

MODULATION DU POSITIONNEMENT DES NUCLÉOSOMES PAR LE VARIANT  
D'HISTONE H2A.Z CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

par

Geneviève Morin

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2007

III-1858



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-42997-6*  
*Our file    Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-42997-6*

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 5 février 2008

*le jury a accepté le mémoire de Mme Geneviève Morin dans sa version finale.*

*Membres du jury*

M. Luc Gaudreau  
Directeur  
Département de biologie

M. Daniel Lafontaine  
Membre  
Département de biologie

M. Benoît Leblanc  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est empaqueté dans une structure nommée chromatine, principalement grâce à des protéines appelées histones. Le haut niveau de compaction de cette structure exerce généralement un effet négatif sur les processus impliquant l'ADN, tels la recombinaison, la réplication, la réparation et la transcription. Un remodelage de la chromatine est nécessaire pour que ces processus puissent être effectués. Ce remodelage peut impliquer divers procédés, dont l'incorporation de variants d'histones. Le variant d'histone H2A.Z a ici été étudié afin de mieux comprendre son rôle dans la régulation de la transcription chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La présence du variant d'histone H2A.Z aux promoteurs des gènes *GAL1* et *GAL10*, impliqués dans le catabolisme du galactose, a été observée par immunoprécipitation de la chromatine par notre groupe. Nous avons aussi déterminé que sa présence est nécessaire pour l'activation de la transcription de ces gènes, son rôle exact restant encore irrésolu. Les travaux ci-présentés se basent sur l'hypothèse selon laquelle H2A.Z joue un rôle dans la stabilisation de nucléosomes clés à la région promotrice, en attente du signal d'activation, lesquels seraient désassemblés au moment de l'induction. Aussi, nous avons voulu étudier le rôle de H2A.Z sur le positionnement, la stabilité et l'abondance relative des nucléosomes à l'ensemble de la région promotrice de *GAL1* et *GAL10* chez *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide de la technique de balayage des nucléosomes. Cette technique a nécessité une mise au point à ce jour inachevée, étant donné la rencontre de différents obstacles, tels le besoin d'un contrôle pour réduire les faux positifs, l'optimisation de l'amplification par toutes les paires d'amorces dans les mêmes conditions expérimentales, etc. Ainsi, il a été possible d'obtenir un patron reproductible du positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *GAL1* et *GAL10* en absence d'induction dans la levure de type sauvage et pour le mutant de délétion de H2A.Z correspondant. Ces patrons démontrent des positions

similaires, mais des niveaux d'abondance différents pour certains nucléosomes, ce qui permet de supposer que H2A.Z influence la stabilité de certains nucléosomes, du moins à cette région promotrice.

Dans le but de valider la technique utilisée, des études similaires ont été réalisées à une autre région promotrice bien caractérisée. Le promoteur du gène *CHAI* a récemment fait l'objet de plusieurs études sur le positionnement des nucléosomes à sa région promotrice, de même que sur la présence du variant d'histone H2A.Z à cette même région. De ces expériences découlent la connaissance du positionnement des nucléosomes au promoteur en absence et en présence d'induction du gène, en plus de la confirmation de la présence de H2A.Z à cette région. Ce gène modèle a permis de valider l'efficacité de la technique de balayage des nucléosomes à fournir les mêmes résultats que ceux observés précédemment. Afin de vérifier le rôle de H2A.Z dans l'activation de la transcription de ce gène, un essai d'extension d'amorce a été réalisé. Contrairement au résultat attendu, il a été observé que la délétion de H2A.Z a un effet positif sur l'expression de *CHAI*.

Les expérimentations réalisées dans le cadre de ces travaux de maîtrise permettent de constater que la technique de balayage des nucléosomes est adéquate pour reproduire le positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *CHAI*. Toutefois, à la région promotrice de *GAL1* et *GAL10*, cette technique ne semble pas encore tout à fait au point. Finalement, il peut être conclu que l'influence du variant d'histone H2A.Z sur la régulation de la transcription de ces gènes s'exerce via des mécanismes différents.

## REMERCIEMENTS

Je désire d'abord remercier Luc Gaudreau, mon directeur de recherche, pour les conseils fournis au cours de mes travaux de maîtrise. J'aimerais en outre remercier les membres passés et présents du laboratoire, plus particulièrement Liette Laflamme, Benoît Guillemette, Joëlle Brodeur, Marc Larochelle, Annie Moisan, Sylvain Éthier, Alain Gervais et Maud Marques pour les discussions, le support, le matériel et les conseils. Je désire également souligner l'apport de mes conseillers Benoît Leblanc et Daniel Lafontaine. Je suis de plus reconnaissante envers le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies pour leur soutien financier.

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION	1
<b>1.1 La transcription eucaryote</b>	1
<b>1.2 La chromatine</b>	3
<b>1.3 Les histones</b>	5
<b>1.4 Le remodelage de la chromatine</b>	6
1.4.1 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN	8
1.4.1.1 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN de type I	9
1.4.1.2 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN de type II	9
1.4.1.3 La torsion induite par le passage de l'ARN polymérase de type III	10
1.4.2 Les modifications post-traductionnelles des histones	11
1.4.2.1 La phosphorylation	12
1.4.2.2 La méthylation	13
1.4.2.3 L'acétylation	14
1.4.2.4 L'ADP-ribosylation	16
1.4.2.5 L'ubiquitination	16
1.4.3 Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP	17
1.4.3.1 La famille SWI/SNF	18
1.4.3.2 La famille ISWI	21
1.4.3.3 La famille CHD	23
1.4.3.4 La famille INO80	24
1.4.4 Les variants d'histones	24
1.4.4.1 Variants de H2A	24
<b>1.4.4.1.1 H2A.Z</b>	24
<b>1.4.4.1.2 H2A.X</b>	31
<b>1.4.4.1.3 H2Av</b>	32
<b>1.4.4.1.4 MacroH2A</b>	32
<b>1.4.4.1.5 H2A<sup>Bbd</sup></b>	33
1.4.4.2 Variants de H3	33
<b>1.4.4.2.1 H3.3</b>	33
<b>1.4.4.2.2 CENP-A</b>	34
<b>1.5 Les gènes <i>GAL1</i> et <i>GAL10</i></b>	35
<b>1.6 Le gène <i>CHAI</i></b>	37

CHAPITRE 1	38
<b>2.1 matériels et méthodes</b>	38
2.1.1 Souches de levure et milieux de croissance	38
2.1.2 Préparation de noyaux	39
2.1.3 Préparation d'ADN génomique	40
2.1.4 Digestion à la nucléase micrococciale	40
2.1.5 Balayage des nucléosomes	41
2.1.5.1 Calcul d'analyse des résultats de Q-PCR	42
<b>2.2 Résultats</b>	43
CHAPITRE 2	51
<b>3.1 matériels et méthodes</b>	51
3.1.1 Souches de levure et milieux de croissance	51
3.1.2 Préparation d'ARN	51
3.1.3 Marquage de sondes radioactives	52
3.1.4 Extension d'amorce	52
<b>3.2 Résultats</b>	53
CONCLUSION	58
BIBLIOGRAPHIE	60

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADP : adénosine diphosphate  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNt : ARN de transfert  
ATP : adénosine triphosphate  
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine  
CTD : *Carboxy-Terminal Domain* (motif)  
dNTPs : les quatre désoxyribonucléotides triphosphates  
DO<sub>260</sub> : densité optique à 260nm  
DO<sub>600</sub> : densité optique à 600nm  
FACT : *FAcilitates Chromatin Transcription* (complexe)  
g : constante gravitationnelle =  $6,6 \times 10^{-11} \text{ N m}^2 / \text{kg}^{-2}$   
g : gramme  
G1 : première phase de croissance du cycle cellulaire (GAP-1)  
HMGB : famille de protéines de type *High Mobility Group*  
K : lysine  
L : litre  
LM-PCR : *Ligation-Mediated PCR*  
M : molaire (nombre de moles d'un soluté par litre de solution)  
mg : milligramme  
mL : millilitre  
mM : millimolaire  
MNase : nucléase micrococcale  
nm : nanomètre

P : proline

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (amplification en chaîne par polymérase)

pmol : picomole

Q-PCR : PCR Quantitatif ou PCR en temps réel

rpm : révolutions par minute

S : sérine

S : seconde phase du cycle cellulaire : réplication de l'ADN (*synthesis*)

SWI/SNF : complexe de remodelage de la chromatine SWI (*homothalic SWItching deficient*) –SNF (*Sucrose Non-Fermenting*)

T : thréonine

TBP : protéine liant la boîte TATA

U : unité d'enzyme\*

Y : tyrosine

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP : ATP marqué par un phosphore radioactif en position  $\gamma$

$\mu\text{L}$  : microlitre

$^{\circ}\text{C}$  : degrés Celsius

% p/v : nombre de g d'un soluté par 100mL de solution

% v/v : nombre de mL d'un liquide par 100mL de solution

\* La définition d'unité dépend de l'enzyme :

MNase : Une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour changer la  $\text{DO}_{260}$  d'un substrat d'ADN de 1 à pH8,0 et à 37°C.

AMVRT : Une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser le transfert d'une nanomole de déoxynucléotide en matériel précipitable par l'acide en 10 minutes à 37°C.

RNAsin : Une unité est la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber l'activité de 5ng de ribonucléase d'un facteur de 50%.

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 1

1 Souches de levures employées

38

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

- |          |                                                                                                 |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | Représentation des niveaux de compaction de la chromatine (adapté de Horn et Peterson, 2002).   | <b>4</b>  |
| <b>2</b> | Mécanismes proposés pour le déplacement des nucléosomes (adapté de Längst et Becker, 2003).     | <b>8</b>  |
| <b>3</b> | Comparaison de la structure d'un nucléosome contenant H2A et H2A.Z (tiré de Suto et al., 2000). | <b>25</b> |

## CHAPITRE 1

- |          |                                                                                                                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | Trois profils de nucléosomes possibles pour la technique de balayage des nucléosomes.                                                                           | <b>45</b> |
| <b>2</b> | Première ébauche de balayage de nucléosomes chez MSY590 en milieu riche non inducteur.                                                                          | <b>47</b> |
| <b>3</b> | L'ADN correspondant aux mono-nucléosomes n'est pas sur-digéré.                                                                                                  | <b>48</b> |
| <b>4</b> | Balayage des nucléosomes à la région promotrice de <i>GAL1-GAL10</i> en milieu non inducteur chez la levure de type sauvage et le mutant $\Delta$ <i>htz1</i> . | <b>50</b> |

## CHAPITRE 2

- 1 Schéma du positionnement des nucléosomes en milieu inducteur ou non à la région promotrice de *CHA1*, tel que décrit par Moreira et Holmberg (1998). 54
- 2 Un balayage des nucléosomes à la région promotrice de *CHA1* en milieu non inducteur valide la technique. 55
- 3 L'expression de *CHA1* n'est pas affectée négativement par la délétion de *HTZ1*. 56

# INTRODUCTION

## 1.1 La transcription eucaryote

La machinerie transcriptionnelle eucaryote peut être définie par le regroupement d'une polymérase d'ARN dépendante de l'ADN, de facteurs généraux de transcription, du complexe médiateur, de différents régulateurs de transcription et de complexes de remodelage de la chromatine. Il existe trois types de polymérases d'ARN chez les eucaryotes : i) la polymérase d'ARN de type I, responsable de la transcription des gènes codant pour les ARNs ribosomiques (ARNr) 28S, 5.8S et 18S ; ii) la polymérase d'ARN de type II, qui synthétise les ARNs messagers (ARNm), généralement destinés à servir de matrice pour la synthèse protéique ; iii) la polymérase d'ARN de type III, catalysant la transcription des ARNs de transfert (ARNt), de l'ARNr 5S et d'autres petits ARNs.

La polymérase d'ARN d'intérêt principal pour ces travaux de maîtrise est celle de type II. Cette dernière est composée de 12 sous-unités hautement conservées chez les eucaryotes (Woychik et Hampsey, 2002), nommées Rpb1 à Rpb12, requises pour la croissance normale, mais pas toutes essentielles. La plus grosse sous-unité, Rpb1, possède en son extrémité carboxy-terminale un domaine appelé CTD composé d'une répétition de l'heptapeptide YSPTSPS. Cette séquence consensus est conservée à travers l'évolution, mais le nombre de répétitions varie d'un organisme à l'autre, avec 26 copies chez la levure contre 52 chez l'être humain (Dahmus, 1996). La phosphorylation des résidus sérine de ce motif CTD constitue un point de contrôle de la transcription. En effet, la forme hypophosphorylée de la polymérase est associée avec la formation du complexe de pré-initiation au promoteur, tandis que sa forme hyper-phosphorylée est associée avec l'élongation de l'ARNm et est retrouvée aux régions codantes (Dahmus, 1996). Il est intéressant de noter

que la phosphorylation du CTD permet le recrutement de facteurs qui modifient les histones. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 5 de la répétition YSPTSPS entraîne le recrutement de Set1 dans l'extrémité 5' des gènes transcrits, Set1 catalysant la méthylation de la lysine 4 de H3, marque dont la corrélation avec l'expression génique compte parmi les plus claires (Ng *et al.*, 2003). Aussi, la phosphorylation du CTD entraîne le recrutement de Set2, un enzyme qui méthyle la lysine 36 de H3, et active l'épissage des ARNm (Krogan *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003; Millhouse et Manley, 2005).

Les facteurs généraux de transcription (entre autres TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH) sont des complexes multi-protéiques ayant pour rôle de cibler la polymérase au promoteur et de faciliter la réaction de transcription (Gill, 2001). Par exemple, TFIID contient TBP, une protéine liant une séquence consensus appelée «boîte TATA», retrouvée au promoteur de certains gènes chez la levure, et permettant d'y diriger la machinerie transcriptionnelle. Ce complexe induit une courbure dans l'ADN et peut interagir avec différents activateurs, ainsi qu'avec d'autres facteurs généraux de transcription, de sorte à faciliter la transcription (Coulombe et Burton, 1999).

Le complexe Srb/médiateur est requis pour la réponse aux activateurs de transcription. Il lie fortement et spécifiquement le CTD, mais ne serait pas présent lors de l'élongation transcriptionnelle (Pérez-Martin, 1999). Ce complexe contient un nombre variable de protéines; c'est sa composition qui détermine sa fonction positive ou négative en transcription (Pérez-Martin, 1999). Chez la levure, Med17 (anciennement Srb4 (Bourbon *et al.*, 2004)) est essentiel à la transcription de 95% des gènes de classe II (Holstege *et al.*, 1998). Alors que la plupart des formes de médiateur ont été caractérisées comme étant des co-activateurs (Rachez and Freedman, 2001), la kinase du CTD Cdk8 (Srb10) et son partenaire CycC (Srb11) sont présents dans certaines formes répressives de médiateur

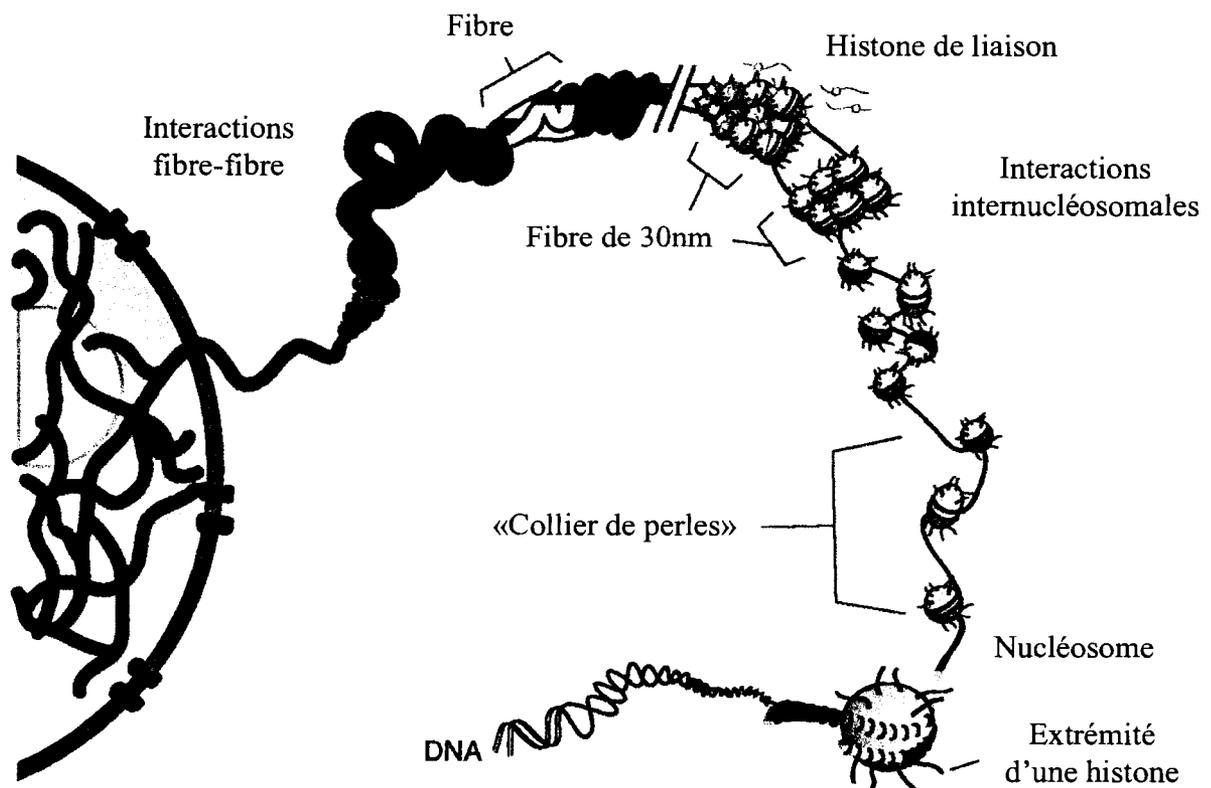
(Akoulitchev *et al.*, 2000; Hengartner *et al.*, 1998). Le complexe Srb/médiateur peut donc être impliqué dans l'activation ou la répression de la transcription.

La plupart des activateurs de transcription sont des protéines modulaires ayant à la fois un domaine d'activation et un domaine de liaison à l'ADN, servant à cibler la séquence à transcrire. Cependant, il existe des activateurs de transcription reconnaissant de façon indirecte, via d'autres protéines, la séquence cible. Les mécanismes d'action des régulateurs sont variés, pouvant cibler diverses composantes de la machinerie transcriptionnelle susmentionnée, telles TBP, TFIIB, TFIIF, des sous-unités du complexe Srb/médiateur, des complexes de remodelage de la chromatine, etc. (Berk, 1999; Pérez-Martin, 1999) Ils peuvent aussi agir en stimulant l'élongation, en favorisant le dégagement du promoteur ou en stabilisant un intermédiaire de réinitiation de la transcription (Berk, 1999).

## **1.2 La chromatine**

La compaction de l'ADN dans le noyau eucaryote représente un obstacle à différents processus cellulaires, tels la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN. L'enroulement et la compaction de l'ADN dans le noyau sont rendus possibles grâce à une structure formée d'ADN et de protéines appelée chromatine. Le nucléosome en est l'unité élémentaire et est composé de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones. Les extrémités amino-terminales de ces histones se projettent à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome et sont soumises à des modifications covalentes (Finch *et al.*, 1977; Chahal *et al.*, 1980).

Au cours de l'interphase, l'ADN est enroulé de 1,75 tour autour des histones H2A, H2B, H3 et H4, chacune en deux exemplaires, pour former un nucléosome et assembler, à l'aide de l'histone H1, une structure en collier de perles. Celle-ci est à son tour compactée sous forme d'une fibre de 30nm de diamètre, qui peut elle-même être plus ou moins condensée (voir Figure 1). Au niveau ultrastructural, en microscopie électronique, on distingue l'euchromatine, peu dense, qui contient les gènes actifs en transcription et l'hétérochromatine, plus dense, qui contient les gènes inactifs en transcription ainsi que l'ADN non codant. L'hétérochromatine peut à son tour se subdiviser en deux types : i) l'hétérochromatine constitutive, jamais exprimée, qui est située autour du centromère et dans les télomères, entre autres, et consiste en général en des séquences répétitives ; ii) l'hétérochromatine facultative, qui est parfois exprimée (Hediger et Gasser, 2006).



