



HAL
open science

Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire et Étude de l'équilibre prolifération/différenciation des kératinocytes

Marjorie Coisy-Quivy

► **To cite this version:**

Marjorie Coisy-Quivy. Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire et Étude de l'équilibre prolifération/différenciation des kératinocytes. Biologie cellulaire. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2004. Français. NNT : . tel-00192360

HAL Id: tel-00192360

<https://theses.hal.science/tel-00192360>

Submitted on 27 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
UFR Sciences

T H E S E

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II
Discipline : Biologie Cellulaire et Biochimie
Formation Doctorale : Biologie Santé
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Marjorie Coisy Quivy

Le Jeudi 16 Décembre 2004

Titre :

Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire
et
Étude de l'équilibre prolifération/différenciation des kératinocytes

JURY

Mr le Pr Philippe Jeanteur	Président
Mr le Dr Jean-Marie Blanchard	Directeur de thèse
Mme le Pr Nicole Basset-Seguin	Rapporteur
Mr le Pr Bernard Ducommun	Rapporteur
Mr le Dr Jean-Christophe Dantonel	Examineur

*Pour ceux qui ne sont plus parmi nous, mon père et Candie
mais aussi à mon mari, Alex, et à toute ma famille*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur Jean Marie Blanchard pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir ainsi offert l'opportunité de réaliser cette thèse dans un environnement scientifique et technique exceptionnel. Je te remercie également pour m'avoir laissé mener avec tant de liberté mes travaux de recherches.

Je remercie les Professeurs Nicole Basset Sequin et Bernard Ducommun pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et pour toutes leurs remarques critiques qui ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je remercie également le professeur Philippe Jeanteur de m'avoir accueilli au sein de son institut l'IGM lorsque j'ai débüté ma thèse, d'avoir exercé avec le plus de justesse possible ses fonctions de directeur d'institut et de responsable de la formation doctorale et enfin d'avoir présidé cette thèse.

Je tiens tout particulièrement à dire un grand merci à Jean-Christophe Dantonel (JC) pour avoir tout simplement sauvé ma thèse qui débutait vraiment très mal. Tu as su me remotiver puis me redonner confiance et plaisir à manipuler après tout ce que j'avais enduré et tous les moments de doute que j'avais traversés. Tu as également eu le courage de me supporter durant ces longues journées de travail et apparemment ce n'est pas une simple affaire. Et puis, tu as passé énormément de temps à corriger le papier kératinocytes (bien que ce n'était pas ton job), mes demandes de financement et mon manuscrit de thèse. Enfin, je voudrais également te remercier pour m'avoir écouté, pour m'avoir fait confiance, pour nos nombreuses discussions tant professionnelles que personnelles, pour m'avoir aidé à me poser les bonnes questions et donc finalement pour m'avoir appris ce qu'était la véritable recherche. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et je n'ai jamais douté de cette collaboration qui fut fructueuse et qui n'a toujours dépendu que de nous. Franchement, j'ai passé trois années de bonheur dans des conditions idéales et avec un encadrement de rêve.

J'aimerais remercier tous les autres membres de l'équipe Jean Marie Blanchard, les restants (Marie Luce Vignais, Cosette, Patrick, Olivier) mais aussi les anciens (Edouard, Eugenia, Séverine, Céline, Annick, Alexandre Philips) pour tous leurs conseils techniques et toutes les discussions scientifiques. Mais n'oublions pas les étudiants qui sont passés par là, Virginie, Magali, Sandy, Constance, Laëtitia, Carolina, Andrée, Sophie, Jennifer et Sylvain, merci pour votre travail acharné et pour votre contribution à la bonne ambiance du labo.

Merci également à la meilleure des marraines de thèse, Catherine Bonne-Andréa qui m'a écouté, soutenu, et qui a passé énormément de temps à me défendre pour essayer de faire publier ce travail sur les kératinocytes.

Je voudrais aussi remercier Vjeko Dulic pour ces longues conversations sur le cycle cellulaire et pour m'avoir aidé à mettre au point les immunoprécipitations des Cyclines et les tests d'activité kinase des complexes Cyclines/Cdk dans les kératinocytes humains.

