

Quand la méthylation des histones entre en scène...

La structure de la chromatine joue un rôle majeur dans le contrôle de mécanismes, comme la transcription, qui nécessitent l'accès à la double hélice d'ADN. Cette structure peut notamment être contrôlée par des modifications post-traductionnelles des histones nucléosomales. Le rôle crucial de l'acétylation ou de la

phosphorylation des histones dans le contrôle de l'expression génique est maintenant bien établi. Un certain nombre de résultats très nouveaux mettent en évidence l'importance d'une autre modification post-traductionnelle des histones, la méthylation. Cette revue se propose de faire le point sur ces récents développements.

Dans les cellules eucaryotes, l'organisation de l'ADN en chromatine joue un rôle déterminant dans toutes les fonctions du génome comme la transcription, la réplication de l'ADN et sa réparation, en contrôlant notamment l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs nucléaires. L'unité de base de la chromatine, le nucléosome, est constituée d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule la double hélice d'ADN. Un des moyens de contrôler la structure de la chromatine est l'ajout de modifications post-traductionnelles sur les extrémités N-terminales des histones nucléosomales (figure 1). La plus connue de ces modifications est l'acétylation/désacétylation, la relation entre acétylation des histones et activation de la transcription étant maintenant clairement établie (revue dans [1]). De fait, les histone acétyl transférases sont généralement des co-activateurs transcriptionnels, alors qu'au contraire, les histone désacétylases sont des co-répresseurs transcriptionnels ([2], et *m/s* 1997, n° 10, p. 1205). La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 joue quant à elle un rôle important dans la condensation des chromosomes en phase M ainsi que dans l'activation de la transcription des gènes immédiats précoces (pour revue voir [3]). Enfin, une troisième modification des extrémités N-terminales des histones nucléosomales est la méthylation (figure 1) [4] : les histones sont en effet méthylées

in vivo sur certains résidus lysine, et l'on sait qu'elles sont méthylables *in vitro* sur des résidus arginine (pour revues sur les mécanismes de ces méthylations, voir [4, 5]). Certains auteurs ont proposé que ces différentes modifications post-traductionnelles constituent un code, le code des histones [6]. Selon cette hypothèse, chaque combinaison de modifi-

cations conduirait à une réponse biologique spécifique, en créant par exemple un site de liaison pour une protéine. Étant donné la diversité des modifications possibles sur une seule histone (par exemple H3, figure 1), le nombre de combinaisons potentielles sur un nucléosome composé d'un octamère d'histones est extrêmement élevé.