**Figure 1. Représentation des niveaux de compaction de la chromatine (adapté de Horn et Peterson, 2002).**

### 1.3 Les histones

Le cœur du nucléosome est composé de seulement quatre types de protéines, toutes de petite taille (11 à 16 kDa) et chargées positivement, que l'on appelle histones. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont chacune retrouvées en deux exemplaires dans le cœur d'un nucléosome (Chodaparambil *et al.*, 2006). Les histones du cœur nucléosomal sont étonnamment bien conservées à travers l'évolution. La stabilisation des nucléosomes et l'espacement entre chacun seraient favorisés, entre autres, par l'histone H1, une histone de liaison ayant un poids moléculaire significativement supérieur aux autres (27,8 kDa). Chez la levure, elle permet de maintenir environ 20 paires de bases entre les nucléosomes régulièrement espacés, par opposition à environ 50 chez plusieurs autres types cellulaires (Linder et Thoma, 1994 ; Zlatanova et van Holde, 1998).

Même s'il n'existe pas d'homologie de séquence entre les différentes histones nucléosomales, leur portion carboxy-terminale adopte une structure particulière commune : le motif « *histone-fold* ». Ce dernier est composé de trois hélices alpha et constitue le domaine d'hétéro-dimérisation des histones H2A-H2B et H3-H4 (Arents *et al.*, 1991 ; Arents *et al.*, 1995). Les paires d'histones (hétérodimères) sont arrangées de façon antiparallèle, formant une structure en forme de croissant appelé le « *handshake motif* » qui produit trois sites de liaison pour l'ADN (Arents *et al.*, 1995). Ce sont les extrémités carboxy-terminales qui sont les déterminants de l'assemblage du tétramère et ensuite de l'octamère. En effet, l'association de deux H3 lie les hétérodimères H3-H4 pour former un tétramère. Deux hétérodimères H2A-H2B sont ensuite ajoutés par la formation de deux associations entre H2B et H4. Ces interactions impliquent des liaisons hydrogènes et des liaisons hydrophobes entre les extrémités carboxy-terminales des différentes histones (Luger *et al.*, 1997).

Les extrémités amino-terminales des histones, moins structurées, sont indispensables pour la formation du nucléosome, mais essentielles pour la formation de la fibre de chromatine (Luger *et al.*, 1997). En fait, les extrémités amino-terminales sortent assez loin du centre du nucléosome, en passant par des canaux créés par la juxtaposition des sillons mineurs, et sont responsables d'assurer le contact avec d'autres protéines participant à différents niveaux de compaction de la chromatine (Luger *et al.*, 1997). Ainsi, l'extrémité amino-terminale de H4 sort du nucléosome, où elle entre en contact avec l'hétérodimère H2A-H2B d'un nucléosome adjacent sur une région chargée très négativement (Luger *et al.*, 1997). La modification post-traductionnelle des queues d'histones peut ainsi avoir un effet sur la structure et la condensation de la chromatine ; par exemple, l'acétylation de H4 (ajout d'une charge négative) peut affecter l'ouverture de la fibre de chromatine (Tse C. *et al.*, 1998).

#### **1.4 Le remodelage de la chromatine**

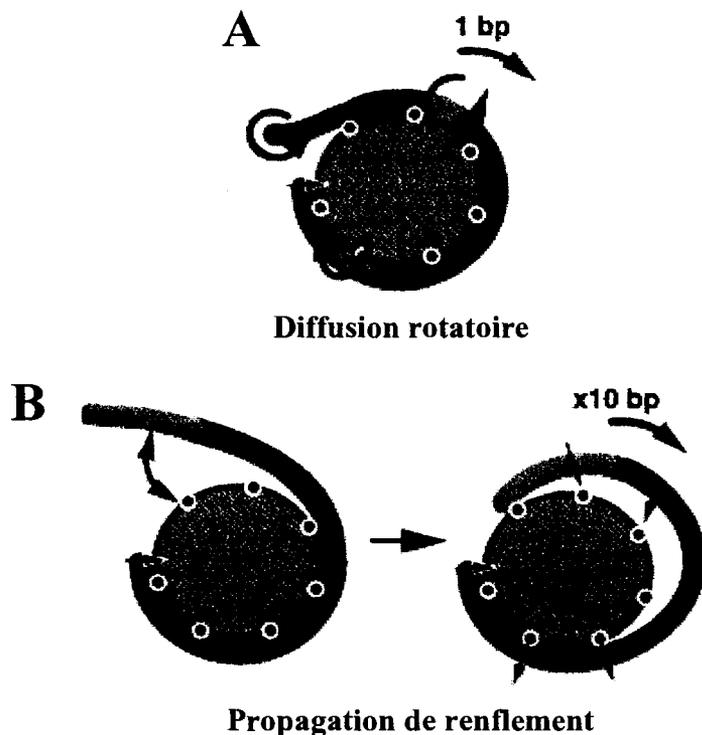
Le remodelage de la chromatine correspond à différents changements dynamiques de sa structure. Ils vont des changements locaux nécessaires à la régulation transcriptionnelle jusqu'aux modifications globales permettant la ségrégation des chromosomes : le remodelage de la chromatine peut être un phénomène épigénétique, c'est-à-dire un ensemble de changements réversibles et héréditaires qui ont lieu sans modification de la séquence d'ADN (Peterson et Workman, 2000).

Le remodelage de la chromatine est observable par la modification de sa structure et par la variation du positionnement des nucléosomes. Le déplacement des nucléosomes, de même que l'exposition transitoire de l'ADN nucléosomal, est un phénomène observable en absence d'activité enzymatique : à des concentrations ioniques élevées (environ 0,5M), les nucléosomes peuvent être déplacés en cis (glissement du nucléosome le long de l'ADN) sur

de longues distances simplement grâce à l'énergie thermique (Beard, 1978; Weischet, 1979). Même en présence de concentrations salines physiologiques, une légère hausse de température facilite le mouvement des nucléosomes sur plusieurs dizaines de bases (Pennings *et al.*, 1991; Meersseman *et al.*, 1991; Meersseman *et al.*, 1992).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le déplacement des nucléosomes : le processus de diffusion rotatoire et le processus de propagation de renflement (voir Figure 2) (Flaus et Owen-Hughes, 2001 ; Längst et Becker, 2003). Le modèle de diffusion rotatoire soutient qu'une activité de remodelage pourrait appliquer une torsion à l'ADN et altérer sa rotation à la surface du nucléosome (van Holde et Yager, 1984). La propagation directionnelle de cette torsion le long de l'ADN nucléosomal résulterait en son déplacement d'une paire de bases à la fois. Le mécanisme de propagation de renflement agit certainement au cours du remodelage par le passage des polymérases d'ARN et est aussi probablement impliqué dans le remodelage dépendant de l'ATP (Längst et Becker, 2003). Le modèle de propagation de renflement selon lequel les nucléosomes se déplacent sur l'ADN via la formation et la rotation d'un renflement d'ADN à la surface de l'octamère pourrait toutefois expliquer la translocation des nucléosomes dépendante de la transcription (Studitsky *et al.*, 1994).

La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN, la modification post-traductionnelle des queues des histones, l'interférence par l'ARN, l'incorporation de variants d'histones et l'activité des complexes de remodelage sont autant de moyens qui permettent le remodelage de la chromatine.



**Figure 2. Mécanismes proposés pour le déplacement des nucléosomes (adapté de Längst et Becker, 2003).** (A) et (B) Les éléments essentiels des deux modèles de remodelage du nucléosome. Les points noirs représentent les points de contact entre les histones et l'ADN.

#### 1.4.1 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN

Plusieurs études suggèrent l'existence de deux mécanismes principaux permettant la progression des polymérase d'ARN à travers la chromatine. Un de ces mécanismes a été identifié pour des polymérase d'ARN d'origine virale et de type III eucaryotes, et probablement aussi des complexes de remodelage de la chromatine : ce mécanisme permet la translocation des nucléosomes sans le démantèlement de l'octamère en solution (Clark et Felsenfeld, 1992 ; Studitsky *et al.*, 1997). Par contre, la transcription par la polymérase

d'ARN de type II impliquerait le déplacement d'un dimère H2A-H2B (Studitsky *et al.*, 2004).

#### **1.4.1.1 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN de type I**

Les nucléosomes des gènes activement transcrits par la polymérase d'ARN de type I sont dissociés (Dammann *et al.*, 1993), mais son mécanisme de remodelage de la chromatine est inconnu (Studitsky *et al.*, 2004).

#### **1.4.1.2 La torsion induite par le passage de la polymérase d'ARN de type II**

Les gènes transcrits par la polymérase d'ARN II conservent leur structure nucléosomale (Hartzog *et al.*, 2002), tout en étant transitoirement déplétés d'environ 50% des histones H2A et H2B (Baer et Rhodes, 1983; Louters et Chalkley, 1985; Nacheva *et al.*, 1989; Jackson, 1990), et possiblement des histones H3 et H4 (Ahmad et Henikoff, 2002; Tagami *et al.*, 2004). De plus, la position des nucléosomes est souvent changée, et la chromatine d'ordre supérieur est aussi dissociée durant la transcription (Hartzog *et al.*, 2002). La transcription par la polymérase d'ARN de type II d'une double-hélice d'ADN de pas droit requiert la rotation de la polymérase et du brin d'ARN nouvellement synthétisé autour de l'ADN. Le passage de la polymérase induit le super-enroulement positif de l'ADN matrice en amont et le super-enroulement négatif de l'ADN en aval (Liu et Wang 1987). La torsion induite par le passage de l'ARN polymérase n'est cependant pas toujours suffisante pour déplacer les histones (Johnson *et al.* 2005); l'action des complexes de remodelage de la chromatine est souvent requise.

Le complexe FACT (*F*Acilitates *C*hromatin *T*ranscription) a initialement été identifié par sa capacité à faciliter l'élongation de la transcription à travers les nucléosomes *in vitro* (Orphanides *et al.*, 1998; Sims *et al.*, 2004). Plus récemment, des études *in vivo* et *in vitro* ont confirmé que FACT est un déterminant majeur pour l'élongation de la transcription par la polymérase d'ARN de type II (Belotserkovskaya *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2003; Mason et Struhl, 2003). Des études biochimiques ont montré que le complexe FACT retire spécifiquement un dimère H2A-H2B du nucléosome, déstabilisant la structure de ce dernier pour permettre le passage de la polymérase. De plus, il a été trouvé que FACT possède une activité de chaperone d'histones, ce qui suggère qu'il joue un rôle dans l'établissement de la structure chromatinienne après que la polymérase ait traversé le nucléosome (Belotserkovskaya *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2003). Un indice du mécanisme d'action de FACT provient de la présence d'un domaine HMGB, capable d'induire la courbure de l'ADN (Orphanides *et al.*, 1999). Plusieurs facteurs d'élongation additionnels liant l'élongation de la transcription au remodelage de la chromatine ont été trouvés associés avec FACT (Simic *et al.*, 2003).

#### **1.4.1.3 La torsion induite par le passage de l'ARN polymérase de type III**

Les petits gènes transcrits par la polymérase d'ARN de type III sont couverts de facteurs de transcription qui pourraient prévenir la formation de nucléosomes sur les gènes actifs (Gerlach *et al.*, 1995). Le mécanisme de propagation de renflement est fortement suggéré pour expliquer la mobilisation des nucléosomes par la polymérase d'ARN de type III sur les autres gènes. Premièrement, l'octamère est transféré dans la direction opposée au mouvement de la polymérase (Clark et Felsenfeld, 1992; Studitsky *et al.*, 1994); si le déplacement était accompli via la diffusion rotatoire par la polymérase, on s'attendrait à ce que le nucléosome aille dans la direction inverse. Aucune évidence de mouvement dans cette direction n'a été obtenue. Deuxièmement, l'octamère reste à sa position originale sur l'ADN jusqu'à ce que la polymérase ait transcrit entre 50 et 60 nucléotides à l'intérieur du

nucléosome et qu'un fragment d'ADN suffisamment long (présumément pour permettre la formation du renflement) soit détaché de la surface de l'octamère (Studitsky, 2001). Finalement, étant donné que l'octamère ne quitte jamais l'ADN durant le transfert (Studitsky *et al.*, 1994), le seul mécanisme raisonnable pour que la polymérase et l'octamère se croisent est la formation d'un renflement d'ADN.

#### **1.4.2 Les modifications post-traductionnelles des histones**

Les queues d'histones sont impliquées dans divers processus cellulaires via deux mécanismes non mutuellement exclusifs : (i) changements dans la structure ou la composition des nucléosomes et/ou de la fibre chromatinienne et (ii) modulation de l'interaction de facteurs de régulation avec les queues d'histones (Hartzog et Winston, 1997). Les modifications covalentes des histones ne sont toutefois pas suffisantes à elles seules pour provoquer le déplacement des nucléosomes (Johnson *et al.*, 2005).

Les queues amino-terminales des histones nucléosomales sont sujettes à diverses modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la glycosylation, l'ADP-ribosylation, la carbonylation, la déimination et la sumoylation (Kouzarides, 2007). Ces modifications contrôlent la structure du nucléosome et des niveaux subséquents de compaction, en plus de médier la signalisation pour divers processus cellulaires (Fuchs *et al.* 2006). La distribution de telles modifications varie le long du cycle cellulaire, en réponse aux différents régulateurs, et entre les différents groupes eucaryotes (Fuchs *et al.* 2006). La présence de plusieurs résidus modifiés au cœur du nucléosome, sur des sites en apparence inaccessibles aux enzymes de modification suggère que certains résidus sont modifiés avant l'assemblage du nucléosome ou après le retrait d'un dimère H2A-H2B (Cosgrove et Wolberger, 2005).

La coordination de la structure de la chromatine pourrait être accomplie par la synergie entre différents enzymes de modification. Le fait que les complexes de remodelage dépendants de l'ATP puissent être acétylés par des acétyltransférases d'histones suggère que ces activités pourraient se retrouver associées sous forme de complexes multi-enzymatiques (Luo et Dean, 1999). Malgré le nombre toujours croissant d'enzymes identifiées comme modificateurs des queues d'histones, le mécanisme par lequel ces modifications régulent la structure de la chromatine n'est pas toujours clair (Cosgrove et Wolberger, 2005). Même si différentes études d'expression génomique à grande échelle vont à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle les différentes modifications participent à un très complexe code d'histone (Schubeler *et al.*, 2004), l'activation et la répression des gènes est clairement associée à différents patrons de modification.

#### **1.4.2.1 La phosphorylation**

Ayant lieu sur les sérines et thréonines, la phosphorylation des histones joue des rôles très variés dans la cellule, dont voici quelques exemples. Elle a été associée à la condensation des chromosomes (Ahn *et al.*, 2005) et à l'apoptose par la phosphorylation de la sérine 10 de H2B chez la levure (Ahn *et al.*, 2006). La phosphorylation de la sérine 129 de H2A, ainsi que de la sérine 1 de H4 à des sites de bris d'ADN double brin ont aussi été associés à la réparation de l'ADN chez la levure (Cheung *et al.*, 2005). Finalement, la phosphorylation de la sérine 10 de H3 a été observée chez plusieurs gènes actifs en transcription (Labrador et Corces, 2003).

D'anciens modèles proposent qu'en ajoutant des charges négatives aux histones, certaines modifications réversibles, comme la phosphorylation, pourraient affaiblir les interactions entre celles-ci et l'ADN, influençant directement la structure de la chromatine. Cependant, il n'y a pas d'évidences expérimentales appuyant cette théorie (Peterson et Laniel, 2004;

Cosgrove et Wolberger, 2005). Il est probable que ces modifications agissent au moins en contrôlant la liaison de protéines autres que les histones à la fibre chromatinienne, par exemple les enzymes de modification des histones, les enzymes de remodelage de la chromatine et les protéines associées à l'hétérochromatine. Même si certains chromodomaines lient les lysines méthylées, et que certains bromodomaines lient les lysines acétylées, aucune protéine interagissant spécifiquement avec les histones phosphorylées n'a encore été décrite (Fuchs *et al.*, 2006).

#### **1.4.2.2 La méthylation**

Il est maintenant évident que la méthylation des queues d'histones est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, dans la transduction de signaux et dans le développement (An, 2007). Les lysines peuvent être mono-, di- ou triméthylées, tandis que les arginines peuvent être mono- ou diméthylées. Il est présumé que la méthylation de l'arginine pourrait influencer la stabilité nucléosomale ou les interactions internucléosomales (Shilatifard, 2006).

Contrairement aux modifications réversibles des histones, comme l'acétylation, l'ubiquitination et la phosphorylation, la méthylation des histones, extrêmement stable, est généralement considérée comme une marque épigénétique à long terme (Sims *et al.*, 2004). En fait, des activités de déméthylation des histones n'ont été découvertes que récemment. Par exemple, LSD1 agit comme co-répresseur de la transcription par son activité de déméthylation spécifique de la lysine 4 de H3 (Shi *et al.*, 2004). Aussi, la protéine JHDM1, qui déméthyle spécifiquement la lysine 36 de H3, possède le domaine JmjC, qui lui confère un mécanisme de déméthylation particulier (Tsukada *et al.*, 2006).

Il est connu que les chromodomaines protéiques peuvent lier les lysines méthylées (Jenuwein et Allis, 2001); quelques protéines, comme par exemple HP1, ont été trouvées associées aux queues d'histones (H3K9 pour HP1) et impliquées dans la transmission de signaux de répression (Lachner *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2002). La reconnaissance de la lysine 9 méthylée de H3 par HP1 est en effet partiellement responsable de l'établissement et du maintien de l'hétérochromatine facultative (Shilatifard, 2006). HP1 est très conservée chez les eucaryotes, avec comme exception notable la levure *Saccharomyces cerevisiae*, chez laquelle les fonctions de silenceur dépendent de protéines spécifiques appartenant au complexe SIR (*Silent Information Regulatory*).

#### 1.4.2.3 L'acétylation

L'acétylation des histones est un processus réversible, possible sur les quatre histones majeures. Les histones sont globalement hypoacétylées. La décondensation de la structure du nucléosome par l'acétylation rend la chromatine plus accessible aux protéines nucléaires – les bromodomaines peuvent lier les lysines acétylées (Jenuwein et Allis, 2001) – et contribuerait, selon certains, au code d'histone (Fuchs *et al.* 2006). Le degré d'acétylation des queues d'histones est indicateur, entre autres, de l'efficacité de la réparation de l'ADN et de l'activité des silenceurs (Fuchs *et al.* 2006).

L'acétylation des histones peut jouer deux rôles non mutuellement exclusifs dans la régulation de la transcription. Premièrement, l'acétylation des lysines des histones peut directement affecter la condensation de la chromatine par l'ajout de charges négatives. En effet, des études *in vitro* ont montré qu'après avoir atteint un certain seuil d'acétylation par nucléosome, la condensation de la chromatine est bloquée (Tse *et al.*, 1998). Ainsi, la fonction de l'acétylation de plusieurs des résidus lysine semble être cumulative (Fischle *et al.*, 2003; Dion *et al.*, 2005). Deuxièmement, dans un modèle supporté par de nombreuses

évidences expérimentales, l'acétylation, tout comme l'hypo-acétylation des queues d'histones sert de signal pour la liaison d'autres facteurs, par exemple diverses acétyltransférases et déacétylases d'histones (Dhalluin *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 2002; Kurdistani et Grunstein, 2003; Parsons *et al.*, 2003).

Les complexes enzymatiques responsables de l'acétylation des histones sont nommés acétyltransférases. Il en existe deux grandes catégories, l'une responsable de l'acétylation des histones associées à la chromatine (Type A), l'autre acétylant H3 et H4 libres dans le cytoplasme (Type B) (Brownell et Allis, 1996; Kuo et Allis, 1998). Plusieurs acétyltransférases acétylant les histones chromatiniennes sont par la même occasion des co-activateurs de transcription, puisqu'il est reconnu que les histones des régions actives en transcription sont généralement hautement acétylées (Mizzen *et al.*, 1996; Grunstein, 1997; Haswell et O'Shea, 1999).

