aussi un rôle signalétique ; elle est reconnue par les protéines à bromodomaine (Zeng and Zhou, 2002). Le niveau d’acétylation délimite l’hétérochromatine facultative de l’euchromatine (Babiarz et al., 2006). L’acétylation des histones joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, la recombinaison, la réparation de l’ADN, la transcription et l’apoptose (Krebs, 2007).

Le tableau 1 présente l’ensemble des enzymes histones acétyltransférase (HAT) et histones déacétylases (HDAC) connues chez la levure (Allis et al., 2007).

Il existe deux familles d’enzymes histones acétyltransférase divisées selon leur domaine actif : les MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et TIP60) et les GNAT (Gcn5 N-Acetyltransférase related). Esa1, la sous-unité catalytique du complexe NuA4, est la seule

HAT essentielle chez la levure (Clarke et al., 1999).

Dans le chapitre suivant, nous parlerons en détail du complexe NuA4, contenant la sous-unité catalytique HAT Esa1 de la famille MYST.

Le complexe SAGA de la famille GNAT est le plus gros complexe HAT chez la levure et est un coactivateur de l'ARN polymérase II. La sous-unité Tra1 présente dans les complexes NuA4 et SAGA permet leur recrutement aux promoteurs de gènes spécifiques (Brown et al., 2001). Gcn5, la sous-unité catalytique de SAGA, acétylant les queues histones H2B et H3 et Esa1, la sous-unité catalytique de NuA4, acétylant les queues histones H2A et H4 collaborent à l'élongation de la transcription (Ginsburg et al., 2009; Mutiu et al., 2007).

Les HDAC peuvent être divisées en trois classes : classe I, II et III. Les classes I et II sont sensibles à l'inhibiteur de HDAC nommé trichostatin A (TSA) alors que la classe III ne l'est pas. La classe III a également besoin pour fonctionner de NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide) comme coenzyme. Les classes I et II sont définies par rapport à l'homologie existant entre deux HDAC de la levure *S. cerevisiae* : Rpd3 pour la classe I et Hda1 pour la classe II. Rpd3 et Hda1 sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de gènes différents.

Le complexe Rpd3(S) comprend la sous-unité Eaf3, aussi présente dans NuA4. Eaf3 est requise pour la régulation / localisation des activités HATs et HDACs de NuA4 et Rpd3(S) lors de la transcription et à l'inhibition de transcrits cryptiques des gènes (Carrozza et al., 2005).

La classe III est définie par l'homologie avec Sir2 (Silencing Regulatory Protein). Sir2 code pour une déacétylase impliquée dans la formation d'un état réprimé de la chromatine (hétérochromatine).

**Tableau 1: HAT et HDAC présents chez la levure**

Famille	Enzyme	Nomenclature	Complexe	Modification	Fonction
GNAT	Hat1	KAT1	HatB	H4K5,12	DNA.R ; H
	Gcn5	KAT2	SAGA/ADA/SLIK	H3 K9,14,18,23,36 H2B K16 Htz1 K14	TA ; DNA.R
	Elp3	KAT9	Elongator	H3	TE
	Hap2	KAT10	HAP2/3/4	H3K14 ; H4	TA
MYST	Esa1	KAT5	NuA4	H4 K5,8,12,16 H2A K5,8 Htz1 K14	TA ; DNA.R
	Sas3	KAT6	NuA3	H3 K14,23	TA ; TE ; réplication
	Sas2	KAT8	Sas	H4K16	DNA.R
	Rtt109	KAT11	Associé à Asf1 ou Vps75	H3K59 H3K9	GS ; DNA.R
	Taf1	KAT4	TFIID	H3>H4	TA
HDAC Class1	Hda1			H2BK11,16 H3K9,14,18,23	TR
	Hos1,2,3			H3K9,14,18,23	TR
HDAC Class2	Rpd3		Sin3/Rpd3 S et L	H2AK5,8 H2BK11,16 H3K9,14,18,23 H4K5,8,12	TR, TS
HDAC Class3  Sir family	Hst3,4			H3K56	Mise en silence des télomères, TS, répression de la mitose
	Sir2		Sir	H3K9,14 H4K16	Mise en silence des télomères

Stabilité du Génome (GS), Elongation de Transcription (TE), Activation de la Transcription (TA), Mise en Silence de la Transcription (TS), Régulation de la Transcription (TR), Déposition d'Histones (H), Réparation d'ADN (DNA.R).

#### b. Méthylation des histones

La mono-, di-, triméthylation des résidus lysines (K) et la mono-, diméthylation (symétrique et asymétrique) des résidus arginines (R) des histones sont des modifications plus complexes et considérées comme uniquement signalétiques. La méthylation des lysines 4 (set1) et 36 (set2) de l'histone H3 a un rôle connu dans l'activation de la transcription (Ng et al., 2003; Roguev et al., 2001; Strahl et al., 2002). Le chromodomaine d'Eaf3 lie l'histone H3 méthylée sur la lysine 36 et méthylée sur la lysine 4, spécificités modulées par la contribution des domaines PHD spécifiques des sous-unités Rco1 pour le complexe Rpd3(S) et Yng2 pour NuA4 (Li et al., 2007). La méthylation de lysine 9 de l'histone H3 est retrouvée dans l'hétérochromatine et la répression de la transcription (Sims et al., 2003).

#### c. Phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones est spécifique aux résidus sérine et thréonine. Elle est impliquée dans la reconnaissance (H2A S129P (Downs et al., 2000)) et la réparation (H4S1P (Utley et al., 2005)) des bris d'ADN et lors de l'activation transcriptionnelle (Krebs, 2007). Une même phosphorylation (H3S10P) peut se produire à des phases différentes du cycle cellulaire, par des enzymes kinases différentes (Snf1 et Aurora) et conduire à des réponses spécifiques différentes (activation transcriptionnelle et condensation des chromosomes mitotiques) (résumé dans (Berger, 2002; Johansen and Johansen, 2006; Prigent and Dimitrov, 2003)). Arp4, sous-unité présente dans les complexes NuA4, SWR1 et INO80, lie le variant d'histone H2AX phosphorylé,  $\gamma$ H2AX et permet leur recrutement aux sites de cassures d'ADN (Downs et al., 2004).

#### d. Ubiquitination des histones

La mono-ubiquitination du résidu lysine 123 du domaine Carboxy-terminal d'H2B est aujourd'hui connue pour avoir un rôle important pour la régulation transcriptionnelle des gènes actifs et silencieux et participe par trans-activation à la méthylation de l'histone H3 (K4 et K79) (Osley, 2006). Rad6 est une protéine identifiée pour son importance dans la réparation des bris d'ADN. Son activité d'ubiquitine ligase sur H2B K123 a mis en évidence de nouvelles fonctions pour cette protéine. La protéine Ubp8, composante du complexe histone acétyltransférase SAGA est responsable de la déubiquitination d'H2B

K123 (Weake and Workman, 2008).

Il est important de noter que ces enzymes ou complexes protéiques responsables de modifications post-transcriptionnelles sont de plus en plus identifiés comme ayant des substrats non-histones, bien que toujours liés à la régulation de la chromatine. Pour la plupart, les enzymes responsables de la phosphorylation ou déphosphorylation des histones, kinases et phosphatases avaient déjà été identifiées pour leurs fonctions sur d'autres substrats nucléaires.

Comme les protéines de remodelage de la chromatine à domaine ATPase du chapitre précédent, les enzymes de modification de la chromatine sont :

- Subdivisées en plusieurs familles selon la similarité de leur domaine actif.
- Associées à différents complexes protéiques, selon leur spécificité de recrutement.
- Associées parfois à une deuxième activité de modification des histones ou de remodelage de la chromatine dans un complexe protéique. Par exemple, le complexe SAGA comprend deux sous-unités catalytique Gcn5 (acétylation) et Ubp8 (déubiquitylation) (Henry et al., 2003) et le complexe humain Tip60 comprend une sous-unité p400/Domino (ATPase) et une sous-unité Tip60 (acétylation) (Auger et al., 2008).

## **1.2 Le complexe histone acétyltransférase NuA4**

Le complexe NuA4 a pour sous-unité catalytique Esa1 qui est la seule HAT essentielle chez *S. cerevisiae* (Clarke et al., 1999). Elle acétyle l'histone H4 sur les lysines 5, 8, 12 et l'histone H2A sur les lysines 4,7 ; le variant Htz1 sur la lysine 14 (Allard et al., 1999; Babiarz et al., 2006; Boudreault et al., 2003; Carmen et al., 2002; Millar et al., 2006). Des protéines non-histones sont aussi régulées par l'acétylation de NuA4 (Lin et al., 2009). Le complexe NuA4 (Nucleosome acetyltransferase of H4) est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes (Doyon and Cote, 2004), dans les processus de réparation de l'ADN (Doyon and Cote, 2004), dans la progression du cycle cellulaire

(Choy et al., 2001; Clarke et al., 1999) et dans la stabilité chromosomique (Babiarz et al., 2006; Lin et al., 2009). Analyser le complexe NuA4 en détaillant les sous-unités et modules du complexe, nous permettra de mieux comprendre ces différents rôles.

### 1.2.1 Organisation en modules de NuA4 et fonctions associées

NuA4 est un complexe de 1,3MDa comprenant 13 sous-unités (Allard et al., 1999) (figure 5 et tableau 2), dont 6 essentielles à la survie cellulaire (entourées en rouge dans la figure 5), et 3 autres ayant des phénotypes graves.

Des mutants de délétions totales ou partielles des sous-unités de NuA4 ont permis d'identifier les interactions protéine - protéine qui structurent le complexe. Ainsi les 13 protéines ont été incorporées à des modules qui tous se lient la sous-unité plateforme de NuA4 : Eaf1 (Auger et al., 2008).

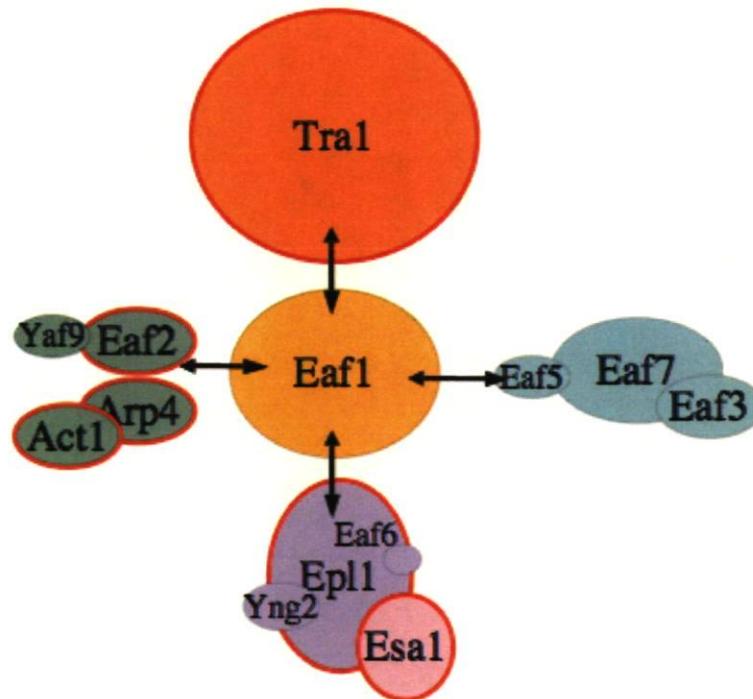


Figure5 : Représentation schématique de NuA4 à partir de données biochimiques.

Tableau 2 : les sous-unités de NuA4 (Doyon and Cote, 2004)

Protéine	Poids KDa	Phénotype du mutant (de délétion ou Ts)	Sensibilité aux drogues	Domaine protéique connu	Homologue humain	autres complexes
Tra1	437	Létal		PI3K, AID	TRRAP	SAGA/SLIK
Eaf1	125	Défauts de croissance, Perte de fragments chromosomiques	MMS, bénomyl, Rapamycine	SANT, HSA	P400/ Domino	
Epl1	105	Létal	MMS, CPT, Rapamycine	EPcA	EPC1/2	Piccolo NuA4
Eaf2/ Swc4	59	Létal	MMS, HU	SANT	DMAP1	SWR1
Arp4	54	Létal	MMS, HU, UV bénomyl	Actin related	BAF53	SWR1/ INO80
Esa1	55	Létal (Accumulation en G2/M)	MMS, CPT, Rapamycine	CHD, MYST HAT	Tip60	Piccolo NuA4
Eaf7	49	Viable	Formamide, caféine, Rapamycine		MRGBP	Trimère
Eaf3	47	Viable Transcrits cryptics	Rapamycine	CHD et CHD MRG	MRG15	Trimère Sin3/Rpd3
Act1	44	Létal			Actin	SWR1/ INO80
Yng2	37/36	Défauts de croissance	MMS, HU, UV, benomyl	PHD finger,	ING3	Piccolo NuA4
Eaf5	32	Viable	Formamide, caféine, Rapamycine			Trimère
Yaf9	32	Viable Perte de fragments chromosomiques	Bénomyl MMS, HU	YEATS	GAS41	SWR1
Eaf6	16	Viable			hEaf6	PicNuA4, NuA3

MMS : methyl methane sulfonate, HU : Hydroxyurée, CPT : camptothécine)

### 1.2.1.1 Eaf1 (Esa1 associated factor 1), la plateforme du complexe.

Eaf1 est la seule sous-unité unique à NuA4. Les résultats obtenus au laboratoire récemment publiés montrent son rôle de plateforme d'assemblage du complexe NuA4 (Auger et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Elle relie les différents sous-complexes présents de manière indépendante dans la cellule (piccolo NuA4 : Epl1, Yng2, Esa1, Eaf6 et le trimère Eaf5/7/3) ou modules présents dans d'autres complexes (Tra1 dans SAGA, Eaf2/Yaf9 dans SWR1, Arp4/ Act1 dans SWR1 et INO80). L'étude d'Eaf1 permet de différencier les rôles cellulaires attribués à NuA4 et à piccolo NuA4. Eaf1 est essentiel pour la transcription spécifique de certains gènes dont certains gènes ribosomiaux, pour une réponse cellulaire aux dommages à l'ADN et pour la répression télomérique. Eaf1 est aussi requis pour la progression normale du cycle cellulaire en mitose. Cependant, Eaf1 n'est pas requis pour l'acétylation globale de la chromatine, rôle attribué à piccolo NuA4 (Boudreault et al., 2003).