Merci aussi à nos nouveaux voisins, Michel Hahne, Lourdes et Karine pour les pauses Bière de fin de journée, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Merci à tous les membres de l'équipe de Claude Sardet pour leurs discussions toujours constructives au cours des réunions du lundi, leurs conseils techniques et leur sympathie.

Je tiens également à remercier les membres des services communs: la laverie, l'informatique, le magasin, l'iconographie, l'atelier et l'équipe du secrétariat (Jeanine, Sylvie, Anne, Maryse), qui font tourner cet institut, pour leur gentillesse, leur efficacité et leur disponibilité.

Je remercie aussi Pierre Trauo et Sylvain de la plateforme d'imagerie du CRBM pour avoir toujours été présent lorsque j'ai eu besoin de leurs services, pour leur enthousiasme et leur compétence.

Merci à tous les chefs de groupe pour faire de cet institut ce qu'il est, mais merci aussi à tous les étudiants pour leur bonne humeur à toute épreuve, leur aide et les nombreuses discussions. À tous, bon courage pour cette longue

traversée qu'est la thèse qui finalement, j'en suis sûre, finira bien pour tout le monde.

Je tiens également à remercier tous mes amis de l'institut qui font que chaque jour passé au labo reste agréable et ceux, même si les manip de la journée ont été foireuses. Merci donc aux thésards de chez Danièle: Elias et Mickael et aux thésards de chez Ulla: les anciens, Zouzou, Olivier Disson et les fidèles, Willy et Fabien pour tous les bons moments partagés: les pauses café, les heures repas à la cantine, les soirées, mais aussi pour m'avoir souvent remonter le moral grâce leur bonne humeur et leurs blagues (bien qu'elles ne soient pas toujours drôles !). Merci aussi aux autres membres de la bande, Cécile Malnou et Audrey Ceschia. Merci également à tous les autres, qui ont croisé mon chemin dans les couloirs, en salle de culture, à la machine à café, pour un simple bonjour accompagné d'un sourire qui nous rappelle que l'on ne fait pas partie des meubles de l'institut bien qu'on y passe la majorité de notre temps.

Je voudrais finalement remercier les personnes qui font partie de ma vie hors du labo mais qui ont été extrêmement importantes pour mon équilibre mental pendant ces quatre années de folie, qui ne m'ont pas réservé uniquement des bonnes surprises. Grâce à eux, j'ai tenu bon et j'ai eu le courage d'aller jusqu'au bout et même de finir en beauté: un molecular cell, un mariage et un futur bébé.

Dans un premier temps, j'aimerais remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu, m'avoir fait confiance et m'avoir toujours permis de faire ce que j'aimais, entre autres le judo et la science. Je regrette seulement que mon père n'est pas été là, il aurait été si fier de sa petite dernière, comme quoi même sans kimono, j'aurais pu l'impressionné. Merci au reste de ma famille et aussi ma belle famille pour leur confiance, leur soutien et pour les nombreux moments de bonheur partagé.

Merci à mon compagnon de tous les jours, mon mari Alex, qui me supporte chaque jour et dieu sait qu'il y a eu des jours très difficiles (mon père, ma

belle soeur et ☹). Merci à lui d'avoir su patienté, de m'avoir toujours soutenu, remis dans le droit chemin, de m'avoir permis de ne pas m'effondrer, mais seulement tomber et toujours me relever.

Merci aux amis: Christine, Eric, Laurent, Cyril, Charlotte, Aurélie, Stéphane, Guy, Sergine, Pascal, Sanjay, Christelle, Gwen, Julien, Céline, Cédric, Henri, Nolwenn, Henrik, Audrey et sûrement pleins d'autres qui ont rempli certaines de mes soirées et de mes vacances de joie.

Merci à mes professeurs de judo, Thierry Marchand et Thierry Brun qui m'ont permis de devenir ce que je suis, qui ont forgé mon caractère et qui m'ont enseigné le contrôle de soi, je crois que sans eux j'aurais pu bien souvent exploser !!!

