



Assemblage et remodelage : le nucléosome sous influence

**Angela Taddei
Dominique Ray-Gallet
Geneviève Almouzni**

A. Taddei, D. Ray-Gallet, G. Almouzni : UMR 218 du Cnrs, Institut Curie, Section recherche, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

► Le nucléosome, qui est l'unité de base de l'organisation chromatinienne, joue un rôle essentiel dans l'ensemble des fonctions du génome. Sa structure est déterminée par de nombreux facteurs qui contrôlent son assemblage et son remodelage. Des approches biochimiques ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action parfois redondants de ces facteurs et leurs interactions. Des approches génétiques chez la levure et la drosophile ont permis de préciser leurs fonctions physiologiques. Enfin, la mise en évidence de mutations dans les gènes codant pour certains de ces facteurs en pathologie humaine souligne leur importance et dévoile une partie de leurs fonctions. Identifier les cibles et les régulations de ces facteurs est la tâche du moment. ◀

L'organisation de l'ADN en chromatine dans les cellules eucaryotes est le substrat de toutes les réactions qui impliquent le génome. Le nucléosome est la brique élémentaire de cette structure. Il est composé de la particule nucléosomique, soit 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère de protéines (histones H3, H4, H2A et H2B), et d'une région d'ADN dite de liaison dont la taille varie selon les espèces et le type cellulaire. Ce module de base se répète régulièrement pour former un nucléofilament qui peut s'organiser lui-même en structures de plus en plus compactes. La structure du nucléosome n'est pas figée: elle est influencée par de nombreux facteurs qui peuvent la modifier. Cette structure dynamique est déterminante pour toutes les fonctions du génome: la transcription, la réplication, la réparation et la recombinaison. Outre son rôle structural, le nucléosome a la capacité de moduler l'accessibilité des séquences d'ADN aux facteurs transcriptionnels, de participer à la signalisation, et même de transmettre de génération en génération des infor-

mations de type épigénétique [1]. Les questions fondamentales qui découlent de ce constat sont: (1) comment cette structure est-elle dupliquée et maintenue à travers les divisions cellulaires? (2) quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent de lui donner la malléabilité requise? (3) quels sont les paramètres définissant la spécificité de ces mécanismes vis-à-vis d'une fonction ou d'une région particulière du génome? Des études à la fois biochimiques et génétiques ont permis d'aborder ces questions. On peut envisager trois types d'actions. La première s'adresse directement aux histones, par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation/désacétylation qui est à ce jour la mieux étudiée [2] (voir *m/s* 1997, n° 10, p. 1205-11). Nous discuterons ici de deux types de remaniements dont l'aboutissement apparaît directement inverse: l'assemblage, au cours duquel s'établissent les interactions entre les histones et l'ADN pour construire la particule nucléosomique, et le « remodelage » (désassemblage?) qui recouvre un ensemble de remaniements qui rendent l'ADN nucléosomique plus accessible.

Les facteurs d'assemblage et la transmission de l'organisation fonctionnelle du génome

Le maintien de l'intégrité de l'information génétique dans sa globalité recouvre le maintien de la séquence nucléotidique ainsi que de son organisation en chromatine. Ainsi, la fidélité de la réplication du génome s'accompagne de la transmission de caractères épigénétiques. De même, lors de la réparation de l'ADN, l'organisation en chromatine transitoirement déstabilisée doit être restaurée. Au niveau de la fourche de réplication, la formation des nucléosomes est couplée à la synthèse d'ADN et résulte de deux processus. D'une part les histones parentales sont transférées sur l'ADN nouvellement répliqué, fournissant un moyen de transmettre des modifications post-traductionnelles des histones d'une génération de cellules à la suivante. D'autre part, des histones nouvellement synthétisées sont incorporées pour former de novo des nucléosomes. Les histones nouvellement synthétisées sont modifiées selon un profil caractéristique, qui est très conservé chez les eucaryotes pour l'histone H4 (acétylée sur les lysines 5 et 12). Cette conservation suggère une importance particulière de cette modification. Pourtant, elle n'est pas nécessaire à la reconstitution *in vitro* de particules nucléosomales. D'autres hypothèses sont à envisager, parmi lesquelles une stimulation de la translocation de ces protéines dans le noyau, ou une utilisation comme marqueur de l'assemblage en chromatine.