Eaf1 possède donc différents domaines qui régulent ses interactions avec les protéines du complexe. Son domaine SANT peut être motif protéique impliqué dans les interactions avec les queues histones, l'ADN et la protéine Tra1. Son domaine HSA est impliqué dans la liaison des protéines Arp4/Act1 et Eaf2/Yaf9.

### 1.2.1.2 Tra1, membre de la famille des (PI3K)K.

Tra1 représente à elle seule 1/3 de la masse du complexe. Elle s'associe au complexe grâce à Eaf1. Elle est aussi présente dans le complexe acetyltransférase SAGA dont la sous-unité catalytique Gcn5 acétyle les histones H3 et H2B. Tra1 fait partie de la famille des (PI3K)K (phosphatidylinositol 3 kinase related kinase). Les enzymes de la famille des PI3K régulent plusieurs voies de signalisations clés contrôlant des processus cellulaires vitaux, souvent impliqués dans la carcinogénèse. Tra1 possède des domaines connus :

- Un domaine AID pour interagir avec des facteurs transcriptionnels à domaines acides (en particulier de gènes de réponse au stress) (Brown et al., 2001).
- Un domaine PI3K inactif (Mutiu et al., 2007).

Des analyses de mutants de Tra1 lui confèrent un rôle au niveau de la réplication et de la conservation des télomères (Mutiu et al., 2007).

Très récemment, Tra1 a été associé à un nouveau complexe ASTRA (Assembly of Tel, Rvb and Atm-like kinase) comprenant Tel2 et les hélicases Rvb1/Rvb2. Ce qui rapproche Tra1 des PI3K nucléaires Tel1/Mec1 et l'associe au sentier de signalisation des dommages à l'ADN (Shevchenko et al., 2008).

### 1.2.1.3 Piccolo NuA4

PicNuA4 comprend 4 sous-unités. Esa1, Yng2, Eaf6 interagissent avec Epl1 qui lie Eaf1 (figure 5). L'acétylation globale de la chromatine est effectuée par piccolo (Boudreault et al., 2003), contrairement au complexe NuA4, qui serait responsable de l'acétylation ciblée.

Esa1 est la seule enzyme du complexe. Elle possède un domaine histone acétyltransférase MYST et un chromodomaine essentiel à son activité HAT (Selleck et al., 2005). Seule, Esa1 ne peut acétyler que les histones libres, mais au sein de piccolo, son substrat principal est la chromatine (Boudreault et al., 2003). La souche mutante thermosensible (Ts) d'Esa1 arrête son cycle cellulaire en G2/M dépendant du point de contrôle de réparation de l'ADN médié par Rad9 (Clarke et al., 1999)

Yng2 est homologue à la protéine humaine ING3, un suppresseur de tumeur impliqué dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Yng2 n'est pas un gène vital, mais il est essentiel à la croissance normale des cellules. Les cellules  $\Delta$ yng2 présentent une croissance très faible, sont plus grandes et ont de multiples bourgeonnements sans noyau (Nourani et al., 2001). Le domaine N-terminal de Yng2 est suffisant pour retrouver un phénotype sauvage et est essentiel à la reconnaissance et l'acétylation des nucléosomes (Selleck et al., 2005). Yng2 possède un domaine PHD en C-terminal, important pour l'activation transcriptionnelle-dépendante du recrutement de NuA4 (Choy et al., 2001; Nourani et al., 2001). La perte de Yng2 pour PiccoloNuA4 / NuA4 permettrait d'arrêter son activité HAT (Lin et al., 2008). Des expériences réalisées au laboratoire avaient déjà démontré que Yng2 était important pour l'activité du complexe NuA4 (Nourani et al., 2001). Yng2, Esa1, Eaf6 interagissent avec une large portion N-terminale d'Epl1, le domaine essentiel

Enhancer of Polycomb A (EPcA) qui est essentiel à l'activité d'acétylation d'Esal. Le domaine C-terminal d'Epl1 interagit avec Eaf1 (Boudreault et al., 2003).

Eaf6 est la sous-unité la plus petite de NuA4. Elle est aussi présente dans NuA3. Elle n'a pas de fonctions connues à ce jour. Des expériences réalisées au laboratoire tendent à penser qu'Eaf6 aurait un rôle dans la transcription. Plusieurs facteurs d'élongation et de transcriptions, notamment Msn2/4 pour les gènes de réponse au stress et déjà connus pour interagir avec NuA4 (Mitchell et al., 2008), sont présents dans une purification TAP-Eaf6.

#### 1.2.1.4 Le module commun aux complexes de remodelage de la famille INO80

Act1 et Arp4 interagissent avec le domaine HSA d'Eaf1 (ou de Swr1) et associent Eaf2 et Yaf9 au complexe (Auger et al., 2008; Szerlong et al., 2008). Ces quatre sous-unités sont rassemblées géographiquement, dans deux complexes, ce qui suggère une stratégie commune. Le fait que trois de ces quatre protéines soient essentielles, rend leur étude plus difficile. Ino80 associe deux autres protéines à Arp4/Act1 qui sont Arp8/Taf14 ; Taf14 contient le domaine essentiel YEATS comme Yaf9 (Bao and Shen, 2007a). Au laboratoire, les modalités de l'interaction *in vitro* de Swr1/NuA4 et Ino80 dans l'échange de dimère d'histones H2A-H2B sont étudiées.

##### - Act1/ Arp4

Les rôles des protéines Arp nucléaire (4 à 9) et de l'actine dans les complexes de modification et de remodelage de la chromatine sont encore peu connus. Arp4, connu pour lier les histones, a une fonction importante dans le recrutement des complexes NuA4/Swr1/Ino80 au niveau des bris d'ADN en liant le variant d'histone H2AX phosphorylé,  $\gamma$ H2AX (Downs et al., 2004).

##### - Eaf2/Yaf9

Les deux portions C-terminales de Yaf9 et Eaf2 sont impliquées dans leur interaction mutuelle et Eaf2 interagit avec Eaf1, la plateforme de NuA4. La région C-terminale de Yaf9 contient une B box prédit comme région « Coiled-coiled », et qui est cruciale dans la liaison de Yaf9 avec Eaf2 (Auger et al., 2008; Bittner et al., 2004; Zhang et al., 2004). Eaf2 reste une des protéines les moins définies du complexe. Elle est essentielle à la survie

cellulaire et possède un domaine SANT. Une étude récente des mutants Ts des gènes essentiels de *S.cerevisiae*, identifie Eaf2 comme une protéine essentielle à la cohésion des chromatides sœurs (Ben-Aroya et al., 2008). L'homologue humain d'Eaf2, DMAP1 est une protéine associée à DNMT1 retrouvée à la fourche de réplication de l'ADN (Rountree et al., 2000).

Yaf9, homologue de la protéine AF9 associée à des leucémies humaines, contient un domaine essentiel YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5). Les protéines contenant ce domaine essentiel chez la levure se retrouvent dans les complexes d'acétylation et de remodelage ATP-dépendant de la chromatine et sont associées à la régulation de la chromatine de la transcription et ont un lien avec le cancer (Bittner et al., 2004). Yaf9 est essentiel à la réparation et au métabolisme de l'ADN et à l'acétylation et l'expression des gènes proches des télomères. L'activation transcriptionnelle par Yaf9 dépend de son interaction et de l'intégrité de la protéine Eaf2 (Zhang et al., 2004).

#### 1.2.1.5 Le trimère Eaf5/7/3

La majorité du trimère Eaf5/7/3 constitue un complexe indépendant de NuA4 dans le noyau (Cramet, non publié). Eaf5 est la protéine qui lie le trimère à Eaf1. Eaf5 lie Eaf7 qui lie Eaf3 (figure 6). De plus, Eaf3 est aussi une sous-unité stable du complexe déacétylase Rpd3S (Carrozza et al., 2005).

Le rôle d'Eaf3 est lié à son chromodomaine qui lui permet de lier l'histone H3 méthylée sur la lysine 36 et méthylée sur la lysine 4, spécificités modulées par la contribution des domaines PHD spécifiques des sous-unités Rco1 pour le complexe HDAC Rpd3(S) et Yng2 pour NuA4 (Li et al., 2007). Eaf3 est essentielle à la régulation / localisation des activités HATs et HDACs de NuA4 et Rpd3(S) lors de la transcription et à l'inhibition de transcripts cryptiques des gènes (Carrozza et al., 2005; Utley et al., 2005).

Les protéines Eaf5/7 ont des rôles inconnus. Des études par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) menées au laboratoire montrent une présence du trimère aux régions codantes des gènes, alors que NuA4 en est absent. De plus, les mutants de délétion  $\Delta$ eaf5

et  $\Delta eaf7$  montrent une sensibilité à des drogues qui perturbent la transcription. Le trimère pourrait avoir un rôle dans l'élongation de la transcription (Cramet, non publié).

En résumé, les protéines du complexe NuA4 vont permettre : la spécificité de sa fonction d'acétylation, un recrutement spécifique du complexe aux promoteurs cibles ou aux sites de réparation de dommages à l'ADN, un arrimage du complexe sur les nucléosomes par reconnaissance de modifications spécifiques d'histones. Ces fonctions vont être médiées par des domaines protéiques, dont certains, comme les domaines SANT d'Eaf1 et Eaf2, ont un rôle encore peu connu.

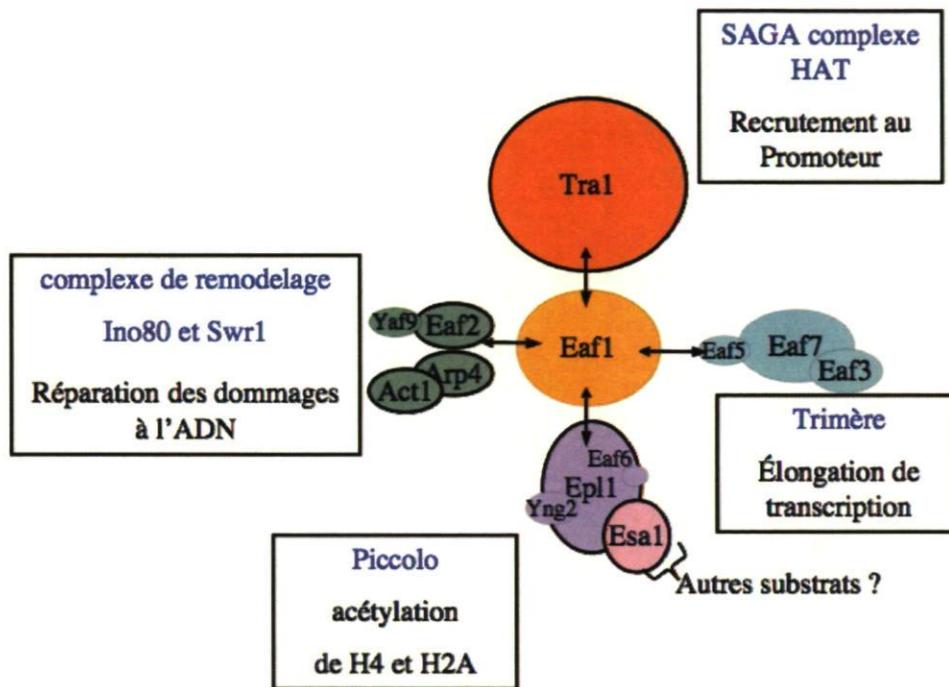


Figure 6: Résumé schématique des fonctions connues associées aux modules du complexe NuA4.

## 1.2.2 Fonctions de NuA4

### 1.2.2.1 Transcription

NuA4, comme SAGA, est recruté aux promoteurs de gènes spécifiques par la sous-unité Tra1 (Brown et al., 2001). Ils ont une activité complémentaire puisqu'ils acétylent les queues des 4 histones pour permettre l'ouverture de la chromatine aux promoteurs. Cependant, les zones acétylées par ces deux complexes ne sont pas identiques et NuA4 acétyle une plus grande région que SAGA (Nourani et al., 2004; Vignali et al., 2000). NuA4 peut être recruté par Pho2, un activateur transcriptionnel possédant un homéodomaine (Nourani et al., 2004), recrutement requis pour l'incorporation de l'histone H2A.Z par le complexe SWR1 précédant l'activation du gène *PHO5*. SAGA et NuA4 collaborent aussi à l'élongation de la transcription (Ginsburg et al., 2009).

