

Table des matières

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introduction | 3 |
| 1.1 | Structure et dynamique de la chromatine | 3 |
| 1.1.1 | Le nucléosome | 3 |
| 1.1.2 | Les variants d’histones | 4 |
| 1.2 | Chromatine et division cellulaire | 4 |
| 1.2.1 | Chromatine centromérique : structure et fonction | 5 |
| 1.2.2 | Les protéines passagères | 6 |
| 1.3 | Objectifs de mon stage | 6 |
| 2 | Matériels et méthodes | 6 |
| 2.1 | Clonage de mCENPA | 6 |
| 2.1.1 | Amplification de la séquence codante de mCENPA | 7 |
| 2.1.2 | Addition des sites de restriction | 8 |
| 2.1.3 | Clonage dans pEGFP-C1 | 8 |
| 2.2 | Culture cellulaire et transfection | 8 |
| 2.3 | Immunofluorescence | 9 |
| 2.4 | Immunoblots | 9 |
| 3 | Résultats et discussion | 10 |
| 3.1 | Construction du vecteur recombinant pEGFP–mCENPA | 10 |
| 3.2 | Expression et localisation de GFP–mCENPA | 11 |
| 3.3 | Localisation centromérique de GFP–mCENPA | 12 |
| 4 | Conclusion | 13 |

1 Introduction

1.1 Structure et dynamique de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique se présente sous la forme d'une structure nucléoprotéique, la chromatine, dont l'unité de base est le nucléosome. Elle est organisée en plusieurs niveaux, dont les premiers, à savoir la fibre de chromatine de 10 nm et la fibre de chromatine de 30 nm, sont relativement bien connus. Les niveaux d'organisation supérieurs, aboutissant à l'assemblage des chromosomes interphasiques et mitotiques, le sont moins (Swedlow and Hirano, 2003). Cependant, l'observation en microscopie électronique d'un noyau interphasique permet de distinguer deux états de compaction : l'*euchromatine*, une chromatine décondensée transcriptionnellement active, et l'*hétérochromatine*, une chromatine condensée longtemps considérée comme transcriptionnellement inactive.

1.1.1 Le nucléosome

Le nucléosome représente l'unité de base de la chromatine. Il est constitué d'un octamère d'histones « de cœur » autour duquel s'enroule un fragment d'ADN d'environ 146 paires de bases (figure 1a). Les histones de cœur — H2A, H2B, H3 et H4 — sont caractérisées par un domaine C-terminal conservé, constitué de trois hélices α , le domaine « histone-fold ». Les extrémités N-terminales des histones, plus divergentes, sont à l'extérieur de la particule de cœur, et ne sont pas structurées.

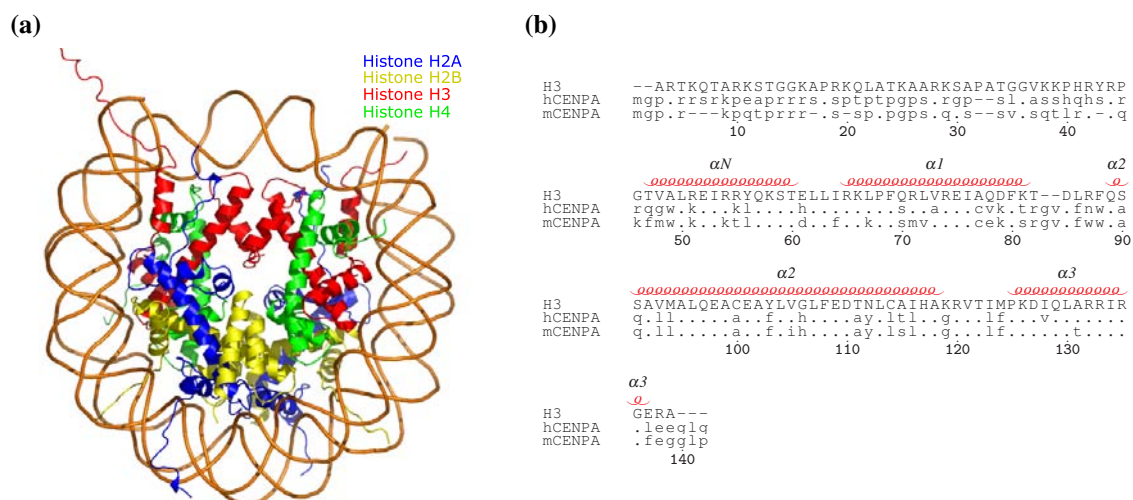


FIG. 1. Nucléosomes et variants d'histones. (a) Structure du nucléosome conventionnel, résolue par cristallographie aux rayons X (d'après Luger *et al.*, 1997). (b) Comparaison de séquences entre l'histone H3 et les variants centromériques CENPA humain et murin. Les tracés rouges figurent les hélices α du domaine globulaire de H3.