Merci à ma chienne Sam et à mon lapin, pampan, pour leur amour sans limites et leurs nombreux câlins qui ont su me réconforter.

Et enfin à tous ceux que j'ai oublié de citer sur le papier. Désolé...

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES.....	12
I. INTRODUCTION.....	14
1.1 CYCLE CELLULAIRE	15
1.1.1 <i>Le cycle cellulaire</i> □ <i>Définition</i>	15
1.1.2 <i>Les complexes cdk/cycline</i>	17
1.1.3 <i>Régulation de l'activité des Cdk</i>	17
1.1.4 <i>Régulation des différentes phases du cycle cellulaire</i>	27
1.2 RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION	48
1.2.1 <i>Les complexes Rb /E2F</i>	48
1.2.2 <i>Le facteur de transcription c-Myc</i>	53
1.2.3 <i>Régulation de la transcription par la chromatine</i>	59
1.3 L'ÉPIDERME.....	82
1.3.1 <i>Morphologie de la peau</i>	82
1.3.2 <i>Programme de différenciation des kératinocytes</i>	87
1.4 OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	95
1.4.1 <i>Objectif général de la thèse</i>	95
1.4.2 <i>Étude du mécanisme de répression de la cycline A</i>	95
1.4.3 <i>Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire</i>	96
1.4.4 <i>Contrôle de l'équilibre prolifération/différenciation de cellules de la peau, les kératinocytes</i>	97
II. RESULTATS.....	99
2.1 PUBLICATION 1 : MÉCANISME DE RÉPRESSION DU GÈNE DE LA CYCLINE A EN QUIESCENCE	100
2.1.1 <i>Introduction</i>	100
2.1.2 <i>Résultats</i>	101
2.1.3 <i>Conclusion</i>	101
2.2 PUBLICATION 2 : LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LE CONTRÔLE DU CYCLE CELLULAIRE	103
2.2.1 <i>Introduction</i>	103
2.2.2 <i>Résultats</i>	103
2.2.3 <i>Conclusion</i>	104
2.3 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : C-MYC ET CYCLINE A DEUX MÉCANISMES DE RÉPRESSION DIFFÉRENTS .	105
2.4 PUBLICATION 3 : CYCLE CELLULAIRE ET DIFFÉRENCIATION DES KÉRATINOCYTES	107
2.4.1 <i>Introduction</i>	107
2.4.2 <i>Résultats</i>	108

2.4.3 Conclusion.....	109
2.5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : RÔLE DE p21 DANS LA DIFFÉRENCIATION DES KÉRATINOCYTES INDUITE PAR EXPRESSION DE C-MYC	110
III. DISCUSSION	113
3.1 CARACTÉRISATION DU MÉCANISME DE RÉPRESSION DE LA CYCLINE A AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE..	114
3.2 LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LA CROISSANCE CELLULAIRE.....	119
3.3 LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LE CYCLE CELLULAIRE.....	122
3.4 CYCLE CELLULAIRE ET DIFFÉRENCIATION DES KÉRATINOCYTES.....	128
3.5 DIFFÉRENCIATION DES KÉRATINOCYTES, CYCLE CELLULAIRE ET CHROMATINE.....	134
IV. PERSPECTIVES.....	135
V. BIBLIOGRAPHIE.....	138

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF	ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly <i>Factor</i>
ADA	alteration/deficiency in activation
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal
APC	Anaphase <i>Promoting Complex/Cyclosome</i>
p19/ARF	<i>Alternative Reading Frame</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARS	<i>Autonomously Replicating Sequences</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BAF	<i>Brg1 Associated Factor</i>
bHLH-LZ	<i>basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper</i>
Brg1	SNF2□, <i>Brm Related gene</i>
Brm	<i>Brahma</i>
cad	<i>C</i> carbamoyl phosphate synthase <i>Aspartate carbamoyltransférase</i> <i>Déhydrooratas</i>
CAF-1	<i>Chromatin Assembly Factor-1</i>
CAK	Cdk activating kinase
Cdk	Cycline Dependent Kinase
CHD	<i>Chromo Helicase DNA-binding</i>
CHRAC	<i>CHromatin Remodeling and Assembly Complex</i>
CIP/KIP	<i>Cdk Inhibiting Protein</i>
CKI	<i>Cdk inhibitor</i>
Cks	<i>Cdc kinase subunit</i>
C-Nap1	<i>Centrosomal Nek2 Associated Protein 1</i>
CRS	signal de rétention cytoplasmique
DDK	<i>Dbf4 Dependant Kinase, Cdc7/Dbf4</i>
DP	Desmoplakine
DP	<i>Dimerisation Partner</i>
DSC1-3	Desmocoline