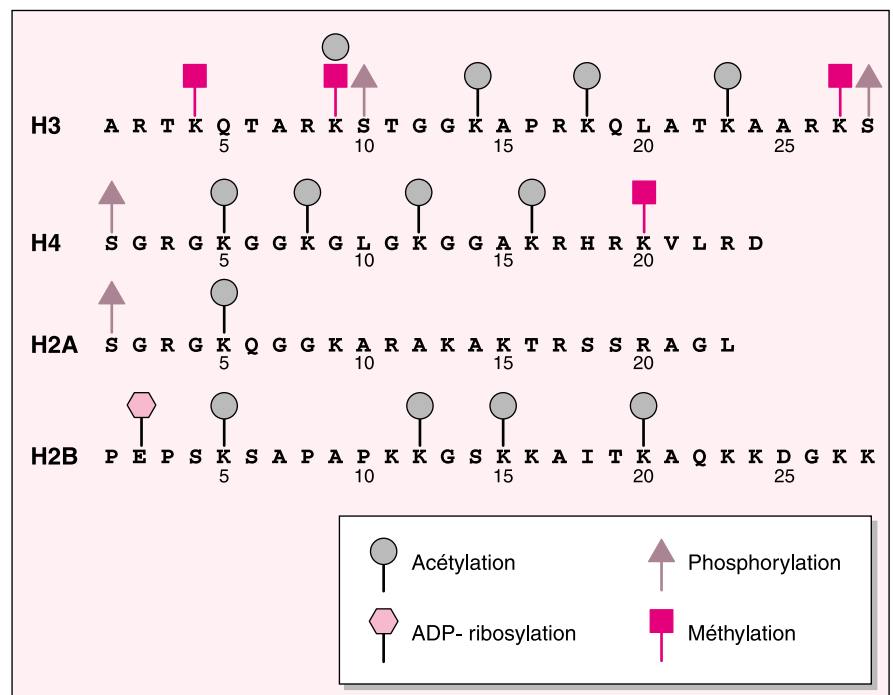


Figure 1. Séquence primaire des queues N-terminales des histones nucléosomales H2A, H2B, H3 et H4. Les modifications post-traductionnelles détectées *in vivo* sont indiquées. Les nombres indiquent la position des acides aminés.

La méthylation des histones

Si l'hypothèse du code des histones est exacte, la méthylation des histones est susceptible de jouer un rôle important dans divers processus intéressant l'ADN. Des travaux maintenant assez anciens ont permis de montrer, en analysant des acides aminés des extrémités N-terminales des histones, que trois lysines de l'histone H3 et une lysine de H4 sont méthylées *in vivo* (figure 1) (pour revue, voir [4]). Mais aucune corrélation entre la méthylation des histones et le contrôle de la transcription n'a pu être établie dans ces études, et il a ainsi été proposé que la méthylation des histones ne soit que le reflet du caractère mature de la chromatine [4]. Plus récemment, l'équipe de Dave Allis a cependant montré que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 n'est observée que dans le noyau transcriptionnellement actif de *Tetrahymena* [7]. Il est important de noter que les études sur le rôle de la méthylation des histones ont été longtemps limitées par le manque d'outils spécifiques : la méthylation, contrairement à l'acétylation et à la phosphorylation, ne modifie pas la charge de la protéine, et les histones méthylées sont donc sur le plan biochimique très proches des histones non méthylées. De plus, on ne dispose pas actuellement d'anticorps spécifiques des histones méthylées, réactifs cruciaux pour les études concernant l'acétylation et la phosphorylation des histones. Enfin, ce n'est que tout récemment que les premières histone méthyl transférases ont été découvertes (voir ci-dessous).

Les histone méthyl transférases

La caractérisation récente des premières histone méthyl transférases a apporté les premiers arguments convaincants en faveur d'un rôle important de la méthylation des histones.

La première histone méthyl transférase potentielle, appelée CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1), a été clonée en 1999 par la technique de double hybride en utilisant comme appât le co-activateur des récepteurs nucléaires GRIP1

(glucocorticoid receptor interacting protein) [8]. CARM1 a été identifiée comme une méthyl transférase sur la base d'homologies de séquences avec la méthyl transférase d'arginine PRMT1, responsable de la méthylation des protéines se liant à l'ARN. *In vitro*, CARM1 est en effet capable de méthyliser spécifiquement l'arginine 17 de l'histone H3 libre (Tableau I) [9]. Elle a une fonction de co-activateur transcriptionnel des récepteurs nucléaires, et ce de manière dépendante de son activité méthyl transférase. Cependant, on ne sait pas si les histones sont les vrais substrats de CARM1, car la méthylation de l'arginine 17 de H3 n'a jamais été observée *in vivo* (figure 1) [4]. S'il est possible que, sur certains promoteurs et dans certaines conditions, cette arginine soit effectivement méthylée par CARM1, on peut aussi envisager que des protéines autres que les histones, comme des facteurs généraux de transcription, soient les substrats de cette méthyl transférase.

Une autre histone méthyl transférase potentielle est la protéine JPB1 (Janus kinase binding protein), qui méthyle spécifiquement, *in vitro*, les histones H4 et H2A [10] (Tableau I). Tout comme CARM1, elle a été identifiée comme une méthyl transférase sur la base d'homologies de séquence avec des arginine méthyl transférases. Cette protéine, conservée de la levure à l'homme (HSL7 chez *S. cerevisiae* et Skb1 chez *S. pombe*), est un inhibiteur de la mitose chez la levure *S. pombe*

(pour revue voir [11]). Son rôle moléculaire pourrait être de contrôler l'activité des protéine kinases Shk1 ou Swe1 dans la levure ou JAK (Janus activated kinase) chez l'homme. Mais ici encore, on ne sait toujours pas si les histones sont de vrais substrats de JPB1, d'autant plus que la méthylation de l'histone H2A n'a jamais été observée *in vivo*.