La structure de la chromatine est très dynamique. Son remodelage partiel ou total lui confère de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles pour permettre le déroulement d'activités nucléaires comme la transcription, la réplication ou la mitose. Trois mécanismes distincts assurent ce dynamisme :

- le recrutement de facteurs de remodelage, qui favorisent le déplacement des nucléosomes en *cis* ou en *trans* en fournissant, par l'hydrolyse d'ATP, l'énergie nécessaire à la rupture des interactions histones-ADN (Vignali *et al.*, 2000 ; Längst and Becker, 2004) ;
- les modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones (Strahl and Allis, 2000 ; Ausió *et al.*, 2001) ;
- l'incorporation de variants d'histones au sein d'un nucléosome.

1.1.2 Les variants d'histones

Les variants d'histones sont des isoformes non-alléliques des histones conventionnelles. De tels variants sont connus pour toutes les histones conventionnelles exceptée l'histone H4 (Kamakaka and Biggins, 2005). Ils sont classés en deux catégories sur la base de leur mobilité électrophorétique : les variants *homéomorphes* ne diffèrent de l'histone conventionnelle correspondante que par quelques résidus ; les variants *hétéromorphes* divergent suffisamment en taille et en séquence pour présenter une mobilité électrophorétique distincte de l'histone conventionnelle. Les divergences des variants hétéromorphes concernent essentiellement les extrémités non structurées, le domaine histone-fold étant conservé. Une distinction est également établie entre les variants d'histones qui sont produits et incorporés dans la chromatine lors de la phase S, tout comme les histones conventionnelles, et les variants dits de « remplacement » dont la synthèse et l'incorporation sont découplés de la réplication de l'ADN (Doenecke *et al.*, 1997).

Certains variants d'histones ont en plus une distribution spécifique dans le génome, associée à leur fonction. C'est le cas du variant centromérique de l'histone H3 CENPA, qui intervient dans la répartition équilibrée du matériel génétique en mitose.

1.2 Chromatine et division cellulaire

Lors de la division cellulaire, les chromosomes se condensent en prophase, s'alignent sur la plaque métaphasique en métaphase, puis migrent vers les deux pôles de la cellule au cours de l'anaphase et de la télophase. Ces mouvements sont dirigés par les microtubules, qui accrochent les chromosomes au niveau du centromère via les kinétochores (figure 2a).

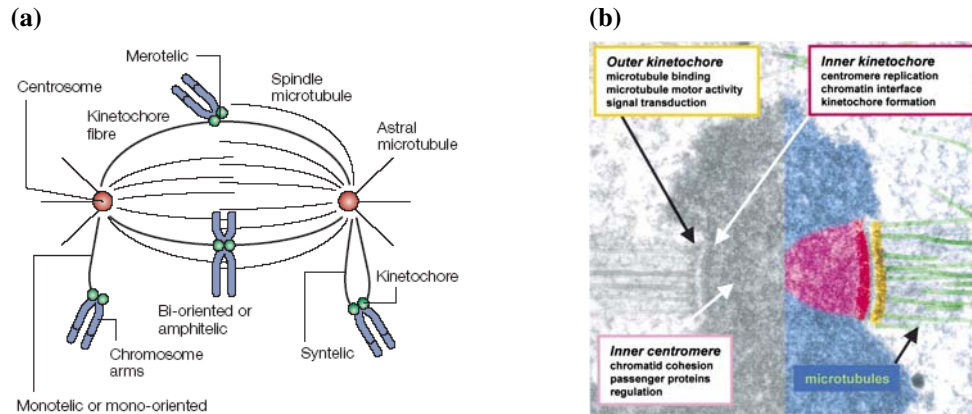


FIG. 2. Centromères et mobilisation des chromosomes. (a) Attachement des chromosomes aux microtubules au cours de la mitose. Les mauvais attachements (attachements mérotélique, monotélique et syntélique) sont corrigés par la protéine passagère Aurora B en attachement amphitélique (d'après Keen and Taylor, 2004). (b) Structure globale du centromère et du kinétochore. Section d'un chromosome mitotique (d'après Cleveland *et al.*, 2003).

1.2.1 Chromatine centromérique : structure et fonction

Le centromère est une région spécialisée de la chromatine impliquée dans la bonne ségrégation des chromosomes. Il apparaît sur des chromosomes condensés sous forme de la constriction primaire à la jonction entre les deux chromatides. C'est sur cette région que s'assemble le kinétochore, un complexe protéique auquel s'attachent les microtubules (figure 2b).

Les fonctions centromériques — notamment, la capacité à recruter les protéines du kinétochore — sont conférées par les propriétés épigénétiques de la chromatine du centromère (Wiens and Sorger, 1998). La seule présence de motifs d'ADN spécifiques du centromère (tels les satellites α chez *H. sapiens*) n'est en effet ni nécessaire ni suffisante pour définir un centromère actif.