DSG1-3	Desmogléine
EVPL	Envoplakine
Filagrine	<i>filament aggregating</i> activity
GSK3 \square	Glycogen Synthase 3 \square
HAT	histone acétyltransférase
HDAC	histone déacétylase
HK	histone kinase
HMT	histone méthyltransférase
INK4	<i>Inhibitor of Cdk4</i>
Iswi	<i>Imitation swi</i>
MCM	<i>Mini-Chromosome Maintenance</i>
MBD2	<i>Methyl-CpG Binding Domain protein 2</i>
MeCP2	<i>Methyl CpG binding Protein 2</i>
Mta1	<i>Metastasis associated gene 1</i>
MTOC	<i>Microtubule-Organizing Center</i>
MTS1	<i>Multiple Tumor Supressor</i>
Nek2	<i>NIMA Related Kinase 2</i>
NES	signal d'export nucléaire
NoRC	<i>Nucleolar Remodeling Complex</i>
NuA3	<i>Nucleosomal Acetyltransferase of histone H3</i>
NuA4	<i>Nucleosomal Acetyltransferase of histone H4</i>
NURF	<i>NUcleosome Remodeling Factor</i>
Orc	<i>Origin Recognition Complex</i>
PBAF	<i>PolyBromo Associated Factor</i>
PCAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>
PCM	<i>Pericentriolar Material</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PG	Plakoglobine, \square caténine
PKP1-4	Plakophilines
Plk	<i>Polo Like Kinase</i>
PPL	Periplakine
PRMT	arginine méthyltransférases
RFC	<i>Replication Factor C</i>
RPA	<i>Replication Protein A</i>

RSC	<i>Remodel the Structure of Chromatin</i>
RSF	<i>Remodeling and Spacing Factor</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5-acétyltransférase</i>
SAM	S-adénosyl-méthionine
SANT	<i>Swi3 Ada2 N-CoR TFIIIB</i>
Scc	<i>Sister Chromatid Cohesion</i>
SCF	<i>Skp1-Cdc53/Cul1-F-box protein</i>
Smc	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
SNF	<i>Sucrose Non Fermenting</i> , mutant déficient pour la fermentation du glucose
SSB	<i>Single Strand Binding protein</i>
STAGA	<i>Spt3-TAFII31-Gcn5-L acétylase</i>
SWI	<i>SWItch</i> , mutant déficient dans le changement de type sexuel au locus MAT
TAC	<i>Transit Amplifying Cell</i> , cellules d'amplification transitoire
TAD	domaine transactivateur
TCF/LEF	<i>T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor</i>
TFTC	<i>TBP-Free-TAFII-containing Complex</i>
□TuRCs	□ <i>Tubuline Ring Complex</i>
UBC	<i>UBiquitin-Conjugating enzymes</i>
WCRF	<i>Williams syndrome transcription factor Chromatin Remodeling Factor</i>