La formation de la particule nucléosomale: un auto-assemblage assisté par des chaperons

Un ensemble d'approches, menées aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, a permis d'établir que la formation de la particule nucléosomale procède en deux étapes [3]. Un tétramère d'histone (H3/H4)₂ entre d'abord en interaction avec l'ADN, puis deux dimères H2A/H2B viennent s'adjoindre (figure 1). Ces deux étapes peuvent être reproduites *in vitro* indépendamment de la réplication et en l'absence

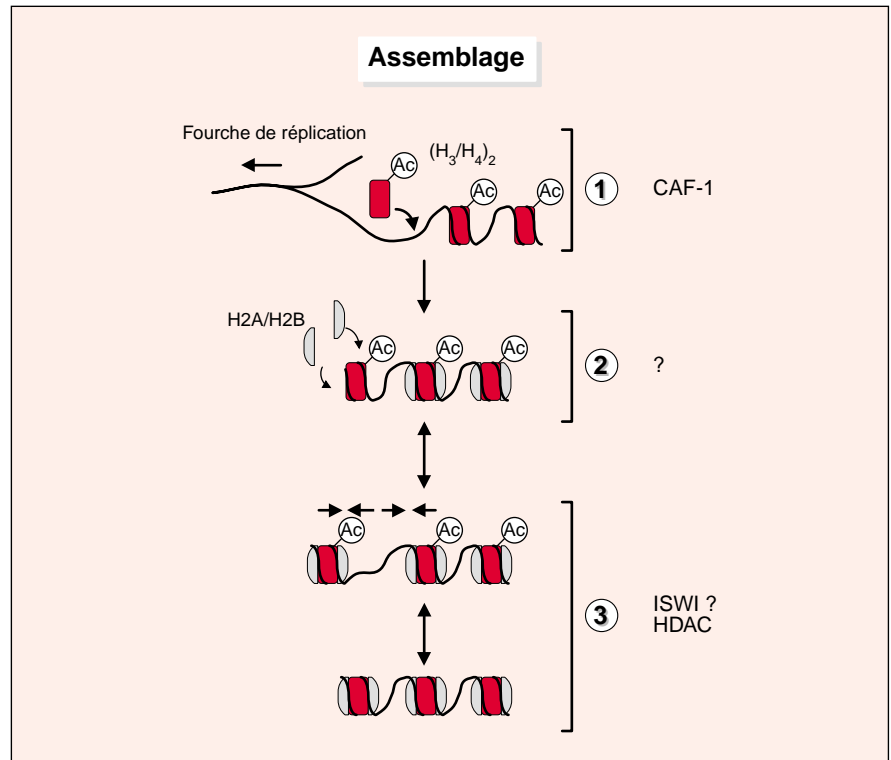


Figure 1. **L'assemblage des nucléosomes.** Au niveau de la fourche de réplication, l'assemblage des nucléosomes de novo procède en plusieurs étapes qui sont schématisées dans cette figure. **A.** Un tétramère d'histones (H3/H4)₂ nouvellement synthétisées (sous forme acétylée) est d'abord associé à l'ADN naissant. Cette étape est stimulée par le facteur d'assemblage CAF-1 (chromatin assembly factor 1). **B.** Deux dimères (H2A/H2B) sont ensuite ajoutés, et complètent la particule nucléosomique. **C.** Enfin, une étape dite de « maturation » permet l'espacement régulier des nucléosomes et généralement la désacétylation des histones nouvellement incorporées. L'obtention d'une telle régularité pourrait impliquer, entre autres, des facteurs dits de « remodelage ».

d'énergie. En effet, en conditions artificielles, les histones et l'ADN possèdent la capacité de former des particules nucléosomiques. Néanmoins, dans des conditions salines physiologiques, cette réaction requiert la présence de protéines « chaperons » de nature acide qui peuvent neutraliser la charge positive des histones, et assister la formation de la particule nucléosomique. Parmi ces chaperons, la protéine N1/N2 et la nucléoplasmine, identifiées dans des extraits d'œufs de xénope, sont respectivement associées aux histones H3/H4 et aux histones H2A/H2B [4]. NAP-1 (*nucleosome assembly protein 1*), un autre chaperon capable d'interagir sous forme purifiée avec toutes les histones, est spécifiquement complexée aux histones H2A/H2B dans les extraits de cellules humaines et d'embryons de drosophile [5, 6]. Si

ces chaperons facilitent la formation de particules nucléosomiques *in vitro*, leur importance dans ce processus *in vivo* reste à établir. Enfin, les cinétiques d'assemblage observées *in vitro* ne sont pas compatibles avec les exigences requises *in vivo*.

L'assemblage couplé à la réplication et à la réparation de l'ADN

Des extraits dérivés de cellules humaines, d'œufs de xénope ou d'embryons de drosophile permettent de reproduire les réactions de réplication et de réparation de l'ADN ainsi que son assemblage en chromatine. L'utilisation de ces extraits a permis de mettre en évidence une voie d'assemblage couplée à la réplication et à la réparation de l'ADN, beaucoup plus rapide et efficace [7, 8]. Dans cette voie, le facteur CAF-1 (*chroma-*

tin assembly factor 1) délivre les histones H3/H4 sur l'ADN nouvellement synthétisé. Les histones H2A/H2B pourraient utiliser le chaperon NAP-1 pour compléter la particule nucléosomique, comme cela a pu être obtenu avec des histones purifiées.

