

UNIVERSITÉ JOSEPH-FOURIER — GRENOBLE I

Rôles de l'extrémité amino-terminale  
de l'histone centromérique CENP-A

Mise au point d'un système de pseudogénétique modifiée

Damien GOUTTE-GATTAT

janvier – juin 2007

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>3</b>
1.1	Chromatine et variants d’histones . . . . .	3
1.2	Centromère et chromatine centromérique . . . . .	4
1.2.1	Le variant d’histone CENP-A, la marque épigénétique du centromère . . . . .	5
1.2.2	Structure de la chromatine centromérique . . . . .	6
1.3	Objectifs du stage . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>8</b>
2.1	Construction de HA-CENP-A* et HA-CENP-A*-Flag . . . . .	8
2.2	Interférence ARN dirigée contre CENP-A . . . . .	9
2.3	Culture cellulaire et transfection . . . . .	9
2.4	Tests de clivage . . . . .	10
2.5	Immunoblots . . . . .	10
2.6	Immunofluorescence . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>11</b>
3.1	Expression des protéines HA-CENP-A* et HA-CENP-A*-Flag . . . . .	11
3.2	Clivage des protéines HA-CENP-A* et HA-CENP-A*-Flag . . . . .	12
3.3	Localisation cellulaire de HA-CENP-A* et HA-CENP-A*-Flag . . . . .	14
3.4	Inhibition de la synthèse de CENP-A endogène par ARN interférence . . . . .	15
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>16</b>

# 1 Introduction

## 1.1 Chromatine et variants d'histones

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. Le nucléosome 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 de petites protéines basiques dont la masse moléculaire varie entre 13 et 15 kDa. Elles sont caractérisées par un domaine C-terminal relativement conservé, constitué de trois hélices  $\alpha$ , 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 (Figure 1b).

La chromatine 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 connus. Les niveaux d'organisations 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 :

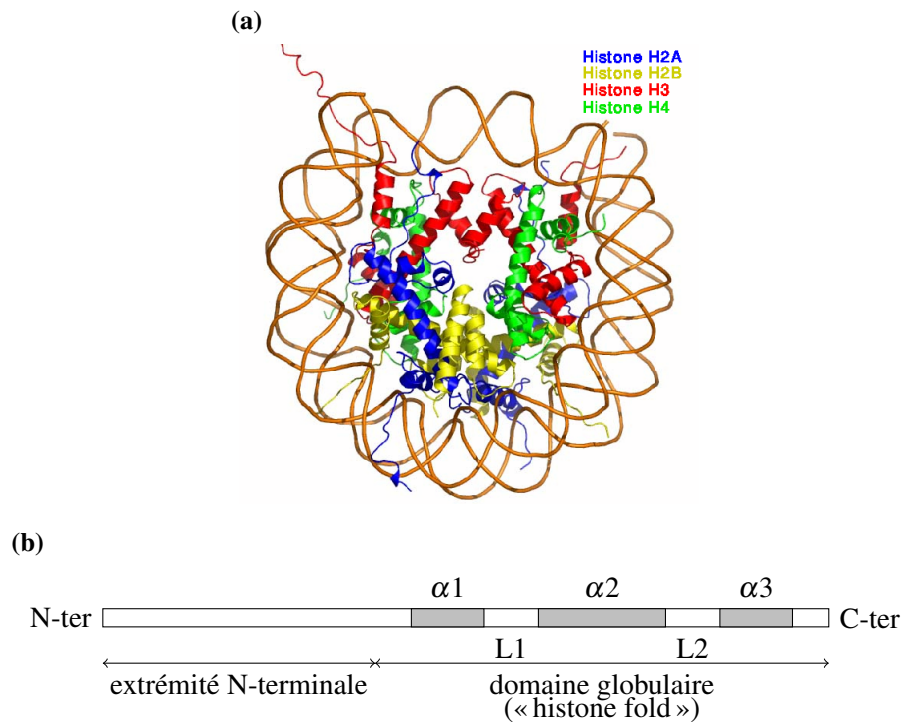


FIG. 1. Nucléosome et histones de cœur. (a) Structure du nucléosome conventionnel, résolue par cristallographie aux rayons X (d'après Luger *et al.*, 1997). (b) Représentation schématique d'une histone de cœur. Les segments grisés marqués  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  indiquent les hélices  $\alpha$  du domaine histone-fold, séparées entre elles par les boucles L1 et L2. L'extrémité N-terminale n'est pas structurée.

l'*euchromatine*, une chromatine décondensée transcriptionnellement active, et l'*hétérochromatine*, une chromatine condensée longtemps considérée comme transcriptionnellement inactive.

La structure de la chromatine est très dynamique. Son remodelage partiel ou total lui confère de nouvelles propriétés structurales ou fonctionnelles pour permettre le déroulement d'activités nucléaires comme la transcription, la réplication ou la répartition équitable des lots de chromosomes en mitose. Deux mécanismes bien connus assurent ce dynamisme : le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine et les modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones (Cosgrove *et al.*, 2004). Un troisième mécanisme, l'incorporation de variants d'histones au sein d'un nucléosome, a été mis en évidence récemment et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches au sein de notre laboratoire.

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 que par quelques résidus ; les variants *hétéromorphes* divergent suffisamment en taille et en séquence pour présenter une mobilité électrophorétique distincte de l'histone conventionnelle.

*In vitro* et *in vivo*, il a été montré que les variants d'histones s'incorporent dans la chromatine. Il en résulte des variations subtiles de la structure du nucléosome (Suto *et al.*, 2000), et de tels nucléosomes variants possèdent des propriétés fonctionnelles différentes de celles d'un nucléosome conventionnel. Leur remodelage, par exemple, nécessite des facteurs de remodelage spécifiques (Angelov *et al.*, 2006).

De plus, à la différence des histones conventionnelles, qui sont produites et incorporées dans la chromatine lors de la phase S, la synthèse et l'incorporation des variants d'histones sont découplées de la réplication de l'ADN (Kamakaka and Biggins, 2005). Ainsi, l'incorporation d'un variant d'histone à un stade donné du cycle cellulaire, ou à un stade donné de différenciation d'une cellule, confère à la chromatine des propriétés de type épigénétique, permettant de réguler toutes les activités nucléaires, indépendamment de la séquence primaire d'ADN.