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	page
Figure 1	Le cycle cellulaire	16
Figure 2	Les différents complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire	18
Figure 3	Variation de l'activité des complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire	18
Figure 4	Induction de la transcription de la cycline D par la voie RAS/ERK	19
Figure 5	Dégradation de la Cycline E par le système ubiquitine-protéasome	20
Figure 6	Dégradation de la Cycline B1 par le système ubiquitine-protéasome	21
Figure 7	Régulation des complexes Cdk/Cycline par phosphorylation/déphosphorylation	23
Figure 8	Représentation schématique de la structure de Cdk2	23
Figure 9	Régulation de la transition G0/G1 via les récepteurs tyrosine kinase et les intégrines	28
Figure 10	Action des cadhérines dans le contrôle de la prolifération	31
Figure 11	Contrôle moléculaire de la réplication	33
Figure 12	Schématisation de la fourche de réplication chez les eucaryotes	35
Figure 13	Les différentes phases de la mitose	36
Figure 14	Le cycle de réplication du centrosome	42
Figure 15	Mécanisme de séparation des chromatides soeurs chez les vertébrés	44
Figure 16	Dégradation des différents acteurs mitotiques via l'APC au cours de la mitose	47
Figure 17	Régulation des deux formes de l'APC par phosphorylation	47
Figure 18	Diagramme schématique des "pocket" protéines	50
Figure 19	Nature des complexes "pocket" protéines/E2F au cours du cycle cellulaire	52
Figure 20	Mécanismes cellulaires régulés par les complexes "pocket" protéines/E2F	52
Figure 21	Mécanisme de régulation transcriptionnelle par c-Myc	54
Figure 22	Les différents domaines de la protéine c-Myc	54
Figure 23	La structure du nucléosome	60
Figure 24	Structure primaire des histones du nucléosome	61

Figure 25	Modifications connues des extrémités N-terminales des histones du nucléosomes	62
Figure 26	Rôle de l'histone H1 dans la formation de la chromatine	62
Figure 27	Les différents degrés d'organisation de la chromatine	63
Figure 28	Coopération entre les voies de phosphorylation et d'acétylation des histones dans l'activation de la transcription des gènes	69
Figure 29	Les méthylations H3-K9 et H3-K4 ont des effets opposés sur la transcription	71
Figure 30	Les complexes de remodelage de la chromatines dépendants de l'ATP	73
Figure 31	Les complexes remodelant la chromatine de la famille SWI/SNF	74
Figure 32	Modèle de régulation de l'expression des cyclines par les complexes SWI/SNF-Rb-HDAC	80
Figure 33	Structure de la peau	82
Figure 34	Structure de la jonction dermo-épidermique	85
Figure 35	Distribution tissulaire et cellulaire des différentes kératines	88
Figure 36	Morphologie de l'épiderme	88
Figure 37	Protéines desmosomales présentes dans les différentes couches de l'épiderme	90
Figure 38	Les jonctions cellule-cellule de l'épiderme	90
Figure 39	Les différentes étapes de la formation de l'enveloppe cornifiée	94
Figure 40	Assemblage des précurseurs de l'enveloppe cornée	94
Figure 41	Répression des gènes c-myc et cycline A par Brm	106
Figure 42	Rôle de p21 dans l'inhibition des complexes Cdk/Cycline au cours de la différenciation des kératinocytes induite par expression de c-Myc	111

I. INTRODUCTION

1.1 CYCLE CELLULAIRE

1.1.1 Le cycle cellulaire □ Définition

Tous les organismes vivants sont constitués de cellules qui se multiplient par division cellulaire. Chez les espèces unicellulaires, chaque division cellulaire engendre un organisme supplémentaire. Chez les espèces pluricellulaires, de nombreuses divisions cellulaires successives, à partir d'une cellule œuf unique, produisent un organisme d'une grande complexité. Par exemple, un organisme adulte de l'espèce humaine comporte plus de 10 milliards de cellules, toutes originaires d'une même cellule, le zygote. De plus, chaque jour, des cellules de l'organisme meurent et sont remplacées par division cellulaire. On estime ainsi que chez un homme adulte, plus de 250 millions de cellules sont en cours de division chaque seconde.

Le cycle cellulaire est défini comme une suite ordonnée de processus qui permet à une cellule de se diviser en deux cellules filles, strictement identiques. Il est divisé en deux parties : l'interphase et la mitose (phase M). L'interphase est elle-même subdivisée en trois phases, qui se déroulent dans l'ordre suivant : G1 (*Gap* □), S (Synthèse), G2 (*Gap* □) (figure 1). Les phases G1 et G2 sont essentiellement des phases de croissance. La phase S assure la duplication du génome par le mécanisme de réplication de l'ADN. La mitose conduit à la division nucléaire et cellulaire appelée cytotérièse (ou cytokinèse). Elle permet le partage équitable de l'information génétique mais aussi des organelles entre les deux cellules filles.