CAF-1 a été initialement identifié dans des extraits de cellules humaines. Des activités équivalentes ont été ensuite caractérisées dans des extraits d'œufs de xénope, de levure, ou encore d'embryons de drosophile. Dans les extraits de cellules humaines, ce complexe, composé de trois sous-unités (p150, p60 et RbAp48: *retinoblastoma associated protein 48 kDa*), s'associe aux formes nouvellement synthétisées des histones H3 et H4 probablement via RbAp48, une petite protéine retrouvée dans de nombreux autres complexes (figure 3). La localisation sub-cellulaire de CAF-1, aux sites de réplication en phase S [9, 10] et dans la chromatine endommagée [11], fournit un argument supplémentaire pour une implication *in vivo* de CAF-1 dans l'assemblage couplé à la réplication et à la réparation de l'ADN. A ce jour, CAF-1 est le seul facteur pour lequel les données *in vitro* sont cohérentes avec sa localisation au niveau des sites d'action proposés. La démonstration récente de l'interaction entre CAF-1 et la protéine PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) [12, 13] établit un lien moléculaire direct entre l'assemblage en chromatine et les processus de réplication et de réparation de l'ADN. En effet, PCNA, marqueur de prolifération connu, intervient à la fois dans la réparation et la réplication de l'ADN et se localise au niveau des sites correspondants.

Des facteurs redondants pour une fonction essentielle ?

CAF-1 représente un candidat idéal pour promouvoir l'assemblage de nucléosomes *de novo* couplé à la réplication et à la réparation de l'ADN. Pourtant, des analyses génétiques, chez la levure, montrent que les gènes codant pour les sous-unités de CAF-1 (CAC1, CAC2, CAC3 – CAC pour *chromatin assembly complex*) ne sont pas essentiels. Ceci implique soit l'existence de voies d'assemblage alternatives, soit qu'un

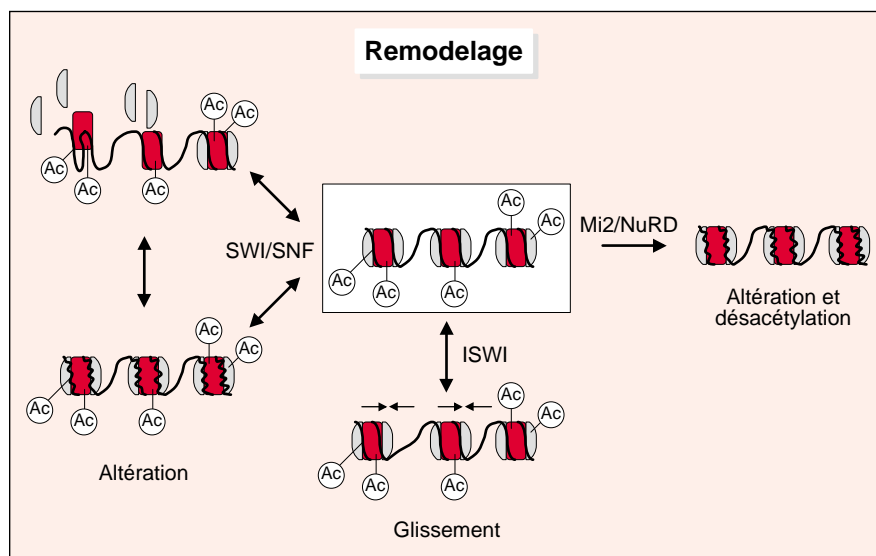


Figure 2. **Mécanismes de remodelage des nucléosomes: des modèles.** Le remodelage du nucléosome représente l'ensemble des réarrangements structuraux qui rendent l'ADN nucléosomal potentiellement plus accessible. Sur ce schéma sont représentés les modèles correspondant aux principaux processus de remodelage catalysés par les facteurs du type SWI/SNF, ISWI et Mi2/NuRD. Ces facteurs sont des complexes multiprotéiques qui contiennent tous une activité ATPase critique pour le remaniement de l'organisation nucléosomale. Les facteurs de la famille SWI/SNF altéreraient les contacts histones/ADN. La structure ainsi plus fluide pourrait osciller entre une forme altérée et la forme d'origine. Un mécanisme de « glissement », entraînant le déplacement des octamères d'histones en cis le long de l'ADN, est proposé pour la famille ISWI. Enfin, dans le cas de la famille Mi2/NuRD, une altération de l'organisation nucléosomique serait accompagnée d'une désacétylation des histones, catalysée par les sous-unités histone désacétylases (HDAC1/2).

assemblage non assisté par des chaperons puisse suffire dans des conditions normales. Récemment, le fractionnement d'extraits dérivés d'embryons de drosophile a permis d'identifier une sous-fraction appelée RCAF (*replication coupling assembly factor*), capable *in vitro* de stimuler la formation de nucléosomes couplée à la réplication en présence de CAF-1 [14]. RCAF comprend les histones H3 et H4 nouvellement synthétisées et un polypeptide homologue à une protéine connue chez la levure, Asf1 (*anti silencing function 1*). *In vitro*, ce facteur permet, comme un chaperon, la formation de nucléosomes en l'absence de réplication et augmente l'activité de CAF-1 sur l'ADN réplacatif. Chez la levure, les mutants *asf1* présentent un défaut de progression du cycle cellulaire et sont sensibles aux agents induisant des cassures double brin dans l'ADN.