NuA4 possède la sous-unité Eaf3. Le chromodomaine d'Eaf3 permet sa fixation sur les méthylations des lysines de l'histone H3 présentes au cours de l'initiation et de l'élongation de transcription. Le complexe HDAC Rpd3(S) possède lui aussi la sous-unité Eaf3. Eaf3 est essentielle à la régulation / localisation des activités HATs et HDACs de NuA4 et Rpd3(S) lors de l'élongation de transcription (Biswas et al., 2008; Li et al., 2007; Xu et al., 2008) et à l'inhibition de transcripts cryptiques des gènes (Carrozza et al., 2005).

### 1.2.2.2 Réparation

La délétion de plusieurs sous-unités de NuA4, comme Yng2, Epl1 ou encore Esa1, rend les cellules extrêmement sensibles aux agents endommageant l'ADN (tableau 2 (Boudreault et al., 2003; Choy and Kron, 2002)). Il a été démontré que NuA4 était requis pour la ligature d'extrémités non-homologues NHEJ, Non Homologous End Joining (Bird et al., 2002) et Arp4 a été identifié comme étant recruté au site de dommage ; il lie l'histone H2AX phosphorylé ( $\gamma$ H2AX) aux sites de cassures (Downs et al., 2004). NuA4 est également requis pour la réparation des bris durant la réplication (Choy and Kron, 2002). NuA4 est le seul complexe HAT associé aux complexes de remodelage de la famille INO80. Il partage

avec eux les sous-unités Arp4/Act1. Ces trois complexes sont connus pour interagir au niveau de la réparation des bris double brin d'ADN (Downs et al., 2004).

### 1.2.2.3 Autres fonctions

La souche mutante thermosensible (Ts) d'Esal arrête son cycle cellulaire en G2/M dépendant du point de contrôle de réparation de l'ADN médié par Rad9 (Clarke et al., 1999). De plus, les souches mutantes délétées de Eaf1, Arp4, Yaf9 et Yng2 sont aussi sensibles au bénomyl (tableau2), une drogue déstabilisant les microtubules; et Eaf2 a été identifié comme essentiel à la cohésion des chromatides sœurs (Ben-Aroya et al., 2008). Ces données suggèrent un rôle du complexe NuA4 durant la mitose, qui reste à déterminer.

L'acétylation étant connu comme une marque post-traductionnelle régulant l'activité des protéines, Esal acétyle aussi des substrats non-histones, notamment Yng2, marque qui stabilise le complexe NuA4 (Lin et al., 2009; Lin et al., 2008).

### 1.2.3 Le complexe Tip60, orthologue de NuA4 chez l'humain

La protéine Tip60, orthologue de Esal (Doyon et al., 2004), a été originellement identifiée par double hybride comme interagissant avec la protéine HIV-tat. Le complexe Tip60 possède la même activité HAT sur les histones H2A et H4 que NuA4, les mêmes fonctions de co-activateur transcriptionnels et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Tip60 est aussi requis pour l'apoptose. Comme p53, la stabilité de Tip60 est régulée par sa liaison avec l'ubiquitine ligase Mdm2 et son activité HAT par la phosphorylation (Avvakumov and Cote, 2007a; Tang et al., 2006).

C-myc recrute Tip60 aux gènes cibles et TRRAP, BAF53, Tip48/49 (orthologues de Tra1, Arp4, Rvb1/Rvb2) sont requis pour sa transformation oncogénique (Avvakumov and Cote, 2007b; Cole and McMahon, 1999; Deleu et al., 2001; McMahon et al., 1998; Park et al., 2001). L'activation transcriptionnelle par E2F et p53 nécessite aussi l'intervention de Tip60 (Ard et al., 2002; Barlev et al., 2001; McMahon et al., 1998).

Sur les 13 sous-unités de NuA4, 12 homologues humains se retrouvent chez Tip60 (seulement Eaf5 n'a pas d'homologue humain). Cependant, Tip60 contient d'autres protéines : les hélicases « ruvB-like » Tip48/49, et Brd8, la protéine à double

bromodomaines homologues à Bdf1. Bdf1 et Esa1 sont connues pour avoir des interactions génétiques chez la levure même si elles ne sont pas associées dans un complexe. Tip48/49 sont associés à p400/domino qui contient trois domaines homologues à Eaf1 incluant les domaines HSA, SANT et la région C-terminal riche en glutamine. Le domaine SWI2-related de p400/domino liant les hélicases « ruvB-like » est homologue à la protéine Swr1 du complexe SWR1 qui partage 4 sous-unités avec NuA4. Tip60 serait donc une association évolutive des complexes NuA4 et SWR1 de levure (figure7, (Doyon and Cote, 2004). D'autres expériences publiées par le laboratoire (Auger et al., 2008) montrent la possibilité de recréer p400/domino chez la levure en combinant les domaines de Swr1 et Eaf1 et de conserver une grande partie de la fonctionnalité des complexes NuA4 et SWR1. De plus, piccoloNuA4 est conservé chez l'humain, avec les sous-unités hEaf6, ING3, EPC1 (Doyon and Cote, 2004).

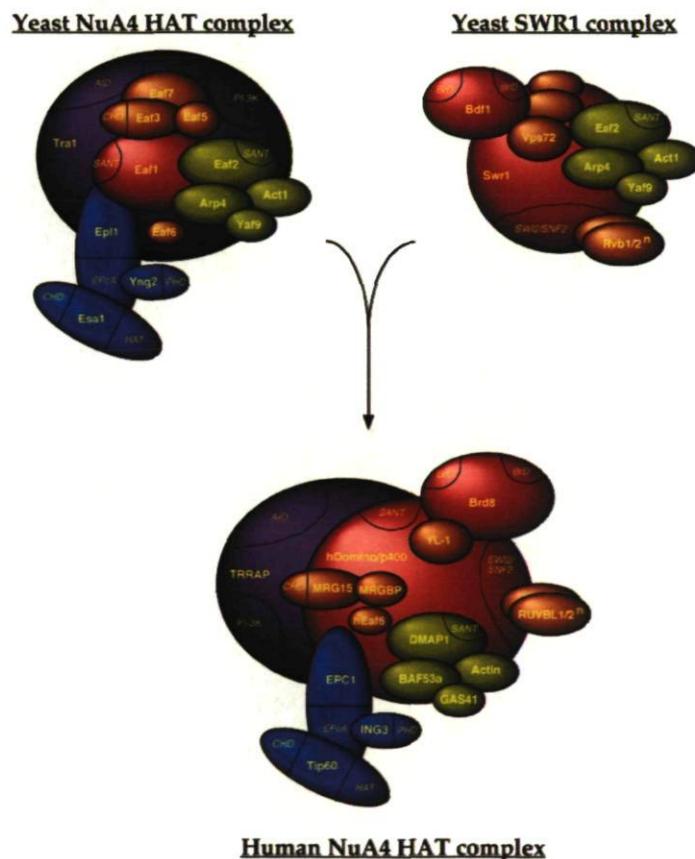


Figure 7: Schéma des trois complexes NuA4, SWR1 et Tip60 (Auger et al., 2008)

### **1.3 Objectif du projet : la structure tridimensionnelle de NuA4**

Les données biochimiques nous renseignent énormément sur l'organisation du complexe. Epl1 (EpcA), Esa1, Arp4, Eaf3, Yng2 (et sûrement Yaf9 et Eaf6) semblent être proches géographiquement, interagir avec les nucléosomes et réguler l'activité d'Esa1. Tra1 semble indépendant des autres sous-unités de NuA4, mais son organisation spatiale pourrait lui permettre d'avoir un ou des domaines proches avec Esa1. Des questions demeurent sans réponses. Quelle est la conformation du complexe NuA4? Peut-elle varier? Comment NuA4 interagit avec un nucléosome? Sa conformation est-elle modifiée lors de cette interaction?

De plus, l'organisation spatiale de NuA4 peut nous renseigner sur les complexes avec lesquels NuA4 partage des sous-unités et coopère dans l'accès à la chromatine pour la transcription ou la réparation de l'ADN.

Les techniques de purifications actuelles de complexes permettent d'obtenir de bons rendements et les techniques de microscopie électronique permettent d'acquérir la structure tridimensionnelle d'un complexe avec une grande précision et fiabilité. La cryo-microscopie électronique (cryo-EM) permet d'éliminer la déformation des échantillons et d'obtenir une configuration de haute résolution (inférieur à 10 Angstroms) avec de faible quantité de matériel.

Nous avons donc collaboré avec le laboratoire de Francisco Asturias et Jerry Workman pour réaliser l'analyse par microscopie électronique de complexes natifs et mutants NuA4 purifiés.

Mon but étant de purifier des complexes NuA4 de souches contenant des sous-unités étiquetées ou délétées afin d'identifier les différents modules dans la structure tridimensionnelle du complexe, j'ai dû optimiser la technique de purification du complexe pour obtenir un rendement et une pureté optimale, ainsi qu'une bonne homogénéité de taille des complexes, visible par microscopie électronique.

**Chapitre 2 :**  
**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 Souches de levures

Tableau 3 : Souches de levures

Souche	Souche parentale	Cassette transformation	insertion
TAP Epl1	LPY3431 MATa his3200 leu2-3,112 trp11 ura3-52 (Clarke et al., 1999)	Cassette TAP, TRP	C-terminale
TAP Eaf1			
TAP Epl1 $\Delta$ eaf5			
TAP Eaf5			
TAP Epl1 myc Tra1	KY320 MATa ura3-52 ade2-101 trp1-D1 lys2-801 his3-D200 leu2TPET56 (Chen and Struhl, 1998)		
	tra1TTn10LUK myc-TRA1 (Saleh et al., 1998)		
TAP Epl1 HA Arp4	Ha-Act3 W303 MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} (Jiang and Stillman, 1996)		

## 2.2 Techniques de purification de complexe protéique

Classiquement, on utilise une technique de purification avec une étiquette double pour purifier un complexe. La plus répandue est la méthode TAP (Tandem Affinity Purification), dont le schéma est retrouvé dans la figure 8. L'étiquette TAP est ajoutée en C-terminal ou N-terminal du gène d'intérêt, codant pour une sous-unité du complexe protéique. Elle code pour deux peptides : la protéine A et un peptide de liaison à la calmoduline séparés par le site de clivage de l'enzyme TEV (tobacco etch yirus). On réalise donc deux étapes de purifications par liaison de la protéine A à des billes IgG sépharose et par liaison du peptide liant la calmoduline à des billes chargées en calmoduline et en présence de calcium (Puig et al., 2001).

La méthode classique par TAP est très efficace pour purifier des complexes protéiques. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir une grande homogénéité de complexes par analyse

de microscopie électronique. Cette technique ne permet pas d'éliminer les complexes partiellement dégradés, notamment contenant une forte dégradation de Tra1.

Nous avons donc combiné la purification TAP avec une purification par gel filtration sur la colonne Superose 6® déjà calibrée au laboratoire. Nous avons éliminé la deuxième étape de purification TAP sur résine calmoduline car elle ne permet pas de réduire suffisamment le volume d'élution pour charger directement la colonne Superose 6® et entraîne une perte de la quantité de protéine d'au moins 50 % (figure 8).

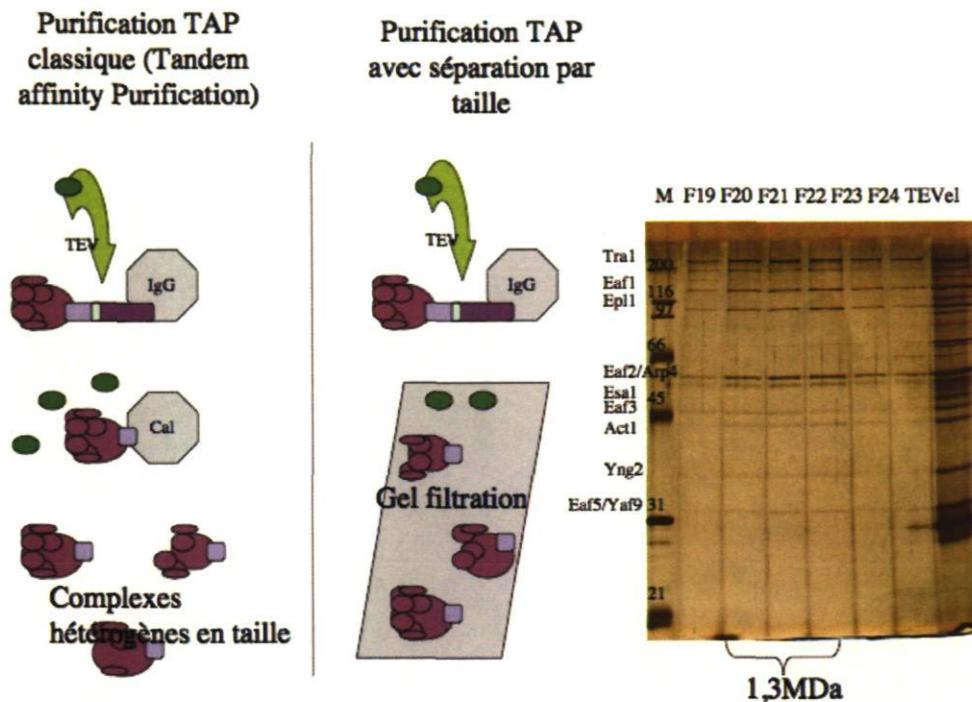


Figure 8: Représentation schématique de la technique de purification TAP classique et avec séparation de taille; ainsi qu'un de mes résultats sur gel des fractions purifiées par taille contenant le complexe NuA4.