## 1.2 Centromère et chromatine centromérique

Une partie de notre laboratoire s'intéresse à la chromatine centromérique. Le centromère est défini en microscopie comme le point de constriction primaire d'un chromosome mitotique. Il est responsable de la ségrégation équilibrée des chromosomes lors de la division cellulaire (Fi-

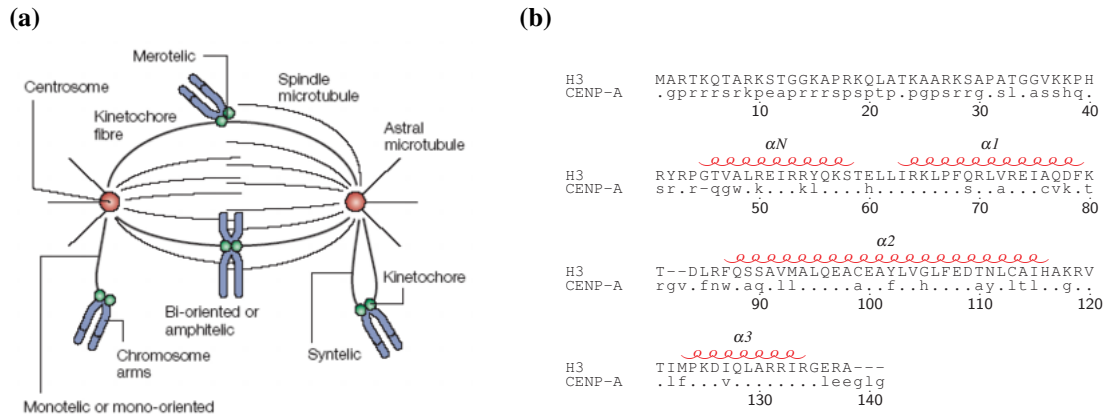


FIG. 2. Centromères et variants d'histones. (a) Représentation schématique du fuseau mitotique, montrant les différents modes d'attachement des microtubules aux kinétochores. Seul l'attachement amphitélique permet une ségrégation correcte des chromatides-sœurs de chaque chromosome en anaphase. Les points verts figurent les centromères, sur lesquels s'assemblent les kinétochores (d'après Keen and Taylor, 2004). (b) Comparaison de séquences entre l'histone H3 conventionnelle et son variant centromérique CENP-A. Les points dans la séquence de CENP-A représentent les aminoacides conservés dans les deux protéines. Les tracés rouges figurent les hélices  $\alpha$  du domaine globulaire de H3.

gure 2a). C'est à son niveau que s'assemble le kinétochore, une structure protéique complexe, sur laquelle s'ancrent les microtubules kinétochoriens du fuseau mitotique et qui dirige les mouvements du chromosome (Maiato *et al.*, 2004). C'est à son niveau également qu'agit le point de contrôle du fuseau mitotique (Musacchio and Hardwick, 2002), qui empêche la séparation des deux chromatides sœurs en anaphase, tant que tous les chromosomes ne sont pas bi-orientés selon un mode d'attachement amphitélique en métaphase (Figure 2a). Ainsi, on conçoit aisément qu'un défaut de la fonction centromérique soit souvent associé à une aneuploïdie.

### 1.2.1 Le variant d'histone CENP-A, la marque épigénétique du centromère

Chez les eucaryotes supérieurs, l'ADN centromérique est caractérisé par la présence de séquences répétées d'environ 170 paires de bases, riches en A-T, de type  $\alpha$ -satellite. Cependant, la séquence primaire de ces motifs, leur nombre, et leur agencement sont extrêmement variables d'un organisme à l'autre, et même d'un chromosome à l'autre au sein d'un même organisme (Fukagawa, 2004), ce qui prouve que la séquence d'ADN n'est pas le facteur déterminant de l'identité du centromère.

La protéine CENP-A est un variant de l'histone H3. Son domaine histone-fold est très similaire à celui de H3. En revanche, son extrémité N-terminale est très divergente (Figure 2b). Localisé exclusivement dans la chromatine centromérique, CENP-A est considéré comme le déterminant épigénétique du centromère (Dawe and Henikoff, 2006). En effet, sa seule présence

est suffisante pour conférer au centromère ses fonctions centromériques (Blower and Karpen, 2001), ainsi que pour conférer des fonctions centromériques à des régions chromatiniennes dépourvues de séquences de type  $\alpha$ -satellite, comme les « néocentromères » (Amor and Choo, 2002). CENP-A est indispensable à l'assemblage du kinétochore en mitose (Heit *et al.*, 2006). CENP-A constitue ainsi, structurellement et fonctionnellement, l'élément fondateur du centromère.

### 1.2.2 Structure de la chromatine centromérique

Si CENP-A est la marque épigénétique du centromère, la chromatine centromérique est caractérisée par plusieurs autres marques épigénétiques. La combinaison de ces marques permet de définir plusieurs domaines au sein de la chromatine centromérique.

Le domaine central, ou chromatine CEN (Figure 3a), s'étale sur environ 500 à 1 500 kb sur des fibres de chromatine étirées. Il est constitué par une alternance de blocs de nucléosomes contenant le variant CENP-A et de blocs de nucléosomes contenant l'histone H3 conventionnelle, dont l'extrémité N-terminale est diméthylée sur la lysine 4 (Blower *et al.*, 2002). Au sein des chromosomes, la chromatine CEN se replie sur elle-même, ce qui aboutit à présenter les nucléosomes contenant CENP-A alignés à la surface du centromère, où s'assemblera le kinéto-

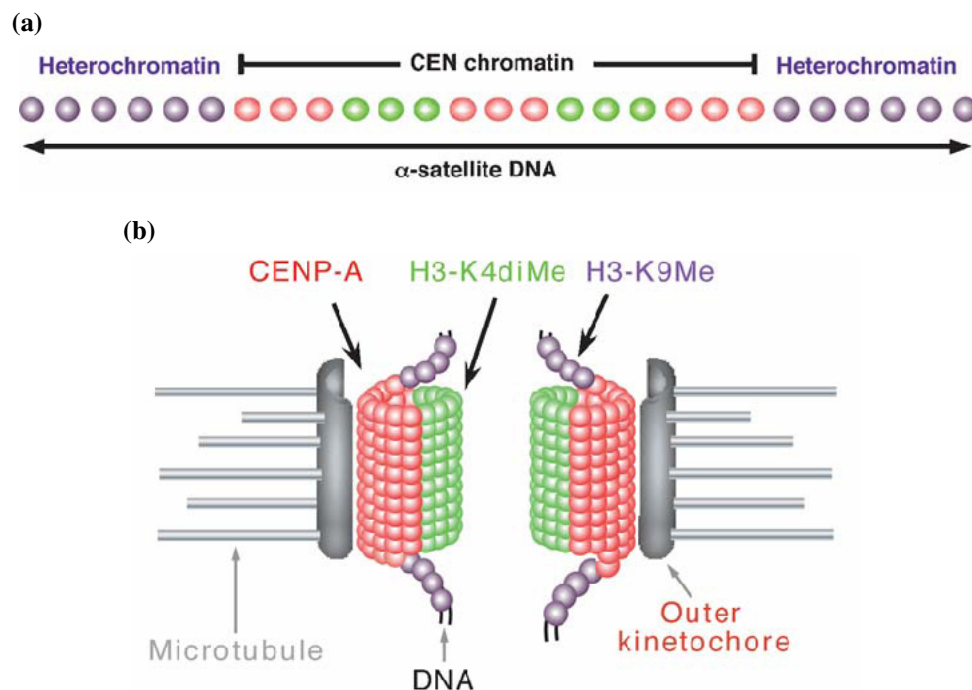


FIG. 3. Modèle d'organisation de la chromatine centromérique. (a) Représentation linéaire de la chromatine centromérique, montrant les différents domaines caractérisés par leurs marques épigénétiques. (b) En mitose, la chromatine CEN adopte une conformation spatiale conduisant à la présentation des nucléosomes CENP-A à la surface du centromère (d'après Schueler and Sullivan, 2006).

chore en mitose (Figure 3b).