Bien que viables, les mutants de CAF-1 chez la levure présentent une sensibilité modérée aux irradiations UV et

un défaut de répression transcriptionnelle dans les régions d'hétérochromatine. Ce défaut est sévèrement aggravé chez les doubles mutants, *cac1/asf1*. Ces deux facteurs semblent donc coopérer pour assembler une structure chromatinienne répressive. Ces données chez la levure sont en faveur d'une redondance partielle des activités des deux protéines. Asf1 pourrait jouer le rôle d'un transporteur des histones H3/H4 qui seraient ensuite transmises à CAF-1 pour une utilisation aux sites d'assemblage. On peut envisager que d'autres facteurs restent à découvrir puisque les doubles mutants *cac1/asf1* sont viables. Les différents facteurs d'assemblage, non essentiels individuellement, fonctionneraient en réseau pour assurer la formation des nucléosomes. Dans ce contexte, certains facteurs pourraient être dédiés spécifiquement à l'assemblage de structures spécialisées comme les régions centromériques, télomériques... Dans les organismes multicellulaires, des facteurs pour-

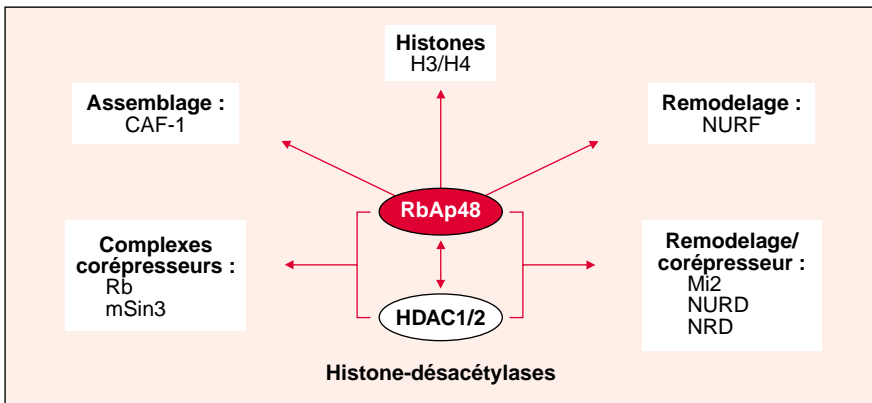


Figure 3. **RbAp48: une petite protéine au centre d'un réseau de facteurs intimement liés.** La protéine RbAp48 (Rb associated protein 48 kDa) est associée à de nombreux complexes impliqués dans différentes fonctions nucléaires: l'assemblage et le remodelage des nucléosomes, la désacétylation des histones, la répression transcriptionnelle et la régulation du cycle cellulaire [24, 29]. En effet, elle peut être associée aux histones H3/H4 nouvellement synthétisées et constitue une des sous-unités du facteur d'assemblage CAF-1. Elle est aussi l'homologue de la sous-unité p55 du facteur de remodelage NURF chez la drosophile. Enfin, elle peut être associée aux histones désacétylases HDAC1/2. Sous cette forme, on la retrouve dans les complexes corépresseurs transcriptionnels mSin3 et Rb ainsi que dans le facteur de remodelage Mi2.

raient aussi être critiques à des étapes clés du développement.

Lorsqu'une série de nucléosomes est assemblée, la chromatine nouvellement formée subit un processus dit de « maturation ». Les histones incorporées sont désacétylées, et la série de nucléosomes est organisée avec un espacement régulier pour atteindre une architecture plus complexe, spécifique des régions du génome concernées. Si les mécanismes permettant de parvenir à ces niveaux d'organisation supérieurs sont encore mal compris, l'agencement de nucléosomes régulièrement espacés peut être reproduit *in vitro*. Ce processus dépend de la présence d'ATP et pourrait impliquer des facteurs de remodelage (voir plus loin).

Les facteurs de remodelage: des fonctions diversifiées

Le terme de remodelage recouvre un ensemble de changements, peu ou pas définis sur le plan moléculaire, qui affectent les nucléosomes. Ces changements d'ordre conformationnel sont catalysés par des complexes multiprotéiques appelés facteurs de

remodelage. Ces facteurs ont tous en commun une sous-unité catalytique ATPase ayant un domaine hélicase. L'activité ATPase permet au complexe de modifier la structure nucléosomique, en partie grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP [15]. Les facteurs de remodelage ayant des sous-unités ATPase identiques ou très similaires ont été classés, ici, dans une même famille (voir Tableau 1 et figure 2). La sous-unité ATPase, appelée swi2/snf2 (*mating-type switching/sucrose non-fermenting*) définit la première famille appelée SWI/SNF. L'ATPase ISWI (*imitation of switch*) définit la deuxième famille ainsi nommée ISWI; enfin la dernière famille est appelée Mi2/NuRD (*nucleosome remodeling histone deacetylase complex*) d'après le nom de sa sous-unité ATPase, Mi2.