6 litres de culture de levures sont arrêtés en phase exponentielle de croissance entre 1,5 et 1,8 DO 600nm. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes à froid et lavées une fois avec 40 ml de tampon d'extraction filtré froid (40 mM Hepes pH7,5 ; 350 mM NaCl ; 10% glycérol ; 0,1% tween20 ; 2 mg/ml pepstatin ; 2 mg/ml leupeptin ; 5 µg/ml aprotinin ; 1 mM PMSF ; 0,5 mM DTT ; 5 mM sodium butyrate ; 5

mM  $\beta$ -glycérophosphate). Les cellules sont reprises dans 30 à 40 ml de tampon d'extraction et introduites dans la chambre de lyse « bead beater » avec 40ml de billes de verres. La lyse se fait en chambre froide. 8 à 10 coups de 30 secondes sont nécessaires pour obtenir une lyse de 70% visible au microscope. Le lysat brut obtenu est centrifugé à 12000 rpm pendant 20 à 30 minutes, puis ultracentrifugé à 45000 rpm pendant 1 heure. Le lysat clair (environ 40ml) est mis en présence de 600 $\mu$ l de résine IgG sepharose Fast Flow® GE Healthcare (préalablement lavée avec du tampon d'extraction). L'incubation se fait sous agitation douce, à froid, pendant 4 à 7 heures. La résine est ensuite récupérée par centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes, lavée avec 30 ml de tampon d'extraction, déposée sur une colonne BioRad 15ml (Poly-Prep Column®), lavée deux fois avec 10 ml de tampon d'extraction et une fois avec 10 ml de tampon TEV (40mM Hepes pH7,5 ; 350mM NaCl ; 10% glycérol ; 0,02% NP40 ; 0,5mM EDTA ; 1mM DTT). La résine est récupérée dans un tube de 2ml. 1,2 ml de tampon TEV et 20 $\mu$ l de TEV recombinante (évaluée à 10 U/ $\mu$ l et produite au laboratoire) sont ajoutés. L'élution se déroule sur la nuit, sous agitation douce, à froid. Le lendemain, l'élution est déposée sur une mini-colonne BioRad 2ml. 600  $\mu$ l de tampon TEV sont encore ajoutés puis la colonne est rapidement centrifugée pour récupérer toutes les protéines éluées. L'élution TEV, environ 2ml, contenant beaucoup d'IgG, elle est mise 15 minutes en présence de 15 $\mu$ l de résine liant la protéine A sous agitation douce, à froid. Les Centricon® YM-30 de chez Amicon / Millipore sont utilisés pour concentrer l'élution TEV à 300 $\mu$ l. La concentration peut entraîner une perte et une dégradation partielle du complexe protéique mais elle permet d'obtenir un volume optimal pour charger une colonne de séparation de taille et aussi d'obtenir des concentrations suffisantes de protéines éluées. L'élution TEV concentrée à 300 $\mu$ l est chargée sur une colonne Superose 6® à l'aide d'un FPLC (Fast Flow Purification Liquide Chromatography). La séparation de masse se fait à froid, à un flux de 0,2 ml/minutes dans un tampon spécifique (40 mM Hepes pH7,5 ; 350 mM NaCl ; 10% glycérol ; 0,1% tween20 ; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 2 mg/ml pepstatin ; 2 mg/ml leupeptin ; 5  $\mu$ g/ml aprotinin ; 1 mM PMSF ; 0,5 mM DTT ). Des fractions de 500 $\mu$ l sont collectées. Le complexe NuA4 est élué dans les fractions 19 à 23 mais les fractions 20 et 21 montrent la plus grande homogénéité et la plus forte concentration après coloration à l'argent sur gel

(voir section 2.3.2) et aussi par microscopie électronique. Les fractions sont premièrement testées par essai HAT (voir section 2.3.1) avant d'être analysées sur gel et envoyées congeler pour analyse par microscopie électronique.

## **2.3 Techniques d'analyse des protéines**

### **2.3.1 Essais d'activité HAT**

1 µl de complexe protéique purifié est ajouté à 14 µl de mélange réactionnel contenant 0,5 µg de court nucléosomes ; 50 mM de KCl ; 10 mM sodium butyrate ; 0,5 µl de <sup>3</sup>H Acétyl CoA à 0,25 µCi/µl et du tampon HAT (50 mM Tris pH8 ; 5% glycérol ; 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 1 mM PMSF).

Les réactions sont incubées 30 minutes à 30°, puis déposées sur des membranes P81 Whatman. Séchées à l'air, elles sont ensuite lavées 3 fois 5 minutes avec 50 mM de tampon carbonate pH9,2, rincées à l'acétone et de nouveau séchées. Les membranes sont placées dans des tubes de scintillation.

La radioactivité mesurée avec un compteur à scintillation détermine les fractions les plus actives. (Grant et al., 1997)

### **2.3.2 Coloration à l'argent**

5 à 12 µl des fractions protéiques sont déposées sur gels 10% SDS PAGE et migrés pendant 1h40 à 160V. Après migration, les gels sont fixés pendant 30 minutes dans une solution contenant 7% d'acide acétique et 5% de méthanol. Puis ils sont incubés 30 minutes dans une solution contenant 10% de glutaraldéhyde. Les gels sont alors agités dans un bain d'eau toute la nuit (ou minimum trois heures) pour éliminer le glutaraldéhyde. Ils sont ensuite agités 30 minutes en présence de DTT à 5 µg/ml et colorés à l'argent 30 minutes (0,1% AgNO<sub>3</sub>). Les gels sont rapidement rincés à l'eau distillée puis incubés avec 160 ml de développeur (0,0185% formaldéhyde, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,28 M). La révélation est arrêtée par ajout de 8ml d'acide acétique 2.3M. (Shevchenko et al., 1996)

## **2.4 Cryo-microscopie électronique**

La cryo-microscopie électronique permet l'observation, sans déformation structurale, d'un échantillon biologique dans son état natif. La cryo-EM possède plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes structurales:

- Faibles quantités de matériels
- Des cristaux ne sont pas nécessaires.
- L'ordre de grandeur d'objets observés de ~250 kDa à 1000 MDa.
- La préservation des échantillons dans un état hydraté presque natif (sans déformations des échantillons des colorations classiques de microscopie électronique).

Naturellement, il y a aussi des limites. Les échantillons doivent être purs, uniformes en taille et sans agrégats, et contenir seulement une faible concentration de sel et de solvants (sans glycérol) afin de maximiser le contraste entre la protéine et le tampon. Cependant, la purification des complexes requiert 10% de glycérol minimum et 350 mM de sel pour obtenir une bonne homogénéité des particules de complexes observées. La concentration des échantillons envoyés doit donc être environ dix fois supérieure à celle requise.

NuA4 a une taille de 1,3MDa qui permet son analyse, cependant la délétion d'une seule des sous-unités (excepté Tra1) n'est pas envisageable, seule la délétion d'un module supérieur à 200 KDa, comme piccoloNuA4 et le trimère Eaf5/3/7, est possible.

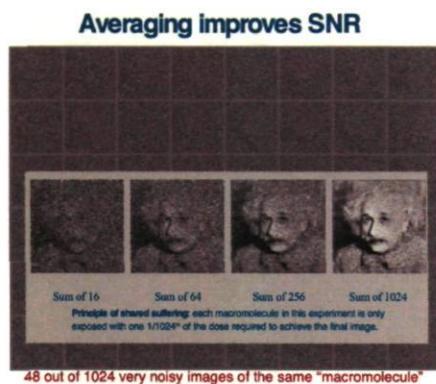
Un échantillon de chaque fraction purifiée de complexes est envoyé congelé pour éviter la dégradation des protéines à 4°C. Leur analyse est réalisée au laboratoire de microscopie électronique du Dr. Asturias (Asturias et al., 2004).

Premièrement, l'échantillon est disposé sur une grille EM quadrillée et conservé dans une solution salée contenant des métaux lourds (coloration classique) pour obtenir un micrographe de l'échantillon. Les images planes obtenues par micrographe sont analysées

pour leur homogénéité de taille. Si l'homogénéité est trop faible, aucune analyse par cryo-EM n'est possible.

Deuxièmement, l'échantillon est congelé dans un bain d'éthane pour produire une glace non cristalline et conservé à la température de l'azote liquide dans le microscope électronique pour la collection des images. Les particules sont regroupées selon leur orientation (leur proximité de forme) et compilées de manière à obtenir une image plus nette (figure9).

a.



b.



c.

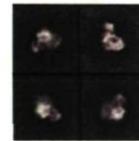
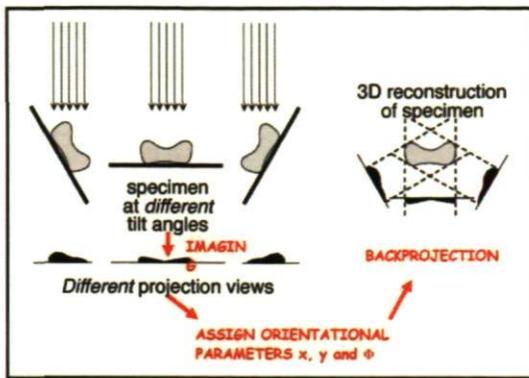


Figure 9 : a. Exemple de moyennage d'image bidimensionnelle. b. Micrographe obtenu avec un échantillon de complexe NuA4 par EM. c. Images moyennes obtenues par cryo-EM avec un échantillon de complexe NuA4.

Troisièmement, les différentes compilations bidimensionnelles sont réorientées dans un espace tridimensionnel par backprojection (figure10). Cette technique de calcul utilise la transformation de fourrier (trois angles et deux axes). L'analyse de 30000 particules est requise au minimum pour obtenir une bonne probabilité de structure tridimensionnelle du complexe protéique. Cependant, les analyses subséquentes de mutant de délétions, de sous-unités étiquetées ou d'interaction du complexe avec un nucléosome nécessitent moins de particules puisque l'analyse est réalisée par comparaison avec le modèle existant.



### Reconstruction by Backprojection

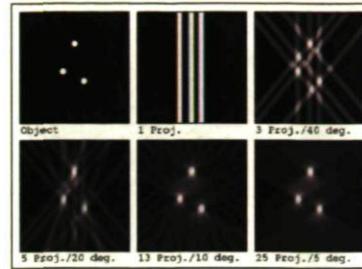


Figure 10 : Schéma de la technique de backprojection et un exemple comprenant 3 points dans l'espace.

Finally, the analysis of conformation mutations could be envisaged. One can then know the molecular flexibility of the protein complex. This technique is particularly interesting in the case of the analysis NuA4 in interaction with a nucleosome.

## **Chapitre 3 : RÉSULTATS**

### **3.1 Structure tridimensionnelle de NuA4 précédemment obtenue**

En premier lieu, je présente des résultats obtenus avant que j'intègre ce projet.

Une purification du complexe NuA4 par « Tandem Affinity Chromatography » avait été réalisée par Mike Carroza au laboratoire de Jerry Workman (au Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, USA). À partir de 20L de culture d'une souche TAP-Epl1, une grande quantité de complexe a été obtenue et congelée après élution des billes calmoduline. Une fraction du complexe NuA4 purifié a été déposée sur gel SDS- PAGE pour analyse (figure11a). Une autre fraction a été envoyée pour l'analyse par microscopie électronique. La structure tridimensionnelle initiale du complexe NuA4 a été établie au laboratoire du Dr Francisco J. Asturias (au Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Le micrographe obtenu pour l'échantillon préparé par EM (figure11b) a démontré une homogénéité suffisante à son analyse et à son exploitation par cryo-EM (figure12).