Les domaines flanquant de part et d'autre la chromatine CEN forment la « chromatine péracentromérique. » Elle porte des marques épigénétiques fréquemment associées à de l'hétérochromatine : elle est globalement hypoacétylée (Taddei *et al.*, 2001) et contient des histones H3 triméthylées sur la lysine 9. Elle est également enrichie en histone H2A.Z, un variant de l'histone H2 (Greaves *et al.*, 2007).

### 1.3 Objectifs du stage

Même s'il est établi que CENP-A est le déterminant épigénétique des centromères, les fonctions mitotiques de l'extrémité N-terminale et du domaine histone-fold de CENP-A ne sont pas clairement identifiées. Un domaine semblant responsable de la localisation centromérique de CENP-A a récemment été mis en évidence à l'intérieur du domaine histone-fold (Black *et al.*, 2007), mais le rôle du domaine N-terminal reste ambigu.

Pour apporter des précisions sur les fonctions du domaine N-terminal de CENP-A, mon projet de recherche de M2 a consisté à mettre au point un système expérimental, dérivé du système de pseudogénétique déjà utilisé dans notre laboratoire (Scrittore *et al.*, 2005). La pseudogénétique consiste à éteindre l'expression de la protéine d'intérêt par interférence ARN, de manière à reproduire le phénotype d'un mutant nul pour la protéine étudiée. Grâce à la dégénérescence du code génétique, il est alors possible d'exprimer de manière ectopique la protéine d'intérêt (sauvage ou portant une mutation) dont les ARNm ne seront pas reconnus par les ARN interférents. Cette approche expérimentale permet d'étudier l'impact fonctionnel des différentes mutations de la protéine, en absence de la protéine endogène.

Cette approche nous permettra très probablement de confirmer que la partie N-terminale de CENP-A constitue un domaine fonctionnel de ce variant d'histone (Chen *et al.*, 2000). Mais elle ne nous permettra pas de déterminer la ou les phases de la mitose au cours desquelles la partie N-terminale de CENP-A exerce des fonctions mitotiques. C'est pourquoi nous avons élaboré une stratégie, basée sur la pseudogénétique, permettant d'étudier le rôle de la partie N-terminale de CENP-A, à une phase précise et choisie du cycle cellulaire.

Cette stratégie consiste à cliver de manière spécifique et contrôlée la partie N-terminale de CENP-A exprimée de manière ectopique, en absence de la protéine CENP-A endogène, grâce aux potentialités de la protéase virale TEV (*Tobacco Etch Virus*). Cette protéase est extrêmement spécifique, et ne reconnaît que quelques sites de clivage (Carrington and Dougherty,

1988), dont la séquence est absente de la majorité des protéines codées par les organismes eucaryotes.

En exprimant la protéase TEV à un moment précis du cycle cellulaire, nous pourrions provoquer le clivage de la partie N-terminale de CENP-A. Nous serons alors à même d'étudier les conséquences, à cet instant précis, de l'absence du domaine N-terminal de CENP-A sur les fonctions mitotiques de la protéine.

Au cours de mon stage, nous avons commencé à mettre en place ce système de pseudo-génétique modifiée. J'ai construit par génie génétique un vecteur d'expression codant pour une protéine CENP-A\* dont l'ARNm est insensible à l'interférence ARN et qui contient le site de clivage de la protéase TEV entre le domaine N-terminal et le domaine histone-fold. J'ai vérifié que cette protéine s'exprimait dans des cellules eucaryotes. J'ai vérifié qu'elle était efficacement clivée par la protéase TEV *in vitro*. J'ai vérifié qu'elle se localisait au niveau des centromères. Enfin, j'ai également commencé à mettre au point l'extinction de la protéine CENP-A endogène par interférence ARN.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Construction de HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag

Le clone pcDNA-HA-CENP-A\*, contenant le site de clivage de la TEV entre les domaines N-terminal et histone-fold de CENP-A, est construit à partir d'un clone HA-CENP-A dont la séquence codante a été altérée afin de le rendre insensible à des ARN interférents dirigés contre CENP-A (Tanaka *et al.*, 2004). Le site de clivage reconnu par la protéase TEV est inséré par PCR chevauchante, comme schématisé sur la Figure 4a. Deux fragments de PCR sont obtenus en utilisant les deux couples d'amorces T7PROM 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3', CTEV- 5'-CCC AGG CTC GGG CCG **CCC TGA AAA TAA AGA TTC TCG CGG CGG CTC GGA CC-3'** et BGHREV 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3', CTEV+ 5'-GGT CCG AGC CGC CGC **GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC GGC CCG AGC CTG GG-3'** (en gras, la séquence nucléotidique du site TEV). Ces deux fragments de PCR servent ensuite à la fois de matrice et d'amorce pour construire un fragment de PCR couvrant toute la séquence codante de la protéine, incluant le site de clivage pour la protéase TEV.

Le clone pcDNA-HA-CENP-A\*-Flag est construit à partir de HA-CENP-A\*. Le tag Flag est inséré à l'extrémité carboxyterminale du clone HA-CENP-A\* par PCR (Figure 4b), en uti-

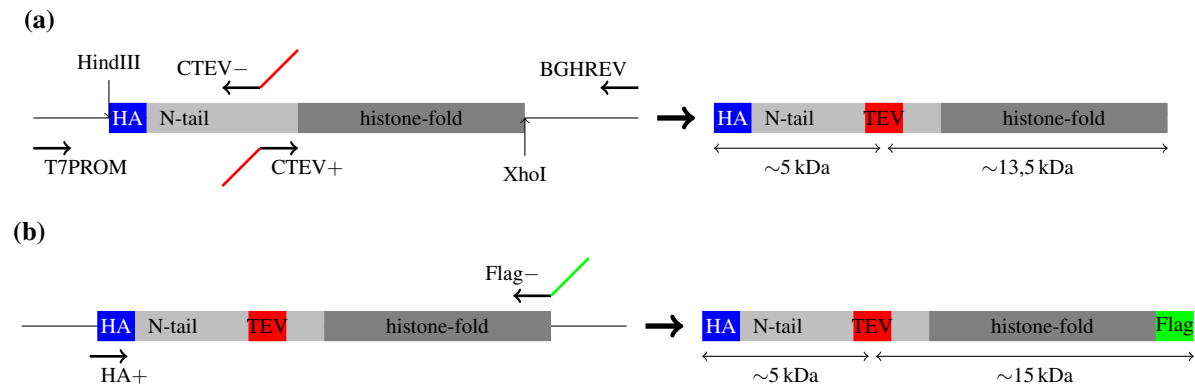


FIG. 4. Stratégies de clonage. (a) Construction du clone HA-CENP-A\* par PCR chevauchante. (b) Construction du clone HA-CENP-A\*-Flag, par addition du tag Flag à l'extrémité C-terminal de HA-CENP-A\*.