Les membres fondateurs: la famille SWI/SNF

Les premiers membres de cette famille ont été isolés comme régulateurs de la transcription chez la levure, ce sont les complexes SWI/SNF (*mating-type switching/sucrose non-fermenting*) [16] et RSC (*remodels the structure of*

chromatin). Chez la drosophile, le complexe Brahma (BRM) a été identifié. Chez les mammifères (homme, souris) on retrouve des complexes équivalents dont les sous-unités ATPases sont, soit la protéine BRG-1 (Brm/ SWI2 related gene 1), soit l'homologue de BRM (voir Tableau 1). Des approches biochimiques ont montré que les différents complexes SWI/SNF ont la capacité de rendre l'ADN plus accessible en créant une structure nucléosomique qui oscille entre la forme canonique d'origine et une nouvelle forme, dite altérée, récemment mise en évidence [17]. Lors de ce processus, les histones nucléosomiques peuvent être transférées *in trans* sur de l'ADN libre. L'état « altéré » rendrait l'ADN plus accessible à des protéines telles que des facteurs de transcription.

La question du ciblage des facteurs SWI/SNF au niveau de la région promotrice d'un gène a été récemment abordée par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) dans le cas du gène de l'endonucléase HO chez la levure [18]. Cette étude réalisée au cours du cycle cellulaire montre que, via le facteur de transcription Swip5, sont recrutés successivement, dans la région promotrice du gène HO, la sous-unité swi2/snf2 du facteur SWI/SNF et la sous-unité Ada2p du complexe acétyl-transférase SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase*). Ces données fournissent un modèle de régulation du ciblage de l'activité de remodelage. Le modèle proposé est un mécanisme d'ancrage du complexe de remodelage par l'intermédiaire d'un facteur de transcription spécifique d'un promoteur.

Contrairement au complexe SWI/SNF, plusieurs des sous-unités du complexe RSC sont essentielles à la viabilité chez la levure. Un allèle thermosensible de l'une des sous-unités essentielles de RSC, Sfh1p (*Snf5 homolog1*), induit l'arrêt des cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire indiquant l'importance de RSC dans la progression du cycle cellulaire [19]. Ces différences entre les complexes SWI/SNF et RSC révèlent donc des fonctions physiologiques distinctes bien que leurs activités biochimiques soient comparables. De la même façon, chez les mammifères, des études d'inactivation des gènes BRM et BRG-1 dans des cellules humaines

Tableau I
FACTEURS DE REMODELAGE

Nom	Organisme	ATPase	Nombre de sous-unités	
Famille SWI-SNF				
SWI/SNF	<i>Mating-type switching/sucrose non-fermenting</i>	<i>S. cerevisiae</i>	swi2/snf2	11
RSC	<i>Remodels the structure of chromatin</i>	<i>S. cerevisiae</i>	STH1	15
complexe Brahma		<i>D. melanogaster</i>	BRM	6 à 9
complexe BRM	Brahma	<i>H. sapiens</i>	hBRM	9 à 12
		<i>M. musculus</i>	mBRM	ND
complexe BRG-1	<i>BRM/swi2-related gene 1</i>	<i>H. sapiens</i>	BRG-1	9 à 12
		<i>M. musculus</i>	mBRG-1	ND
Famille ISWI				
ISW1	<i>Imitation of switch 1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	ISW1	4
ISW2	<i>Imitation of switch 2</i>	<i>S. cerevisiae</i>	ISW2	2
NURF	<i>Nucleosome remodeling factor</i>	<i>D. melanogaster</i>	ISWI	4
ACF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor</i>	<i>D. melanogaster</i>	ISWI	4
CHRAC	<i>Chromatin accessibility complex</i>	<i>D. melanogaster</i>	ISWI	5
RSF	<i>Remodeling and spacing factor</i>	<i>H. sapiens</i>	hSNF2H	2
Famille Mi2/NuRD*				
Mi2		<i>D. melanogaster</i>	dMi2	ND
Mi2		<i>M. musculus</i>	mMi2	ND
complexe Mi2		<i>X. laevis</i>	xMi2	6
NuRD	<i>Nucleosome remodeling histone deacetylase complex</i>	<i>H. sapiens</i>	Mi2β	7
NRD	<i>Nucleosome remodeling and deacetylating</i>	<i>H. sapiens</i>	Mi2β/α	6
NURD	<i>Nucleosome remodeling and histone deacetylation</i>	<i>H. sapiens</i>	Mi2β	18

Le terme de remodelage recouvre un ensemble de changements conformationnels des nucléosomes catalysés par des complexes multiprotéiques appelés facteurs de remodelage. Ces facteurs contiennent tous une sous-unité ATPase appartenant à la superfamille de protéines swi2/snf2 (mating-type switching/sucrose non-fermenting). Les protéines de cette superfamille, dont le nombre ne cesse de croître [20] (et voir <http://www.stanford.edu/~jeisen/SNF2/SNF2.Frame2.html>), possèdent un domaine ATPase/hélicase. Sur la base de l'homologie de ces sous-unités, les facteurs de remodelage peuvent être classés en trois groupes : les facteurs SWI/SNF (mating-type switching/sucrose non-fermenting), ISWI (imitation of switch) et Mi2/NuRD (dermatomyositis/nucleosome remodeling histone deacetylase) dont les sous-unités ATPases sont respectivement homologues aux protéines swi2/snf2, ISWI et Mi2.