Le complexe acétyltransférase de type A le plus étudié chez la levure est nommé SAGA (*Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase*) (Grant *et al.*, 1997). Sa sous-unité catalytique, Gcn5, acétyle principalement H3 et H2B. Ce faisant, elle exerce un contrôle positif sur la transcription (Suka *et al.*, 2001). Un autre complexe de type A possédant une activité acétyltransférase est NuA4 (*Nucleosome acetyltransferase of histone H4*), dont la sous-unité catalytique est Esa1 (Allard *et al.*, 1999). Chez la levure, NuA4 est le seul complexe acétyltransférase d'histone essentiel à la survie (Smith *et al.*, 1998; Allard *et al.*, 1999). Celui-ci est plutôt actif dans l'acétylation de H4 et de H2A, et tout autant pour l'activation de la transcription.

#### **1.4.2.4 L'ADP-ribosylation**

Parmi les histones, H1 et H2B sont les accepteurs préférentiels d'ADP-ribose *in vivo* (Huletsky *et al.*, 1989). L'ADP-ribosylation des histones, généralement activée après des dommages à l'ADN, peut être covalente ou non covalente. La plupart des observations suggèrent que l'ADP-ribosylation de H1 affaiblit son interaction avec l'ADN, modulant la décondensation de la chromatine et affectant la stabilité des nucléosomes (Reale *et al.*, 2000). Cependant, la condensation de la chromatine a aussi été nommée comme conséquence de l'ADP-ribosylation de H1 (Wong *et al.* 1983). Ces rôles en apparence conflictuels pourraient dépendre de la distribution des modifications sur le chromosome (Kraus et Lis, 2003).

#### **1.4.2.5 L'ubiquitination**

L'ubiquitination consiste en l'ajout réversible, sur les résidus lysines, d'une protéine de 76 acides aminés très conservée chez les eucaryotes. Contrairement à la majorité des cas, l'ubiquitination des histones n'est pas liée à la dégradation protéique; elle a plutôt été associée avec une chromatine active en transcription, car elle déstabiliserait la structure du nucléosome (Li *et al.*, 1993) . À l'encontre de ces observations, certains affirment qu'elle serait impliquée dans la répression télomérique. D'autres ont récemment trouvé H2A ubiquitinée sur le chromosome X inactif de cellules femelles (Shilatifard, 2006).

Différents groupes ont identifié la mono-ubiquitination de H2B comme étant un prérequis pour la méthylation spécifique de la lysine 4 de H3 (Sims *et al.* 2004), mais aucun facteur n'est connu pour lier H2B ubiquitinée (Shilatifard, 2006). Il a récemment été montré que l'ubiquitination de la lysine123 de H2B augmente le taux de recrutement de la polymérase

d'ADN de type II au promoteur du gène *GALI*, rôle indépendant de la méthylation de la lysine 4 de H3 (Shukla et Bhaumik, 2007).

### **1.4.3 Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP**

Durant l'interphase, l'ADN est majoritairement assemblé en nucléofilament protéique dense, même dans les régions euchromatiques où le génome subit la réplication, la transcription, la réparation ou la recombinaison (Peterson, 2000). Les remodeleurs de la chromatine y sont évidemment impliqués dans les fonctions telles la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, en plus du développement et de la progression du cycle cellulaire. De récents travaux ont aussi montré diverses nouvelles fonctions des remodeleurs de chromatine, telles le dépôt de variants d'histones, la cohésion entre chromatides sœurs, ainsi que la participation à l'élongation et la terminaison de transcrits (Cairns, 2005).

Le premier complexe de remodelage de la chromatine a été décrit chez la levure. Les gènes codant pour ses diverses sous-unités ont été originellement identifiés lors de deux criblages indépendants visant à identifier des mutations affectant le changement de type sexuel ou la croissance sur sucrose (Workman et Kingston, 1998; Sudarsanam et Winston, 2000), d'où le nom SWI (*homothalic SWItching deficient*) –SNF (*Sucrose Non-Fermenting*). Des études génétiques ont révélé que plusieurs mutations pouvant supprimer les phénotypes du mutant *swi/snf* correspondaient à des gènes d'histones, indiquant une connexion directe entre la fonction de SWI/SNF et la chromatine. Les évidences biochimiques de cette relation ont été apportées par l'observation que le complexe SWI/SNF pouvait altérer la structure des nucléosomes de façon dépendante de l'ATP (Workman et Kingston, 1998; Vignali *et al.*, 2000). Depuis, plusieurs protéines homologues ayant des rôles similaires

dans la modulation de l'accessibilité à la chromatine ont été identifiées chez les eucaryotes supérieurs.

Plusieurs remodeleurs de la chromatine sont des complexes multiprotéiques hydrolysant l'ATP pour altérer le positionnement des nucléosomes, rompre les contacts ADN-histone et déstabiliser la structure et la fluidité de la chromatine (Cairns, 2005). L'altération de la structure ou du positionnement des nucléosomes dans la chromatine est accomplie par leur dissociation, leur glissement ou leur relocalisation, autrement dit, de façon non-covalente. Ce type de réaction de remodelage laisse l'octamère d'histone intact et change uniquement sa localisation relativement à la séquence d'ADN, soit le transfert d'histones hors de la région promotrice vers une molécule acceptrice (*trans*), soit le glissement du nucléosome le long de l'ADN (*cis*) (Korber *et al.* 2004). Lors du remodelage de la chromatine, l'ADN nucléosomal devient plus accessible aux endonucléases de restriction et aux facteurs de transcription (Peterson et Workman, 2000).

Les complexes de remodelage de la chromatine de la super-famille Swi2/Snf2 sont divisés en quatre groupes selon leurs propriétés biochimiques, la similarité de séquence de leur sous-unité ATPase et leur cofacteur préférentiel d'acides nucléiques : Swi2, ISWI, CHD et INO80 (Peterson, 2000; Längst et Becker, 2001; Tsukiyama *et al.*, 2002). Les deux classes de complexes les mieux caractérisées sont SWI/SNF et ISWI, généralement associés à l'activation et à la répression de la transcription, respectivement.

#### **1.4.3.1 La famille SWI/SNF**

Les ATPases de cette famille contiennent un bromodomaine (Grüne *et al.*, 2003) capable de reconnaître les lysines acétylées de la queue amino-terminale de H4 (Winston et Allis,

1999), interaction en partie responsable du recrutement du complexe (Dhalluin *et al.*, 1999 ; Jacobson *et al.*, 2000 ; Owen *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2005). Les complexes faisant partie de la famille SWI/SNF sont composés de neuf protéines ou plus, certaines formant le cœur du complexe et d'autres, non conservées, dont plusieurs sont des protéines régulatrices liant l'ADN. Les protéines de la famille Swi2/Snf2 possèdent une activité de remodelage et une activité d'hydrolyse de l'ATP. En plus d'une multitude de motifs prédits de liaison d'histones, les complexes de remodelage SWI/SNF possèdent plusieurs domaines de liaison non spécifiques à l'ADN; par exemple, le domaine HMG, hautement conservé, qui induit une courbure nette de l'ADN en contactant le sillon mineur (Thomas et Travers, 2001). Aussi, ils comptent deux motifs en doigts de zinc, ceux-là moins conservés, dont les fonctions sont de médier la reconnaissance de séquences d'ADN et les interactions inter-protéiques (Thomas et Travers, 2001). Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que SWI/SNF est un co-activateur essentiel de certains récepteurs hormonaux nucléaires et que certaines de ses sous-unités représentent des cibles dans diverses cascades de signalisation (Simone, 2006). Une étude a démontré que SWI/SNF facilite la liaison de HP1 aux sites nucléosomiques, suggérant son implication dans la formation de l'hétérochromatine (Nielsen *et al.*, 2002). D'autres ont trouvé le complexe SWI/SNF associé à l'holoenzyme de la polymérase d'ADN de type II, ainsi qu'au médiateur (Wilson *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1998; Alen *et al.*, 2002), indiquant un rôle de SWI/SNF dans la régulation de la transcription.

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que les enzymes SWI/SNF induisent la formation de structures nucléosomales altérées en rompant les interactions entre l'ADN et les histones (Bazett-Jones *et al.*, 1999; Aoyagi *et al.*, 2001; Narlikar *et al.*, 2001; Aoyagi *et al.*, 2002;). Cependant, l'état du nucléosome après la réaction de remodelage est controversé (Côté *et al.*, 1998; Schnitzler *et al.*, 1998; Lorch *et al.*, 1998; Jaskelioff *et al.*, 2000 ; Kassabov *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2003) : certains prétendent que le nucléosome nouvellement remodelé aurait une conformation plus compacte (Kassabov *et al.*, 2003). De plus, il n'y a aucun consensus à savoir si les nucléosomes sont replacés en des localisations bien définies

(Kassabov *et al.*, 2003; Flaus et Owen-Hughes, 2003; Zofall *et al.*, 2006), s'ils sont redistribués aléatoirement le long de l'ADN (Whitehouse *et al.*, 1999; Jaskelioff *et al.*, 2000) ou si l'octamère est perdu en solution.

Une récente publication de Shundrovsky *et al.* (2006) stipule que le remodelage par SWI/SNF n'altère pas la structure générale du nucléosome : l'octamère d'histones resterait intact, et la force et la position de ses interactions avec l'ADN seraient essentiellement inchangées (Shundrovsky *et al.*, 2006). Ces résultats n'impliquent pas que la structure du nucléosome ne soit pas altérée durant le remodelage; seulement que ces nucléosomes altérés soient transitoires. Ils avancent aussi que le remodelage par SWI/SNF ne résulterait pas en la perte d'un dimère H2A-H2B — même si une telle perte a souvent été suggérée (Côté *et al.*, 1994; Bruno *et al.* 2003; Vicent *et al.* 2004) — indiquant que la perte de ce dimère ne soit pas une marque universelle de remodelage.

Le remodelage des nucléosomes par le complexe SWI/SNF humain (hSWI/SNF) peut amener le glissement en *cis* d'un octamère d'histones le long de l'ADN. Des observations structurales et biochimiques suggèrent que le glissement du nucléosome impliquerait un processus de diffusion rotatoire par lequel le stress torsionnel ferait pivoter l'ADN sur l'axe hélical, sans déplacement majeur par rapport au nucléosome (Steger et Workman, 1996). Aoyagi et Hayes ont démontré en 2002 que hSWI/SNF pouvait catalyser efficacement le glissement de nucléosomes contenant un ADN ramifié bloquant la diffusion rotatoire ou une coupure simple brin permettant la dissipation du stress torsionnel, conformément aux résultats obtenus pour ISWI chez *Drosophila* (Längst et Becker, 2001). Ces résultats suggèrent que le glissement des nucléosomes via SWI/SNF n'est pas exclusivement attribuable à un simple mécanisme de diffusion rotatoire et appuient les modèles qui soutiennent que l'ADN maintient son orientation rotationnelle par rapport au nucléosome, tout en étant partiellement séparé de la surface des histones durant la translocation. De

plus, le mécanisme de diffusion rotatoire est incompatible avec les résultats de positionnement des nucléosomes, étant donné que l'on s'attendrait à un processus de déplacement continu, sans que les nucléosomes aient tendance à être localisés en des sites discrets, tel qu'il est observé (Kassabov *et al.*, 2003).

Les complexes de remodelage de la famille SWI/SNF sont généralement associés à l'activation de la transcription, comme par exemple aux gènes *GALI* et *GAL10* (Lemieux et Gaudreau, 2004). Cependant, il a été observé chez la levure que le complexe de remodelage RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*), isolé de par son homologie au complexe SWI/SNF, est requis pour le positionnement approprié des nucléosomes au promoteur de *CHAI*, générant une structure chromatinienne permettant la répression de la transcription en absence de l'inducteur (Moreira et Holmberg, 1999).

#### **1.4.3.2 La famille ISWI**

Le groupe ISWI a originellement été identifié chez *Drosophila*, de laquelle trois différents complexes de type ISWI ont été purifiés : NURF (*NUcleosome-Remodeling Factor*), ACF (*ATP-dependant Chromatin assembly and remodeling Factor*) et CHRAC (*CHRomatin Accessibility Complex*) (Dirscherl et Krebs, 2004). Depuis, des complexes homologues ont été identifiés chez plusieurs eucaryotes (Johnson *et al.*, 2005). Les complexes ISWI sont généralement petits (de 2 à 5 unités), comparativement aux autres complexes de la super-famille Swi2/Snf2 (Johnson *et al.*, 2005). Les ATPases de cette famille contiennent des domaines SANT et SLIDE (Grüne *et al.*, 2003), responsables de l'interaction entre ISWI et les lysines de l'histone H4 (Johnson *et al.*, 2005). Il semble y avoir deux différences majeures entre la famille ISWI et la plupart des autres remodeleurs dépendant de l'ATP : la diversité des fonctions et la différence de ciblage. La plupart des autres complexes de remodelage interviennent dans la régulation de la transcription de gènes spécifiques, leurs

différentes sous-unités étant impliquées dans le ciblage et le recrutement d'autres enzymes de modification de la chromatine. Cependant, les fonctions attribuées *in vivo* aux complexes ISWI incluent non seulement la régulation de la transcription, mais aussi l'assemblage de la chromatine, l'espacement et le déplacement des nucléosomes, la réplication à travers la chromatine, le maintien de structures d'ordre supérieur de la chromatine et la fixation du complexe cohésine (Dirscherl et Krebs, 2004; Sims *et al.* 2004).

Plusieurs des rôles des complexes ISWI ne requièrent pas un ciblage spécifique, et le fait de les retrouver dans l'hétérochromatisme télomérique et le nucléole soutient l'idée qu'ils pourraient être ciblés à des structures plutôt qu'à des séquences d'ADN (Mellor, 2006).

Le modèle de diffusion rotatoire requiert la rotation de l'ADN nucléosomal à la surface de l'octamère et l'absence de bris simple-brin qui pourraient disperser le stress rotationnel accumulé. Or, l'introduction de bris simple-brin dans l'ADN nucléosomal n'empêche pas le déplacement des nucléosomes par les complexes de remodelage de la famille ISWI (Längst et Becker, 2001). De plus, des nucléosomes contenant des ADN ramifiés qui forment une barrière stérique à la diffusion rotatoire sont déplacés avec succès (Aoyagi *et al.*, 2003). L'ensemble des démonstrations expérimentales disponibles va à l'encontre du mécanisme de diffusion rotatoire de remodelage de la chromatine. Le mécanisme de propagation de renflement est en général retenu pour expliquer le remodelage par les complexes de la famille ISWI (voir Figure 2).

Il a été démontré que la chaperonne HMGB1 augmente la cinétique de déplacement des nucléosomes par ACF et CHRAC, deux complexes de remodelage de la famille ISWI (Bonaldi *et al.*, 2002 ). HMGB1 interagit avec le sillon mineur de l'ADN et, comme tous

les domaines HMGB, induit une courbure de l'ADN de 100° (Lnenicek-Allen *et al.*, 1996; Payet et Travers, 1997).

#### **1.4.3.3 La famille CHD**

Les ATPases de cette famille, généralement associées à la répression de la transcription, contiennent un chromodomaine et des doigts PHD, motif similaire aux doigts de zinc (Längst et Becker, 2001). Chez les mammifères, le chromodomaine semble être soit un composant structural de grands complexes chromatiniens, soit une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine. Il a aussi un rôle dans la régulation de l'activité génique et aurait une influence sur l'organisation du génome. Les doigts PHD sont quant à eux en cause dans la régulation de l'expression des gènes. Les ATPases de la famille CHD sont parfois retrouvées sous forme de complexe avec des déacétylases d'histones (Lusser et Kadonaga, 2003).

Il a été observé que le remodelage des nucléosomes d'un ADN ramifié (en épingle à cheveux) par Mi-2 de *Xenopus* (un complexe du groupe CHD) était identique à celui des nucléosomes de l'ADN natif. Ces résultats portent à croire que le glissement des nucléosomes par le complexe Mi-2 aurait lieu via un autre mécanisme que la simple diffusion rotatoire (Aoyagi *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.4 La famille INO80**

Les membres de cette famille contiennent un domaine ATPase dédoublé (Längst et Becker, 2001). La protéine Ino80 fait partie d'un grand complexe possédant environ douze sous-unités, dont Rvb1 et Rvb2, qui possèdent une activité hélicase. Des rôles de réparation de l'ADN et de régulation de la transcription ont été attribués au complexe INO80 (voir la section 1.4.4.1.2 sur H2A.X) (Lusser et Kadonaga, 2003).

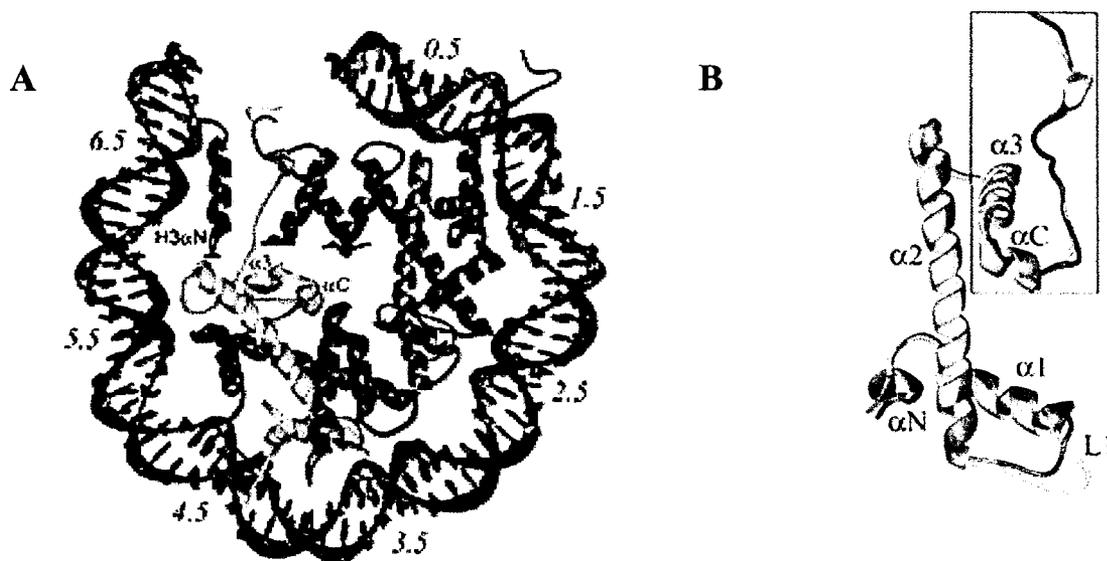
#### **1.4.4 Les variants d'histones**

##### **1.4.4.1 Variants de H2A**

###### **1.4.4.1.1 H2A.Z**

Le variant d'histone H2A.Z, qui constitue entre 5 et 10% de toutes les histones de type H2A, est l'un des plus étudiés actuellement. Il partage seulement ~60% d'identité de séquence avec H2A (Jin J. *et al.*, 2005), ses différences par rapport à H2A étant principalement situées dans les portions amino- et carboxy-terminales, cette dernière lui conférant une fonction particulière (Suto *et al.*, 2000 ; Adam *et al.*, 2001 ; Larochelle et Gaudreau, 2003). De plus, il est intéressant de noter que H2A ne peut fonctionnellement remplacer H2A.Z, et *vice versa* (Jackson et Gorovsky, 2000; Adam *et al.*, 2001). Souvent retrouvé dans les régions promotrices chez la levure, H2A.Z peut agir en créant une chromatine spécialisée favorisant la transcription, comme silenceur ou contre-silenceur à différents loci, ainsi que dans le maintien de l'intégrité génomique (Santisteban *et al.*, 2000; Meneghini *et al.*, 2003; Guillemette *et al.*, 2005 ; Raisner *et al.*, 2005 ; Shia *et al.*, 2006). Chez la levure, une fonction de barrière a été suggérée pour H2A.Z dans l'étalement de

l'hétérochromatine formée par les facteurs Sir2, Sir3 et Sir4 (Meneghini *et al.*, 2003). Cependant, des études chez des eucaryotes supérieurs ont plutôt démontré un rôle de ce variant d'histone dans la formation de l'hétérochromatine (Rangasamy *et al.*, 2003 ; Greaves *et al.*, 2006). Les mécanismes impliqués dans les différentes fonctions de H2A.Z sont encore mal caractérisés ; le mécanisme par lequel H2A.Z régule la transcription paraît très important, compte tenu du fait que ce variant d'histone est essentiel à la survie chez plusieurs métazoaires, incluant *Drosophila melanogaster* et *Tetrahymena thermophila*, et que sa surexpression a été observée dans plusieurs cas de cancers indifférenciés (van Daal et Elgin, 1992; Liu *et al.*, 1996; Rhodes, 2004).