lisant les amorces suivantes : HA+ 5'-AAG CTT ATG GAC TAC CCT TAT-3', Flag- 5'-CTC GAG CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT GGT CGC CGG CAC ACG GCT GCC CAG ACC TTC TTC (en gras, la séquence nucléotidique du tag Flag).

Tous les produits de PCR sont amplifiés à l'aide de la High Fidelity Taq DNA Polymerase (Roche), dans des conditions adaptées à la taille des fragments à amplifier et aux températures d'hybridation des différentes amorces. Les produits de PCR finaux sont clonés dans le vecteur intermédiaire pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), puis sous-clonés dans les sites HindIII et XhoI du vecteur pcDNA (Invitrogen). Après vérification par séquençage, ils sont amplifiés chez *E. coli* et purifiés sur colonne NucleoBond<sup>®</sup> AX (Macherey nagel).

## 2.2 Interférence ARN dirigée contre CENP-A

Pour éteindre l'expression de la protéine CENP-A endogène, un lot de quatre plasmides de type HuSH<sup>™</sup> a été commandé chez Origene. Chaque plasmide code pour un shRNA de 29 nucléotides ciblant une partie de la séquence codante de CENP-A.

Un plasmide HA-CENP-A non résistant à l'interférence ARN, disponible au laboratoire, a été utilisé pour suivre et tester l'efficacité de chacun des quatre plasmides HuSH.

## 2.3 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa sont cultivées en milieu DMEM complété avec 1 % de L-glutamine, 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine) et 10 % de sérum de veau fœtal, à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>. Elles sont transfectées par 3 à 10 µg d'ADN à l'aide 3 à 30 µl de Lipofectamine<sup>™</sup> (Invitrogen), en fonction de la quantité de cellules transfectées, en suivant les

recommandations du fournisseur.

## 2.4 Tests de clivage

Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont récupérées dans 1 ml de tampon de clivage (Tris HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Elles sont centrifugées 3 minutes à 1 000 rpm, reprises dans 200  $\mu$ l de tampon et lysées par sonication à 200 J/W.s<sup>-1</sup>. Le lysat est ensuite divisé en fractions de 20  $\mu$ l dans lesquelles est ajouté de 0,1 à 2  $\mu$ g de TEV recombinante (aimablement fournie par le docteur Bertrand Séraphin). Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 2 heures.

## 2.5 Immunoblots

Les extraits protéiques sont dénaturés par addition de tampon de Laemmli (Tris 60 mM, SDS 1,5 %, glycérol 6 %,  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 %, bleu de bromophénol) et 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 électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est saturée par une solution de PBS 1 $\times$ , lait 5 %, Tween 0,1 % pendant une nuit à 4°C, puis incubée successivement avec les solutions d'anticorps primaires et secondaires pendant une heure à température ambiante. Trois lavages successifs de 5 minutes au PBS 1 $\times$ , Tween 0,1 % sont réalisés après chaque incubation.

Les anticorps primaires utilisés, tous monoclonaux, sont des anti-HA (Covance) dilués 1 000 $\times$ , des anti-Flag M2 (Sigma) dilués 5 000 $\times$  ou des anti- $\alpha$ -Tubuline (Sigma) dilués 2 000 $\times$ . Ils sont dilués dans une solution de PBS 1 $\times$ , lait 1 %, Tween 0,1 %. Les anticorps secondaires sont des polyclonaux anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (Amersham Biosciences) dilués 10 000 $\times$  dans la même solution que les anticorps primaires. La membrane est révélée par le système SuperSignal<sup>®</sup> West Pico (Pierce).

## 2.6 Immunofluorescence

Les cellules transfectées sont fixées vingt-quatre heures après la transfection par 4 % de paraformaldéhyde pendant 15 minutes à 37°C. Après un lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées par une incubation de 5 minutes dans une solution de PBS 1 $\times$ , Triton X100 0,2 %.

La surface des lamelles est saturée par une solution de PBS 1 $\times$ , sérumalbumine bovine

0,5 mg/ml pendant 5 minutes. Elles sont ensuite successivement incubées pendant 1 heure avec les anticorps primaires puis secondaires dilués dans une solution de PBS 1×, sérum de veau foetal 10 %, Tween 0,2 %. Quatre lavages au PBS 1×, Tween 0,2 % sont réalisés après chaque incubation.

Les anticorps primaires sont des anti- $\beta$ -Tubuline (Abcam) dilués 200×, des anti-Survivin (Eurogentes) dilués 250× et des anti-HA dilués 500× ; les secondaires sont des anti-IgG de souris couplés au fluorophore Alexa 555 ou des anti-IgG de lapin couplés au fluorophore Alexa 657, tous deux dilués 500×. L'ADN est finalement marqué par une solution de Hoechst à 2  $\mu$ g/ml, 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, deux Hélium-Néon à 543 nm et 633 nm et un saphir à 720 nm en mode biphotonique, permettent l'observation respectivement de l'Alexa 555, de l'Alexa 657 et du Hoechst.

### 3 Résultats

#### 3.1 Expression des protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag

Comme nous ne disposons pas actuellement d'un anticorps anti-CENP-A, les vecteurs codant pour les protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag, dont la construction est décrite en section 2.1, ont été conçus de manière à ce que la protéine CENP-A\* soit étiquetée soit avec un tag HA en N-terminal, soit avec un tag HA en N-terminal et un tag Flag en C-terminal.