La durée du cycle cellulaire varie en fonction de la nature et des conditions physiologiques de la cellule. Pour des cellules humaines en culture, les différentes phases du cycle durent approximativement 11 heures pour G1, 8 heures pour S, 4 heures pour G2 et 1 heure pour M, soit 24 heures, en moyenne, pour un cycle complet. Mais, le cycle cellulaire peut dans certains cas être beaucoup plus court. C'est le cas, notamment, des cycles embryonnaires précoces qui ne comportent pas de phase de croissance (ni phase G1, ni phase G2); ils consistent en une alternance de phase S et M. Ces cycles, d'une durée comprise entre 8 et 60 minutes selon les espèces, permettent de diviser très rapidement l'œuf, cellule géante en cellules plus petites. Par ailleurs, lorsque les conditions environnementales ne sont pas propices à la prolifération cellulaire (absence de facteurs de croissance, par exemple), les cellules ont la capacité de sortir du cycle pour entrer dans une phase de quiescence G0. Cette sortie réversible du cycle est permise uniquement avant un point de non-retour ou point de restriction en phase G1.

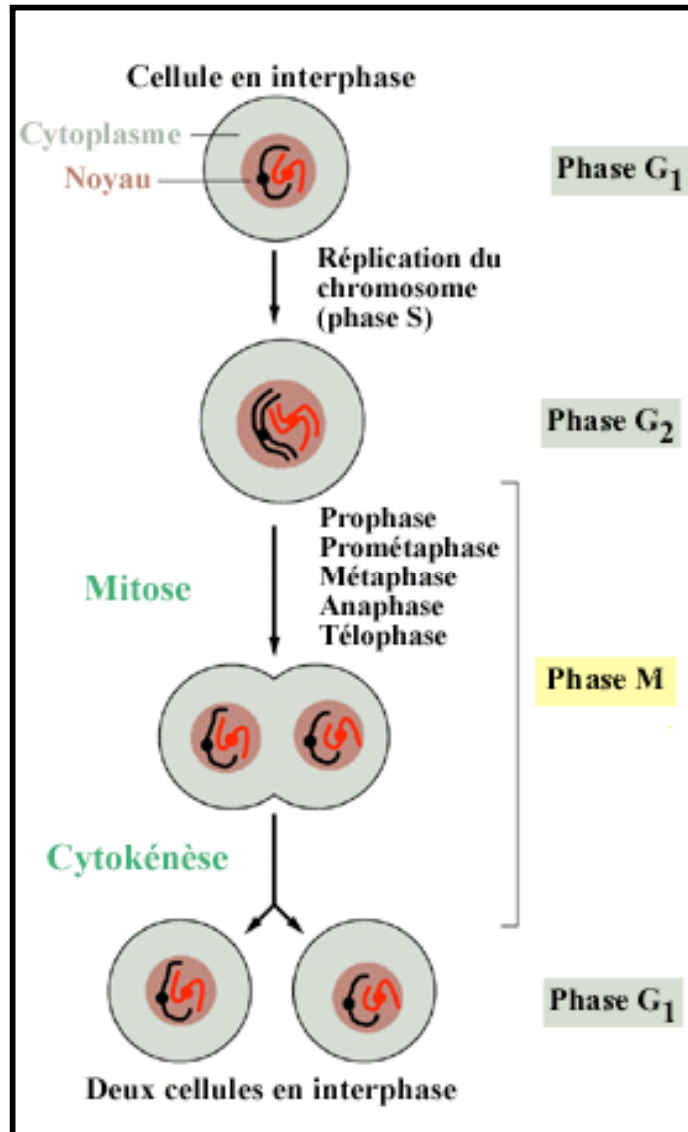


Figure 1 □ Le cycle cellulaire

1.1.2 Les complexes cdk/cycline

L'état de prolifération des cellules est déterminé par la disponibilité de facteurs de croissance et de mitogènes dans leurs environnements proches. Les facteurs de croissance ciblent de nombreuses voies de signalisations cytoplasmiques qui aboutissent à l'activation de complexes, formés d'une sous unité régulatrice, la Cycline et d'une sous unité catalytique, la Cdk (*Cycline Dependent Kinase*). L'activation séquentielle des différents complexes permet les transitions ordonnées entre les phases du cycle cellulaire et le mécanisme qui contrôle cet événement est hautement conservé de la levure à l'homme. La découverte de ces protéines essentielles au