* La famille Mi2/NuRD est composée de plusieurs complexes similaires chez l'homme (NuRD, NRD et NURD) et d'un complexe chez le xénope. Chez la drosophile et la souris, seules les sous-unités ATPases ont été caractérisées.

ou des embryons de souris mettent en évidence leur implication physiologique dans des fonctions distinctes. Ces expériences suggèrent un rôle essentiel de BRG-1 (comme RSC), ce qui ne semble pas être le cas de BRM qui serait impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. Enfin, des mutations dans la sous-unité hSNF5/INI1 (la plus petite sous-unité commune aux complexes humains SWI/SNF: hBRM et BRG-1) ont été retrouvées dans des tumeurs rhabdoïdes malignes chez l'enfant. Il faut

maintenant déterminer si l'absence d'activité SWI/SNF, en tant que facteur de remodelage, joue un rôle direct dans un processus de cancérisation. La liste des facteurs présentant une ATPase homologue à Swi2/Snf2 dépasse largement les quelques complexes mentionnés sur le tableau. En effet, la conservation du domaine ATPase/hélicase permet d'identifier une série de protéines [20] (pour une mise à jour en ligne voir : <http://www.stanford.edu/~jeisen/SNF2/SNF2.Frame2.html>), telles que CSB (coc-

kayne syndrome B), impliquée dans l'un des syndromes associés à des défauts de réparation de l'ADN ; RAD54 qui intervient dans la recombinaison ; ATRX (*alpha thalassemia mental retardation on the X chromosome*) impliquée dans un syndrome de retard mental, et retrouvée principalement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. Pour toutes ces protéines, une fonction de remodelage des nucléosomes est plausible, et représente une hypothèse qu'il faudra tester expérimentalement.

De la régulation de la transcription à l'assemblage en chromatine : la famille ISWI

NURF (*nucleosome remodeling factor*), CHRAC (*chromatin accessibility complex*) et ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) sont des complexes protéiques, isolés chez la drosophile, qui contiennent la même sous-unité ATPase, ISWI (*imitation of switch*). Des complexes ISWI ont été également décrits chez la levure (ISWI1 et 2) et chez l'homme (RSF : *remodeling and spacing factor* et WCRF : *WSTF related chromatin remodeling factor*) ce qui souligne l'universalité de ces complexes.

NURF, le membre fondateur de cette famille a été caractérisé en tant qu'activité dépendante de l'ATP permettant au facteur de transcription GAGA de se fixer sur sa séquence cible dans un ADN nucléosomal *in vitro*. Ce complexe de 4 sous-unités contient la protéine RbAp48 (NURF-55) également retrouvée dans le complexe d'assemblage CAF-1. *In vitro*, les complexes de la famille ISWI, ainsi que la sous-unité ISWI isolée, sont capables de faire « glisser » un nucléosome sur de l'ADN en *cis* [21, 22], ce qui faciliterait l'accès à l'ADN.

Les facteurs CHRAC ou ACF, voire même la sous-unité ISWI seule, favorisent une réorganisation de la chromatine sous forme de nucléosomes régulièrement espacés. Cette activité pourrait être impliquée dans l'étape de maturation des nucléosomes après leur formation. Cette propriété n'est pas observée avec le facteur NURF, qui possède la propriété d'activer la transcription *via* un facteur transcriptionnel dans un contexte chromatinienn. Ceci suggère que l'activité de la sous-unité ISWI serait modulée par la présence des sous-unités spécifiques des différents complexes de cette famille.

Outre RSF, un nouveau facteur de remodelage de la famille ISWI, WCRF (*WSTF related chromatin remodeling factor*), a été récemment identifié chez l'homme à partir d'extraits cellulaires [23]. Une de ses deux sous-unités, WCRF180, présente une forte homologie avec un facteur de transcription, WSTF (*Williams syndrome transcription factor*), correspondant à

l'un des gènes délétés dans le syndrome de Williams chez l'homme, un syndrome caractérisé par des défauts dans le développement. Cet exemple devrait inciter à rechercher un rôle potentiel des facteurs de remodelage dans des pathologies humaines.

Le mode de recrutement des complexes ISWI au niveau de séquences cibles n'a pas été élucidé; néanmoins, l'abondance de la protéine ISWI pourrait permettre une présence générale non ciblée au niveau de la chromatine avec l'intervention de facteurs de régulation locaux. Dans ce cas, le contrôle s'exercerait non pas en termes de présence ou d'absence mais plutôt en termes de régulation d'activité.