Pour vérifier l'expression de la protéine de fusion HA-CENP-A\*, des cellules HeLa transfectées avec les vecteur pcDNA ou pcDNA-HA-CENP-A\* sont lysées et les protéines analysées

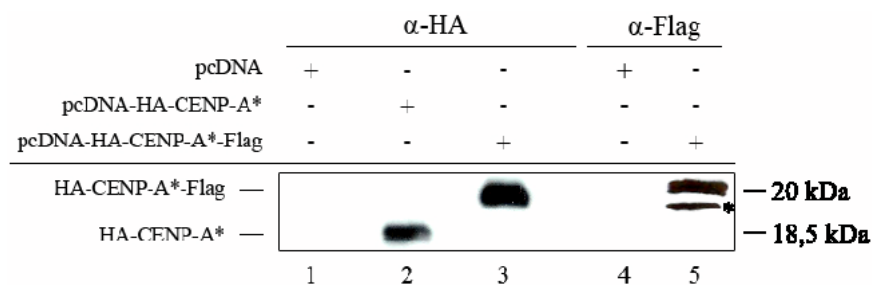


FIG. 5. Détection des protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag exprimées dans des cellules HeLa, transfectées avec les vecteurs pcDNA-HA-CENP-A\* (piste 2) ou pcDNA-HA-CENP-A\*-Flag (pistes 3 et 5), à l'aide d'anticorps anti-HA ou anti-Flag. En contrôle, des extraits de cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA (pistes 1 et 4).

par immunoblot avec un anticorps dirigé contre le tag HA. Un signal est détecté uniquement dans l'extrait protéique provenant des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA-HA-CENP-A\* (Figure 5, pistes 1 et 2). La masse moléculaire apparente correspond à celle attendue pour la protéine HA-CENP-A\*, soit environ 18,5 kDa.

L'expression de la protéine HA-CENP-A\*-Flag dans des cellules HeLa est analysée dans un premier temps à l'aide de l'anticorps anti-HA (Figure 5, piste 3). Une protéine d'environ 20 kDa est détectée. La différence de masse moléculaire observée par rapport au signal de la protéine HA-CENP-A\* correspond à la masse moléculaire du tag Flag. L'expression de HA-CENP-A\*-Flag est également analysée en utilisant un anticorps anti-Flag (Figure 5, piste 5). Comme attendu, une protéine de même taille est détectée avec les deux anticorps. Cependant, une protéine d'une taille légèrement inférieure (signalée par un «\*», Figure 5, piste 5) est détectée par l'anticorps anti-Flag. Nous ignorons la provenance de cette protéine ; il s'agit vraisemblablement d'un artefact expérimental.

### 3.2 Clivage des protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag

Pour tester si l'insertion du site TEV dans la séquence de CENP-A rend la protéine résultante clivable par la protéase TEV, des essais de clivage *in vitro* sont réalisés. Des cellules transfectées avec les plasmides pcDNA-HA-CENP-A\* ou pcDNA-HA-CENP-A\*-Flag sont lysées dans le tampon de clivage, et le lysat est incubé avec différentes quantités de protéase TEV recombinante pendant deux heures à température ambiante. Les fragments de la digestion sont détectés avec un anticorps anti-HA et/ou avec un anticorps anti-Flag.

La Figure 6 montre les résultats du test de clivage sur des lysats de cellules transfectées avec le clone pcDNA-HA-CENP-A\*. En absence de protéase, un signal correspondant à la

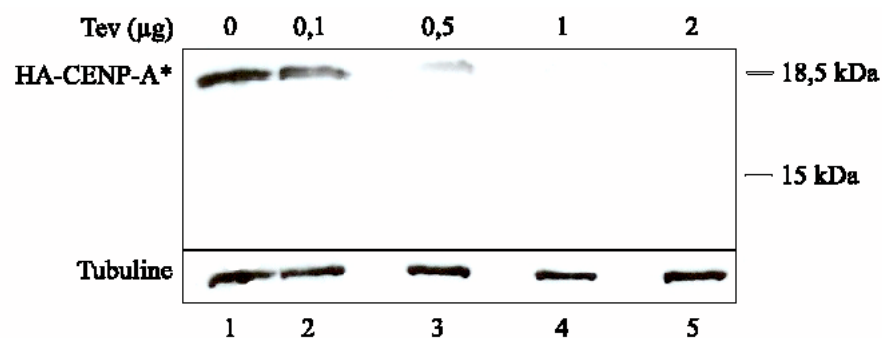


FIG. 6. Clivage de la protéine HA-CENP-A\* par la protéase TEV. Suivi de la digestion de la protéine HA-CENP-A\*, exprimée dans des cellules HeLa, par la protéase TEV, à l'aide de l'anticorps anti-HA. Un anticorps anti-Tubuline est utilisé pour vérifier la charge de chaque puits.

protéine entière est détecté (piste 1). En présence de quantités croissantes de protéase TEV, le signal décroît progressivement jusqu'à disparaître à partir de 1  $\mu\text{g}$  de protéase (pistes 2 à 5). Cette disparition n'est pas due à une variation dans la quantité totale de protéines chargées, comme on peut le vérifier en détectant l' $\alpha$ -tubuline dont le signal est constant dans toutes les conditions utilisées. Il est alors possible d'expliquer la disparition du signal par le clivage de la protéine HA-CENP-A\*, même si les produits de clivage ne peuvent être détectés. En effet, le fragment N-terminal, qui porte le tag HA, n'excède pas 5 kDa (Figure 4a) : un fragment de cette taille sort d'un gel d'acrylamide de 15 % et n'est en conséquence pas détectable dans nos conditions expérimentales. Le fragment C-terminal, de masse moléculaire plus importante mais non étiqueté, n'est évidemment pas détectable non plus.

C'est pourquoi nous avons réalisé le test de clivage sur la protéine HA-CENP-A\*-Flag, qui est étiquetée à ses deux extrémités (Figure 4b). Le fragment C-terminal de cette protéine n'est pas détectable avec un anticorps anti-HA (Figure 7a), pour la même raison que précédemment. En revanche, il est possible de détecter le fragment C-terminal avec un anticorps anti-Flag. Comme l'indique la Figure 7b, la disparition du signal correspondant à la protéine entière,