Le centromère est une structure hétérochromatinienne, et est caractérisé par une alternance de régions chromatiniennes contenant l'histone H3 conventionnelle et de régions chromatiniennes contenant son variant CENPA. CENPA est le seul variant d'histone connu dont la localisation est exclusivement centromérique. Il diffère de l'histone H3 principalement par son extrémité N-terminale (figure 1b). Il représente la marque épigénétique conférant aux centromères leurs fonctions (Cleveland *et al.*, 2003). La présence de CENPA est en effet indispensable à l'assemblage du kinétochore (Blower and Karpen, 2001).

1.2.2 Les protéines passagères

Les protéines passagères sont un groupe de protéines présentant un profil d'expression subcellulaire spécifique (Vagnarelli and Earnshaw, 2004) : exprimées à partir de la phase G2, elles s'associent aux chromosomes au cours de leur condensation en prophase, se concentrent au niveau de la chromatine centromérique en prométaphase et métaphase, puis migrent vers le sillon de division en anaphase et le corps résiduel (*midbody*) en télophase (figure 3).

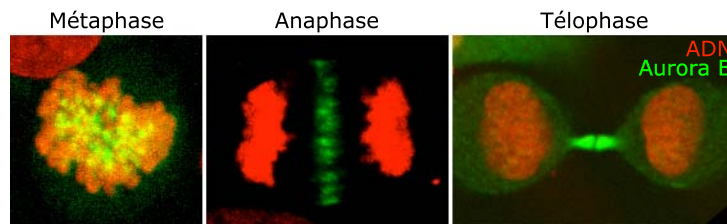


FIG. 3. Profil de localisation de la protéine passagère Aurora B au cours de la division cellulaire.

Parmi ces protéines, la kinase Aurora B remplit deux fonctions distinctes. Elle est d'une part impliquée dans le point de contrôle du fuseau mitotique, en corrigeant les mauvais attachements des microtubules aux chromosomes (figure 2a). D'autre part, elle phosphoryle les extrémités N-terminales de l'histone H3 et de son variant CENPA, ce qui semble indispensable au bon déroulement de la mitose (Zeitlin *et al.*, 2001).

1.3 Objectifs de mon stage

En vue de travaux futurs destinés à approfondir notre connaissance des rôles structuraux et fonctionnels de CENPA, j'ai cloné la séquence codante du gène CENPA murin (mCENPA) dans un vecteur d'expression eucaryote, en phase avec la séquence codante de la GFP (*Green Fluorescence Protein*). Le vecteur recombinant obtenu permet de produire une protéine de fusion, qui peut être localisée par le suivi de la fluorescence verte de la GFP. J'ai vérifié la localisation centromérique de la protéine de fusion exprimée dans des cellules eucaryotes.

2 Matériels et méthodes

2.1 Clonage de mCENPA

La séquence codante de CENPA murin est amplifiée par PCR à partir de banques Marathon-Ready™ (Clontech). Les banques de ce type sont obtenues par RT-PCR à partir d'ARNm

d'une population tissulaire donnée. Des adaptateurs ligués aux cDNA double brin permettent l'amplification à partir des deux extrémités (Chenchik *et al.*, 1996). Dans la mesure où l'utilisation d'amorces comprenant des sites de restriction en 5' réduit la spécificité de l'hybridation et augmente le bruit de fond, l'obtention d'un plasmide permettant l'expression d'une protéine de fusion GFP-mCENPA nécessite une stratégie en plusieurs étapes :

- amplification de la séquence codante depuis la banque et clonage non-orienté dans un vecteur intermédiaire ;
- addition des sites de restriction nécessaires au clonage orienté ;
- clonage orienté dans le vecteur d'expression.

2.1.1 Amplification de la séquence codante de mCENPA

Les amorces sont conçues à partir des extrémités de la séquence codante de CENPA, en tenant compte des recommandations de Clontech pour l'amplification à partir d'une banque Marathon-Ready™ : elles doivent avoir une longueur comprise entre 23 et 28 nucléotides, dont 50 à 70 % de GC, et une température de fusion supérieure à 65°C. Ces amorces sont les suivantes : BY71-sens 5'-ATG GGC CCG CGT CGC AAA CCG CAG-3', BY71-anti 5'-TTA GGG GAG TCC GCC CTC GAA GCC-3'.

La réaction a lieu dans un mélange réactionnel de 50 μ l contenant 2 ng de cDNA Marathon-Ready™, 10 pM de chacune des deux amorces, 0,2 mM de dNTP et 1 μ l de Advantage 2 Polymerase Mix (50 \times). Le programme de PCR comprend une étape de dénaturation à 94°C (1 min) et 30 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 94°C (30 s) et une étape d'hybridation/élongation (3 min) dont la température varie de 72°C (cycles 1 à 5) à 70°C (cycles 6 à 10) et à 68°C (cycles 11 à 20).

Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose ; le fragment d'intérêt est extrait du gel et cloné dans le vecteur intermédiaire pGEM®-T Easy (Promega). Ce vecteur est fourni linéarisé et contient une thymidine à chacune de ses extrémités 3', ce qui facilite l'insertion des produits PCR, la plupart des polymérase thermostables ajoutant une adénine à l'extrémité 3' du fragment en fin de synthèse (Zhou *et al.*, 1995). La présence de l'insert est vérifiée par une digestion par EcoRI (qui coupe de part et d'autre du site d'insertion) et par séquençage. Le plasmide recombinant est désigné pGEM-T-mCENPA.

2.1.2 Addition des sites de restriction

Le plasmide pGEM-T-mCENPA est utilisé comme matrice dans une seconde PCR avec les amorces suivantes : BglII.BY71 5'-**AGA TCT** ATG GGC CCG CGT CGC AAA CCG-3', EL.BY71 5'-**GAA TTC** TTA GGG GAG TCC GCC CTC GAA GC-3'. Les sites de restriction BglII et EcoRI (en gras dans les séquences) ont été choisis pour permettre l'insertion de la séquence codante de CENPA en 3' de la séquence codante de la GFP, en respectant le cadre de lecture.

La réaction a lieu dans un mélange réactionnel de 50 μ l contenant 10 ng d'ADN matrice, 10 pM de chacune des deux amorces, 0,2 mM de dNTP et une unité de Expand High Fidelity Taq DNA Polymerase (Roche). Le programme de PCR comprend une étape de dénaturation initiale à 94°C (5 s) et 30 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C (45 s), une étape d'hybridation à 55°C (45 s) et une étape d'élongation à 72°C (45 s).

Le produit de PCR est purifié sur gel et à nouveau cloné dans pGEM[®]-T Easy. La position des sites de restriction, aux extrémités du fragment, rend en effet difficile voire impossible la digestion directe de ce fragment par les endonucléases.

2.1.3 Clonage dans pEGFP-C1

Environ 1 μ g du vecteur recombinant obtenu ci-dessus et du vecteur pEGFP-C1 (Clontech) sont digérés par 10 unités de BglII et de EcoRI pendant une heure à 37°C. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose et les fragments d'intérêts sont purifiés. La ligation est réalisée dans un rapport molaire de 5 sur 1 en faveur de l'insert, par une unité de T4 DNA ligase (New England BioLabs), une nuit à 16°C. Le plasmide recombinant est amplifié et purifié sur colonne NucleoBond[®] AX (Macherey Nagel). Il est désigné pEGFP-mCENPA.

2.2 Culture cellulaire et transfection

Les cellules NIH 3T3 ou HeLa sont cultivées en milieu DMEM complété avec 1 % de L-glutamine, 1 % d'antibiotiques et 10 % de sérum de veau fœtal, à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Pour l'analyse par immunofluorescence, les cellules sontensemencées dans des Lab-Tek[™] à fond lamelle (Nunc) et cultivées jusqu'à 80 % de confluence. L'ADN (1,5 μ g) est dilué dans 750 μ l de milieu sans sérum contenant 6 μ l de Lipofectamine[™] (Invitrogen). La solution est

incubée 30 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes ADN-lipides, puis elle est diluée dans 750 μ l de milieu et ajoutée aux cellules. Après 6 heures d'incubation à 37°C, le milieu sans sérum est complété avec 1,5 ml de milieu complet.

Pour l'analyse par immunoblot, les transfections sont réalisées dans des boîtes de 10 cm en utilisant 4,5 μ g d'ADN et 18 μ l de Lipofectamine™ dans 4,5 ml de milieu sans sérum. Vingt-quatre heures après la transfection, les protéines sont extraites par 300 μ l de tampon de Laemmli (Tris 60 mM, SDS 1,5 %, glycérol 6 %, β -mercaptoéthanol 1 %, bleu de bromophénol), puis lysées par sonication.