Récemment, l'équipe de T. Jenuwein a montré que les protéines humaines Suv39H1 et Suv39H2, ainsi que la protéine de *S. pombe* Clr4, ont une activité histone méthyl transférase [12]. Ces protéines sont toutes apparentées à la protéine Su(var)3-9 de drosophile. Cette protéine Su(var)3-9 appartient au groupe des suppresseurs de variabilité à effet de position, c'est-à-dire qu'elle joue un rôle dans le *silencing* transcriptionnel associé à l'hétérochromatine [13]. Son homologue de mammifère Suv39H1 est physiquement associé aux zones d'hétérochromatine [14]. L'identification de Suv39H1 comme une méthyl transférase repose sur les homologies de séquence entre son domaine SET et des lysine méthyl transférases de plantes. *In vitro*, Suv39H1 méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3 [12] (Tableau I).

Contrairement aux exemples précédents, plusieurs arguments suggèrent fortement que les histones sont bien des substrats réels de Suv39H1. Tout d'abord, la lysine 9 de l'histone H3 est méthylée *in vivo* (figure 1). De plus, la dérégulation de l'expression de

Tableau I. Liste des histone méthyl transférases potentielles avec leur spécificité *in vitro* et leurs rôles fonctionnels connus.

Histone méthyl-transférase	Spécificité sur les histones	Rôles fonctionnels
CARM1	Arg 17 de l'histone H3	Co-activateur transcriptionnel
Skb1 JBP1 HSL7	Histones H4 et H2A	Régulation de kinases Inhibition de la mitose
Suv39H1 Suv39H2 Su(var)3-9 Clr4	Lys9 de l'histone H3	Ségrégation des chromosomes Formation de l'hétérochromatine Répression transcriptionnelle

CARM1 : coactivator-associated arginine methyltransferase 1 ; Skb1 : shk1 binding protein 1 ; JBP1 : Janus kinase binding protein 1 ; HSL7 : histone synthetic lethal 7 ; Suvar : suppressor of position effect variegation.

Suv39H1 se traduit par un effet sur la phosphorylation de l'histone H3, ce qui indique l'existence d'un lien fonctionnel entre Suv39H1 et l'histone H3 [12, 15]. Enfin, certaines données suggèrent que la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 joue un rôle important dans la formation de l'hétérochromatine (*voir ci-dessous*).

Une question qui reste ouverte est celle de la déméthylation des histones. En effet, la vitesse de déméthylation des histones n'est pas significativement supérieure à celle de leur dégradation, du moins en ce qui concerne l'ensemble des histones, ce qui est en défaveur de l'existence de déméthylases [4]. Pourtant, si la méthylation joue un rôle important dans le contrôle de l'expression génique, il doit bien exister un mécanisme permettant la déméthylation: ce mécanisme pourrait faire intervenir une réelle déméthylase dont les substrats seraient certaines histones spécifiques, ou bien un remplacement des histones méthylées par des histones non méthylées.

Conséquences moléculaires de la méthylation des histones

• Interférences entre méthylation, phosphorylation et acétylation

Peu de choses sont actuellement connues sur la fonction moléculaire de la méthylation des histones. Certains résultats indiquent cependant qu'elle peut interférer avec les autres modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi la lysine 9 de l'histone H3 peut être soit méthylée soit acétylée *in vivo* [6]. Bien que cela n'ait pas été montré formellement – car on ne connaît pas l'identité de l'histone acétyl transférase spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 – la méthylation de la lysine 9 empêche très certainement son acétylation puisque ces deux modifications ont lieu sur le même site, le NH₂ terminal de la chaîne latérale de la lysine. D'autre part, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 inhibe la phosphorylation de la sérine 10 par une kinase purifiée *in vitro* [12]. Comme l'acétylation de la lysine 14 est elle-même couplée à la phosphorylation sur la sérine 10 [3], la méthylation de la lysine 9 pourrait donc interférer de façon indi-

recte avec l'acétylation de la lysine 14. Enfin, il a été montré que l'histone acétyl transférase CBP interagit physiquement avec une histone méthyl transférase, pour l'instant inconnue [9]. L'ensemble de ces données indique que la méthylation des histones interfère avec leur acétylation et leur phosphorylation, et qu'elle est donc susceptible de jouer un rôle important dans la régulation de l'expression génique.