Un double jeu, remodelage et désacétylation : la famille Mi2/NuRD

Le facteur de remodelage Mi2/NuRD (*nucleosome remodeling histone deacetylase*) [24] a été identifié lors de la recherche de complexes protéiques contenant des activités histone-désacétylases (HDAC1/2). Plusieurs complexes ont été isolés (*voir Tableau I*) qui comprennent tous une sous-unité ATPase désignée selon les cas Mi2 ou CHD (*chromodomain*). Mi2 est un auto-antigène associé à la maladie auto-immune « dermatomyositis ». Un faisceau d'arguments expérimentaux, décrit ci-après, suggère que ce complexe participe à l'établissement d'une structure répressive de la chromatine. Au cours de l'embryogenèse précoce chez la drosophile, le profil d'expression des gènes homéotiques est établi *via* l'expression transitoire de gènes de segmentation. Les protéines du groupe Polycomb maintiennent cet état transcriptionnel tout au long du développement [25]. Dans le cas des gènes *HOX*, le facteur Hunchback amorce la répression dans des régions délimitées de l'embryon. Celle-ci est ensuite maintenue, en l'absence de l'initiateur Hunchback, par les protéines du groupe Polycomb. L'interaction entre les protéines Hunchback et Mi2 a été récemment mise en évidence par la technique du double hybride. Enfin, des analyses génétiques suggèrent que Mi2 participe à la fois à la répression par Hunchback et par

Polycomb [26]. Ainsi, Mi2 interviendrait à la fois dans le déclenchement et le maintien de l'état réprimé des gènes *HOX*. De même, chez les mammifères, Mi2 interagit avec Ikaros, un régulateur transcriptionnel essentiel dans la différenciation et la prolifération des cellules lymphoïdes [27]. Une association physique entre Ikaros et le complexe murin BRG-1 (famille SWI / SNF), indépendante de Mi2, a été également décrite. Différents facteurs de remodelage, en interagissant avec Ikaros, pourraient ainsi participer à la différenciation lymphocytaire. Enfin, le complexe Mi2/NuRD pourrait être ciblé dans les régions méthylées du génome *via* sa sous-unité MBD3 (*methyl-CpG-binding domain*) capable de lier l'ADN méthylé. La méthylation de l'ADN apparaît comme un marqueur épigénétique relayé par des modifications de la chromatine telles que la désacétylation [28]; le complexe Mi2/NuRD pourrait ainsi établir un lien entre méthylation et structure chromatinienne répressive.

Un réseau de facteurs intimement liés

Les trois types de complexes que nous avons distingués en introduction sont finalement intimement liés. En effet, les complexes de remodelage Mi2 contiennent des histone désacétylases, et les complexes de remodelage comme ACF et CHRAC sont aussi des facteurs qui pourraient intervenir dans l'assemblage à la phase de maturation aboutissant à un espacement régulier des nucléosomes. Il n'est pas non plus exclu que des facteurs, initialement décrits pour leur capacité à promouvoir l'assemblage, soient aussi capables *in vivo* de catalyser la réaction inverse, et ainsi de participer à des processus de remodelage [16]. Par exemple, la nucléoplasmine est capable *in vitro* de stimuler la liaison de facteurs de transcription à l'ADN nucléosomique, en déplaçant les dimères H2A/H2B de la particule nucléosomique.

Par ailleurs, bon nombre de ces complexes ont des sous-unités communes, qui pourraient coordonner leurs différentes fonctions. L'exemple le plus frappant est celui de RbAp48 [24, 29]. Cette petite protéine qui est

associée aux histones H3/H4 nouvellement synthétisées fait partie du facteur d'assemblage CAF-1, et du facteur de remodelage NURF. Elle peut aussi, avec une protéine de la même famille, RbAp46, être associée aux histone-désacétylases HDAC1/2. Sous cette forme, on la trouve dans les complexes co-répresseurs transcriptionnels mSin3 et Rb, ainsi qu'au sein des complexes de remodelage Mi2/NuRD (voir figure 3). De plus, dans les cellules humaines, RbAp46 appartient au complexe histone acétyltransférase HATB, impliqué dans l'acétylation des histones nouvellement synthétisées. La quasi-omniprésence des protéines de la famille RbAp48 dans des complexes modifiant les histones, libres ou chromatiniennes, suggère que ces protéines escortent les histones pour coordonner les processus d'assemblage et de remodelage des nucléosomes, d'acétylation ou de désacétylation des histones.