**Figure 3. Comparaison de la structure d'un nucléosome contenant H2A et H2A.Z (tiré de Suto et al., 2000).** A) Superposition du cœur du nucléosome contenant H2A et H2A.Z ; seulement un demi-nucléosome est montré. H3 est coloré en bleu, H4 en vert, H2B en rouge, H2A en jaune, H2A.Z en gris, et l'ADN est brun. B) Superposition de H2A et H2A.Z, comme en A. Le domaine responsable de l'interaction du dimère H2A-H2B avec le tétramère H3-H4 est encadré.

La surface du nucléosome formé par l'incorporation de H2A.Z inclue un ion métallique, une région acide plus étendue et une plus grande ouverture au centre du nucléosome. Une hypothèse actuellement retenue pour expliquer la fonction particulière de H2A.Z est que ces changements de surface permettraient la création d'un site d'interaction hautement spécifique pour d'autres protéines nucléaires, tels les facteurs de remodelage de la chromatine (voir Figure 3 et Suto *et al.*, 2000).

### Le rôle de H2A.Z en tant que silenceur de l'hétérochromatine

Plusieurs expérimentations suggèrent fortement que H2A.Z aurait un rôle important dans l'établissement de l'hétérochromatine. D'abord chez la levure, il a été observé que la délétion de *HTZ1* (gène codant pour H2A.Z) cause une dé-répression des gènes aux télomères et que sa surexpression rétablit le silencing au locus *HMR* dans une souche où Sir1 (une protéine impliquée dans le silencing) est déficiente (Dhillon et Kamakaka, 2000). De plus, il a été trouvé que H2A.Z co-localise avec HP1 et interagit directement avec INCENP, deux facteurs hétérochromatiques importants pour la ségrégation des chromosomes (Rangasamy *et al.*, 2003). Par conséquent, il n'est pas surprenant de voir que la déplétion de H2A.Z par interférence à l'ARN cause des défauts dans la ségrégation des chromosomes et entraîne une relocalisation de HP1 (Rangasamy *et al.*, 2004). Aussi, l'homologue de H2A.Z chez la drosophile est essentiel au recrutement de HP1 lors de la formation de l'hétérochromatine (Swaminathan *et al.*, 2005). En outre, des essais d'immunofluorescence ont révélé que, durant les étapes de la spermatogénèse, les chromosomes X et Y deviennent enrichis en H2A.Z au moment de leur inactivation (Greaves *et al.*, 2006). Cependant, une fonction de barrière a été suggérée pour H2A.Z dans l'étalement de l'hétérochromatine formée par les facteurs Sir2, Sir3 et Sir4 chez la levure. Un mécanisme permettant de rallier ces deux fonctions en apparence opposées a été proposé. Il s'agit de l'« anti-silencing », phénomène par lequel une protéine à la bordure d'une région hétérochromatique limite l'étalement de l'hétérochromatine aux régions

actives (Meneghini *et al.*, 2003). Étant donné la quantité limitée de facteurs hétérochromatiques disponibles dans la cellule, l'étalement aux régions actives diminue la quantité de ces facteurs présents aux loci devant être silencieux (Rusche *et al.*, 2003). Donc, un facteur présent dans l'euchromatine (à la bordure de l'hétérochromatine) peut indirectement réguler l'état de l'hétérochromatine.

### Le rôle de H2A.Z dans la stabilité chromosomique

Des essais d'interaction génétique chez la levure ont révélé que *HTZ1* est génétiquement redondant avec plusieurs gènes encodant des facteurs impliqués dans la formation du kinétochore, un complexe protéique qui lie le centromère (Krogan *et al.*, 2004). De plus, la délétion chez la levure ou le « *knock-down* » par interférence par ARN de H2A.Z chez la souris cause des défauts importants dans la ségrégation des chromosomes (Krogan *et al.*, 2004; Rangasamy *et al.*, 2004). Enfin, il a été observé que la mutation d'une lysine spécifique en arginine (K14R) dans la région amino-terminale de H2A.Z peut causer des défauts dans la ségrégation chromosomique (Keogh *et al.*, 2006), suggérant un rôle pour l'acétylation de H2A.Z dans ce processus, puisque ce résidu est acétylé par SAGA et NuA4 (Babiarz *et al.*, 2006).

### Le rôle de H2A.Z dans la progression du cancer

Les cancers sont causés par une mauvaise régulation de l'expression des gènes. L'équipe de Zucchi (Zucchi *et al.*, 2004) a montré que le gène codant pour H2A.Z est parmi les plus fortement exprimés dans les cellules métastatiques provenant d'un ganglion lymphatique, comparativement aux cellules invasives isolées du canal lactifère. Par ailleurs, H2A.Z a été trouvé comme marqueur de cancers colorectaux caractérisés par une instabilité des microsatellites (Dunican *et al.*, 2002). Dans une étude de plus grande envergure, Rhodes *et*

*al.* (2004) ont rassemblé 40 bases de données sur les profils d'expression de plus de 3700 échantillons de cancers et ont établi un profil d'expression commun (Rhodes *et al.*, 2004). Le gène codant pour H2A.Z a été identifié comme faisant partie des gènes les plus exprimés dans les cas de cancers non différenciés, ce qui suggère que ce variant pourrait jouer un rôle central dans la progression de cette maladie (Rhodes *et al.*, 2004).

### Le rôle de H2A.Z dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire

Différentes études de létalité synthétique impliquant *HTZ1* ont identifié plusieurs gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. La délétion de *HTZ1* chez la levure entraîne de surcroît un retard de relâche de certaines origines de réplication, ainsi qu'un ralentissement marqué dans la progression du cycle cellulaire en phases G1 et S (Dhillon *et al.*, 2006). Une partie de ce retard peut être expliquée par un défaut de l'expression des gènes *CLN2* et *CLB5*, codant pour deux cyclines responsables de la progression du cycle cellulaire chez la levure (Dhillon *et al.*, 2006). Toutefois, il est probable que les mécanismes par lesquels H2A.Z régule la transcription des gènes soient les mêmes que ceux utilisés pour réguler la relâche des origines de réplication. Une évidence vient d'études de localisation globale de H2A.Z, où celui-ci est enrichi à certaines origines de réplication dans le génome de la levure (Guillemette *et al.*, 2005).

Dans le même ordre d'idées, il a récemment été montré qu'une déplétion en H2A.Z chez des fibroblastes humains induit la transcription de p21 (qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire en G1) et la voie de signalisation p53 → p21 menant à la sénescence (Gévry *et al.*, 2007).

## Le rôle de H2A.Z dans la transcription génique

Les premières observations démontrant une implication du variant d'histone H2A.Z dans la régulation de la transcription génique ont été réalisées grâce au protozoaire *Tetrahymena thermophila*, chez lequel H2A.Z est associé exclusivement avec le macronoyau transcriptionnellement actif, étant exclu du micronoyau inactif (Allis *et al.*, 1980; Stargell *et al.*, 1993). Des études subséquentes chez *S. cerevisiae* ont permis de constater que *HTZ1* est génétiquement redondant avec des composantes des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et SAGA (Santisteban *et al.*, 2000). Une analyse globale d'expression comparant des cellules  $\Delta htz1$  avec la levure de type sauvage par hybridation des transcrits sur une puce à ADN a permis d'identifier 214 gènes qui sont affectés positivement par *HTZ1* en conditions de croissance exponentielle, gènes parmi lesquels environ la moitié est située à proximité des régions télomériques (Meneghini *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que la répression observée chez ces gènes en absence de *HTZ1* est partiellement réversible par une délétion de *SIR2*, gène codant pour une protéine impliquée dans le silencing. Ces résultats appuient l'idée mentionnée précédemment selon laquelle H2A.Z préviendrait l'étalement de l'hétérochromatine aux régions subtélomériques (Meneghini *et al.*, 2003). Il est toutefois probable que l'analyse par Meneghini *et al.* (2003) sous-estime la quantité de gènes affectés positivement par H2A.Z. En effet, cette analyse a été effectuée sur des cellules en croissance exponentielle dans un milieu riche; elle pourrait donc faillir à détecter certains gènes induits uniquement dans des conditions différentes. Parmi les gènes dont l'expression est affectée négativement par la délétion de *HTZ1*, mentionnons : *GAL1*, *GAL7* et *GAL10* (Adam *et al.*, 2001; Santisteban *et al.*, 2000); *PHO5*, lorsque *SWI2/SNF2* est délété (Santisteban *et al.*, 2000), *PUR5*, lorsque la réplication est bloquée (Larochelle et Gaudreau, 2003), *CLN2* et *CLB5*, induits dans le cycle cellulaire (Dhillon *et al.*, 2006) et finalement plusieurs gènes qui répondent au stress de température élevée (Zhang *et al.*, 2005). L'hyper-acétylation de H2A.Z a finalement été observée à l'extrémité 5' de gènes transcriptionnellement actifs (Bruce *et al.*, 2005).

Des chaperonnes d'histones sont requises pour aider l'assemblage et le remodelage des nucléosomes durant la réplication et la transcription (Akey et Luger, 2003; Tagami *et al.*, 2004). Une de ces chaperonnes, Nap1, peut transférer des dimères H2A–H2B durant la transcription *in vitro*, transfert facilité par l'acétylation des queues d'histones (Ito *et al.*, 2000; Levchenko et Jackson, 2004; Park *et al.*, 2005). Mizuguchi *et al.* (2004) ont aussi montré Nap1 présent en association avec un dimère H2A.Z–H2B chez la levure. De plus, il a récemment été observé que la chaperonne Chz1 peut aussi aider l'incorporation spécifique d'un dimère H2A.Z–H2B dans un nucléosome (Luk *et al.*, 2007).

Un premier complexe de remodelage de la chromatine impliqué dans l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine *in vitro* a été identifié en 2004 chez la levure (Mizuguchi *et al.*, 2004; Kobor *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004). Le complexe SWR1 est composé de 13 sous-unités, incluant Swr1, une ATPase de la famille Swi2/Snf2, essentielle pour le dépôt de H2A.Z, tant aux régions transcrites que non transcrites (Meneghini *et al.*, 2003; Dryhurst *et al.*, 2004). Il est intéressant de mentionner que SWR1 opère la rupture de contacts entre les histones, sans déplacer l'octamère ou le nucléosome (Korber et Horz, 2004). La destinée du dimère H2A–H2B retiré est inconnue; ainsi, il est plus à propos de parler d'un remplacement d'histones que d'un échange. L'orthologue de SWR1 chez *Drosophila*, le complexe Tip60, présente un rôle analogue (Kusch *et al.*, 2004). Chez l'humain, deux homologues de SWR1 ont été identifiés : p400/Domino et SRCAP (Doyon et Côté, 2004 ; Jin *et al.*, 2005). Un complexe contenant SRCAP a récemment été identifié, et il a été observé qu'il pouvait catalyser l'échange d'un dimère H2A–H2B pour H2A.Z–H2B dans des mono-nucléosomes reconstitués (Ruhl *et al.* 2006). Il reste cependant à déterminer si ces homologues de SWR1 peuvent aussi remplir cette fonction *in vivo*.

Les évidences disponibles à ce jour tendent à démontrer que la présence de H2A.Z dans un nucléosome en augmenterait la stabilité. Toutefois, cette affirmation reste controversée et est le sujet d'intenses débats. D'une part, des études de sédimentation ont révélé que le

nucléosome contenant H2A.Z facilite la formation *in vitro* de structures condensées comparables à la forme 30S de la chromatine trouvée *in vivo* (Fan *et al.*, 2002), ce qui faciliterait la liaison de HP1 (Fan *et al.*, 2004). D'autre part, il a été démontré que la structure de l'octamère dans le nucléosome H2A.Z est plus stable que celle de H2A (Li *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2004; Thambirajah *et al.*, 2006). Tout d'abord, le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) a permis d'observer que H2A.Z stabilise l'interaction entre le dimère H2A.Z-H2B et le tétramère H3-H4 (Park *et al.*, 2004). Une autre technique a permis d'arriver à une conclusion semblable : lorsqu'un extrait de chromatine partiellement digérée est appliqué sur une colonne d'hydroxyapatite (qui interagit fortement avec l'ADN), H2A.Z est élué à des concentrations plus élevées de sel que H2A et H2B, ce qui suggère une meilleure stabilité (Li *et al.*, 1993; Thambirajah *et al.*, 2006). Toutefois, la stabilité du nucléosome contenant H2A.Z serait dépendante du niveau d'acétylation des histones (Thambirajah *et al.*, 2006). D'autres études ont cependant rapporté que H2A.Z déstabilise l'interaction avec H2B (Placek *et al.*, 2005) ou rend le nucléosome plus mobile sur l'ADN (Flaus *et al.*, 2004). Il est probable que les différences expérimentales dans ces essais biochimiques soient à l'origine de conclusions différentes.

#### **1.4.4.1.2 H2A.X**

Le variant d'histone H2A.X possède une séquence carboxy-terminale unique contenant un résidu sérine conservé à travers les espèces (la sérine 129 chez la levure), lequel est phosphorylé dans les nucléosomes adjacents à un site de bris d'ADN double-brin (Aussio et Abbott, 2002 ; Redon *et al.*, 2002). H2A.X est habituellement disposé de façon aléatoire dans les chromosomes, indépendamment des dommages à l'ADN. La perte de H2A.X cause une augmentation de la fréquence des événements de réarrangements chromosomiaux et de transformations oncogéniques.

Chez la levure, le complexe de remodelage de la chromatine INO80 peut s'associer à H2A.X et est recruté aux sites de bris d'ADN double-brin (van Attikum *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2004; Downs *et al.*, 2004). Même si l'hélicase du complexe INO80 contient un domaine ATPase similaire à celui du complexe SWR1, il n'y a encore eu aucune démonstration que INO80 pouvait catalyser une réaction de remplacement d'histones similaire (Mizuguchi *et al.*, 2004). Ainsi, le rôle des complexes INO80 pourrait être de stabiliser les nucléosomes H2A.X, de retirer l'histone H2A.X ou d'être recruté aux sites de bris d'ADN double-brin pour remplir une fonction à ce jour indéterminée.

#### **1.4.4.1.3 H2Av**

Chez *Drosophila*, le variant d'histone H2Av combine les propriétés de H2A.Z et H2A.X, incluant le résidu sérine carboxy-terminal conservé, qui est phosphorylé dans les nucléosomes adjacents à un site de bris d'ADN double-brin (Madigan *et al.*, 2002). Le complexe Tip60, qui contient une activité de type Swr1 et une activité acétyltransférase, acétyle H2Av phosphorylé et l'échange contre un H2Av non modifié *in vitro* (Kusch *et al.*, 2004).

#### **1.4.4.1.4 MacroH2A**

MacroH2A est un variant d'histone spécifique aux vertébrés qui possède un domaine carboxy-terminal capable de lier des métabolites nucléotidiques spécifiques et des déacétylases d'histones. Il est enrichi dans le chromosome X inactif chez les mammifères (Chadwick et Willard, 2004). Zhang *et al.* (2005) ont montré que la chaperonne d'histones HIRA et la protéine ASF1a, impliquée comme contre-silenceur, sont responsables de l'incorporation de macroH2A aux foyers hétérochromatiques associés à la sénescence. Toutefois, le mécanisme d'incorporation des histones dans la chromatine par HIRA, ainsi

que le rôle exact de macroH2A dans la structure hétérochromatinienne restent inconnus (Chakravarthy *et al.*, 2005).

#### **1.4.4.1.5 H2A<sup>Bbd</sup>**

Le variant H2A<sup>Bbd</sup> (*Barr-body-deficient*), mal connu, est accumulé aux sites actifs de transcription et est exclu du chromosome X inactif chez les mammifères femelles (Chadwick et Willard 2001). Ce variant est donc une marque de chromatine active en transcription. Il peut être incorporé au nucléosome, toutefois, il lui confère une plus faible stabilité par rapport à H2A, conformément à son rôle positif en transcription (Gautier *et al.*, 2004). Les complexes de remodelage SWI/SNF et ACF sont incapable de mobiliser les nucléosomes formées du variant H2A<sup>Bbd</sup> (Angelov *et al.*, 2004). Les mécanismes de régulation de la transcription et de remodelage de ces nucléosomes sont encore sous investigation.

### **1.4.4.2 Variants de H3**

#### **1.4.4.2.1 H3.3**

H3.3 diffère de H3 par seulement quatre acides aminés. La structure de nucléosomes contenant chacune des formes est presque identique, rendant improbable l'hypothèse que H3.3 agisse directement par des modifications structurelles (Davey *et al.*, 2002). Or, la modification post-traductionnelle de H3.3 pourrait introduire des changements au niveau de la structure du nucléosome. Par exemple, la phosphorylation (ou non) d'un résidu sérine spécifique conservé est associée à différents processus cellulaires (Malik et Henikoff, 2003; Hake *et al.*, 2005). H3.3 est enrichi dans des régions actives en transcription (Ahmad et

Henikoff, 2002), alors que H3 est associé aux modifications trouvées dans la chromatine silencée, telle la méthylation de H3K9 (Hendzel et Davie, 1990; McKittrick *et al.*, 2004; Wirbelauer *et al.*, 2005). La raison pour laquelle H3.3 est retrouvé préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives est encore inconnue, or un rôle a été suggéré pour H3.3 dans la prévention de l'étalement de l'hétérochromatine (Malik et Henikoff, 2003; Janicki *et al.*, 2004).

L'histone H3 est associée principalement avec des complexes contenant la chaperonne d'histone Caf1, alors que H3.3 co-purifie avec des complexes contenant HIRA (voir plus haut), celle-ci étant impliquée dans le dépôt de ce variant d'histone par un mécanisme indépendant de la réplication encore irrésolu (Chakravarthy *et al.*, 2005).

#### **1.4.4.2.2 CENP-A**

Le variant d'histone CENP-A, spécifique au centromère, est impliqué dans la ségrégation des chromosomes (Malik et Henikoff, 2003); des études génétiques révèlent que CENP-A est associé avec plusieurs facteurs impliqués dans la structure et la fonction des centromères et est essentiel pour l'assemblage du kinétochore, auquel les microtubules s'attachent lors de la mitose et de la méiose (Stoler *et al.* 1995; Howman *et al.* 2000; Smith, 2002; Amor *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2004; Walfridsson *et al.*, 2005). Le centromère n'est pas déterminé par la séquence d'ADN, mais plutôt par la structure de la chromatine centromérique (Lo *et al.*, 2001 ; Alonso *et al.*, 2003; Nagaki *et al.*, 2004). Un complexe récemment identifié, CID, permettrait l'assemblage de ce variant d'histone dans la chromatine chez *Drosophila* (Furuyama *et al.*, 2006), et les facteurs de chargement de CENP-A interagiraient avec différents complexes de modification des histones (Hayashi *et al.*, 2004).

Chez la levure, ce variant de H3 est appelé Cse4. Il est un composant structurel du coeur centromérique. Chez les mutants de délétion pour H4 (délétion de *HHF2* et mutation faux-sens thermo-sensible de *HHF1*) et Cse4 (interruption de *CSE4*), la structure du centromère est altérée à une température de 37°C (température restrictive). La surexpression de Cse4 chez le mutant H4 étant en mesure d'abolir cette altération dans la structure, il est supposé que les deux protéines agissent conjointement sur la structure du centromère (Meluh *et al.*, 1998).