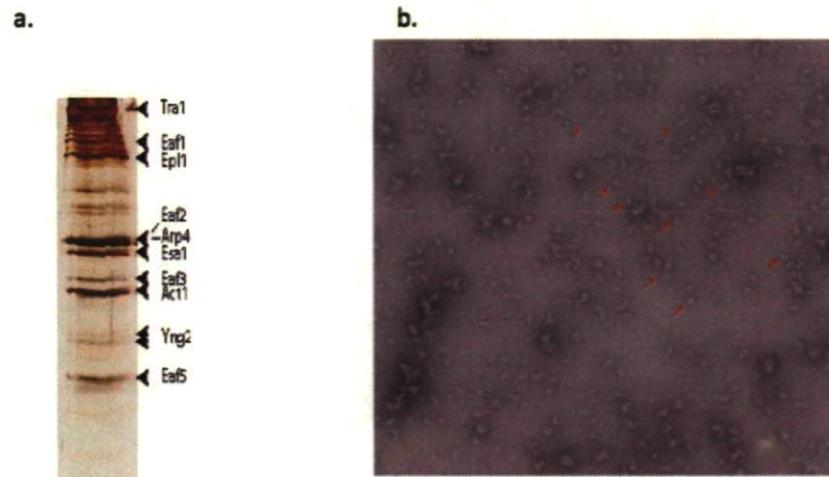
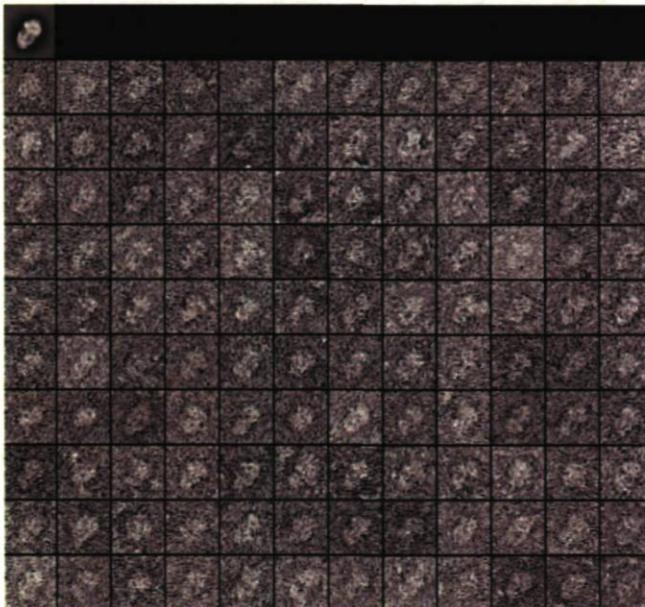


Figure 11: a. Gel SDS-PAGE 10% de la purification de NuA4 (M.C.) et b. Micrographe de NuA4 Epl1-TAP (M.C.). La majorité des particules ont la même forme et taille, plusieurs ont été soulignées avec des flèches rouges.

Les images isolées de 35 000 molécules de tailles similaires ont été regroupées selon leur orientation bidimensionnelle (leur similarité bidimensionnelle) et des images moyennes (Class Average from images) ont été obtenues (figure12a). À partir de ces images de plus haute qualité, révélant déjà des singularités structurales (figure12b), une reconstitution tridimensionnelle par « backprojection » du complexe NuA4 a été produite (figure13) par le Dr. Asturias.

a.



b.

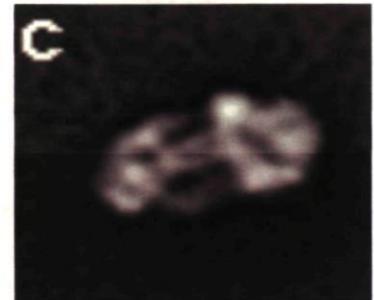


Figure 12: (a) Particules individuelles de NuA4 Epl1-TAP (M.C.) et (b) Exemple d'image moyenne.

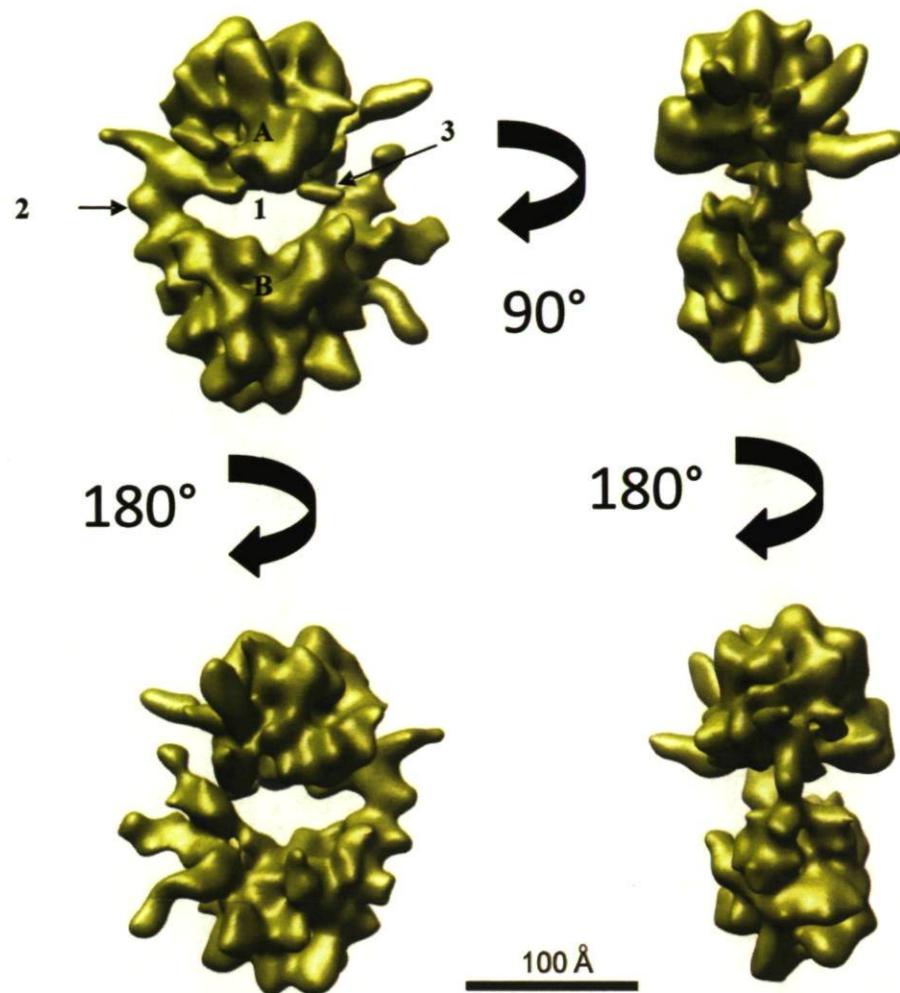


Figure 13: Reconstitution tridimensionnelle de NuA4.

La structure de NuA4 ainsi obtenue apporte beaucoup d'information et aussi des questionnements. Cette structure montre un complexe en deux lobes (A et B) séparés par une cavité (1), un pont (2) et une légère interaction (3). Sachant que la cavité est de taille suffisante pour contenir un nucléosome, on émet l'hypothèse que le pont est une partie structurale flexible, que les deux domaines peuvent s'espacer pour qu'un nucléosome s'insère dans la cavité.

D'autre part, on se demande où sont localisés les modules du complexe NuA4 dans cette structure. On sait déjà par sa taille (430KDa) que la protéine Tra1 représente 1/3 du complexe et donc peut représenter un lobe (A) à elle seule.

Une expérience de marquage anticorps de la sous-unité Epl1-TAP qui permet la localisation du module piccoloNuA4 et une expérience de liaison avec un nucléosome ont aussi été tentées à partir de cette première purification (figure 14).

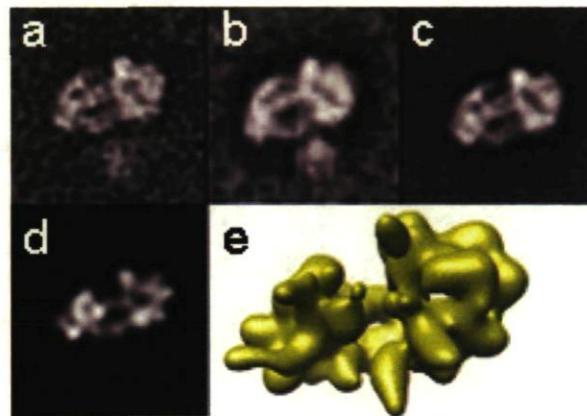


Figure 14 : Interactions de NuA4 avec un nucléosome et localisation de piccoloNuA4. (a) Image moyenne de NuA4 Epl1 marqué par un anticorps. (b) Image moyenne de NuA4 lié à un nucléosome (NCP). (c) Image moyenne de NuA4 seul. (d) Projection de la structure 3D de NuA4 qui semble la plus proche de l'orientation majoritaire de NuA4 en microscopie. (e) Vue du volume de NuA4 sous le même angle de projection.

La localisation de la sous-unité Epl1 avec un anticorps ciblant le peptide de liaison à la calmoduline et l'interaction de NuA4 avec un nucléosome donne des résultats similaires et concordants. Le nucléosome ne semble pas s'insérer dans la cavité du complexe. Piccolo est situé dans la zone d'interaction du nucléosome (NCP, Nucleosome Core Particle) avec NuA4.

À partir de ces expériences et des données connues sur les 4 protéines contenues dans piccolo, deux hypothèses de localisation de piccolo dans la structure tridimensionnelle ont pu être supposées (figure 15).

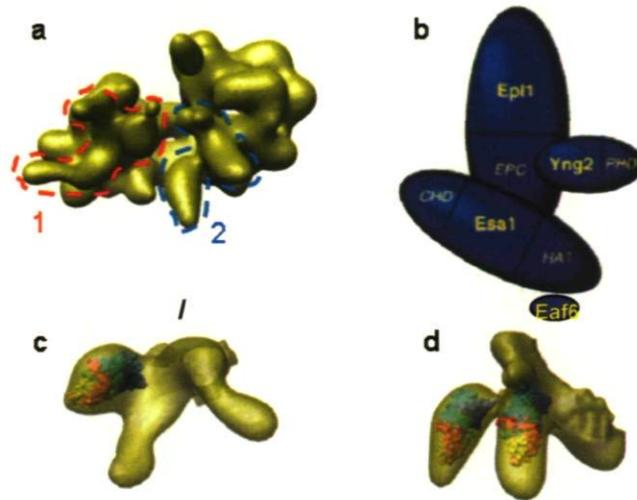


Figure 15 : Localisation possible de Piccolo dans la structure de NuA4. (a) Deux protrusions de la structure de NuA4 dans la zone identifiée par interaction avec un NCP et un marquage AC-Epl1. (b) Schéma de piccoloNuA4 obtenu à partir de données biochimiques. (c) et (d) Localisations possibles de la structure au rayon X de Esa1 dans la reconstitution tridimensionnelle de NuA4 par cryo-EM.

Cependant des reconstitutions tridimensionnelles de piccolo (recombinant produit en bactérie (Selleck et al., 2005)) interagissant avec un nucléosome sont en discordance avec ces résultats. Piccolo NuA4 semble englober le nucléosome. La structure 3D piccoloNuA4-NCP obtenue ne correspond pas aux protrusions possibles identifiées (figure16) pouvant contenir piccolo.

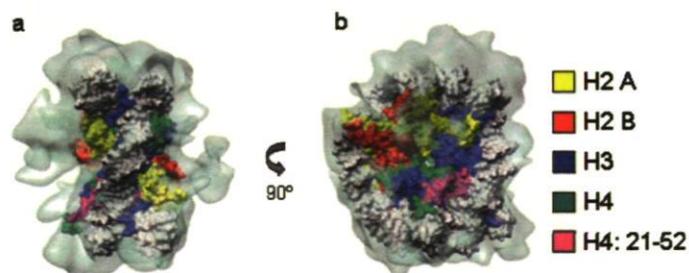


Figure 16 : Analyse par cryo-EM du complexe piccoloNuA4-NCP. La structure au rayon X du NCP (solide et multicolore) est localisée dans le volume de la structure 3D piccoloNuA4-NCP obtenue de l'analyse de 7500 particules. Vues dans l'axe dyad du NCP (a) et à une rotation 90° dans le plan de la page (b).

### 3.2 Résultats obtenus sur la structure de NuA4 et la localisation des modules

Dans cette partie, je présente les résultats obtenus avec des purifications du complexe NuA4 que j'ai réalisées.

Les premières purifications de NuA4 envoyées en analyse par microscopie électronique n'ont pas fait l'objet d'analyse. En fait, les micrographes obtenus montraient que la quantité de particules était satisfaisante mais l'hétérogénéité était trop importante pour identifier les molécules correspondant au complexe NuA4 et les analyser. L'échantillon contenait des agrégats. Cependant, l'analyse des purifications sur gels ne montrait pas de dégradation des sous-unités (sauf Tra1, toujours légèrement dégradée), ni de contaminants (figure 17).

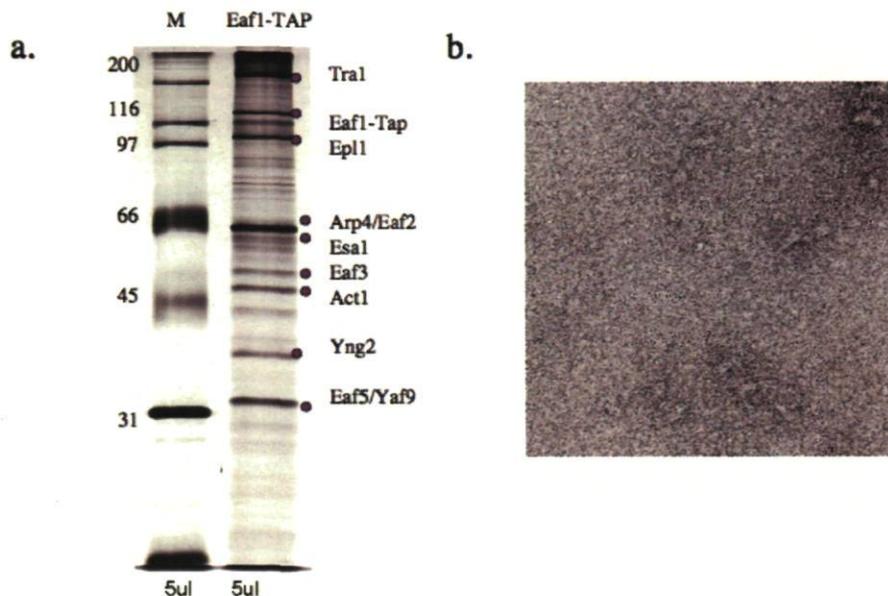


Figure 17 : Analyse sur gel SDS-PAGE coloré à l'argent (a) et par microscopie électronique (b) du complexe NuA4 (Eaf1-TAP) purifié par la méthode TAP.