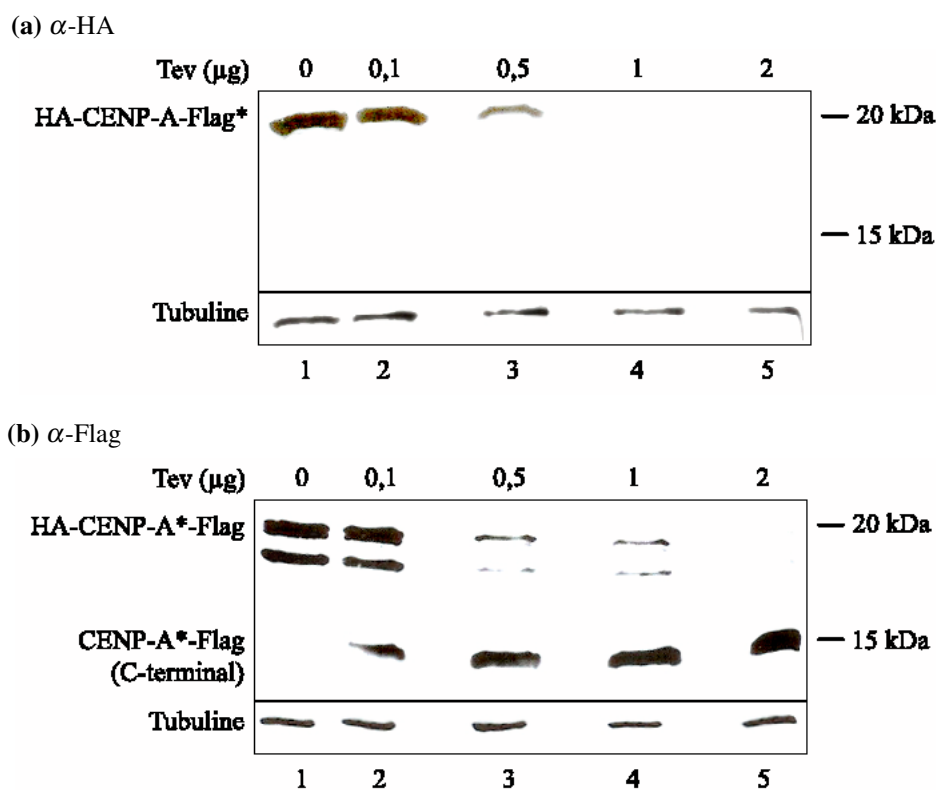


FIG. 7. Clivage de la protéine HA-CENP-A\*-Flag par la protéase TEV. Suivi de la digestion de la protéine HA-CENP-A\*-Flag, exprimée dans des cellules HeLa, par la protéase TEV, à l'aide de l'anticorps anti-HA (a) ou anti-Flag (b). Un anticorps anti-Tubuline est utilisé pour vérifier la charge de chaque puits.

coïncide avec l'apparition du signal correspondant au fragment C-terminal.

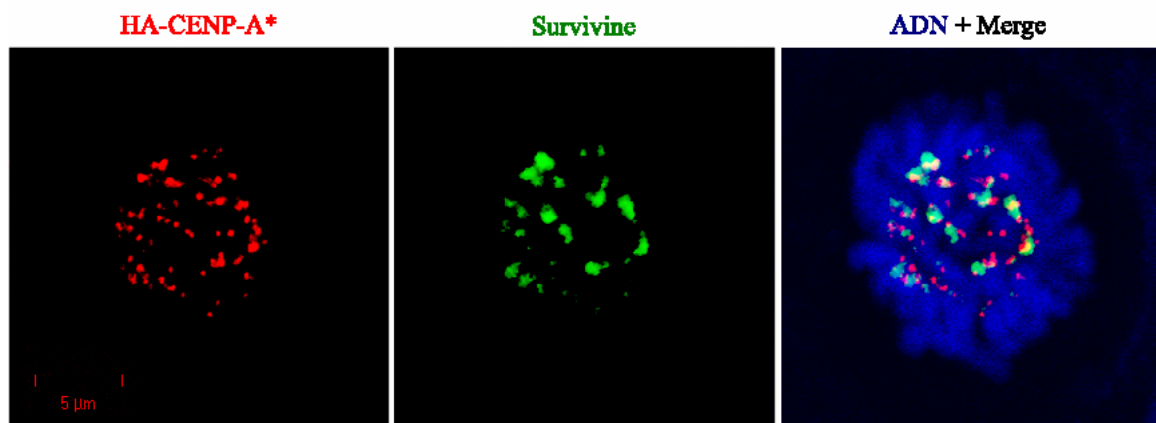
Les protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag sont donc bien clivées, comme attendu, par la protéase TEV.

### 3.3 Localisation cellulaire de HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag

Sachant que les protéines CENP-A\* sont effectivement clivables, nous avons voulu savoir si elles se localisent au niveau des centromères, comme la protéine CENP-A native. Nous devons en effet nous assurer que l'insertion du site TEV et l'addition du ou des tags ne perturbent pas le recrutement centromérique de la protéine. Pour cela, la localisation cellulaire des protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag a été étudiée par immunofluorescence avec un anticorps anti-HA.

Des cellules ont été transfectées avec le vecteur pcDNA-HA-CENP-A\* et observées à

(a) Prophase



(b) Métaphase

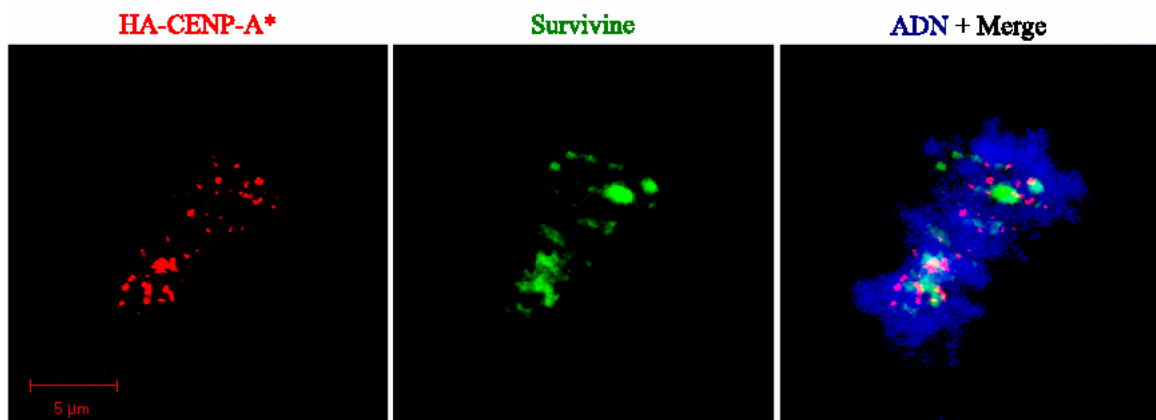


FIG. 8. Localisation centromérique de la protéine HA-CENP-A\*. Codétection par immunofluorescence de la protéine HA-CENP-A\* et de la protéine passagère Survivine au cours des premières phases de la mitose. En rouge, HA-CENP-A\* ; en vert, la Survivine ; en bleu, l'ADN marqué au Hoechst.