2.3 Immunofluorescence

Les cellules transfectées sont enrichies en métaphase par l'ajout de 40 ng/ml de nocodazole pendant 6 heures et fixées par 4 % de paraformaldéhyde pendant 20 minutes. Les Lab-Tek™ sont lavées 2 fois au PBS. Les cellules sont perméabilisées par 0,5 % de Triton X100 dans du PBS pendant 5 minutes. La surface est saturée par 2 % de sérumalbumine bovine dans du PBS pendant 30 minutes. Les Lab-Tek™ sont lavées comme précédemment puis incubées successivement avec les anticorps primaires et secondaires pendant une heure à 37°C. Les anticorps primaires sont des anti-Aurora B (BD Transduction Laboratories) dilués 50 \times ou des anti-centromère (Immunovision) dilués 2 000 \times , les secondaires sont des anti-IgG de souris couplés au fluorophore Alexa 546 (Invitrogen) dilués 400 \times ou des anti-IgG humains couplés à la cyanine-3 (Abcam) dilués 200 \times ; ils sont dilués dans du PBS, sérum de veau fœtal 10 %, Tween 0,2 %. Après chaque incubation, les Lab-Tek™ sont lavées 3 fois par du PBS, Tween 0,2 %. L'ADN est finalement marqué par une solution de Hoechst 2 μ g/ml pendant 5 minutes, avant de procéder au montage entre lame et lamelle.

Les observations sont réalisées avec un microscope confocal à balayage laser LSM 510 (Zeiss). Trois lasers, un Argon à 488 nm, un Hélium-Néon à 543 nm et un saphir à 720 nm en mode biphotonique, permettent l'observation respectivement de la GFP, de l'Alexa 546 ou de la cyanine-3 et du Hoechst.

2.4 Immunoblots

Les extraits protéiques sont dénaturés par incubation à 100°C pendant 10 minutes. Après centrifugation, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS), puis électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose.

La membrane est saturée par une solution de PBS, lait 10 %, Tween 0,3 % pendant une nuit à 4°C, rincée au PBS, puis incubée successivement avec les solutions d'anticorps primaires et secondaires pendant une heure à température ambiante. Quatre lavages successifs de 5 minutes au PBS sont réalisés après chaque incubation. Les anticorps primaires utilisés sont des anti-GFP (Covance) dilués 5 000× ou des anti- α -tubuline (Sigma) dilués 2 000× ; ils sont dilués dans une solution de PBS, sérum de veau fœtal 10 %, Tween 0,2 %. Les anticorps secondaires sont des anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (Amersham Biosciences) dilués 5 000× dans une solution de PBS, lait 1 %, Tween 0,02 %. Les anticorps fixés sont révélés par le système ECL Plus™ (Amersham Biosciences), selon les recommandations du fournisseur.

3 Résultats et discussion

3.1 Construction du vecteur recombinant pEGFP-mCENPA

La séquence codante de mCENPA est amplifiée à partir de banques Marathon par PCR. Les produits de PCR, séparés sur un gel d'agarose, sont présentés en figure 4a. Dans les trois banques testées, un fragment à la taille attendue de 400 paires de bases a été amplifié. Un second fragment de 500 paires de bases a également été amplifié, il a été cloné dans pGEM®-T Easy en vue d'une caractérisation ultérieure.

Le fragment d'intérêt est cloné dans le vecteur d'expression pEGFP-C1 selon la stratégie détaillée dans la section Matériels et méthodes. Les clones recombinants sont identifiés par restriction enzymatique ; comme attendu, un fragment d'environ 400 paires de bases est libéré (figure 4b). Le séquençage de ces clones permet de vérifier que le fragment inséré est bien la séquence codante de mCENPA, et qu'elle est en phase avec la séquence codante de la GFP.

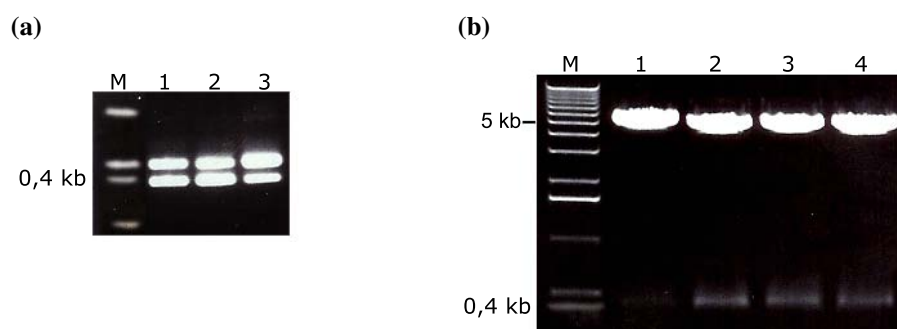


FIG. 4. Clonage de mCENPA. (a) Profil de migration des produits de PCR obtenus à partir de banques Marathon de cerveau (piste 1), de testicules (piste 2) et d'embryon de souris (piste 3). (b) Profil de migration de vecteurs recombinants pEGFP-mCENPA digérés par BglII et EcoRI.