• Méthylation des histones et formation de l'hétérochromatine

Plusieurs résultats récents sont en faveur d'un rôle de la méthylation des histones dans la formation de l'hétérochromatine. Les groupes de T. Kouzarides et T. Jenuwein [16, 17] ont en effet montré que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 crée un site d'interaction de haute affinité pour la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), une protéine impliquée dans la formation de l'hétérochromatine [18]. C'est par l'intermédiaire de son chromodomaine que HP1 reconnaît l'histone H3 méthylée, qui représente certainement le site de liaison de HP1 sur l'hétérochromatine. En effet, l'ajout sur des cellules d'un peptide dérivé de l'histone H3 méthylé sur la lysine 9, se traduit par la perte de la localisation normale de la protéine HP1 endogène [16].

Par ailleurs, on sait que la protéine Su(var)3-9 joue un rôle important dans le processus de *silencing* par formation d'hétérochromatine. Son homologue de levure, la protéine Clr4, possède également une activité histone méthyl transférase. En utilisant des mutants ponctuels de Clr4, l'équipe de T. Kouzarides a pu montrer que l'activité méthyl transférase est nécessaire d'une part à la localisation hétérochromatinienne de Swi6, l'homologue de HP1 chez *S. pombe*, et d'autre part au *silencing* par formation d'hétérochromatine [16]. L'ensemble de ces résultats permet de proposer un modèle hypothétique (*figure 2*) de formation de l'hétérochromatine: la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par une protéine de la famille de Su(var)3-9 entraînerait le recrutement de HP1 sur le nucléosome (*via* son interaction avec l'histone H3 méthylée) qui à son tour constituerait une plateforme d'assemblage des différents constituants de l'hétérochromatine. Le *silencing* transcriptionnel serait une conséquence de cet assemblage. Un tel mécanisme de répression transcriptionnelle *via* le recrutement de Su(var)3-9 pourrait intervenir dans la régulation spécifique de l'expression de certains gènes, notamment ceux impliqués dans le cycle cellulaire. En début de la

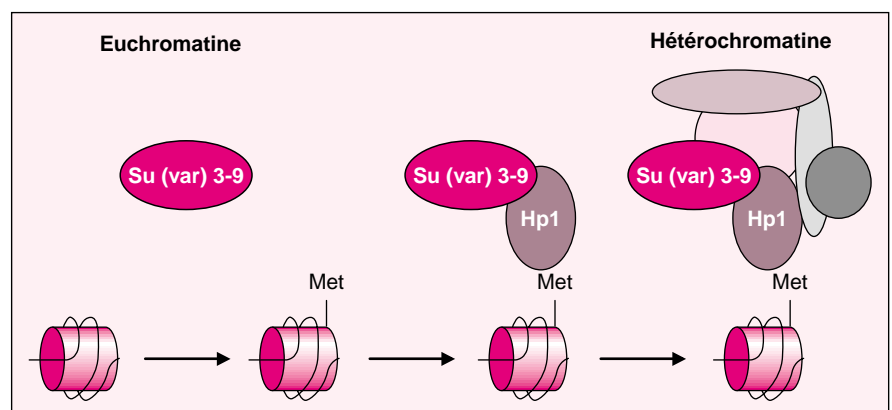


Figure 2. **Modèle hypothétique de la formation de l'hétérochromatine.** Su(var)3-9 (ou Suv39H1 ou Clr4) méthyle l'histone H3 sur la lysine 9, ce qui permet le recrutement de HP1, puis de protéines associées à HP1, encore mal connues [18]. Notons que Suv39H1 interagit physiquement avec HP1: elle peut donc méthyle l'histone H3 du nucléosome voisin, ce qui conduit à l'extension de la région hétérochromatinienne.