### 1.5 Les gènes *GAL1* et *GAL10*

Les gènes *GAL1* et *GAL10*, situés sur le chromosome II de *Saccharomyces cerevisiae* ont un rôle primordial dans le métabolisme du galactose. Le gène *GAL1* code pour une galactokinase responsable de la phosphorylation de l'alpha-D-galactose en alpha-D-galactose-1-phosphate, ce qui constitue la première étape du catabolisme du galactose. La fonction principale de la protéine encodée par *GAL10* est de catalyser l'interconversion de l'UDP-galactose et de l'UDP-D-glucose, réactions impliquées dans le métabolisme du galactose ; Gal10 est donc une UDP-glucose-4-épimérase. L'expression de l'ensemble des gènes structuraux impliqués dans le métabolisme du galactose (*GAL1*, *GAL10*, *GAL7*, *GAL2*) est régulée de façon coordonnée en réponse à la présence de galactose par Gal4, Gal80 et Gal3 (Bash et Lohr, 2001). En présence de raffinose ou de galactose, un dimère de l'activateur transcriptionnel Gal4 est lié aux sites d'activation en amont trouvés dans les promoteurs des gènes *GAL*. En présence de raffinose, un milieu non inducteur, mais non répresseur, Gal80 est lié au dimère de Gal4, empêchant ce dernier de recruter différents activateurs, facteurs de remodelage de la chromatine et la machinerie transcriptionnelle (Lohr *et al.*, 1995). Cependant, en présence de galactose, Gal3 séquestre le répresseur transcriptionnel Gal80 au cytoplasme, levant ainsi la répression de Gal4, ce qui permet l'expression des gènes *GAL* (Lohr *et al.*, 1995). La source de carbone préférentiellement utilisée par la levure est le glucose, dont le catabolisme requiert moins d'investissement

énergétique par rapport au galactose. Ainsi, lorsque les levures croissent dans un milieu où le glucose est disponible, les gènes *GAL* sont réprimés (Ptashne, 2002). Il a été démontré, pour le gène *GAL1*, que le répresseur Mig1 lie un élément spécifique situé au promoteur, ce qui permet le recrutement de TUP1, qui est impliqué dans l'établissement d'une structure chromatinienne répressive via des interactions avec les histones H3 et H4 (Ptashne, 2002). De plus, Mig1 réprime l'expression de *GAL4*.

La présence du variant d'histone H2A.Z aux promoteurs de *GAL1* et de *GAL10* a été observée par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) par notre groupe (Adam *et al.*, 2001). Conformément à des résultats obtenus par Santisteban *et al.* (2000), nous avons aussi observé une diminution du signal correspondant à H2A.Z dans le temps à ce même site, suite à l'activation transcriptionnelle des gènes *GAL* (Adam *et al.*, 2001). Dès lors, le variant d'histone semblait être impliqué d'une quelconque façon dans la régulation de la transcription des gènes *GAL1* et *GAL10*. Un essai d'extension d'amorce a déterminé que la délétion de *HTZ1*, affecte négativement l'induction de la transcription de *GAL1* et de *GAL10* (Adam *et al.*, 2001). La présence du variant semble donc nécessaire pour l'activation de la transcription de ces gènes, son rôle exact restant encore irrésolu. L'hypothèse sur laquelle les travaux ci présentés sont basés se résume par un rôle de H2A.Z dans la stabilisation de nucléosomes clés, en attente du signal d'activation, lesquels seraient désassemblés au moment de l'induction. Cette hypothèse est soutenue par l'observation récente par Gligoris *et al.* (2007) que le co-répresseur Tup1 dirige le dépôt de H2A.Z à *nucC*, marquant ainsi *GAL1* pour une activation rapide (voir Chapitre 1, Figure 2C et Gligoris *et al.*, 2007). Il a d'abord été observé par la technique de LM-PCR, qu'au moins un des nucléosomes présents à la région promotrice de *GAL1* occupe une position différente chez la levure de type sauvage, comparativement au mutant de délétion de *HTZ1* : le nucléosome est déplacé d'approximativement 20 paires de bases en aval chez le mutant (Guillemette *et al.*, 2005). L'objectif des travaux ci présentés est de déterminer le rôle de H2A.Z sur le positionnement, la stabilité et l'abondance relative des nucléosomes à

l'ensemble de la région promotrice de *GAL1* et *GAL10* chez *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce faire, la technique de balayage des nucléosomes sera employée.

## 1.6 Le gène *CHA1*

Le gène *CHA1* code pour une sérine / thréonine déshydratase. Son expression peut être induite par l'ajout de sérine au milieu ; la déshydratase étant dès lors impliquée dans le catabolisme de cet acide aminé (Bornaes *et al.*, 1992). Le gène *CHA1* est situé sur le chromosome III et a récemment fait l'objet de plusieurs études sur le positionnement des nucléosomes à sa région promotrice, de même que sur la présence du variant d'histone H2A.Z à cette même région (Moreira et Holmberg, 1998 ; Guillemette *et al.*, 2005 ; Yuan *et al.*, 2005). De ces expérimentations découlent la connaissance du positionnement des nucléosomes au promoteur en absence et en présence d'induction du gène, en plus de la confirmation de la présence de H2A.Z à cette région. Ce gène a été choisi dans le but de valider la technique de balayage des nucléosomes, opérée d'abord à la région promotrice de *GAL1-GAL10*. Afin de vérifier si l'hypothèse mentionnée précédemment concernant le rôle de H2A.Z dans l'activation de la transcription s'applique aussi au gène *CHA1*, il reste donc aussi à vérifier si la délétion de H2A.Z a un effet négatif sur son expression.

# CHAPITRE 1

## POSITIONNEMENT DES NUCLÉOSOMES PAR LE VARIANT D'HISTONE H2A.Z À LA RÉGION PROMOTRICE DE *GAL1-10* CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### 2.1 matériels et méthodes

#### 2.1.1 Souches de levure et milieux de croissance

Tableau 1. Souches de levures employées.

Souche	Génotype
W303	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-1, leu2-3, 112, ade2-1, his3-11, 15, trp1-1, can1-100</i>
MAY424	<i>w303<math>\alpha</math>, <math>\Delta</math>htz1::hisg</i>
MSY590	<i>MAT<math>\alpha</math> HHT1-HHF1 <math>\Delta</math> (hht2-hhf2) leu2-3,112 lys2-<math>\Delta</math>201 ura3-52</i>
MSY1147	<i>MSY590<math>\alpha</math>, <math>\Delta</math>htz1::URA3</i>

Les milieux employés pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'atteinte des objectifs du chapitre 1 sont tous composés des mêmes ingrédients de base, à savoir 10g d'extrait de levure, 20g de peptone et 0,14g d'adénine par litre. La différence entre eux provient du sucre ajouté, soit galactose 5% p/v, raffinose 2% p/v ou glucose 2% p/v, pour induire, ne pas induire ou réprimer l'expression des gènes *GAL1* et *GAL10* respectivement.

### 2.1.2 Préparation de noyaux

L'isolation de noyaux pour *Saccharomyces cerevisiae* débute par l'obtention d'une culture d'un volume de 1L dans le milieu approprié, avec agitation à 225 rpm, à 30°C, jusqu'à une densité optique à 600nm ( $DO_{600}$ ) de 1 à 3, soit l'équivalent de 2 à 6 x10<sup>7</sup> cellules/mL. Les cellules sont d'abord pontées au formaldéhyde (concentration finale de 1% v/v) 30 minutes à 30°C, avec agitation à 225 rpm. Le pontage est arrêté par l'incubation en présence de 0,125M de glycine, 20 minutes à 30°C, avec agitation à 225 rpm. Les cellules sont ensuite centrifugées 10 minutes à 3000 x g à 4°C, pesées et lavées deux fois dans 50mL d'eau distillée. Deux volumes de solution de pré-incubation (0,7M  $\beta$ -mercaptoéthanol et 2,8mM EDTA) sont ajoutés et le tout est incubé 30 minutes à 30°C, avec agitation à 225 rpm. Cette suspension subit alors deux étapes de lavage consistant en une centrifugation de 5 minutes à 3000 x g à 4°C suivie d'une resuspension dans 50mL de milieu supplémenté de 1M sorbitol, puis dans 5mL de milieu supplémenté de 1M sorbitol et de 5mM  $\beta$ -mercaptoéthanol par gramme de cellules. La zymolyase est ensuite ajoutée aux levures à raison de 1/50 du volume d'une solution fraîche à 20mg/mL. Le mélange est agité à 80 rpm à 30°C jusqu'à ce qu'une dilution 1:100 dans 1% p/v SDS ait une  $DO_{600}$  inférieure à 5% de la  $DO_{600}$  initiale. Les sphéroplastés ainsi obtenus sont centrifugés 5 minutes à 2000 x g à 4°C et lavés avec 50mL de Sorbitol 1M. Ils sont centrifugés à nouveau 10 minutes à 3000 x g à 4°C et resuspendus dans 7mL de solution de Ficoll (18% p/v Ficoll, 20mM  $KH_2PO_4$  pH 6,8, 1mM  $MgCl_2$ , 0,25mM EGTA et 0,25mM EDTA) par gramme de cellules. Les noyaux sont finalement ultra-centrifugés 30 minutes à 13200rpm à 4°C et soumis pour digestion à la MNase.

### **2.1.3 Préparation d'ADN génomique**

Préparer une culture d'un volume de 10mL dans le milieu approprié, toute la nuit, avec agitation à 225 rpm, à 30°C. Centrifuger les cellules 5 minutes à 2500 x g à température ambiante. Ajouter 400µL de billes de verre et 400µL de phénol-chloroforme pH8,0. Vortexer 4 minutes et centrifuger 10 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse, à température pièce. Reprendre l'extraction de la phase aqueuse jusqu'à ce que l'interphase soit claire. Précipiter l'ADN avec deux volumes d'éthanol, laver avec 1 mL d'éthanol 70% v/v et resuspendre dans 125µL d'eau distillée.

### **2.1.4 Digestion à la nucléase micrococciale**

Cette technique est employée pour digérer des noyaux purifiés, aussi bien que de l'ADN génomique. Pour ce qui est des noyaux, un culot correspondant à environ 0,5g de cellules, et préparé conformément aux instructions de la section 2.1.2, est resuspendu dans 3mL de tampon de digestion frais (15mM Tris-HCl pH8,0, 50mM NaCl, 1,4mM CaCl<sub>2</sub>) en vortexant. Les noyaux sont ensuite centrifugés 5 minutes à 2000 x g à 4°C et resuspendus avec suffisamment du tampon de digestion pour obtenir une DO<sub>260</sub> égale à 100 unités. La suspension de noyaux est divisée en aliquotes de 200µL, auxquelles la MNase est ajoutée à des concentrations variant typiquement de 0 à 300 U/mL. La digestion est terminée après 10 minutes par l'ajout de 10µL d'une solution composée de 1M Tris-HCl pH8,8 et de 80mM EDTA pH8,0. 5µL d'une solution de SDS à 20% p/v sont ajoutés préalablement à une inversion des pontages au formaldéhyde par l'incubation à 65°C pendant un minimum de 6 heures. Le mélange est ensuite déprotéinisé au moins 30 minutes à 37°C en présence de 0,2mg de protéinase K. Pour ce qui est de l'ADN génomique, des étapes similaires sont effectuées en ce qui a trait à la digestion à la MNase et au traitement à la protéinase K. La seule différence notable concerne la concentration de MNase utilisée, qui est plutôt de

l'ordre de 0 à 5 U/mL. Les étapes subséquentes sont exactement les mêmes pour les deux sources d'ADN. Sont alors ajoutés, tout en mélangeant bien : 1/5 du volume d'acétate d'ammonium, un volume de phénol et un volume de chloroforme. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse, à température pièce. La phase aqueuse est de nouveau extraite avec du chloroforme, jusqu'à ce que l'interphase soit claire. La phase aqueuse est ensuite traitée une heure à la RNase et l'ADN est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol 100% v/v, à -20°C et lavé avec 1mL d'éthanol 70% v/v. L'ADN ainsi obtenu est migré sur gel d'agarose 1,5% p/v et les bandes correspondant à la taille d'un mono-nucléosome (140 à 220 paires de bases, approximativement, conformément au protocole du groupe de Kevin Struhl (Sekinger *et al.*, 2005)) sont coupées puis purifiées à l'aide du système de purification sur colonne commercialisé par la compagnie Promega.

### **2.1.5 Balayage des nucléosomes**

La technique de balayage des nucléosomes réside en la réalisation de plusieurs expériences de PCR en temps réel (Q-PCR). L'ADN nucléosomal, l'ADN génomique déprotéinisé et l'ADN génomique déprotéinisé digéré partiellement à la MNase subissent une quantification relative avec des amorces produisant des produits d'élongation de  $100 \pm 11$  paires de bases qui se chevauchent à un intervalle de 30 paires de bases. Ces amorces sont choisies pour couvrir les régions intergéniques entières des gènes étudiés, ainsi que quelques centaines de bases en amont et en aval de celles-ci. La réaction de Q-PCR s'effectue dans un volume de 20 $\mu$ L, en présence de 4 $\mu$ mol de chacun des oligos, de 0,2 $\mu$ L de dNTPs à 25mM, de 0,2 $\mu$ L de polymérase Hotstart Taq Cs3C (Kermekchiev *et al.*, 2003), ainsi que du tampon de Q-PCR pour une concentration finale de 6mM Tris-HCl pH8.3, 25mM KCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 75mM tréhalose, 0,1% v/v Tween 20, 0,1mg/mL BSA non acétylé, 0,0695x SYBR green. Suite à une étape de dénaturation initiale de 4 minutes à 95°C, 40 cycles sont effectués comme suit : 95°C pour 30 secondes, 57°C pour une minute

et 72°C pour 30 secondes. Il est à noter que toutes les expériences de Q-PCR ont été réalisées sur un appareil MX3000P, de Stratagene.

### 2.1.5.1 Calcul d'analyse des résultats de Q-PCR

L'amplification relative en mono-nucléosomes pour une paire d'amorces est calculée selon l'équation suivante :

Équation #1 : Calcul de l'enrichissement en nucléosomes

$$\left[ 2^{-(Ct_{\text{mono}} - Ct_{\text{gén nu}})} \right] - \left[ 2^{-(Ct_{\text{gén dig}} - Ct_{\text{gén nu}})} \right]$$

La valeur des différents Ct correspond au cycle de Q-PCR auquel l'amplification d'ADN, détectée par l'émission de fluorescence (SYBR green), devient significative selon les paramètres déterminés par le logiciel informatique. Les valeurs décrites par les abréviations susmentionnées correspondent à l'amplification due à l'ADN obtenu par la digestion de noyaux à la MNase (Ct mono), l'ADN génomique déprotéinisé et digéré (Ct gén dig) et l'ADN génomique déprotéinisé non digéré (Ct gén nu). Pour chaque exposant, l'amplification due à l'ADN génomique déprotéinisé non digéré est soustrait afin de normaliser les paires d'amorces l'une par rapport à l'autre. En effet, l'on considère que sur l'ADN génomique non digéré, les amorces permettront une amplification optimale, donc parfaitement proportionnelle à la quantité d'ADN présent.

La soustraction de l'amplification due à l'ADN génomique digéré consiste en un contrôle pour des régions qui seraient naturellement résistantes à la digestion à la MNase (la MNase clive moins facilement les régions riches en GC) et qui auraient malencontreusement migré sur gel à la hauteur d'un mono-nucléosome et été purifiées comme tel.

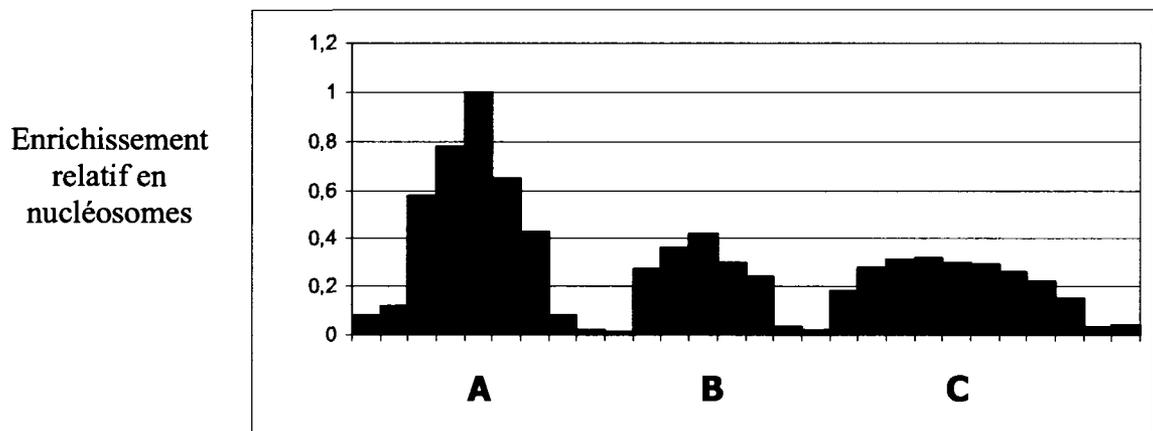
## 2.2 Résultats

Il existe plusieurs techniques pour déterminer le positionnement des nucléosomes à un site d'ADN particulier. À très haute résolution, le LM-PCR, lorsque réalisé parallèlement à un gel de séquençage, permet de localiser un nucléosome à une seule paire de base près. L'utilisation de cette technique a permis à notre laboratoire d'observer, avec une résolution d'environ 20 paires de bases, qu'une délétion de *HTZI* dans la levure altère le positionnement du nucléosome nucC dans la région promotrice de *GALI* (voir Figure 2C et Guillemette *et al.*, 2005). À haute résolution, l'ADN mono-nucléosomal peut aussi être hybridé à une puce d'ADN ayant une résolution atteignant facilement les 10 paires de bases. À résolution moyenne, trois méthodes ont longtemps servi à ce type d'études : l'«indirect end-labeling», la digestion à la DNaseI et la combinaison de digestion à l'exonucléase III avec la nucléase S1. Cependant, une nouvelle technique récemment présentée par le groupe de Kevin Struhl, appelée balayage des nucléosomes, permet d'effectuer un positionnement des nucléosomes avec une résolution moyenne, c'est-à-dire d'environ 30 paires de bases, mais son avantage principal consiste en sa capacité de déterminer l'abondance relative et la stabilité de chacun des nucléosomes individuellement (Sekinger *et al.*, 2005). C'est cette technique qui a été retenue pour ces travaux, étant donné la variété d'informations qu'elle permet d'obtenir.