La conclusion de ces analyses est que la technique de purification par TAP ne permet pas d'éliminer les complexes qui ont subi des dégradations lors de l'extraction ou qui ont perdu

des modules flexibles par dissociation de l'interaction Eaf1/Eaf5 ou du domaine HSA d'Eaf1 (Eaf1/Eaf2, Eaf1/Arp4).

Nous avons donc adapté notre technique de purification en réalisant une séparation par taille pour augmenter l'homogénéité des échantillons de complexes purifiés (chapitre 2.2). La séparation par taille dilue les complexes en deux à trois fractions, mais la concentration obtenue et l'homogénéité des molécules est suffisante pour leur analyse en cryo-microscopie électronique.

### **3.2.1 Analyse de la structure bidimensionnelle de NuA4**

La première purification par séparation de taille envoyée a été faite à partir d'une souche avec la sous-unité Epl1 contenant l'étiquette TAP (figure18). Les résultats obtenus par analyse de micrographes et réalisation d'images moyennes ont été très surprenants. Le complexe NuA4 montre une structure différente, plus pyramidale que plane (figure19) et une densité supplémentaire par rapport à l'échantillon précédent.

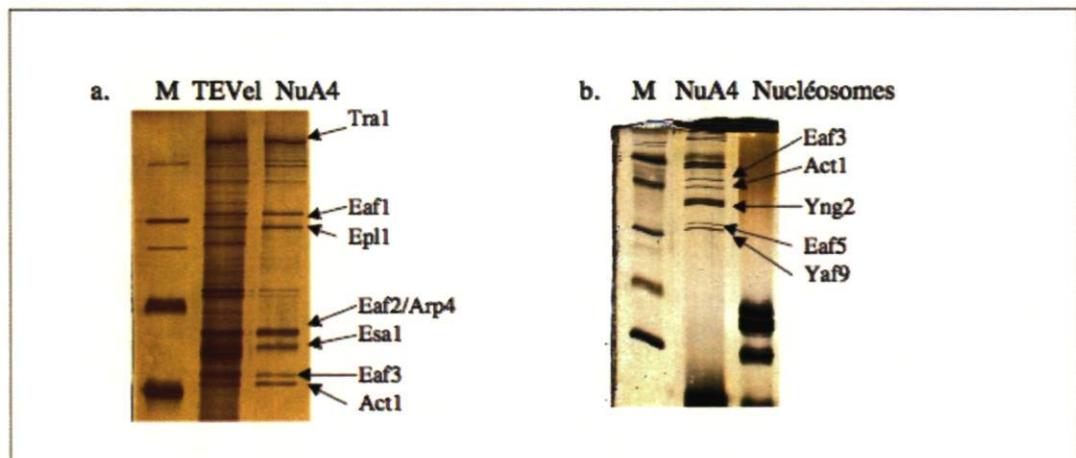


Figure 18 : Gels SDS-PAGE 10% (a) et 18% (b) colorés à l'argent de l'échantillon purifié (fractions 20, 21 et 22) et concentré NuA4 Epl1-TAP et de l'éluion TEV déposée sur colonne de séparation par taille. Les sous-unités Eaf7 et Eaf6 ne sont pas visibles. Le gel 15% permet de mettre en évidence l'absence de nucléosome lié au complexe après purification.

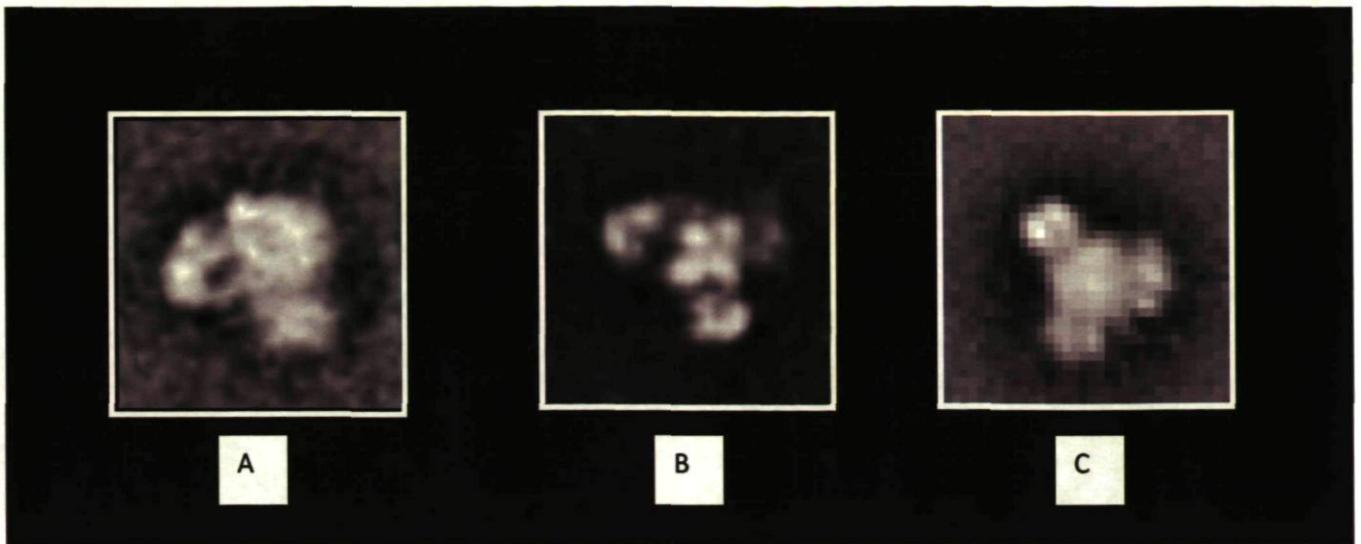


Figure 19 : Image moyenne obtenue à partir de l'analyse par microscopie électronique de la purification NuA4 Epl1-TAP après séparation de taille. Les trois orientations majoritaires A, B et C sont ici représentées. Elles ont toutes une forme pyramidale. L'orientation A présente la structure caractéristique en fourche retrouvée dans les complexes de l'échantillon NuA4 précédemment analysé. L'orientation B présente aussi une structure caractéristique en fleur.

Ces résultats nous ont apporté un nouveau défi. Il a fallu identifier la différence entre notre purification et celle obtenue au laboratoire du Dr. Workman. Une différence qui conduirait à une structure différente. La première conclusion qui en suit par comparaison de l'orientation A de la figure 19 avec l'image de la figure 12b est que les deux molécules sont similaires mais une densité supplémentaire d'environ 200KDa s'associe au complexe. Par comparaison de ces deux images avec l'image b de la figure 14, on peut penser que la densité supplémentaire présente correspond à la présence d'un nucléosome associé à chaque complexe. Cette hypothèse est vite éliminée par l'analyse du gel b de la figure 18 qui montre que les complexes NuA4 purifiés ne sont pas associés à des histones. D'une part, concernant l'expérience de liaison de NuA4 avec un anticorps localisant piccolo par la sous-unité Epl1 et l'expérience d'interaction avec un nucléosome, on pense donc qu'elles sont erronées. Les molécules analysées étaient probablement des complexes « entiers » ou identiques aux nôtres, déjà présent mais en très faible quantité dans l'échantillon de départ.

D'autre part, on a analysé de plus près les échantillons de complexe purifiés mis sur gels et décelé une différence (figure20).

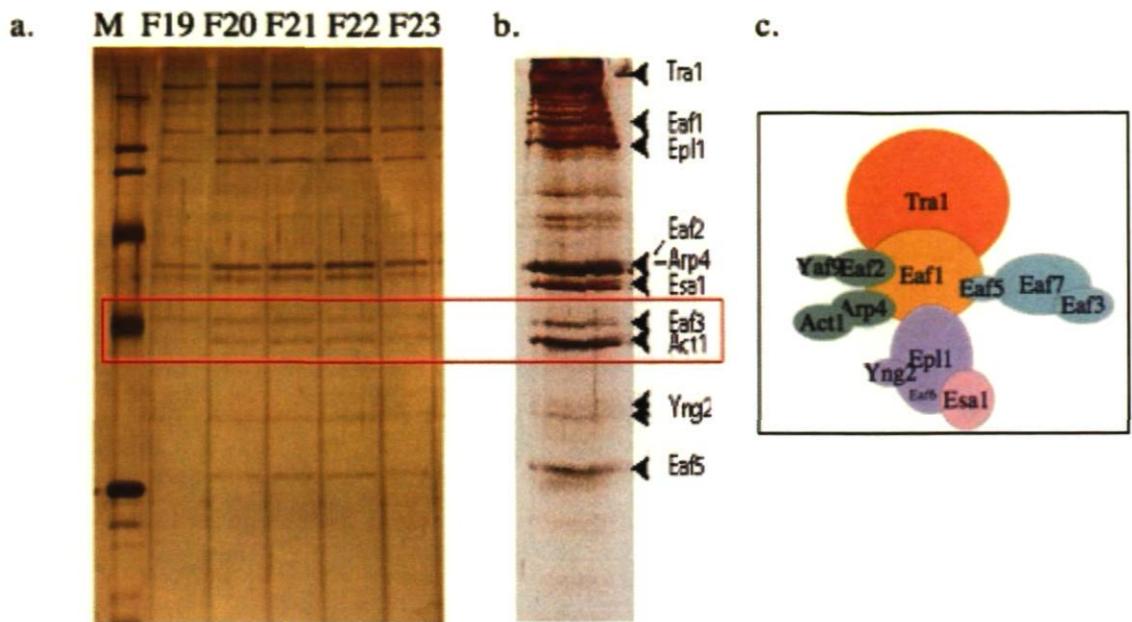


Figure 20 : Deux gels SDS-PAGE 10% colorés à l'argent. Le gel A contient les fractions purifiées (19 à 23) par séparation de taille de NuA4 Eaf1-TAP. Le gel B contient un échantillon du complexe NuA4 purifié par Mike Carrozza. La figure C représente la forme schématique de NuA4 obtenues par analyses biochimiques du complexe.

On peut distinguer à l'œil une diminution d'intensité de la bande correspondante à la sous-unité Eaf3 dans les fractions de taille progressivement décroissante contenant le complexe NuA4 comparativement à la sous-unité Act1 qui reste d'intensité comparable à l'ensemble du complexe (soit en quantité croissante de la fraction 20 à 21 et en quantité similaire dans les fractions 21 et 22). Ces deux sous-unités sont égales en quantités dans les fractions 20 et 21 qui correspondent à la taille attendue de 1,3Mda. On voit très clairement que la sous-unité Eaf3 est en quantité beaucoup plus faible que l'actine dans les complexes purifiés au laboratoire du Dr. Workman. Il est plus difficile de faire la même analyse avec les protéines Eaf7 et Eaf5. Eaf7 (49KDa) a une migration très mauvaise sur gel et est parfois identifiable à une bande plus ou moins floue, migrant à 80KDa environ. Eaf5 co-migre à 31/32 KDa avec la sous-unité Yaf9. Un gel de 18% (figure 18b) permet de les séparer. À partir de cette analyse, il est probable que le trimère constitué des sous-unités Eaf5/7/3 est probablement la densité supérieure visible dans nos échantillons NuA4 purifiés et manquant dans l'échantillon précédemment analysé.

### 3.2.2 Analyse de la localisation du trimère Eaf5/7/3

Pour confirmer ou non cette hypothèse, les purifications des complexes NuA4 Eaf5-TAP et NuA4 sans le trimère (souche Tap Epl1  $\Delta$ eaf5) ont été réalisées (Figure21) et sont en cours d'analyse par microscopie électronique.

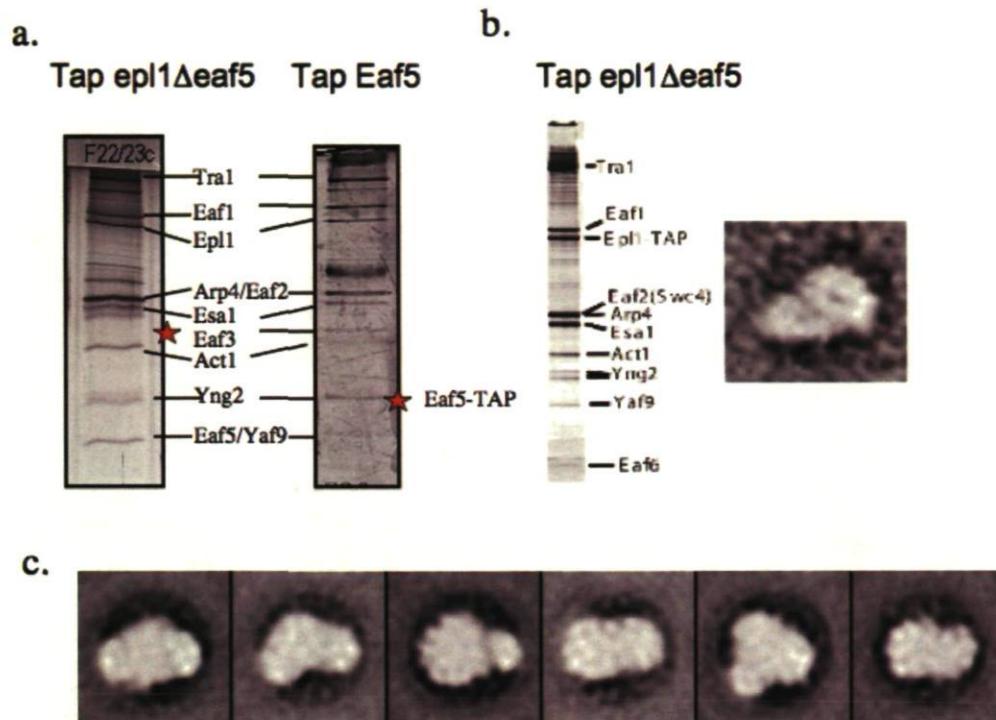


Figure 21 : Localisation du trimère Eaf5/7/3. a. Gels SDS-PAGE 10% des complexes NuA4 purifiés avec séparation de taille sans le trimère (Tap Epl1 $\Delta$ eaf5) et NuA4 avec la sous-unité Eaf5-TAP. b. Gel SDS-PAGE 10% du complexe NuA4 sans le trimère (Tap Epl1 $\Delta$ eaf5) sans séparation de taille et image moyenne obtenue par cryo-EM c. Images moyennes obtenues par cryo-EM du complexe NuA4 (a) sans le trimère Eaf5/7/3.