phase G1 du cycle cellulaire, les gènes requis pour la progression en phase S et contrôlés par le facteur de transcription E2F sont en effet réprimés du fait de l'association de E2F avec la protéine du rétinoblastome (Rb). Cette répression de la transcription pourrait découler, au moins en partie, du recrutement spécifique de l'histone méthyl transférase Suv39H1 par la protéine du rétinoblastome. La répression des gènes cibles de E2F pourrait ainsi faire intervenir la formation d'une structure de type hétérochromatine [19]. Il est également particulièrement intéressant de noter que ces gènes cibles de E2F sont contrôlés par d'autres enzymes exerçant leur action au niveau de la chromatine. En particulier, la répression de la transcription par Rb fait intervenir des histone désacétylases (*m/s n°4, vol. 14, p. 455*). Ces données suggèrent ainsi l'existence d'un lien fonctionnel entre l'histone méthyl transférase Suv39H1 et les histone désacétylases. Il est d'ailleurs envisageable que, comme c'est le cas pour les histone désacétylases, le contrôle de la transcription par le recrutement spécifique de Su(var)3-9 ou d'une autre méthyl transférase méthylant la lysine 9 de l'histone H3 puisse être un mécanisme assez commun. Les histone méthyl transférases joueraient alors un rôle crucial dans le contrôle de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation terminale et l'oncogenèse.

Conclusions

Si les données fonctionnelles disponibles à ce jour concernent principalement la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, on sait que deux autres lysines de H3 et une lysine de H4 sont également méthylées *in vivo*. Rien n'est actuellement connu sur le rôle de ces modifications. La caractérisation d'histone méthyl transférases spécifiques de ces sites, et la disponibilité d'anticorps dirigés spécifiquement contre les histones méthylées permettront certainement de mieux comprendre la fonction de la méthylation des histones. Ces études permettront de confirmer si la méthylation des his-

tones joue, comme l'acétylation, un rôle majeur dans le contrôle de l'expression génique ■

Remerciements

Les auteurs remercient le Pr T. Kouzarides pour leur avoir communiqué des résultats avant publication. Le groupe de Didier Trouche est soutenu par La Ligue Contre le Cancer, en tant qu'équipe labellisée. Laurence Vandel et Estelle Nicolas bénéficient respectivement d'une bourse post-doctorale de l'Association de recherche contre le Cancer et d'une bourse d'étude du MENRT.

RÉFÉRENCES

- Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 326-33.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998; 20: 615-26.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 2000; 103: 263-71.
- van Holde KE. *Chromatin*. New York: Springer-Verlag Inc, 1989.
- Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61: 65-131.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-5.
- Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14967-72.
- Chen D, Ma H, Hong H, *et al*. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999; 284: 2174-7.
- Vandel L, Trouche D. Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase. *EMBO reports* 2001; 2: 21-26.
- Pollack BP, Kotenko SV, He W, *et al*. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 31531-42.
- Ma XJ. Cell-cycle regulatory proteins Hsl7p/Skb1p belong to the protein methyl-

transferase superfamily [letter]. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 11-2.

12. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, *et al*. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases [see comments]. *Nature* 2000; 406: 593-9.

13. Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, *et al*. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 1994; 13: 3822-31.

14. Aagaard L, Laible G, Selenko P, *et al*. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J* 1999; 18: 1923-38.

15. Melcher M, Schmid M, Aagaard L, *et al*. Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3728-41.

16. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, *et al*. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromatin domain. *Nature* 2001; 410: 120-4.

17. O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, *et al*. Isolation and characterization of *suv39h2*, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9423-33.

18. Eissenberg JC, Elgin SC. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 204-10.

19. Ferreira R, Naguibneva I, Pritchard LL, Ait-Si-Ali S, Harel-Bellan A. The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion. *Oncogene* (sous presse).

Estelle Nicolas
Laurence Vandel
Didier Trouche

Laboratoire de biologie moléculaire eucaryote, Cnrs UMR 5099, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

TIRÉS À PART

D. Trouche.