3.2 Expression et localisation de GFP-mCENPA

Pour vérifier l'expression de la protéine de fusion, des cellules fibroblastiques de souris transfectées avec les vecteurs pEGFP-C1 ou pEGFP-mCENPA sont lysées et les protéines analysées par Western-blot avec un anticorps dirigé contre la GFP (figure 5a). Un signal à 30 kDa, correspondant à la masse moléculaire de la GFP, est présent uniquement dans l'extrait protéique provenant des cellules transfectées avec le vecteur pEGFP-C1 (piste 2). Dans l'extrait protéique provenant des cellules transfectées avec le vecteur recombinant pEGFP-mCENPA, l'anticorps reconnaît spécifiquement une protéine d'environ 45 kDa (piste 3), ce qui correspond bien à la masse moléculaire attendue de la protéine de fusion GFP-mCENPA.

La localisation cellulaire de la protéine de fusion GFP-mCENPA est étudiée en suivant la fluorescence verte de la GFP au microscopie confocale. Son profil de localisation est comparé à celui d'une protéine de fusion GFP-H2A, représentatif des histones conventionnelles. La localisation de GFP-H2A est observée sur des cellules fixées dont l'ADN est marqué au Hoechst, afin de révéler les noyaux cellulaires. Comme l'illustre la figure 5b, GFP-H2A est exclusivement nucléaire. GFP-mCENPA, observée sur des cellules non fixées en absence de colorant nucléaire, semble également localisée dans le noyau (figure 5c), mais à la différence des histones conventionnelles, elle apparaît particulièrement concentrée en quelques points discrets, qui pourraient correspondre aux centromères.

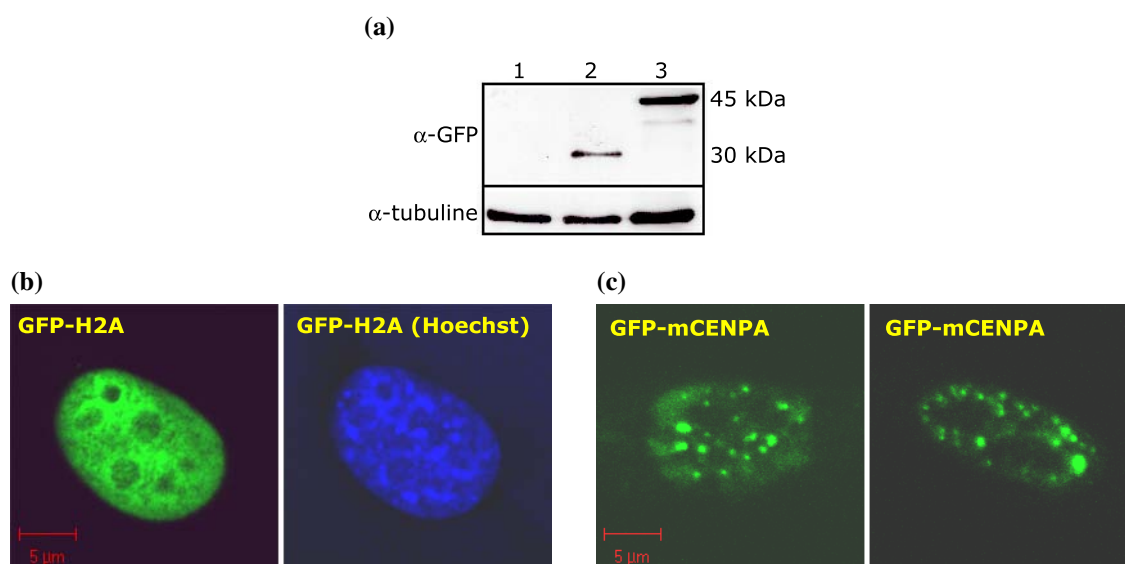


FIG. 5. Expression et localisation de la protéine de fusion GFP-mCENPA. (a) Détection de la protéine GFP (piste 2) et de la protéine de fusion GFP-mCENPA (piste 3) par Western-blot avec un anticorps anti-GFP. La détection de la tubuline permet d'évaluer la quantité de protéines déposées. (b) et (c), localisations nucléaires comparées des protéines de fusion GFP-H2A (b) et GFP-mCENPA (c) dans des cellules murines. En (b), les noyaux sont colorés au Hoechst.

3.3 Localisation centromérique de GFP-mCENPA

Afin de confirmer la localisation centromérique de la protéine de fusion GFP-mCENPA, des expériences d'immunofluorescence sont réalisées, sur les cellules transfectées par le vecteur pEGFP-mCENPA. Pour repérer les centromères, un anticorps anti-Aurora B est utilisé, cette protéine étant concentrée aux centromères en prophase et métaphase (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Comme l'illustre la figure 6a, qui présente une cellule en prométaphase, une colocalisation partielle de Aurora B et de GFP-mCENPA est observée, ce qui témoigne de la localisation centromérique de GFP-mCENPA au cours des premières phases de la mitose.