Les principes de base du balayage des nucléosomes sont, d'une part, l'amplification de l'ADN protégé par le nucléosome et, d'autre part, la mesure de l'enrichissement en

nucléosome par rapport aux sites voisins. La toute première étape de la méthode consiste en la digestion de la chromatine avec un enzyme appelé nucléase micrococcale (MNase), qui clive de manière non spécifique l'ADN qui n'est pas protégé par un nucléosome. L'ensemble de l'ADN mono-nucléosomal est ensuite purifié sur gel en coupant l'ADN correspondant à la taille attendue pour un nucléosome, soit entre 140 et 220 paires de bases de long. Il est à noter qu'il est possible que des fragments d'ADN correspondant par hasard à cette longueur se retrouvent contaminant cette étape de purification. L'ADN nouvellement purifié est soumis à une étape d'amplification par PCR quantitatif (Q-PCR). Les amorces, d'une longueur moyenne de 20 nucléotides, permettent de générer des amplicons d'une longueur de  $100 \pm 11$  paires de bases se chevauchant avec une résolution approximative de 30 paires de bases. L'ensemble des amplicons couvre la totalité de la région promotrice des gènes *GALI* et *GALI0*, ainsi que quelques centaines de paires de bases dans les régions codantes. Pour chacune des paires d'amorces, il y a trois scénarios possibles : lorsque les deux amorces s'hybrident à l'ADN mono-nucléosomal, il y a amplification par Q-PCR, mais dès qu'une amorce ne s'hybride pas à l'ADN mono-nucléosomal, il n'y a pas d'amplification. L'analyse de ces résultats de Q-PCR est effectuée grâce à l'équation #1 présentée à la section 2.1.5.1, ce qui permet de calculer l'enrichissement relatif en nucléosomes par rapport aux sites voisins. Le contrôle consistant à tester les amorces de PCR sur l'ADN génomique non digéré sert, dans cette équation, à relativiser l'efficacité d'amplification des différentes paires d'amorces entre elles. Ainsi, lorsque portés en graphique, les résultats du balayage des nucléosomes d'une région donnée montrent des pics et des vallées, indiquant les nucléosomes et les espaces internucléosomaux, respectivement. Trois types de pics sont attendus avec cette méthode, la forme du pic révélant de l'information sur l'abondance relative et la stabilité de ce nucléosome. La figure 1 A présente un pic attendu pour un nucléosome parfaitement positionné dans toutes les cellules étudiées, c'est-à-dire qu'il atteint un enrichissement relatif de 1 (100%) et qu'il occupe une largeur de trois à cinq amplicons. Pour ce qui est du pic représenté en (B), il s'agirait plutôt d'un nucléosome bien positionné, mais retrouvé seulement dans une partie de la population, étant donnée sa hauteur relative plus basse que le pic A (environ 40% de la hauteur de ce dernier). Finalement, un nucléosome mal

positionné ou ayant des positions alternatives serait représenté par un pic aux allures de celui décrit en (C). Il s'agit d'un pic plus large, ayant un taux d'enrichissement approximativement équivalent à 30% de l'enrichissement maximal. Ce type de patron est aussi observé dans une région où l'ensemble des nucléosomes sont positionnés aléatoirement ou délocalisés. Dans ce cas, on observe une densité de nucléosomes relativement constante (environ 30% de l'enrichissement maximal) couvrant une assez large région.



**Figure 1. Trois profils de nucléosomes possibles pour la technique de balayage des nucléosomes.** A) Nucléosome bien positionné dans l'ensemble de la population. B) Nucléosome bien positionné dans une portion de la population. C) Nucléosome mal positionné ou ayant des positions alternatives.

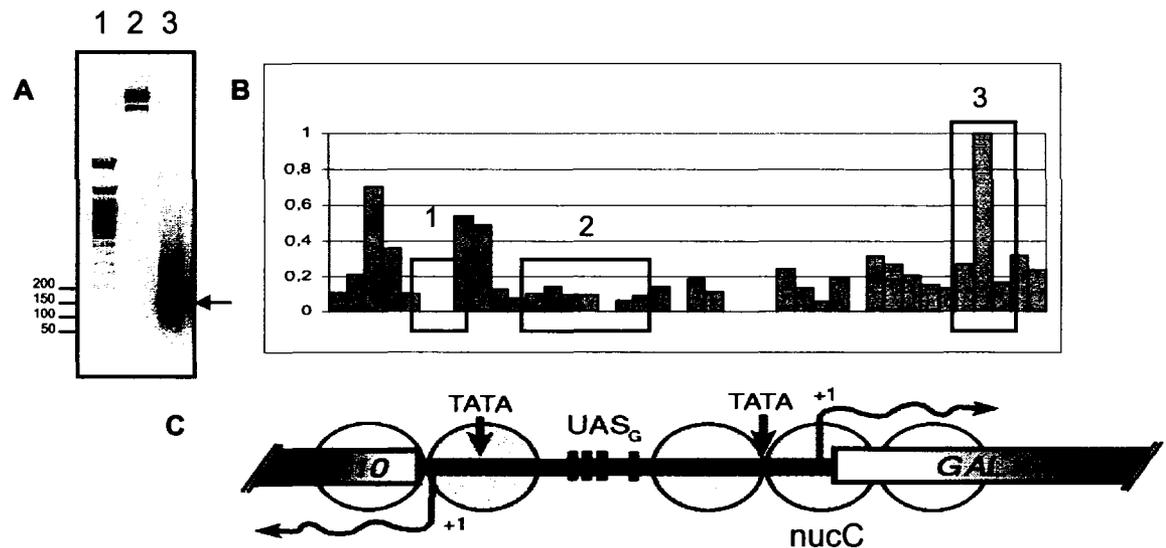
La digestion de la chromatine jusqu'au mono-nucléosome ayant bien fonctionné (voir Figure 2A), cette technique a été appliquée à l'étude du positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *GAL1* et *GAL10*, en milieu riche non inducteur, chez les souches w303, MAY424, MSY590 et MSY1147 de levure *Saccharomyces cerevisiae* décrites au tableau #1 de la section 2.1.1. Il a d'abord fallu optimiser quelques paramètres en fonction des résultats obtenus, étant donné les trois principaux problèmes rencontrés. D'abord, il a été observé qu'il y avait absence d'amplification pour certaines paires d'amorces (Figure

2B (1)), tant sur l'ADN génomique nu que sur l'ADN nucléosomal. Cette difficulté est liée à la résolution employée pour cette technique, soit d'environ 30 paires de bases. Ainsi, il est parfois difficile de générer des paires d'amorces parfaitement capables d'être efficaces dans les mêmes conditions d'amplification que les autres sans trop les déplacer ou en varier la longueur. Outre la nature des amorces, il a fallu aussi mettre au point des conditions réactionnelles (concentration d'oligonucléotides, température d'hybridation, etc.) qui permettaient une amplification par chacune des paires d'amorces simultanément. Une seule paire d'amorces ne permet toujours pas une amplification satisfaisante. Sa position est indiquée par une flèche aux panneaux A et C de la Figure 4.

Ensuite, le balayage des nucléosomes a détecté une amplification à un site connu comme étant dépourvu de nucléosomes (Figure 2B (2)). Cette observation peut être expliquée par l'existence de séquences d'ADN naturellement résistantes à la digestion, et le manque d'un contrôle permettant de soustraire l'amplification due à cet ADN. C'est alors qu'a été introduit le contrôle de l'ADN génomique déprotéinisé (nu) et digéré à la MNase, tout comme la chromatine. Ainsi, des sites d'ADN naturellement résistants à la digestion par cet enzyme et générant des fragments de la taille d'un mono-nucléosome ont pu être purifiés sur gel et soumis à une amplification quantitative par Q-PCR ; par exemple, le site des UAS<sub>G</sub>. Évidemment, la valeur d'amplification obtenue a été soustraite de celle observée pour l'ADN mono-nucléosomal (voir Équation #1, section 2.1.5.1).

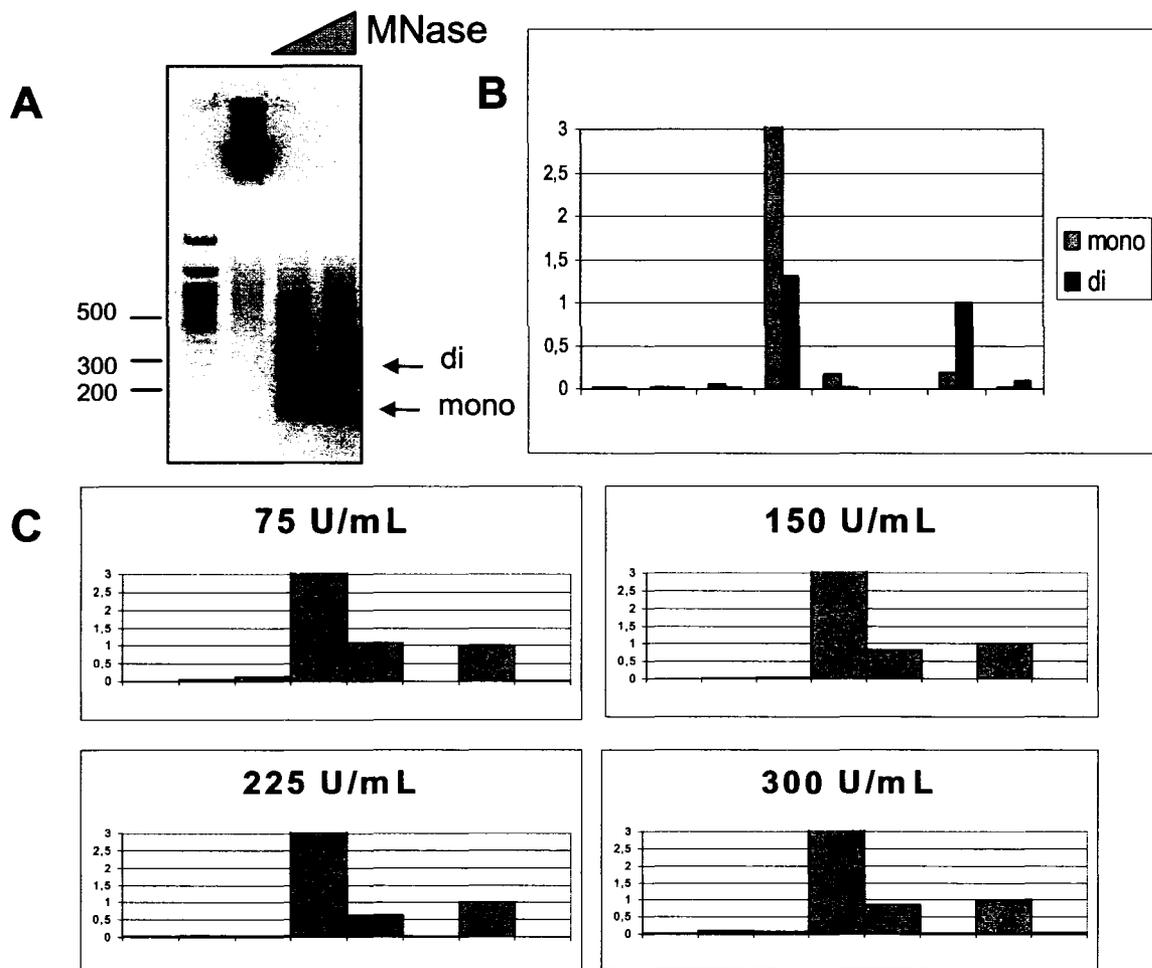
Finalement, un problème plutôt inattendu a fait surface lors de la constatation de l'étroitesse de certains pics (Figure 2B (3)). L'hypothèse prédominante permettant d'expliquer un tel résultat propose que l'ADN purifié comme ayant la taille d'un mono-nucléosome soit en réalité sur-digéré. Il est bien connu qu'il est possible que les extrémités du fragment d'ADN enroulé sur l'octamère d'histones se détachent transitoirement, événement qui permettrait à la MNase de cliver l'ADN libéré (Li *et al.*, 2004). Cependant, cette idée est peu probable, étant donné que la chromatine est pontée chimiquement au formaldéhyde

préalablement à la digestion, ce qui empêche le bris des interactions entre l'ADN et les protéines.



**Figure 2: Première ébauche de balayage de nucléosomes chez MSY590 en milieu riche non inducteur.** A) Migration sur gel d'agarose 1,5% p/v d'une digestion de noyaux (chromatine) jusqu'au mono-nucléosome. (1) Marqueur de poids moléculaire. (2) Chromatine non digérée. (3) Chromatine digérée 10 minutes avec 200 U/mL de MNase. B) Trois principaux problèmes rencontrés : (1) pas d'amplification pour certaines amorces (2) amplification à un site dépourvu de nucléosomes (3) étroitesse des pics. C) Structure nucléosomale de la région promotrice de *GAL1-GAL10* alignée avec les amplicons choisis pour cette région et présentés en B.

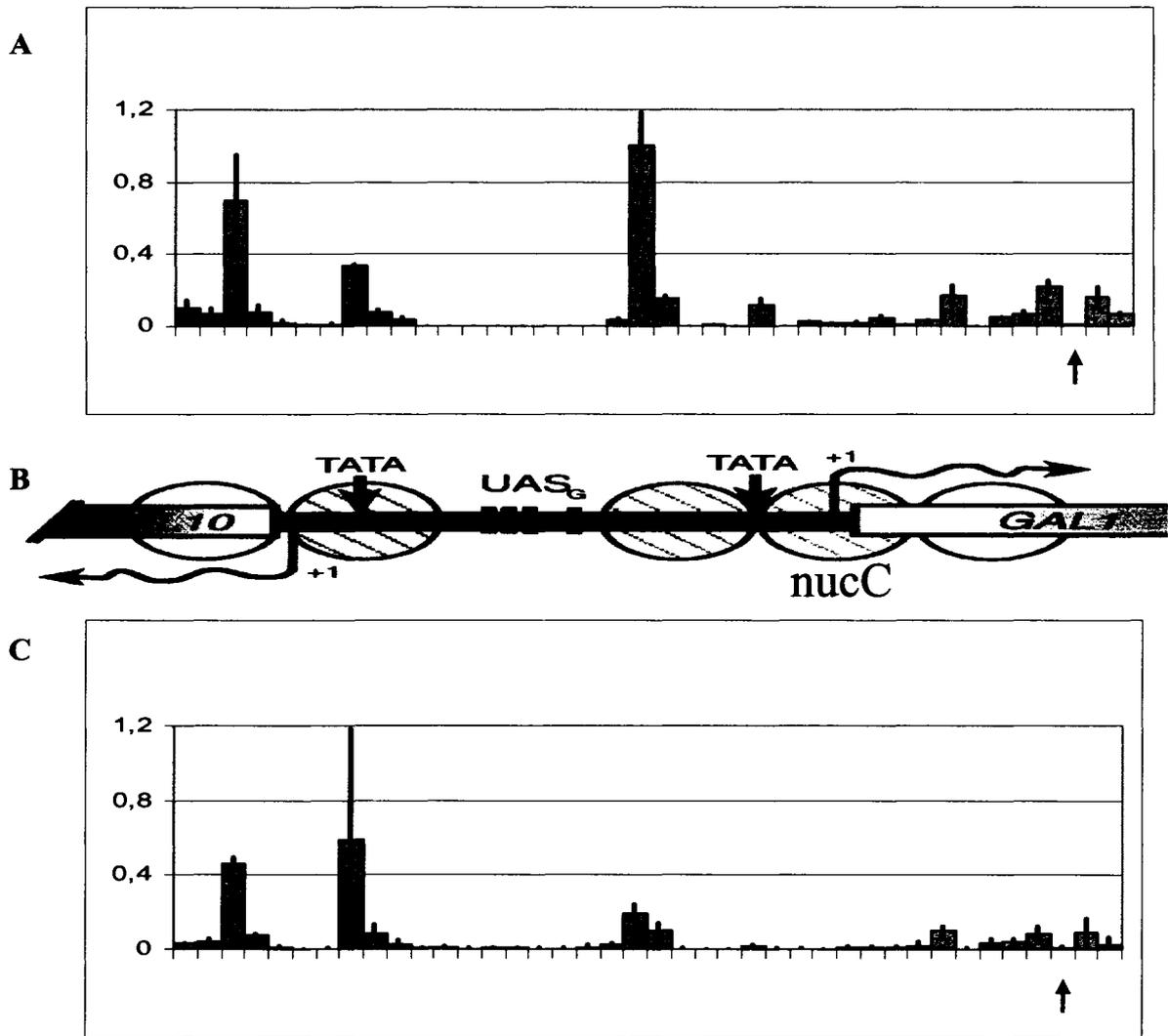
Toutefois, dans le but de vérifier que l'étroitesse des pics est inhérente à la technique et non pas due à une sur-digestion de l'ADN, des balayages de nucléosomes ont été réalisés sur des purifications d'ADN mono et di-nucléosomal, tels que présentés à la Figure 3. L'ADN di-nucléosomal a été obtenu en effectuant une digestion incomplète de la chromatine, soit en utilisant des quantités de MNase ne permettant pas une digestion complète jusqu'au



**Figure 3. L'ADN correspondant aux mono-nucléosomes n'est pas sur-digéré.** A) Migration sur gel d'agarose 1,5% p/v de digestions de chromatine avec une concentration croissante de MNase (0, 75 et 150 U/mL de MNase). B) Balayage des nucléosomes opéré à un pic étroit sur l'ADN purifié mono-nucléosomal et di-nucléosomal. C) Balayage des nucléosomes opéré à un pic étroit sur l'ADN purifié mono-nucléosomal plus ou moins digéré à la MNase.

mono-nucléosome (voir Figure 3A). Si l'étroitesse des pics observée était due simplement à une sur-digestion de l'ADN, l'amplification sur l'ADN di-nucléosomal aurait dû fournir un pic plus large. Or, la Figure 3 B démontre que ce n'est pas le cas ; l'étroitesse des pics observée est donc inhérente à la technique pour ce nucléosome particulier. Cette conclusion a de plus été obtenue via un second test, soit un balayage des nucléosomes réalisé sur de l'ADN mono-nucléosomal sous-digéré (75 ou 150 U/mL) et sur-digéré (225 ou 300 U/mL) (voir Figure 3 C).

En ce qui a trait au balayage des nucléosomes réalisé à l'ensemble de la région promotrice de *GALI* et de *GALI0*, des pics très étroits, mais reproductibles ont été observés, en milieu riche non inducteur, tant pour les levures de type sauvage (W303 et MSY590) que pour leur mutant de délétion de H2A.Z correspondant (MAY424 et MSY1147, respectivement). Les résultats obtenus pour MSY590 et MSY1147 sont montrés à la Figure 4, A et C. Il est intéressant de noter que l'amplitude des pics, mais pas leur position, varie entre les deux souches, ce qui suggère un rôle pour H2A.Z dans la stabilité de certains nucléosomes présents à cette région promotrice. Conformément à l'hypothèse selon laquelle H2A.Z stabilise des nucléosomes spécifiques dans la région promotrice, le nucléosome en amont de nucC est présent, quoique beaucoup moins abondant, chez le mutant de délétion (voir Figure 4 A et C). Toutefois, le pic attendu pour le nucléosome identifié comme nucC (voir Figure 4) est absent dans les deux expériences. Il avait déjà été observé dans notre laboratoire que cette région est particulièrement difficile à amplifier par PCR. Ainsi, ce résultat n'est pas complètement surprenant. L'amplification de l'ADN correspondant à ce nucléosome constitue, outre l'étroitesse des pics, le problème majeur rencontré avec cette technique à cette région ; davantage d'optimisation sera donc requise pour permettre la vérification de notre hypothèse.



**Figure 4. Balayage des nucléosomes à la région promotrice de *GAL1-GAL10* en milieu non inducteur chez la levure de type sauvage et le mutant  $\Delta htz1$ .** A) Balayage des nucléosomes en milieu non inducteur chez MSY590 (levure de type sauvage). n=3 B) Structure nucléosomale de la région promotrice de *GAL1-GAL10* alignée avec les amplicons choisis pour cette région. C) Comme en (A), mais pour la souche MSY1147 (mutant  $\Delta htz1$ ).

## CHAPITRE 2

### EFFET DE LA DÉLÉTION DU VARIANT D'HISTONE H2A.Z SUR L'EXPRESSION DU GÈNE *CHAI*

#### 3.1 matériels et méthodes

##### 3.1.1 Souches de levure et milieux de croissance

Les souches de levures employées dans ce chapitre sont les mêmes que pour le chapitre 1 (voir Tableau 1, section 2.1.1).

Les milieux de culture utilisés pour ces expérimentations sont composés de 6,7g de «yeast nitrogen base», 10g d'acide succinique, 6g de NaOH, 0,7g d'un mélange d'acides aminés excluant la sérine et de 2% p/v glucose. L'expression du gène *CHAI* peut être induite par l'ajout de sérine à ce milieu de culture, à raison de 1g/L.