Les images obtenues des premiers micrographes réalisés avec la purification du complexe NuA4 sans trimères sont difficiles à analyser, l'homogénéité étant plus faible. Nos collaborateurs J. Chittuluru et F.J. Asturias nous ont cependant indiqués que la majorité des particules semblent avoir perdu la densité supplémentaire. La localisation par marquage anticorps du trimère (Eaf5-TAP, figure 21a.) apportera donc des résultats essentiels.

### 3.2.3 Localisation des sous-unités Tra1, Eaf1 et du module piccoloNuA4 (Epl1)

Nous avons réalisé deux purifications de NuA4 avec trois sous-unités étiquetées soit Epl1-TAP, Tra1-Myc et Eaf1-TAP (figure 22a). Ces trois marquages permettront de localiser trois modules du complexe : Tra1, Eaf1 et piccoloNuA4. Connaissant les tailles et les interactions entre les trois sous-unités, deux modèles s'imposent (figure 22b et 22c) :

- Soit Tra1 représente le lobe A et toutes les autres sous unités (sauf le module manquant, le trimère ?) dont Eaf1 et Epl1 forment le lobe B.
- Soit Tra1 et Eaf1 sont contenus dans le lobe B et piccolo se situe dans le lobe A.

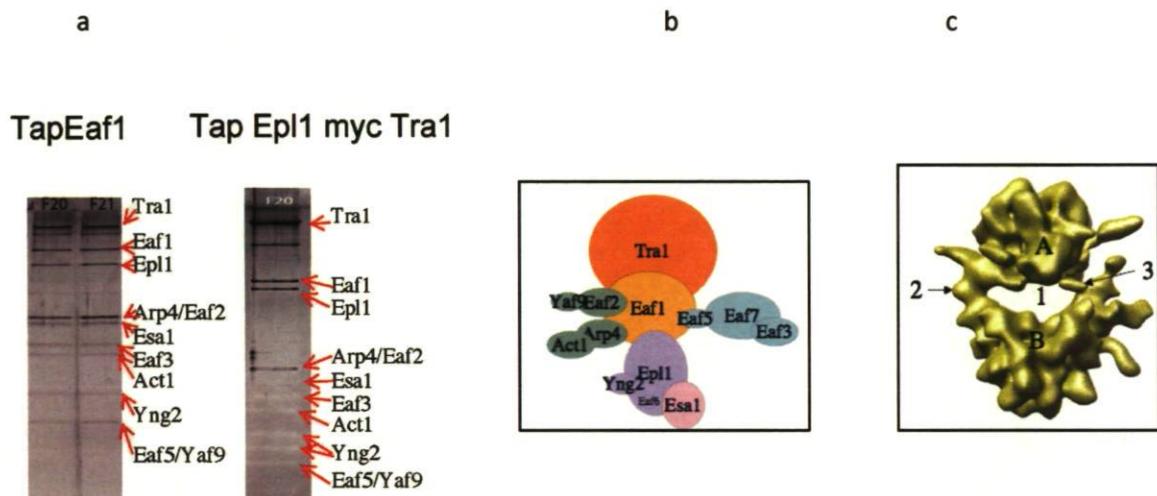


Figure 22 : a. Gels SDS-PAGE 10% et gradient 4%-12% des complexes NuA4 purifiés avec séparation de taille. b. La représentation schématique de NuA4 obtenues par analyses biochimiques du complexe. c. Structure tridimensionnelle annotée.

Pour les deux échantillons envoyés, des expériences de marquage anticorps pour localiser les trois modules vont être réalisées et analyser par J. Chittuluru. Mais ces expériences demandent beaucoup d'analyse et quelques répétitions. Nous avons cependant déjà obtenu des images moyennes pour des complexes NuA4 Tra1-myc (figure 23). Elles sont très semblables à celles qui ont été obtenues avec NuA4 Epl1-TAP. On peut donc confirmer la structure pyramidale du complexe et les deux structures caractéristiques en fourche et en fleur.

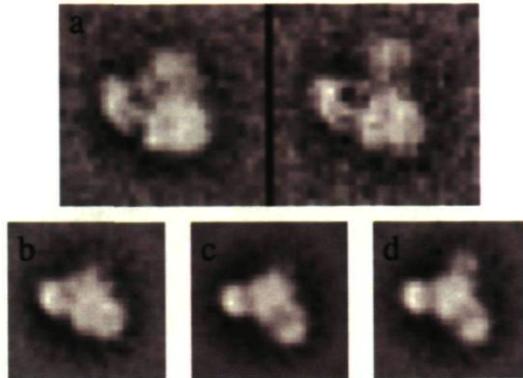


Figure 23 : Images moyennes des orientations majoritaires du complexe NuA4 Tra1-myc (a. et b. Orientation « structure en fourche ». c. et d. Orientation « structure en fleur »).

### 3.2.4 Localisation du module commun au complexe de remodelage de la famille INO80 (Eaf2/Yaf9/Arp4/Act1)

Pour localiser les sous-unités communes au complexe NuA4 et Swr1, nous comptons utiliser des souches Tap Epl1 Arp4-HA et Tap Swr1 Arp4-HA. Des purifications des complexes NuA4 et SWR1 ont déjà été réalisées à partir de ces souches (figure24).

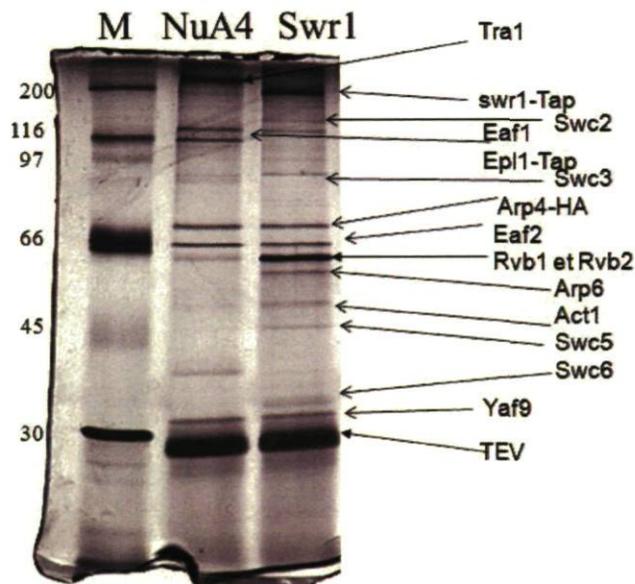


Figure 24 : Gel SDS-PAGE colorés à l'argent des complexes Swr1 et NuA4 Arp4-HA purifiés.

**Chapitre 4 :**  
**DISCUSSION,**  
**CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

## 4.1 Discussion

Dans ce projet de structure tridimensionnelle du complexe NuA4, les techniques de purification de protéines et de microscopie électronique ont toutes deux montré leurs possibilités et leurs limites.

Les purifications des protéines peuvent permettre une grande pureté et de très bons rendements. Dans le cas de complexes protéiques, il reste à analyser l'homogénéité des particules, la quantité d'agrégats, de complexes dégradés et la possibilité de fractions « sous-complexes » ou « complexes partiels ». Cette analyse peut être simplifiée, comme nous l'avons démontré, par l'utilisation de la séparation par taille des complexes, qui va permettre une meilleure homogénéité des particules de complexes. Cette technique pourrait, et si possible, devrait être plus souvent appliquée dans le cas d'analyse biochimique des complexes protéiques. Elle permettrait certainement d'obtenir des résultats plus informatifs. Le fait est qu'il est difficile de définir à quel point la technique d'extraction affecte la structure d'un complexe protéique comme NuA4. L'arrimage des différents modules du complexe à la sous-unité Eaf1 doit être régulé essentiellement par des modifications post-traductionnelles qui sont susceptibles d'être altérées lors de l'extraction des protéines totales des cellules.

La technique d'analyse par cryo-microscopie électronique nécessite une grande homogénéité de taille et de pureté de particules et donc va limiter son analyse à la forme majoritaire. Elle ne va pas pouvoir évaluer si cette forme correspond au complexe protéique dégradé ou partiel (à 200KDa près) et elle ne va pas s'intéresser aux sous-populations de particules.

Dans les prochains mois, nous saurons si la structure de NuA4 englobe un nucléosome, comme il vient de l'être démontré par cryo-EM pour le complexe de remodelage RSC (Chaban et al., 2008). L'analyse du complexe SAGA permettra de déterminer avec une grande précision la localisation de Tra1. Gcn5, la sous-unité catalytique HAT de SAGA ne semble pas localisée dans une cavité (figure23). Si Esa1 est localisée dans la cavité du complexe, il est probable que son positionnement sur la chromatine soit très différent de

SAGA et plus proche de ceux des complexes de remodelages comme RSC. Ces données permettraient de rapprocher NuA4 de son orthologue humain Tip60 et aussi de lui conférer un mécanisme particulier.

Finalement, la structure tridimensionnelle du complexe NuA4 et la localisation des différents modules nous permettra de mettre en évidence la proximité de sous-unités du complexe. Arp4, Yng2, Esa1, Eaf3 sont déjà connus pour interagir avec les histones. Ces interactions sont peut-être interdépendantes ou au contraire compétitives et se régulent mutuellement. Il est aussi possible de découvrir que Tra1 possède un domaine proche de Esa1, ou d'une autre sous-unité. Cette information permettrait d'entreprendre des recherches biochimiques visant à établir une nouvelle fonction à Tra1. Eaf1 étant la sous-unité plateforme, unique à NuA4, des mutations ponctuelles de résidus peuvent entraîner un changement de structure du complexe ; la cryo-microscopie électronique nous permettra peut-être d'identifier un domaine clé d'Eaf1 pour la structure du complexe. Les protéines du complexes NuA4 contiennent des domaines ayant des activités spécifiques, comme les domaines SANT d'Eaf1 et Eaf2, les chromodomains d'Esa1 et Eaf3 ou les domaines PI3K et AID de Tra1 ; la cryo-microscopie électronique en (utilisant des anticorps spécifiques) permettra d'obtenir plus d'information sur ces domaines et leur rôle.

## **4.2 Conclusion et perspective**

La conclusion principale de mes expériences est la mise au point d'une technique de purification du complexe adapté pour l'analyse subséquente par microscopie électronique. La séparation de taille des complexes protéiques permet d'obtenir une grande fiabilité de résultats en choisissant les complexes de taille adéquate, non dégradé ou agrégé ou ceux dont un module serait absent. Cependant, ce projet nous a permis de découvrir la disparité de taille des complexes NuA4 purifiés et d'envisager des analyses biochimiques pour mieux caractériser ces différentes formes de complexe. Notre hypothèse est que le module manquant correspond au trimère Eaf5/7/3. Si elle se révèle juste (par analyse microscopique : marquage anticorps d'Eaf5-TAP et analyse du complexe NuA4 sans le trimère), nous pourrions envisager d'étudier plus en détail le mode d'interaction d'Eaf5 avec Eaf1 et sa régulation. Cette étude était déjà envisagée depuis la découverte du trimère en majorité indépendante de NuA4.

Concernant la reconstitution de la structure du complexe NuA4 déjà établie, on sait à présent qu'elle est partielle. L'analyse des complexes permettant une reconstitution complète du complexe va demander encore plusieurs mois. Cependant, la structure déjà disponible, même partielle, n'est pas sans intérêt. Il est certain, d'après nos données biochimiques et la taille du complexe analysé, que les sous-unités Eaf1 et Tra1, ainsi que le module piccoloNuA4 sont présents dans cette structure. Tra1 représente une masse trop importante pour être absente de ce complexe, Eaf1 est la plateforme d'assemblage du complexe qui lie les modules, et sans piccolo, le complexe serait inactif. Or l'activité des fractions purifiées est toujours testée par essai HAT. Les analyses de microscopie électronique par marquage anticorps vont permettre d'identifier dans quel lobe de la structure se situe Tra1, Eaf1 et piccoloNuA4 et peut-être d'envisager la sous-unité qui a une structure en pont (figure 13).