Pour vérifier si la localisation centromérique de GFP-mCENPA est maintenue tout au long de la mitose, les expériences sont renouvelées avec un anticorps dirigé contre un élément constitutif du centromère ; cet anticorps ne reconnaissant que les centromères humains, les expériences sont réalisées sur des cellules HeLa. La figure 6b présente une telle cellule en

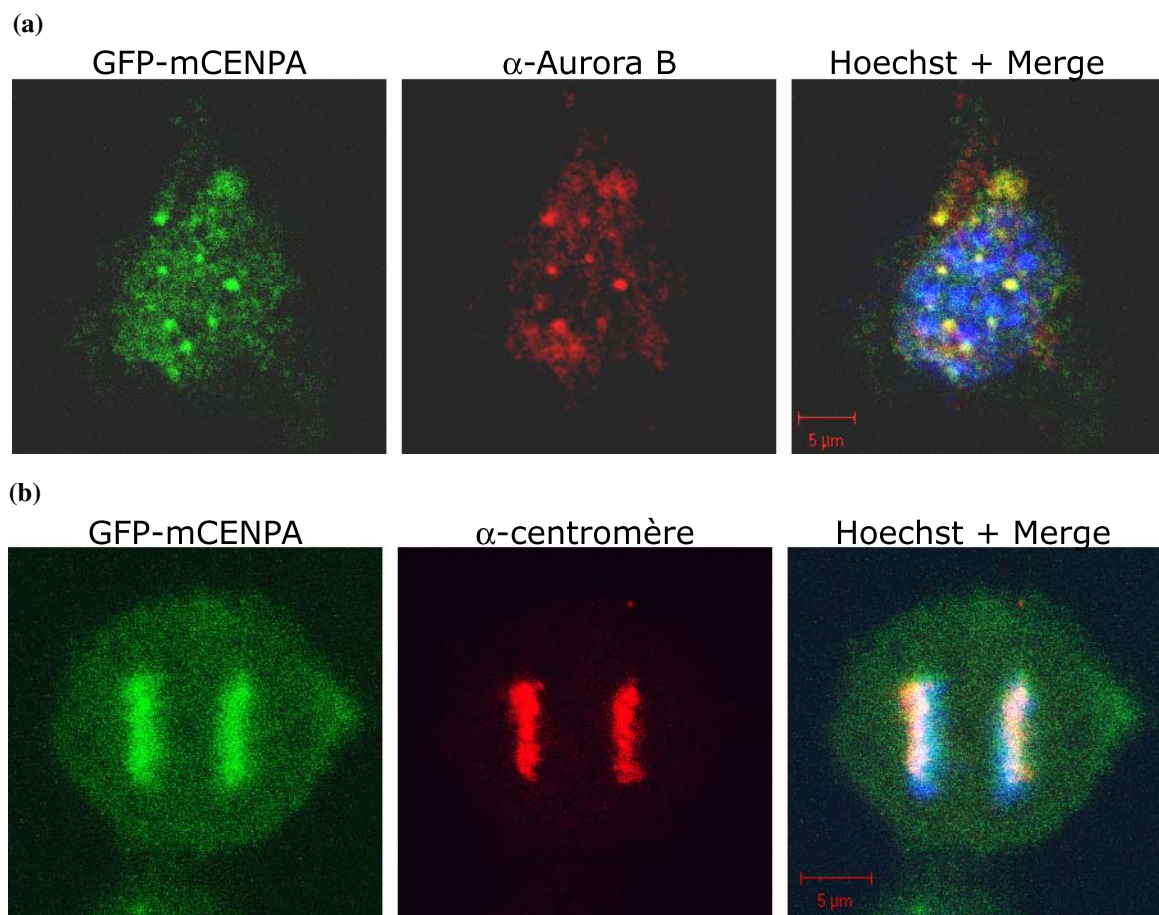


FIG. 6. Localisation centromérique de GFP-mCENPA. (a) Colocalisation partielle de la protéine de fusion GFP-mCENPA avec la protéine passagère Aurora B dans un fibroblaste murin en prométaphase. (b) Colocalisation de GFP-mCENPA avec un épitope centromérique dans une cellule épithéliale humaine en anaphase. En vert, GFP-mCENPA ; en rouge, Aurora B (a) et centromère (b) ; en bleu, ADN marqué au Hoechst.

anaphase. Une colocalisation de l'épitope centromérique et de GFP-mCENPA est observée. La localisation centromérique de GFP-mCENPA est donc maintenue lors de la progression de la mitose, ce qui tend à confirmer qu'il s'agit comme attendu d'une protéine centromérique chromatinienne, et non d'une protéine ponctuellement associée à la chromatine centromérique.

4 Conclusion

Le clonage de la séquence codante de CENPA et la vérification de sa localisation centromérique constituent une étape préliminaire à la conduite de travaux futurs relatifs à l'étude de ce variant d'histone. Cette étape a été menée avec succès au cours de ce stage. Deux axes de recherche sont maintenant particulièrement envisagés.