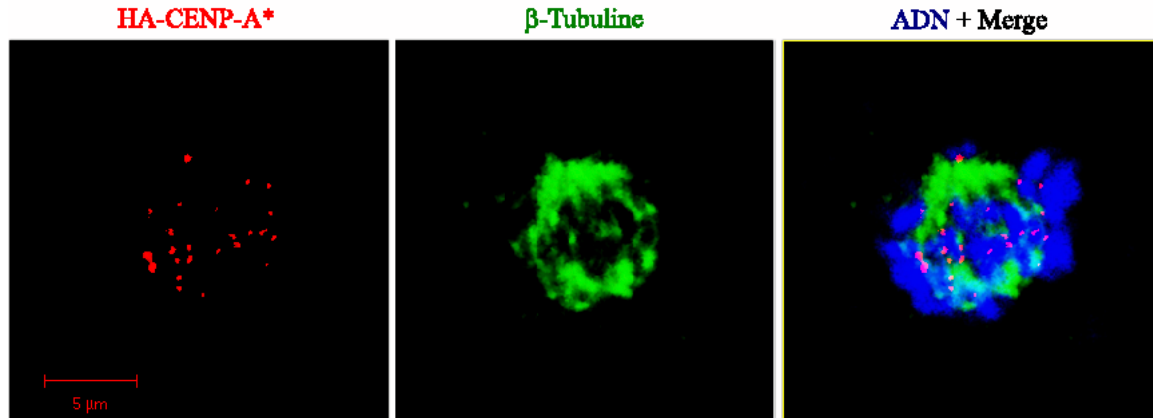


FIG. 9. Maintien de la localisation centromérique de HA-CENP-A\* au cours des phases tardives de la mitose. Codétection de la protéine HA-CENP-A\* et de la  $\beta$ -Tubuline dans une cellule en anaphase. En rouge, HA-CENP-A\* ; en vert, la  $\beta$ -Tubuline ; en bleu, l'ADN marqué au Hoechst.

différents stades de la mitose. En prophase et métaphase (Figure 8), la protéine HA-CENP-A\* apparaît sous formes de points discrets, qui pourraient correspondre aux centromères. La codétection sur les mêmes cellules de la Survivine, une protéine passagère qui se localise aux centromères dans les premiers stades de la mitose (Vagnarelli and Earnshaw, 2004), confirme cette hypothèse. Deux spots HA-CENP-A\*, un par chromatide-sœur d'un même chromosome, semblent encadrer les signaux de la Survivine, ce qui correspond à la localisation attendue de CENP-A, à la surface des centromères (Figure 3b).

Nous avons également procédé à une codétection de HA-CENP-A\* avec les microtubules du fuseau mitotique, qui sont ancrés aux centromères. Sur une cellule en anaphase (Figure 9), HA-CENP-A\* apparaît à l'extrémité positive des microtubules kinétochoriens du fuseau mitotique. Une fois encore, cela correspond à la localisation attendue de la protéine, à la base des kinétochores.

Nous pouvons donc conclure que le recrutement centromérique de la protéine HA-CENP-A\* n'est pas altéré par la présence du site de clivage pour la protéase TEV ni du tag HA en N-terminal. Nous avons réalisé la même étude sur la protéine HA-CENP-A\*-Flag. Toutefois nous n'avons pas réussi à détecter cette protéine au niveau des centromères (données non montrées), ce qui indique que le tag Flag en C-terminal empêche la localisation centromérique de la protéine.

### 3.4 Inhibition de la synthèse de CENP-A endogène par ARN interférence

Notre stratégie de pseudogénétique modifiée nécessite d'éteindre l'expression de la protéine CENP-A endogène par interférence ARN. Dans ce but, nous avons testé quatre plasmides

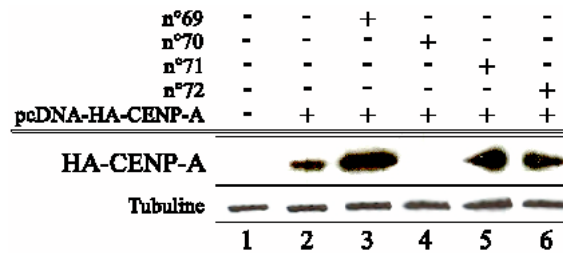


FIG. 10. Test préliminaire d'efficacité des plasmides HuSH™ anti-CENP-A. Des cellules HeLa sont co-transfectées avec un vecteur pcDNA-HA-CENP-A et différents plasmides HuSH anti-CENP-A. Vingt-quatre heures après la transfection, les protéines sont extraites et séparées par PAGE-SDS. La protéine HA-CENP-A est détectée avec un anticorps anti-HA. Un anticorps anti-Tubuline est utilisé pour vérifier la charge de chaque puits.

exprimant des shRNA (*Short Hairspin RNA*) dirigés contre la séquence codante de CENP-A (Paddison *et al.*, 2002). Des cellules HeLa ont été cotransfectées avec un de ces plasmides et un plasmide codant pour une protéine de fusion HA-CENP-A. Le taux d'expression de cette protéine est évaluée dans les extraits protéiques avec un anticorps anti-HA.

La protéine est détectée comme attendu dans des cellules transfectées avec le seul vecteur pcDNA-HA-CENP-A (Figure 10, pistes 1 et 2). Lorsque les cellules sont cotransfectées avec le vecteur pcDNA-HA-CENP-A et l'un des plasmides 69, 71 ou 72 exprimant des shRNA, le niveau d'expression de HA-CENP-A reste équivalent, à celui observé en absence de shRNA (pistes 3, 5 et 6). En revanche, HA-CENP-A n'est pas détectable dans des cellules cotransfectées avec le plasmide n°70 (piste 4). Cela suggère que ce plasmide peut efficacement supprimer l'expression de la protéine CENP-A. Cette expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois, et les résultats rapportés demandent à être confirmés.

## 4 Discussion

La phase mitotique du cycle cellulaire conduit à la répartition équilibrée des deux lots de matériel génétique dans chaque cellule-fille. Cela nécessite l'attachement amphitélique de chaque chromatide-sœur d'un même chromosome au fuseau mitotique, par l'intermédiaire du kinétochore qui s'assemble au niveau du centromère. Le centromère est une région chromatienne très particulière, définie non par la séquence primaire d'ADN mais par un ensemble de marques épigénétiques dont la plus importante est le variant d'histone CENP-A.

CENP-A confère à la chromatine centromérique ses fonctions et sert de fondation à l'assemblage du kinétochore (Dawe and Henikoff, 2006). C'est un variant de l'histone canonique H3, dont il diffère essentiellement au niveau de sa partie N-terminale. De nombreuses études

ont montré le rôle primordial de CENP-A dans le bon déroulement de la mitose ; nous nous intéressons plus particulièrement aux rôles joués par le domaine N-terminal, très variable d'une espèce à l'autre.

Nous proposons une stratégie de pseudogénétique modifiée pour étudier les fonctions du domaine N-terminal de CENP-A. La pseudogénétique classique repose sur l'utilisation du phénomène d'ARN interférence pour supprimer l'expression d'une protéine endogène, et son remplacement par l'expression ectopique d'une protéine modifiée. Les conséquences des modifications apportées à la protéine peuvent alors être étudiées en absence de la protéine native (Scrittore *et al.*, 2005).

La stratégie de pseudogénétique modifiée que nous proposons ajoute à ce schéma l'utilisation d'une protéase capable de cliver très spécifiquement une forme modifiée de CENP-A (désignée « CENP-A\* ») dans laquelle a été inséré le site reconnu par la protéase.