Les images bidimensionnelles obtenues du complexe NuA4 « entier » nous apportent aussi des renseignements sur la structure du complexe. D'après les différentes orientations observées, elle prend une forme pyramidale et présente deux motifs caractéristiques :

- Un motif en fourche, déjà présent dans les complexes NuA4 purifiés au laboratoire du Dr. Workman. Cette structure en fourche est aussi visible dans les images de microscopie électronique publiées du complexe SAGA (figure 25). Il est fort probable que cette structure soit caractéristique de la sous-unité Tra1. Pour confirmer cette hypothèse, nous allons purifier le complexe SAGA, en utilisant une souche Spt7-TAP, et l'analyser par microscopie électronique. Si la structure en fourche est retrouvée lors de cette analyse, nous pourrions l'identifier à Tra1.

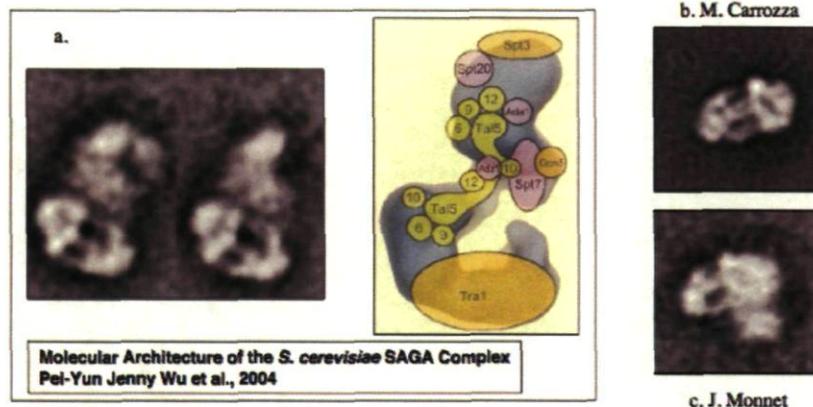


Figure 25 : Comparaison des images de microscopie électronique obtenues avec les complexes NuA4 (1,3 MDa, images b. et c.) et SAGA (1,8 MDa, image a.), contenant tous deux la sous-unité Tra1(Wu et al., 2004).

- Un motif en fleur, comprenant quatre parties globulaires de taille relativement similaire qui pourrait être identifié au module commun au complexe de remodelage SWR1 (Eaf2/Yaf9/Arp4/Act1 ont des poids moléculaires semblables). L'analyse du complexe SWR1 est envisagée par la même technique de purification en utilisant une souche Swr1-TAP. Si cette structure est retrouvée dans le complexe SWR1, on pourra l'assimiler aux sous-unités communes aux deux complexes. Cependant, cette analyse peut être compromise par la présence de la sous-unité Swc5 dans le complexe SWR1 qui se lie à la

même portion N-terminale de la protéine Swr1 (Bao and Shen, 2007a). L'analyse de marquage anticorps par microscopie électronique avec des souches Eaf2-HA et Arp4-HA (figure 23) permettra donc de compléter les informations obtenues avec la souche Swr1-TAP.

De plus, le laboratoire du Dr F.J. Asturias a aussi réalisé l'analyse du complexe recombinant piccolo NuA4. Après avoir obtenu des résultats de l'expérience de marquage anticorps d'Epl1-TAP, il pourra envisager la localisation de piccoloNuA4 dans le complexe NuA4.

De nouveau, nous adaptons nos techniques d'analyse à la particularité de notre complexe NuA4. La similarité des modules ou sous-unités partagés avec d'autres complexes vont permettre la localisation des protéines dans la structure tridimensionnelle de NuA4.

Une expérience essentielle reste encore à réaliser : l'analyse par microscopie électronique du complexe NuA4 en interaction avec un nucléosome. Pour cela l'échantillon de complexe NuA4 purifié est incubé avec des nucléosomes en absence d'acétylCoA. Cette expérience permettra de déterminer si la cavité présente dans la structure du complexe inclus un nucléosome et aussi si cette fixation induit un changement de structure.

Dans notre équipe, nous travaillons principalement sur le complexe NuA4, mais aussi sur son orthologue humain Tip60 et des complexes aux activités proches comme le complexe de remodelage SWR1 de levure ou le complexe histone acétyltransférase HBO1 humain. Nous avons donc comme but de mettre au point la production et la purification de ces complexes pour réaliser leur analyse tridimensionnelle par microscopie électronique.

## **Bibliographie**

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.

Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* 18, 5108-5119.

Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhatar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.

Ard, P.G., Chatterjee, C., Kunjibettu, S., Adside, L.R., Gralinski, L.E., and McMahon, S.B. (2002). Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* 22, 5650-5661.

Asturias, F.J., Ezeokonkwo, C., Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (2004). Electron microscopic analysis of the RSC chromatin remodeling complex. *Methods Enzymol* 376, 48-62.

Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R.T., Cronier, D., Allard, S., and Cote, J. (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol* 28, 2257-2270.

Avvakumov, N., and Cote, J. (2007a). Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease. *Subcell Biochem* 41, 295-317.

- Avvakumov, N., and Cote, J. (2007b). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26, 5395-5407.
- Babiarz, J.E., Halley, J.E., and Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 700-710.
- Bao, Y., and Shen, X. (2007a). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat Res* 618, 18-29.
- Bao, Y., and Shen, X. (2007b). SnapShot: chromatin remodeling complexes. *Cell* 129, 632.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Ben-Aroya, S., Coombes, C., Kwok, T., O'Donnell, K.A., Boeke, J.D., and Hieter, P. (2008). Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 30, 248-258.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Bird, A.W., Yu, D.Y., Pray-Grant, M.G., Qiu, Q., Harmon, K.E., Megee, P.C., Grant, P.A., Smith, M.M., and Christman, M.F. (2002). Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419, 411-415.
- Biswas, D., Takahata, S., and Stillman, D.J. (2008). Different genetic functions for the Rpd3(L) and Rpd3(S) complexes suggest competition between NuA4 and Rpd3(S). *Mol Cell Biol* 28, 4445-4458.

Bittner, C.B., Zeisig, D.T., Zeisig, B.B., and Slany, R.K. (2004). Direct physical and functional interaction of the NuA4 complex components Yaf9p and Swc4p. *Eukaryot Cell* 3, 976-983.

Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev* 17, 1415-1428.

Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S., and Workman, J.L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* 292, 2333-2337.

Cairns, B.R. (2007). Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol* 14, 989-996.

Carmen, A.A., Milne, L., and Grunstein, M. (2002). Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3. *J Biol Chem* 277, 4778-4781.

Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., *et al.* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581-592.

Chaban, Y., Ezeokonkwo, C., Chung, W.H., Zhang, F., Kornberg, R.D., Maier-Davis, B., Lorch, Y., and Asturias, F.J. (2008). Structure of a RSC-nucleosome complex and insights into chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1272-1277.

Chen, Y., and Struhl, G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* 125, 4943-4948.

- Choy, J.S., and Kron, S.J. (2002). NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response. *Mol Cell Biol* 22, 8215-8225.
- Choy, J.S., Tobe, B.T., Huh, J.H., and Kron, S.J. (2001). Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. *J Biol Chem* 276, 43653-43662.
- Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J., and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 19, 2515-2526.
- Cole, M.D., and McMahon, S.B. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18, 2916-2924.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 14, 997-1007.
- Deleu, L., Shellard, S., Alevizopoulos, K., Amati, B., and Land, H. (2001). Recruitment of TRRAP required for oncogenic transformation by E1A. *Oncogene* 20, 8270-8275.
- Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P., and Cote, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* 16, 979-990.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-1004.
- Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev* 14, 147-154.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 24, 1884-1896.

Eisen, J.A., Sweder, K.S., and Hanawalt, P.C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23, 2715-2723.

Ferreira, H., Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2007). Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms. *J Mol Biol* 374, 563-579.

Ginsburg, D.S., Govind, C.K., and Hinnebusch, A.G. (2009). NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Mol Cell Biol* 29, 6473-6487.

Gondor, A., and Ohlsson, R. (2008). Chromatin insulators and cohesins. *EMBO Rep* 9, 327-329.

Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., *et al.* (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11, 1640-1650.

Hatch, C.L., and Bonner, W.M. (1996). An upstream region of the H2AZ gene promoter modulates promoter activity in different cell types. *Biochim Biophys Acta* 1305, 59-62.

Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., and Berger, S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648-2663.

Jiang, Y.W., and Stillman, D.J. (1996). Epigenetic effects on yeast transcription caused by mutations in an actin-related protein present in the nucleus. *Genes Dev* 10, 604-619.

- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., and Kusch, T. (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30, 680-687.
- Johansen, K.M., and Johansen, J. (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res* 14, 393-404.
- Kalocsay, M., Hiller, N.J., and Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 33, 335-343.
- Krebs, J.E. (2007). Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Mol Biosyst* 3, 590-597.
- Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., *et al.* (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13513-13518.
- Li, B., Gogol, M., Carey, M., Lee, D., Seidel, C., and Workman, J.L. (2007). Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. *Science* 316, 1050-1054.
- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J.L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18385-18390.
- Lin, Y.Y., Lu, J.Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., *et al.* (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136, 1073-1084.

Lin, Y.Y., Qi, Y., Lu, J.Y., Pan, X., Yuan, D.S., Zhao, Y., Bader, J.S., and Boeke, J.D. (2008). A comprehensive synthetic genetic interaction network governing yeast histone acetylation and deacetylation. *Genes Dev* 22, 2062-2074.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D., and Cole, M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.

Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.

Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* 20, 711-722.

Mitchell, L., Lambert, J.P., Gerdes, M., Al-Madhoun, A.S., Skerjanc, I.S., Figeys, D., and Baetz, K. (2008). Functional dissection of the NuA4 histone acetyltransferase reveals its role as a genetic hub and that Eaf1 is essential for complex integrity. *Mol Cell Biol* 28, 2244-2256.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.

Mutiu, A.I., Hoke, S.M., Genereaux, J., Hannam, C., MacKenzie, K., Jobin-Robitaille, O., Guzzo, J., Cote, J., Andrews, B., Haniford, D.B., *et al.* (2007). Structure/function analysis of the phosphatidylinositol-3-kinase domain of yeast tra1. *Genetics* 177, 151-166.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11, 709-719.

Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R.T., Allard, S., Lane, W.S., and Cote, J. (2001). Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol Cell Biol* 21, 7629-7640.

Nourani, A., Utley, R.T., Allard, S., and Cote, J. (2004). Recruitment of the NuA4 complex poises the PHO5 promoter for chromatin remodeling and activation. *EMBO J* 23, 2597-2607.

Osley, M.A. (2006). Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 179-189.

Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2008). The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat Struct Mol Biol* 15, 338-345.

Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2001). The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev* 15, 1619-1624.

Pinto, I., and Winston, F. (2000). Histone H2A is required for normal centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19, 1598-1612.

Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116, 3677-3685.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.

Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 650-655.

Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R., and Stewart, A.F. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J* *20*, 7137-7148.

Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* *25*, 269-277.

Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S.B., Litchfield, D.W., Yates, J.R., 3rd, Lees-Miller, S.P., Cole, M.D., and Brandl, C.J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol Chem* *273*, 26559-26565.

Selleck, W., Fortin, I., Sermwittayawong, D., Cote, J., and Tan, S. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex requires the Enhancer of Polycomb A domain and chromodomain to acetylate nucleosomes. *Mol Cell Biol* *25*, 5535-5542.

Shevchenko, A., Roguev, A., Schaft, D., Buchanan, L., Habermann, B., Sakalar, C., Thomas, H., Krogan, N.J., and Stewart, A.F. (2008). Chromatin Central: towards the comparative proteome by accurate mapping of the yeast proteomic environment. *Genome Biol* *9*, R167.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* *68*, 850-858.

Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* *19*, 629-639.

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

Strahl, B.D., Grant, P.A., Briggs, S.D., Sun, Z.W., Bone, J.R., Caldwell, J.A., Mollah, S., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., *et al.* (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 22, 1298-1306.

Szerlong, H., Hinata, K., Viswanathan, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B.R. (2008). The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat Struct Mol Biol* 15, 469-476.

Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.

Tsukiyama, T. (2002). The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 422-429.

Utlely, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Cote, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* 25, 8179-8190.

van Vugt, J.J., Raney, M., Campsteijn, C., and Logie, C. (2007). The ins and outs of ATP-dependent chromatin remodeling in budding yeast: biophysical and proteomic perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1769, 153-171.

Vignali, M., Steger, D.J., Neely, K.E., and Workman, J.L. (2000). Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J* 19, 2629-2640.

Warburton, P.E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., Sullivan, K.F., *et al.* (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7, 901-904.

- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29, 653-663.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F., and Schultz, P. (2004). Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell* 15, 199-208.
- Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064-1071.
- Wu, W.H., Wu, C.H., Ladurner, A., Mizuguchi, G., Wei, D., Xiao, H., Luk, E., Ranjan, A., and Wu, C. (2009). N terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. *J Biol Chem* 284, 6200-6207.
- Xu, C., Cui, G., Botuyan, M.V., and Mer, G. (2008). Structural basis for the recognition of methylated histone H3K36 by the Eaf3 subunit of histone deacetylase complex Rpd3S. *Structure* 16, 1740-1750.
- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513, 124-128.
- Zhang, H., Richardson, D.O., Roberts, D.N., Utlej, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cote, J., and Cairns, B.R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Mol Cell Biol* 24, 9424-9436.