##### 3.1.2 Préparation d'ARN

Préparer une culture d'un volume de 10mL dans le milieu approprié, toute la nuit, avec agitation à 225 rpm, à 30°C. Centrifuger les cellules 5 minutes à 2500 x g à 4°C et les resuspendre dans 200µL de tampon d'extraction (0,5M NaCl, 0,2M Tris-HCl pH 7,6, 0,01M EDTA et 1% p/v SDS, préparé avec de l'eau traitée contre les RNAses). Ajouter 400µL de billes de verre et 200µL de phénol-chloroforme équilibré avec le tampon d'extraction. Vortexer 2,5 minutes et ajouter 300µL de tampon d'extraction et 300µL du

même mélange de phénol-chloroforme. Vortexer 1 minute et centrifuger 5 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse, à température pièce. Reprendre l'extraction de la phase aqueuse jusqu'à ce que l'interphase soit claire. Précipiter l'ADN avec deux volumes d'éthanol, laver avec 1 mL d'éthanol 70% v/v et resuspendre dans 20µL d'eau distillée. La qualité de l'ARN est vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,9% p/v contenant du formaldéhyde.

### **3.1.3 Marquage de sondes radioactives**

Diluer l'oligonucléotide à marquer à une concentration de 10pmol/µL. Pour chaque marquage, utiliser 1µL de l'oligonucléotide, 12µL d'eau distillée stérile, 2µL tampon one-phor-all (USB), 2µL T4 kinase PNK (USB) et 3µL  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Incuber 45 minutes à 37°C. Purifier la sonde en passant le mélange réactionnel sur une mini-colonne de type G-25 (Roche). Ajouter 80µL d'eau distillée stérile. Conserver à -20°C dans un récipient blindé.

### **3.1.4 Extension d'amorce**

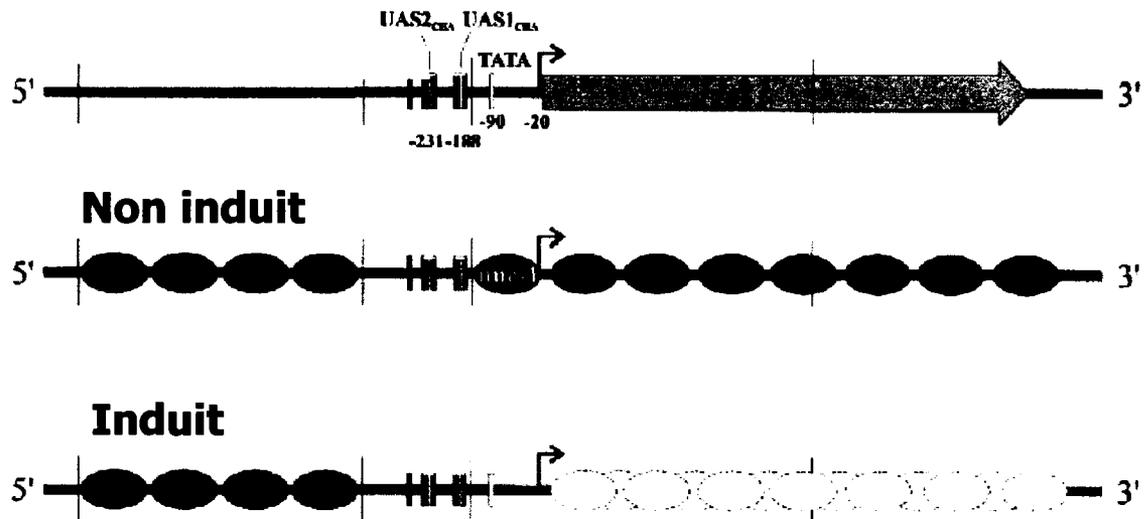
À 20µg d'ARN sont ajoutés 10mM de Tris-HCl pH8.6, 300mM de NaCl, 1mM d'EDTA et 0,1pmol de sonde marquée au  $\gamma^{32}\text{P}$  pour un volume réactionnel final de 22µL. Suite à une incubation de 90 minutes à 55°C, 200µL d'acétate d'ammonium 1M et 200µL d'isopropanol sont ajoutés au mélange. Après une incubation de 15 minutes à température pièce, l'ARN est précipité par centrifugation à vitesse maximale pendant 10 minutes et lavé avec 1mL d'éthanol 70% v/v. Les culots sont séchés 10 minutes sur glace et resuspendus dans 10µL de 10mM Tris-HCl pH8.6 à 4°C. L'extension d'amorce est permise par l'ajout subséquent de 5 unités d'AMVRT (Promega), de 20 unités de RNAsin (Promega), du tampon AMVRT 5X (Promega), de 0,2µL de 1M DTT, 0,8µL de 25mM dNTPs, 1µL

d'Actinomycine D à 1mg/mL et 3 $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O traitée contre les RNases. Ce nouveau mélange est ensuite incubé 90 minutes à 45°C et la réaction est arrêtée par l'ajout de 20 $\mu$ L de colorant au formamide de la compagnie USB. Les produits d'extension d'amorce sont finalement migrés sur gel 5M urée, 10% p/v acrylamide, lequel est ensuite séché et exposé sur un écran permettant la détection de la radioactivité.

### 3.2 Résultats

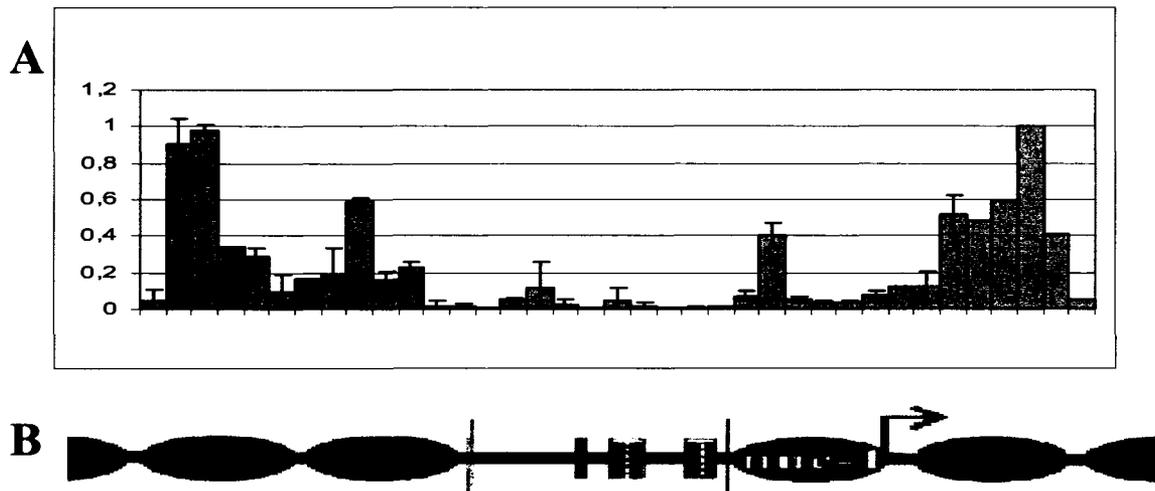
Dans le but de valider la technique de balayage des nucléosomes employée au Chapitre 1, des études similaires ont été réalisées à une autre région promotrice bien caractérisée. Afin d'étudier un gène qui risquait d'avoir une régulation de la transcription similaire à celle de *GALI-GAL10*, le choix du gène reposait sur quatre principaux critères : il devait être inductible, la structure chromatinienne de son promoteur devait être connue, H2A.Z devait être présent à sa région promotrice et son expression devait être dépendante de H2A.Z. Parmi plusieurs candidats potentiels, *CHAI* a été retenu, puisque c'est un gène inductible dont la structure chromatinienne du promoteur est connue, mais aussi en raison de l'observation par notre groupe de la présence de H2A.Z à sa région promotrice (Moreira et Holmberg, 1998; Guillemette *et al.*, 2005). Cependant, il restait à déterminer si l'expression de *CHAI* dépend de la présence de H2A.Z.

La figure 1 présente un schéma du positionnement des nucléosomes au promoteur de *CHAI* dans la levure de type sauvage publié par Moreira et Holmberg (1998). On y voit une comparaison de la structure chromatinienne en absence et en présence d'induction. Les ovales noirs représentent un nucléosome bien positionné, alors que les ovales superposés et blancs indiquent un positionnement aléatoire des nucléosomes tout le long de cette région.



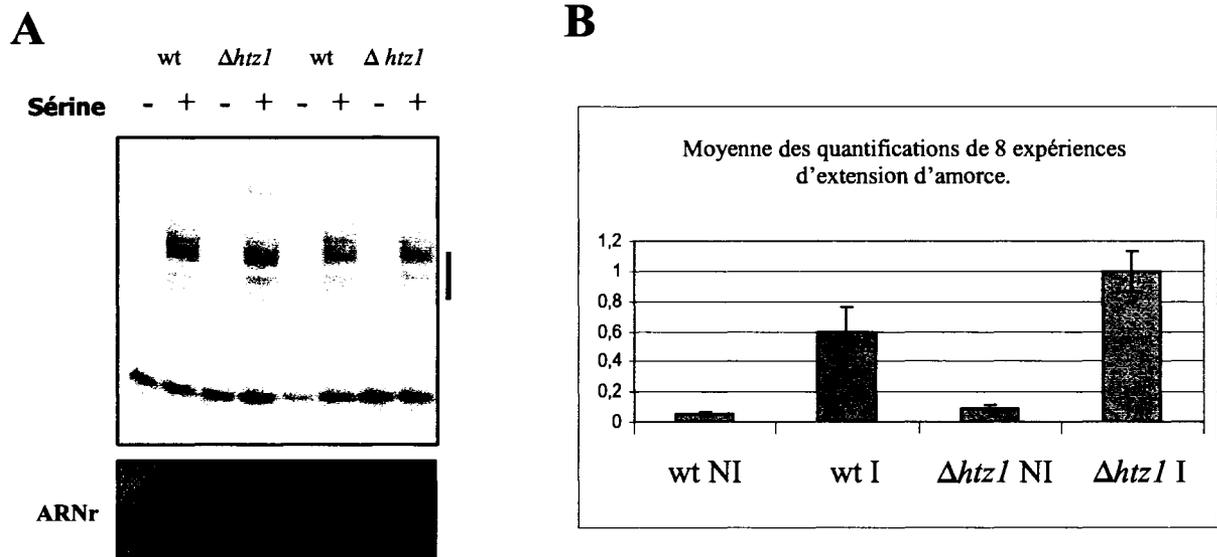
**Figure 1.** Schéma du positionnement des nucléosomes en milieu inducteur ou non à la région promotrice de *CHAI*, tel que décrit par Moreira et Holmberg (1998). En milieu non inducteur, le nucléosome *nuc-1* couvre la boîte TATA et d'autres nucléosomes couvrent la région codante de *CHAI* avec un espacement régulier. En milieu inducteur, *nuc-1* est perdu ou déplacé et le positionnement des autres nucléosomes devient aléatoire.

La technique de balayage des nucléosomes a donc été validée à l'aide d'une étude du positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *CHAI* chez la souche W303 en milieu minimal non inducteur. En effet, le profil reproductible de pics et de vallées obtenu pour cette région (Figure 2) correspond à celui prédit par la littérature (Moreira et Holmberg, 1998); il est à noter que le résultat présenté à la figure 2 a été obtenu sans la soustraction d'un contrôle pour l'ADN déprotéinisé et digéré à la MNase. Ainsi, il peut être conclu des observations présentées à la figure 2 que la technique de balayage des nucléosomes, telle que décrite dans cet ouvrage, permet de déterminer correctement la position des nucléosomes présents à la région promotrice de *CHAI*.



**Figure 2. Un balayage des nucléosomes à la région promotrice de *CHAI* en milieu non inducteur valide la technique.** A) Position et abondance relative des nucléosomes observés chez la levure de type sauvage (w303), en milieu minimal dépourvu de sérine, à la région promotrice de *CHAI*, tel que prédit par les observations de la figure précédente (n=2). B) Agrandissement du schéma de la figure 1 aligné avec les amplicons choisis pour cette région.

Une hypothèse pour expliquer le rôle de H2A.Z dans la régulation positive de la transcription des gènes *GAL1* et *GAL10* propose la stabilisation de nucléosomes clés, en attente d'un signal d'activation, lesquels seraient désassemblés au moment de l'induction. Dans le but de vérifier si un tel mécanisme agissait sur *CHAI*, nous avons d'abord voulu vérifier si l'expression de *CHAI* était dépendante de la présence de H2A.Z. La technique utilisée, l'extension d'amorce radioactive, permet de mesurer le taux de transcription d'un gène en quantifiant l'ARNm correspondant. L'ARN total d'une culture de levures est extrait et une transcription inverse est réalisée avec une amorce spécifique marquée au phosphore radioactif. L'ADNc ainsi synthétisé est migré sur un gel d'agarose et le signal radioactif obtenu est quantifié, l'intensité du signal étant proportionnelle à la quantité de transcrit. La figure 3 A présente deux expériences d'extension d'amorce correspondant au



**Figure 3. L'expression de *CHAI* n'est pas affectée négativement par la délétion de *HTZ1*.** A) Panneau du haut : exemple typique d'extension d'amorce sur le gène *CHAI* chez la levure de type sauvage MSY590 (wt) et mutante MSY1147 ( $\Delta htz1$ ) en milieu inducteur (sérine) ou non. Panneau du bas : contrôle de quantité et de qualité de l'ARN utilisé pour la réaction d'extension d'amorce. B) Quantification de 8 expériences d'extension d'amorce réalisées comme en (A). NI : non inducteur; I : inducteur.

transcrit du gène *CHAI* réalisées chez la levure de type sauvage (MSY590) et chez le mutant de délétion *htz1*- $\Delta$  correspondant (MSY1147). Le gel du bas sert de contrôle pour la quantité d'ARN présente dans chaque réaction. Les trois bandes indiquées par le trait vertical servent à la quantification des transcrits en absence et en présence d'induction de *CHAI*, c'est-à-dire, soit l'absence ou la présence de 1g/L de sérine dans le milieu. En conditions d'induction, il a été observé de façon reproductible, que l'expression absolue de ce gène chez le mutant de délétion pour H2A.Z est supérieure à celle observée chez la levure de type sauvage (Figure 3A et 3B). Cette observation indique que la présence de H2A.Z n'est pas nécessaire à l'expression maximale de *CHAI*. Ainsi, il peut être supposé

que la régulation de la transcription des gènes *GAL1-GAL10* et *CHA1* ne s'effectue pas par les mêmes mécanismes, et que H2A.Z ne joue pas le même rôle à ces deux promoteurs.

## CONCLUSION

Le variant d'histone H2A.Z, impliqué dans le remodelage de la chromatine, a ici été étudié afin de mieux comprendre son rôle dans la régulation de la transcription chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les travaux ci présentés avaient pour objectif de faire avancer les connaissances sur le rôle que joue H2A.Z dans la stabilisation de nucléosomes clés à la région promotrice, en attente du signal d'activation, lesquels seraient désassemblés au moment de l'induction.

Ainsi, nous avons voulu étudier le rôle de H2A.Z sur le positionnement, la stabilité et l'abondance relative des nucléosomes à l'ensemble de la région promotrice de *GAL1* et *GAL10* chez *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide de la technique de balayage des nucléosomes. Cette technique a nécessité beaucoup d'optimisation, mais il a tout de même été possible d'obtenir un patron reproductible de positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *GAL1* et *GAL10* en absence d'induction dans la levure de type sauvage et pour le mutant de délétion de H2A.Z correspondant. Ces patrons démontrent des positions similaires, mais des niveaux d'abondance différents pour certains nucléosomes, ce qui permet de supposer que H2A.Z influence la stabilité de certains nucléosomes, du moins à cette région promotrice. Cependant, l'étroitesse des pics obtenus dans ces patrons portent à croire que cette technique n'est peut-être pas la meilleure pour répondre aux interrogations soulevées dans cet ouvrage.

Toutefois, afin de vérifier que la rencontre de cet obstacle n'était pas due à la technique employée, des études similaires ont été réalisées à une autre région promotrice bien caractérisée ; le promoteur du gène *CHAI* a en effet récemment fait l'objet de plusieurs études sur le positionnement des nucléosomes à sa région promotrice, de même que sur la

présence du variant d'histone H2A.Z à cette même région. Ce gène modèle a permis de valider l'efficacité de la technique de balayage des nucléosomes à fournir les mêmes résultats que ceux observés précédemment.

Afin de vérifier le rôle de H2A.Z dans l'activation de la transcription de ce gène, un essai d'extension d'amorce a été réalisé. Contrairement au résultat attendu, il a été observé que la délétion de H2A.Z a un effet positif sur l'expression de *CHA1*.

Les expérimentations réalisées dans le cadre de ces travaux de maîtrise permettent de constater que la technique de balayage des nucléosomes est adéquate pour reproduire le positionnement des nucléosomes à la région promotrice de *CHA1*. Toutefois, à la région promotrice de *GAL1* et *GAL10*, cette technique ne semble pas encore tout à fait au point. Finalement, il peut être conclu que l'influence du variant d'histone H2A.Z sur la régulation de la transcription de ces gènes s'exerce via des mécanismes différents.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M., and Ausio, J. (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem* 276, 41945-41949.
- Abbott, D.W., Laszczak, M., Lewis, J.D., Su, H., Moore, S.C., Hills, M., Dimitrov, S., and Ausio, J. (2004). Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* 43, 1352-1359.
- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* 21, 6270-6279.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002a). Epigenetic consequences of nucleosome dynamics. *Cell* 111, 281-284.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002b). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.
- Ahn, S.H., Henderson, K.A., Keeney, S., and Allis, C.D. (2005). H2B (Ser10) phosphorylation is induced during apoptosis and meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* 4, 780-783.
- Ahn, S.H., Diaz, R.L., Grunstein, M., and Allis, C.D. (2006). Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol Cell* 24, 211-220.
- Akey, C.W., and Luger, K. (2003). Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 13, 6-14.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407, 102-106.
- Alen, C., Kent, N.A., Jones, H.S., O'Sullivan, J., Aranda, A., and Proudfoot, N.J. (2002). A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol Cell* 10, 1441-1452.
- 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., Glover, C.V., Bowen, J.K., and Gorovsky, M.A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell* *20*, 609-617.
- Alonso, A., Mahmood, R., Li, S., Cheung, F., Yoda, K., and Warburton, P.E. (2003). Genomic microarray analysis reveals distinct locations for the CENP-A binding domains in three human chromosome 13q32 neocentromeres. *Hum Mol Genet* *12*, 2711-2721.
- Amor, D.J., Kalitsis, P., Sumer, H., and Choo, K.H. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* *14*, 359-368.
- An, W. (2007). Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Subcell Biochem* *41*, 351-369.
- Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J* *23*, 3815-3824.
- Aoyagi, S., and Hayes, J.J. (2002). hSWI/SNF-catalyzed nucleosome sliding does not occur solely via a twist-diffusion mechanism. *Mol Cell Biol* *22*, 7484-7490.
- Aoyagi, S., Wade, P.A., and Hayes, J.J. (2003). Nucleosome sliding induced by the xMi-2 complex does not occur exclusively via a simple twist-diffusion mechanism. *J Biol Chem* *278*, 30562-30568.
- Aoyagi, S., Narlikar, G., Zheng, C., Sif, S., Kingston, R.E., and Hayes, J.J. (2002). Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions. *Mol Cell Biol* *22*, 3653-3662.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10148-10152.
- Ausio, J., and Abbott, D.W. (2002). The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* *41*, 5945-5949.
- Ausio, J., Abbott, D.W., Wang, X., and Moore, S.C. (2001). Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochem Cell Biol* *79*, 693-708.
- 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.