Au cours de mon stage, j'ai commencé à mettre au point cette stratégie en construisant les vecteurs codant pour les protéines HA-CENP-A\* et HA-CENP-A\*-Flag, en insérant le site de clivage pour la protéase TEV entre les domaines N-terminal et histone-fold de CENP-A. J'ai vérifié que ces protéines CENP-A\* s'expriment dans des cellules eucaryotes. J'ai vérifié qu'elles sont clivables *in vitro* par la protéase TEV. Enfin, j'ai vérifié que la protéine HA-CENP-A\* adopte une localisation cellulaire semblable à celle de la protéine CENP-A endogène. J'ai constaté que la présence du tag Flag en position C-terminal empêchait la localisation centromérique de la protéine HA-CENP-A\*-Flag.

Nous avons également commencé à mettre au point l'extinction de la protéine CENP-A endogène par ARN interférence. Les premiers résultats sont très encourageants puisque nous avons identifié un plasmide HuSH<sup>TM</sup> qui semble cibler efficacement l'ARNm de CENP-A. Si nous confirmons ce résultat, nous étudierons en immunofluorescence les effets de l'élimination de CENP-A sur le déroulement de la mitose. Nous devrions observer de sévères défauts de ségrégation des chromosomes. Nous procéderons alors à une première étude de pseudogénétique classique pour vérifier si le phénotype résultant de l'extinction de CENP-A endogène peut être réverté en surexprimant transitoirement notre protéine modifiée HA-CENP-A\*. Nous espérons que la présence du site de clivage de la protéase TEV ou du tag HA n'altère pas les fonctions mitotiques de CENP-A.

En parallèle, nous construirons un vecteur d'expression bactérien codant pour la protéase TEV fusionnée à un peptide transducteur de type Tat. Ce peptide conférera à la protéine de

fusion la capacité de franchir rapidement les membranes cellulaires (Wadia and Dowdy, 2002). La protéine sera également fusionnée à un tag poly-histidine, ce qui permettra sa purification sur colonne de Nickel. Nous utiliserons cette protéase sur des cellules exprimant HA-CENP-A\* pour vérifier si le clivage de la protéine, déjà observé *in vitro*, est possible *in vivo*.

Nous pourrions alors tester notre stratégie de pseudogénétique modifiée en faisant agir cette protéase sur des cellules exprimant HA-CENP-A\*, mais pas la protéine CENP-A endogène. Nous serons alors en mesure d'observer les conséquences de la délétion du domaine N-terminal de CENP-A sur le déroulement de la mitose. Puis, en synchronisant préalablement les cellules dans une phase du cycle cellulaire, et en choisissant avec soin l'instant où nous ajouterons la protéase TEV recombinante, nous pourrions étudier les fonctions du domaine N-terminal de CENP-A à chaque stade de la mitose.

En fonction des premiers résultats qu'apportera cette stratégie, nous affinerons la définition du ou des domaines fonctionnels de la partie N-terminale de CENP-A. Nous construirons d'autres vecteurs en insérant le site de clivage à différentes positions le long de la partie N-terminale de CENP-A, et nous réitérerons nos expériences de pseudogénétique modifiée avec ces vecteurs. Nous espérons ainsi cartographier précisément la partie N-terminale de CENP-A du point de vue de ses fonctions mitotiques.

Cette stratégie de pseudogénétique modifiée pourra être appliquée à d'autres protéines. En particulier, nous envisagerons de l'appliquer à un autre variant d'histone, le variant H2A.Z, particulièrement présent au niveau de la chromatine péri-centromérique.

## Références

- Amor, D. J. and K. H. A. Choo (2002). Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**:695–714.
- 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.
- Black, B. E., L. E. T. Jansen, P. S. Maddox, D. R. Foltz, A. B. Desai, J. V. Shah, and D. W. Cleveland (2007). Centromere Identity Maintained by Nucleosomes Assembled with Histone H3 Containing the CENP-A Targeting Domain. *Mol. Cell*, **25**:309–322.

- 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.
- Blower, M. D., B. A. Sullivan, and G. H. Karpen (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell*, **2**:319–330.
- Carrington, J. C. and W. G. Dougherty (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:3391–3395.
- Chen, Y., R. E. Baker, K. C. Keith, K. Harris, S. Stoler, and M. Fitzgerald-Hayes (2000). The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol. Cell. Biol.*, **20**:7037–7048.
- Cosgrove, M. S., J. D. Boeke, and C. Wolberger (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**:1037–1043.
- Dawe, R. K. and S. Henikoff (2006). Centromeres put epigenetics in the driver's seat. *Trends Biochem. Sci.*, **31**:662–669.
- Fukagawa, T. (2004). Centromere DNA, proteins and kinetochore assembly in vertebrate cells. *Chromosome Res.*, **12**:557–567.
- Greaves, I. K., D. Rangasamy, P. Ridgway, and D. J. Tremethick (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:525–530.
- Heit, R., D. A. Underhill, G. Chan, and M. J. Hendzel (2006). Epigenetic regulation of centromere formation and kinetochore function. *Biochem. Cell Biol.*, **84**:605–618.
- 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.
- Maiato, H., J. DeLuca, E. D. Salmon, and W. C. Earnshaw (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J. Cell Sci.*, **117**:5461–5477.

- Musacchio, A. and K. G. Hardwick (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**:731–741.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon, and D. S. Conklin (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, **16**:948–958.
- Schueler, M. G. and B. A. Sullivan (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu. Rev Genomics Hum. Genet.*, **7**:301–313.
- 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.
- Suto, R. K., M. J. Clarkson, D. J. Tremethick, and K. Luger (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.*, **7**:1121–1124.
- Swedlow, J. R. and T. Hirano (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell*, **11**:557–569.
- Taddei, A., C. Maison, D. Roche, and G. Almouzni (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.*, **3**:114–120.
- Tanaka, Y., M. Tawaramoto-Sasanuma, S. Kawaguchi, T. Ohta, K. Yoda, H. Kurumizaka, and S. Yokoyama (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods*, **33**:3–11.
- Vagnarelli, P. and W. C. Earnshaw (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, **113**:211–222.
- Wadia, J. S. and S. F. Dowdy (2002). Protein transduction technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**:52–56.

**Le centromère est la région du chromosome où s'assemble le kinétochore. Il est responsable de la ségrégation équilibrée des chromosomes lors de la mitose. Il est défini de manière épigénétique, et le principal facteur responsable de cette détermination est le variant de l'histone H3 CENP-A, dont la localisation est exclusivement centromérique. Si le domaine histone-fold de CENP-A est très conservé, son extrémité N-terminale est très divergente. Les rôles de l'extrémité N-terminale sont encore largement inconnus. Nous abordons l'étude et l'analyse des fonctions mitotiques de l'extrémité N-terminale de CENP-A en développant une nouvelle approche basée sur l'utilisation d'une protéine CENP-A modifiée pour être spécifiquement reconnue et clivée par la protéase Tev, associée à un système de pseudogénétique disponible au laboratoire.**