Conclusions

Le nombre et la diversité des facteurs impliqués dans les transitions de structure à l'échelle du nucléosome qui ont été découverts récemment, mettent en lumière l'importance et la complexité de l'aspect dynamique de cette structure. Ces transitions affectent potentiellement les niveaux d'organisation plus complexes de la chromatine, qu'il faudra maintenant aborder. La caractérisation des facteurs identifiés par des approches biochimiques, combinées à des études génétiques chez la levure, marque une première étape dans la compréhension de ces mécanismes. Il faut maintenant envisager des stratégies expérimentales permettant de déterminer l'importance de ces facteurs dans des organismes présentant une chromatine d'une complexité supérieure. Enfin, l'appréciation du rôle exact de ces nouveaux acteurs, de leur coopération, et de leur contribution à l'établissement de régions spécialisées du génome, va constituer un des défis importants dans les prochaines années. Au-delà de la notion de ciblage au niveau d'une séquence nucléotidique, il va falloir s'intéresser à des domaines entiers dans le noyau pour comprendre comment les régions présentant différentes classes

de protéines (telles que HP1, *heterochromatin protein 1*, *Polycomb...*) sont établies et maintenues pendant la différenciation, au cours du développement et au cours du cycle cellulaire ■

Remerciements

Les contraintes de longueur de cette revue nous ont obligés à nous limiter dans les citations. Nous tenons à nous en excuser auprès des collègues concernés. Les travaux de notre groupe sont financés par le Cnrs, l'Institut Curie, l'Arc, la CEE (*Training and Mobility Research Program*) et *Human Science Frontier Program*.

RÉFÉRENCES

1. Wolffe A. Chromatin, structure and function: overview, 3rd ed. London: Academic Press, 1998: 1-6.
2. Strahl BD, Allis DC. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-5.
3. Ridgway P, Almouzni G. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *J Cell Sci* 2000 (sous presse).
4. Kleinschmidt JA, Seiter A, Zentgraf H. Nucleosome assembly *in vitro*: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J* 1990; 9: 1309-18.
5. Ito T, Bulger M, Kobayashi R, Kadonaga JT. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3112-24.
6. Chang L, Loranger SS, Mizzen C, Ernst SG, Allis CD, Annunziato AT. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* 1997; 36: 469-80.
7. Smith S, Stillman B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* 1989; 58: 15-25.
8. Gaillard PH, Martini EM, Kaufman PD, Stillman B, Moustacchi E, Almouzni G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* 1996; 86: 887-96.
9. Taddei A, Roche D, Sibarita J, Turner B, Almouzni G. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 1999; 147: 1153-66.
10. Krude T. Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp Cell Res* 1995; 220: 304-11.
11. Martini E, Roche DMJ, Marheineke K, Verreault A, Almouzni G. Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin following UV irradiation of human cells. *J Cell Biol* 1998; 3: 563-75.
12. Moggs JG, Grandi P, Quivy J, et al. A CAF-1/PCNA mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1206-18.
13. Shibahara KI, Stillman B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 1999; 96: 575-85.
14. Tyler JK, Adams CR, Chen S, Kobayashi R, Kamakaka TR, Kadonaga JT. The RCAF complex mediates chromatin assembly during replication and repair. *Nature* 1999; 402: 555-60.
15. Travers A. An engine for nucleosome remodeling. *Cell* 1999; 96: 311-4.
16. Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 545-79.
17. Schnitzler GR, Sif S, Kingston RE. A model for chromatin remodeling by the SWI/SNF family. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998; 63: 535-43.
18. Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 1999; 97: 299-311.
19. Cao Y, Cairns BR, Kornberg RD, Laurent BC. Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3323-34.
20. Henikoff S, Henikoff JG, Pietrokovski S. Blocks: a non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations. *Bioinformatics* 1999; 15: 471-9.
21. Langst G, Bonte EJ, Corona DFV, Becker PB. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* 1999; 97: 843-52.
22. Hamiche A, Sandaltzopoulos R, Gdula DA, Wu C. ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* 1999; 97: 833-42.
23. Bochar DA, Savard J, Wang W, et al. A family of chromatin remodeling factors related to Williams syndrome transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1038-43.
24. Knoepfler PS, Eisenman RN. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 1999; 99: 447-50.
25. Cavalli G, Paro R. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 354-60.

RÉFÉRENCES

26. Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, *et al.* dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* 1998; 282: 1897-900.
27. Kim J, Sif S, Jones B, *et al.* Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 1999; 10: 345-55.
28. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression-belts, braces and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-4.
29. Roth SY, Allis CD. Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? *Cell* 1996; 87: 5-8.

TIRÉS À PART

G. Almouzni.

mS2000**Summary****Assembly and remodeling of nucleosomes**

The nucleosome, the basic unit of chromatin organisation, is critical for all the functions of the genome (transcription, replication, repair and recombination). Thus, controlling nucleosome dynamics will have a direct impact on each of these functions. The assembly and remodelling of the nucleosome has been intensely studied in recent years. This review outlines our current knowledge of the possible factors involved in these processes. Mostly identified by fractionation of cellular or embryonic extracts, these factors display overlapping properties in their molecular function.

Their possible redundancies, targeted functions and potential interconnections are discussed. Genetic approaches in simple model systems (yeast and drosophila) have begun to explore their physiological role. Furthermore, the recent identification of mutations in genes encoding for subunits of these factors in human diseases underlines their importance. Future challenges will be to better understand the processes that control their action at specific sites within the nucleus. This could reveal the exact functions of these factors in higher organisms.