- Baer, B.W., and Rhodes, D. (1983). Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes. *Nature* *301*, 482-488.
- Bash, R., and Lohr, D. (2001). Yeast chromatin structure and regulation of GAL gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *65*, 197-259.
- Bazett-Jones, D.P., Cote, J., Landel, C.C., Peterson, C.L., and Workman, J.L. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol* *19*, 1470-1478.
- Beard, P. (1978). Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40. *Cell* *15*, 955-967.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* *301*, 1090-1093.
- Berk, A.J. (1999). Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 330-335.
- Bonaldi, T., Langst, G., Strohner, R., Becker, P.B., and Bianchi, M.E. (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *Embo J* *21*, 6865-6873.
- Bornaes, C., Petersen, J.G., and Holmberg, S. (1992). Serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the CHA1 polypeptide is homologous with other serine and threonine dehydratases. *Genetics* *131*, 531-539.
- Bourbon, H.M., Aguilera, A., Ansari, A.Z., Asturias, F.J., Berk, A.J., Bjorklund, S., Blackwell, T.K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M., *et al.* (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* *14*, 553-557.
- Boyer, L.A., Shao, X., Ebright, R.H., and Peterson, C.L. (2000). Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer in nucleosome remodeling by the SWI-SNF complex. *J Biol Chem* *275*, 11545-11552.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843-851.
- Bruce, K., Myers, F.A., Mantouvalou, E., Lefevre, P., Greaves, I., Bonifer, C., Tremethick, D.J., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (2005). The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic Acids Res* *33*, 5633-5639.

- Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2003). Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol Cell* *12*, 1599-1606.
- Cairns, B.R. (2005). Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* *15*, 185-190.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* *152*, 375-384.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2004). Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17450-17455.
- Chahal, S.S., Matthews, H.R., and Bradbury, E.M. (1980). Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. *Nature* *287*, 76-79.
- Chakravarthy, S., Gundimella, S.K., Caron, C., Perche, P.Y., Pehrson, J.R., Khochbin, S., and Luger, K. (2005). Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* *25*, 7616-7624.
- Cheung, W.L., Turner, F.B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S.H., Foley, M., Dorsey, J.A., Peterson, C.L., Berger, S.L., and Allis, C.D. (2005). Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* *15*, 656-660.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* *18*, 5355-5363.
- Chodaparambil, J.V., Edayathumangalam, R.S., Bao, Y., Park, Y.J., and Luger, K. (2006). Nucleosome structure and function. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 29-46.
- Clark, D.J., and Felsenfeld, G. (1992). A nucleosome core is transferred out of the path of a transcribing polymerase. *Cell* *71*, 11-22.
- Cosgrove, M.S., and Wolberger, C. (2005). How does the histone code work? *Biochem Cell Biol* *83*, 468-476.
- Cote, J., Peterson, C.L., and Workman, J.L. (1998). Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4947-4952.

- Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L., and Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.
- Coulombe, B., and Burton, Z.F. (1999). DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 457-478.
- Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271, 19009-19012.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331-2338.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 319, 1097-1113.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.
- Dhillon, N., and Kamakaka, R.T. (2000). A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol Cell* 6, 769-780.
- Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S.J., Aparicio, O.M., and Kamakaka, R.T. (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol* 26, 489-501.
- Dion, M.F., Altschuler, S.J., Wu, L.F., and Rando, O.J. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5501-5506.
- Dirscherl, S.S., and Krebs, J.E. (2004). Functional diversity of ISWI complexes. *Biochem Cell Biol* 82, 482-489.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., and Richmond, T.J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 327, 85-96.
- 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.
- 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.

- Dryhurst, D., Thambirajah, A.A., and Ausio, J. (2004). New twists on H2A.Z: a histone variant with a controversial structural and functional past. *Biochem Cell Biol* 82, 490-497.
- Dunican, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D.T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 21, 3253-3257.
- Eissenberg, J.C., and Wallrath, L.L. (2003). Heterochromatin, position effects, and the genetic dissection of chromatin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 74, 275-299.
- Fan, H.Y., Narlikar, G.J., and Kingston, R.E. (2004). Noncovalent modification of chromatin: different remodeled products with different ATPase domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 183-192.
- Fan, H.Y., He, X., Kingston, R.E., and Narlikar, G.J. (2003). Distinct strategies to make nucleosomal DNA accessible. *Mol Cell* 11, 1311-1322.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., and Tremethick, D.J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9, 172-176.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29-36.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 172-183.
- Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* 11, 148-154.
- Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2003). Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol Cell Biol* 23, 7767-7779.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., and Schubert, I. (2006). Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* 11, 199-208.
- Furuyama, T., Dalal, Y., and Henikoff, S. (2006). Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6172-6177.
- Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J., and Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep* 5, 715-720.
- Gerlach, V.L., Whitehall, S.K., Geiduschek, E.P., and Brow, D.A. (1995). TFIIB placement on a yeast U6 RNA gene in vivo is directed primarily by TFIIC rather than by sequence-specific DNA contacts. *Mol Cell Biol* 15, 1455-1466.

- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.
- Gill, G. (2001). Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 37, 33-43.
- Gligoris, T., Thireos, G., and Tzamarias, D. (2007). The Tup1 corepressor directs Htz1 deposition at a specific promoter nucleosome marking the GAL1 gene for rapid activation. *Mol Cell Biol* 27, 4198-4205.
- 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., Berger, S.L., and Workman, J.L. (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.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis. *Mol Cell Biol* 26, 5394-5405.
- Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B., and Muller, C.W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* 12, 449-460.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2005). Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6344-6349.
- Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N., and Kinoshita, K., Jr. (2001). Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* 409, 113-115.
- Hartzog, G.A., and Winston, F. (1997). Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr Opin Genet Dev* 7, 192-198.

- Hartzog, G.A., Speer, J.L., and Lindstrom, D.L. (2002). Transcript elongation on a nucleoprotein template. *Biochim Biophys Acta* 1577, 276-286.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.
- Haswell, E.S., and O'Shea, E.K. (1999). An in vitro system recapitulates chromatin remodeling at the PHO5 promoter. *Mol Cell Biol* 19, 2817-2827.
- Hayashi, T., Fujita, Y., Iwasaki, O., Adachi, Y., Takahashi, K., and Yanagida, M. (2004). Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* 118, 715-729.
- Hediger, F., and Gasser, S.M. (2006). Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev* 16, 143-150.
- Hendzel, M.J., and Davie, J.R. (1990). Nucleosomal histones of transcriptionally active/competent chromatin preferentially exchange with newly synthesized histones in quiescent chicken erythrocytes. *Biochem J* 271, 67-73.
- Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 133-153.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.
- Horn, P.J., and Peterson, C.L. (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297, 1824-1827.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1148-1153.
- Huletsky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Menard, L., Lamarre, D., and Poirier, G.G. (1989). The effect of poly(ADP-ribosylation) on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosylation) on core nucleosome structure. *J Biol Chem* 264, 8878-8886.
- Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W.L., and Muramatsu, M. (2000). p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev* 14, 1899-1907.
- Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res* 28, 3811-3816.

- Jackson, V. (1990). In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry* *29*, 719-731.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* *288*, 1422-1425.
- Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H., and Spector, D.L. (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* *116*, 683-698.
- Jaskelioff, M., Gavin, I.M., Peterson, C.L., and Logie, C. (2000). SWI-SNF-mediated nucleosome remodeling: role of histone octamer mobility in the persistence of the remodeled state. *Mol Cell Biol* *20*, 3058-3068.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- 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.
- Johnson, C.N., Adkins, N.L., and Georgel, P. (2005). Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action. *Biochem Cell Biol* *83*, 405-417.
- Kassabov, S.R., Zhang, B., Persinger, J., and Bartholomew, B. (2003). SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell* *11*, 391-403.
- Kermekchiev, M.B., Tzekov, A., and Barnes, W.M. (2003). Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. *Nucleic Acids Res* *31*, 6139-6147.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* *2*, E131.
- Korber, P., and Horz, W. (2004). SWRred not shaken; mixing the histones. *Cell* *117*, 5-7.
- Korber, P., Luckenbach, T., Blaschke, D., and Horz, W. (2004). Evidence for histone eviction in trans upon induction of the yeast PHO5 promoter. *Mol Cell Biol* *24*, 10965-10974.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
- Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. *Cell* *113*, 677-683.

- 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.
- Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* *12*, 1565-1576.
- Kuo, M.H., and Allis, C.D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* *20*, 615-626.
- Kurdistani, S.K., and Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 276-284.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* *306*, 2084-2087.
- Labrador, M., and Corces, V.G. (2003). Phosphorylation of histone H3 during transcriptional activation depends on promoter structure. *Genes Dev* *17*, 43-48.
- Lachner, M., Sengupta, R., Schotta, G., and Jenuwein, T. (2004). Trilogies of histone lysine methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *69*, 209-218.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116-120.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2001a). ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell* *8*, 1085-1092.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2001b). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci* *114*, 2561-2568.
- Langst, G., and Becker, P.B. (2004). Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* *1677*, 58-63.
- Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *Embo J* *22*, 4512-4522.
- Lemieux, K., and Gaudreau, L. (2004). Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *Embo J* *23*, 4040-4050.

- Levchenko, V., and Jackson, V. (2004). Histone release during transcription: NAP1 forms a complex with H2A and H2B and facilitates a topologically dependent release of H3 and H4 from the nucleosome. *Biochemistry* *43*, 2359-2372.
- Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, and Workman, J.L. (2003). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* *278*, 8897-8903.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J., and Davie, J.R. (1993). Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J* *296* (Pt 3), 737-744.
- Linder, C., and Thoma, F. (1994). Histone H1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* binds to chromatin and affects survival, growth, transcription, and plasmid stability but does not change nucleosomal spacing. *Mol Cell Biol* *14*, 2822-2835.
- Ling, X., Harkness, T.A., Schultz, M.C., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1996). Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev* *10*, 686-699.
- Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 7024-7027.
- Lnenicek-Allen, M., Read, C.M., and Crane-Robinson, C. (1996). The DNA bend angle and binding affinity of an HMG box increased by the presence of short terminal arms. *Nucleic Acids Res* *24*, 1047-1051.
- Lo, K.W., Kogoy, J.M., and Pfister, K.K. (2007). The DYNLT3 light chain directly links cytoplasmic dynein to a spindle checkpoint protein, Bub3. *J Biol Chem* *282*, 11205-11212.
- Lohr, D., Venkov, P., and Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *Faseb J* *9*, 777-787.
- Lorch, Y., Cairns, B.R., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (1998). Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* *94*, 29-34.
- Louters, L., and Chalkley, R. (1985). Exchange of histones H1, H2A, and H2B in vivo. *Biochemistry* *24*, 3080-3085.
- 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.
- Luk, E., Vu, N.D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., and Wu, C. (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell* *25*, 357-368.

- Luo, R.X., and Dean, D.C. (1999). Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *J Natl Cancer Inst* *91*, 1288-1294.
- Lusser, A., and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* *25*, 1192-1200.
- Madigan, J.P., Chotkowski, H.L., and Glaser, R.L. (2002). DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res* *30*, 3698-3705.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* *10*, 882-891.
- Marmorstein, R., and Berger, S.L. (2001). Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene* *272*, 1-9.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol* *23*, 8323-8333.
- McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1525-1530.
- Meersseman, G., Pennings, S., and Bradbury, E.M. (1991). Chromatosome positioning on assembled long chromatin. Linker histones affect nucleosome placement on 5 S rDNA. *J Mol Biol* *220*, 89-100.
- Meersseman, G., Pennings, S., and Bradbury, E.M. (1992). Mobile nucleosomes--a general behavior. *Embo J* *11*, 2951-2959.
- Mellor, J. (2006). Imitation switch complexes. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 61-87.
- Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *94*, 607-613.
- 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.
- Millhouse, S., and Manley, J.L. (2005). The C-terminal domain of RNA polymerase II functions as a phosphorylation-dependent splicing activator in a heterologous protein. *Mol Cell Biol* *25*, 533-544.
- 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.

- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* *87*, 1261-1270.
- Moreira, J.M., and Holmberg, S. (1998). Nucleosome structure of the yeast CHA1 promoter: analysis of activation-dependent chromatin remodeling of an RNA-polymerase-II-transcribed gene in TBP and RNA pol II mutants defective in vivo in response to acidic activators. *Embo J* *17*, 6028-6038.
- Moreira, J.M., and Holmberg, S. (1999). Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *Embo J* *18*, 2836-2844.
- Moreira, J.M., and Holmberg, S. (2000). Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B. *Embo J* *19*, 6804-6813.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* *119*, 767-775.
- Muller, H.J., and Mott-Smith, L.M. (1930). Evidence That Natural Radioactivity Is Inadequate To Explain The Frequency Of "Natural" Mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *16*, 277-285.
- Nacheva, G.A., Guschin, D.Y., Preobrazhenskaya, O.V., Karpov, V.L., Ebralidse, K.K., and Mirzabekov, A.D. (1989). Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell* *58*, 27-36.
- Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., Talbert, P.B., Kim, M., Jones, K.M., Henikoff, S., Buell, C.R., and Jiang, J. (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* *36*, 138-145.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* *292*, 110-113.
- Narlikar, G.J., Phelan, M.L., and Kingston, R.E. (2001). Generation and interconversion of multiple distinct nucleosomal states as a mechanism for catalyzing chromatin fluidity. *Mol Cell* *8*, 1219-1230.
- Ng, H.H., Ciccone, D.N., Morshead, K.B., Oettinger, M.A., and Struhl, K. (2003). Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1820-1825.

- Nielsen, A.L., Sanchez, C., Ichinose, H., Cervino, M., Lerouge, T., Chambon, P., and Losson, R. (2002). Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *Embo J* 21, 5797-5806.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105-116.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284-288.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J* 19, 6141-6149.
- Palmer, D.K., O'Day, K., and Margolis, R.L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32-36.
- Park, Y.J., Chodaparambil, J.V., Bao, Y., McBryant, S.J., and Luger, K. (2005). Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem* 280, 1817-1825.
- Parsons, X.H., Garcia, S.N., Pillus, L., and Kadonaga, J.T. (2003). Histone deacetylation by Sir2 generates a transcriptionally repressed nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1609-1614.
- Payet, D., and Travers, A. (1997). The acidic tail of the high mobility group protein HMG-D modulates the structural selectivity of DNA binding. *J Mol Biol* 266, 66-75.
- Pennings, S., Meersseman, G., and Bradbury, E.M. (1991). Mobility of positioned nucleosomes on 5 S rDNA. *J Mol Biol* 220, 101-110.
- Perez-Martin, J. (1999). Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 23, 503-523.
- Peterson, C.L. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett* 476, 68-72.
- Peterson, C.L., and Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10, 187-192.
- Peterson, C.L., and Laniel, M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.

- Placek, B.J., Harrison, L.N., Villers, B.M., and Gloss, L.M. (2005). The H2A.Z/H2B dimer is unstable compared to the dimer containing the major H2A isoform. *Protein Sci* *14*, 514-522.
- Rachez, C., and Freedman, L.P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 274-280.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* *123*, 233-248.
- 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.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J* *22*, 1599-1607.
- Reale, A., Malanga, M., Zardo, G., Strom, R., Scovassi, A.I., Farina, B., and Caiafa, P. (2000). In vitro induction of H1-H1 histone cross-linking by adenosine diphosphate-ribose polymers. *Biochemistry* *39*, 10413-10418.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 162-169.
- Rhodes, L.E. (2004). Preventive oncology. *Lancet* *363*, 1736-1737.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* *45*, 5671-5677.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* *72*, 481-516.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* *103*, 411-422.
- Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E.D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J.T. (2003). Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* *301*, 1094-1096.
- Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R.E. (1998a). Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* *94*, 17-27.

- Schnitzler, G.R., Sif, S., and Kingston, R.E. (1998b). A model for chromatin remodeling by the SWI/SNF family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 535-543.
- Schnitzler, G.R., Cheung, C.L., Hafner, J.H., Saurin, A.J., Kingston, R.E., and Lieber, C.M. (2001). Direct imaging of human SWI/SNF-remodeled mono- and polynucleosomes by atomic force microscopy employing carbon nanotube tips. *Mol Cell Biol* 21, 8504-8511.
- Schubeler, D., MacAlpine, D.M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D.E., O'Neill, L.P., Turner, B.M., Delrow, J., *et al.* (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18, 1263-1271.
- Sekinger, E.A., Moqtaderi, Z., and Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell* 18, 735-748.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shia, W.J., Li, B., and Workman, J.L. (2006). SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 2507-2512.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243-269.
- Shukla, A., and Bhaumik, S.R. (2007). H2B-K123 ubiquitination stimulates RNAPII elongation independent of H3-K4 methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 214-220.
- Shundrovsky, A., Smith, C.L., Lis, J.T., Peterson, C.L., and Wang, M.D. (2006). Probing SWI/SNF remodeling of the nucleosome by unzipping single DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol* 13, 549-554.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *Embo J* 22, 1846-1856.
- Simone, C. (2006). SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J Cell Physiol* 207, 309-314.
- Sims, R.J., 3rd, Mandal, S.S., and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 263-271.

Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J.C., and Allis, C.D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3561-3565.

Smith, M.M. (2002). Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr Opin Cell Biol* *14*, 279-285.

Stargell, L.A., Bowen, J., Dadd, C.A., Dedon, P.C., Davis, M., Cook, R.G., Allis, C.D., and Gorovsky, M.A. (1993). Temporal and spatial association of histone H2A variant hv1 with transcriptionally competent chromatin during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev* *7*, 2641-2651.

Steger, D.J., and Workman, J.L. (1996). Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? *Bioessays* *18*, 875-884.

Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E., and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev* *9*, 573-586.

Studitsky, V.M., Clark, D.J., and Felsenfeld, G. (1994). A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell* *76*, 371-382.

Studitsky, V.M., Kassavetis, G.A., Geiduschek, E.P., and Felsenfeld, G. (1997). Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science* *278*, 1960-1963.

Studitsky, V.M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M., and Felsenfeld, G. (2004). Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* *29*, 127-135.

Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* *16*, 345-351.

Suka, N., Luo, K., and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* *32*, 378-383.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* *7*, 1121-1124.

Swaminathan, J., Baxter, E.M., and Corces, V.G. (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev* *19*, 65-76.

- Szerlong, H., Saha, A., and Cairns, B.R. (2003). The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling. *Embo J* 22, 3175-3187.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.
- Thambirajah, A.A., Dryhurst, D., Ishibashi, T., Li, A., Maffey, A.H., and Ausio, J. (2006). H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J Biol Chem* 281, 20036-20044.
- Thomas, J.O., and Travers, A.A. (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 167-174.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., and Hansen, J.C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18, 4629-4638.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 422-429.
- Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777-788.
- van Daal, A., and Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 3, 593-602.
- Vicent, G.P., Nacht, A.S., Smith, C.L., Peterson, C.L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004). DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16, 439-452.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E., and Workman, J.L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20, 1899-1910.

- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.
- Walfridsson, J., Bjerling, P., Thalen, M., Yoo, E.J., Park, S.D., and Ekwall, K. (2005). The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to centromeres. *Nucleic Acids Res* 33, 2868-2879.
- Wallrath, L.L., and Elgin, S.C. (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* 9, 1263-1277.
- Weischet, W.O. (1979). On the de novo formation of compact oligonucleosomes at high ionic strength. Evidence for nucleosomal sliding in high salt. *Nucleic Acids Res* 7, 291-304.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B.R., White, M.F., Workman, J.L., and Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400, 784-787.
- Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 285-327.
- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Winston, F., and Allis, C.D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6, 601-604.
- Wirbelauer, C., Bell, O., and Schubeler, D. (2005). Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev* 19, 1761-1766.
- Wong, M., Kanai, Y., Miwa, M., Bustin, M., and Smulson, M. (1983). Immunological evidence for the in vivo occurrence of a crosslinked complex of poly(ADP-ribosylated) histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 205-209.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67, 545-579.
- Woychik, N.A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.
- Xiao, B., Wilson, J.R., and Gamblin, S.J. (2003). SET domains and histone methylation. *Curr Opin Struct Biol* 13, 699-705.

Yager, T.D., and van Holde, K.E. (1984). Dynamics and equilibria of nucleosomes at elevated ionic strength. *J Biol Chem* 259, 4212-4222.

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.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., *et al.* (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.

Zlatanova, J., and van Holde, K. (1998). Linker histones versus HMG1/2: a struggle for dominance? *Bioessays* 20, 584-588.

Zofall, M., Persinger, J., Kassabov, S.R., and Bartholomew, B. (2006). Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* 13, 339-346.

Zucchi, I., Mento, E., Kuznetsov, V.A., Scotti, M., Valsecchi, V., Simionati, B., Vicinanza, E., Valle, G., Pilotti, S., Reinbold, R., *et al.* (2004). Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18147-18152.