Le premier vise à déterminer les rôles fonctionnels de l'extrémité N-terminale de CENPA, grâce à un système de pseudogénétique mis au point dans le laboratoire (Scrittore *et al.*, 2005). Dans ce système, des ARN interférents sont utilisés pour supprimer l'expression d'une protéine endogène. Dans le cas de CENPA, il en résulte d'importants défauts mitotiques (Goshima *et al.*, 2003). Ce phénotype pourra être réverté en exprimant CENPA de manière ectopique. La réversion ou non du phénotype sera ensuite analysée en exprimant des formes mutées de la protéine. Cela permettra de déterminer l'impact des différentes mutations sur la fonction de CENPA et le bon déroulement de la mitose. En prévision de ces travaux, un sérum anti-hCENPA a déjà été obtenu au laboratoire et est en cours de caractérisation. La construction d'un ensemble de vecteurs d'expression eucaryotes portant des versions mutées de CENPA est également planifiée.

Le deuxième axe de recherche consiste à étudier les propriétés structurales et fonctionnelles des nucléosomes contenant CENPA *in vitro*. Pour cela, la protéine sera exprimée dans des bactéries et utilisée pour reconstituer des nucléosomes. Les propriétés de ces nucléosomes seront analysées comme cela a été réalisé avec d'autres variants d'histones (Angelov *et al.*, 2006). En particulier, des régions transcriptionnellement actives ayant été récemment mises en évidence dans la chromatine centromérique (Saffery *et al.*, 2003), un éventuel rôle de CENPA dans la régulation transcriptionnelle sera exploré.

Références

- Angelov, D., V. A. Bondarenko, S. Almagro, H. Menoni, F. Mongélard, F. Hans, F. Mietton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, S. Dimitrov, *et al.* (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.*, **25**:1669–1679.
- Ausió, J., D. W. Abbott, X. Wang, and S. C. Moore (2001). Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochem. Cell Biol.*, **79**:693–708.
- Blower, M. D. and G. H. Karpen (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.*, **3**:730–739.
- Chenchik, A., L. Diachenko, F. Moqadam, V. Tarabykin, S. Lukyanov, and P. D. Siebert (1996). Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *BioTechniques*, **21**:526–534.
- Cleveland, D. W., Y. Mao, and K. F. Sullivan (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, **112**:407–421.
- Doenecke, D., W. Albig, C. Bode, B. Drabent, K. Franke, K. Gavenis, and O. Witt (1997). Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem. Cell Biol.*, **107**:1–10.
- Goshima, G., T. Kiyomitsu, K. Yoda, and M. Yanagida (2003). Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J. Cell Biol.*, **160**:25–39.
- Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev.*, **19**:295–310.
- Keen, N. and S. Taylor (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*, **4**:927–936.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**:251–260.
- Längst, G. and P. B. Becker (2004). Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**:58–63.

- Saffery, R., H. Sumer, S. Hassan, L. H. Wong, J. M. Craig, K. Todokoro, M. Anderson, A. Stafford, and K. H. A. Choo (2003). Transcription within a functional human centromere. *Mol. Cell*, **12**:509–516.
- Scrittore, L., D. A. Skoufias, F. Hans, V. Gerson, P. Sassone-Corsi, S. Dimitrov, and R. L. Margolis (2005). A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function. *Mol. Biol. Cell*, **16**:292–305.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**:41–45.
- Swedlow, J. R. and T. Hirano (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell*, **11**:557–569.
- Vagnarelli, P. and W. C. Earnshaw (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, **113**:211–222.
- Vignali, M., A. H. Hassan, K. E. Neely, and J. L. Workman (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **20**:1899–1910.
- Wiens, G. R. and P. K. Sorger (1998). Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell*, **93**:313–316.
- Zeitlin, S. G., R. D. Shelby, and K. F. Sullivan (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **155**:1147–1157.
- Zhou, M. Y., S. E. Clark, and C. E. Gomez-Sanchez (1995). Universal cloning method by TA strategy. *BioTechniques*, **19**:34–35.

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine. La chromatine centromérique est caractérisée par la présence de nucléosomes contenant CENPA, le variant de l'histone H3 spécifique du centromère. Ce variant représente la marque épigénétique définissant la position et les fonctions du centromère. Il est en effet nécessaire au recrutement de plusieurs autres protéines, dont certaines participent à l'élaboration du kinétochore. En vue de travaux ultérieurs destinés à mieux comprendre le rôle de CENPA, sa séquence codante a été clonée dans un vecteur permettant son expression sous forme d'une protéine de fusion GFP-CENPA. L'expression de cette protéine a été vérifiée par Western-blot ; sa localisation centromérique a été vérifiée à l'aide de marqueurs du centromère tout au long du cycle cellulaire.