contrôle du cycle cellulaire, les Cdk et les Cyclines, a valu à Leland H. Hartwell, Paul M. Nurse et R. Timothy Hunt le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2001. Les complexes Cdk/Cycline orchestrent la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Morgan, 1997) (figure 2). Chez les mammifères, les complexes Cdk4/Cycline D et Cdk6/Cycline D contrôlent la transition G0/G1 (sortie de quiescence) et la progression à travers la phase G1 alors que les complexes Cycline E/Cdk2 et Cycline A/Cdk2 régulent la transition G1/S et le déroulement de la phase S. La phase G2 implique la Cycline A associée à Cdk1 (aussi appelée Cdc2) tandis que le complexe Cycline B/Cdk1 permet la transition G2/M et le déroulement de la phase M (Morgan, 1997). Cette variation cyclique et coordonnée de l'activité des Cdk est un élément clé de la régulation du cycle cellulaire (figure 3). C'est pourquoi, il existe de nombreux niveaux de régulation à l'origine des oscillations d'activités des Cdk.

1.1.3 Régulation de l'activité des Cdk

a) Synthèse et dégradation protéique

L'activité kinase de toutes les Cdk dépend de leur association avec une sous unité régulatrice, la Cycline. Leur nom vient du fait que le niveau d'expression de ces protéines dans les cellules est cyclique. En effet, les gènes des cyclines sont activés périodiquement et la durée de vie de ces protéines est courte. Chaque phase du cycle cellulaire est caractérisée par l'expression de types distincts de cycline et les fluctuations du niveau d'expression des cyclines représentent le premier mécanisme par lequel l'activité des Cdk est régulée. Ces variations de concentration des Cyclines sont contrôlées aux niveaux de la transcription et de la dégradation de ces protéines.

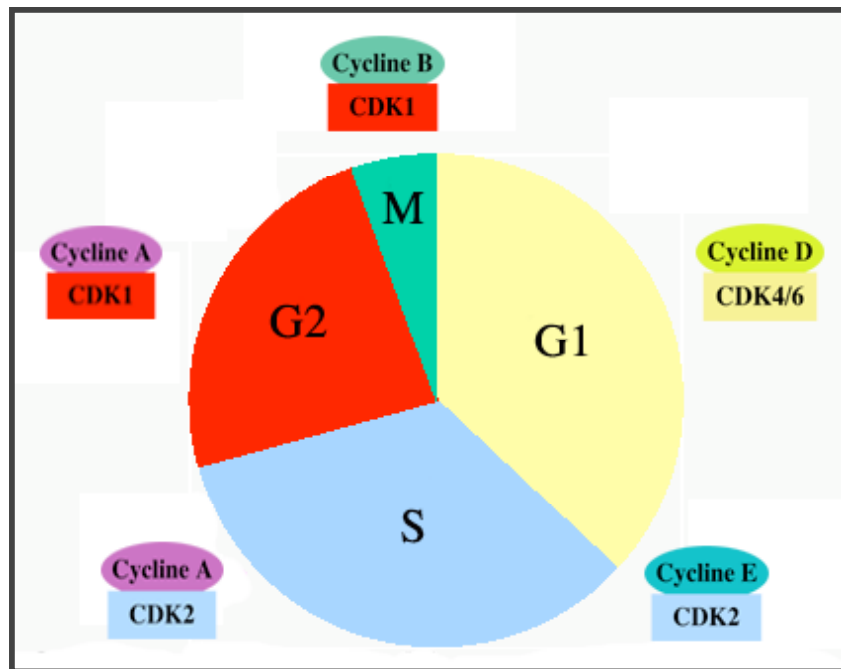


Figure 2 Les différents complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire

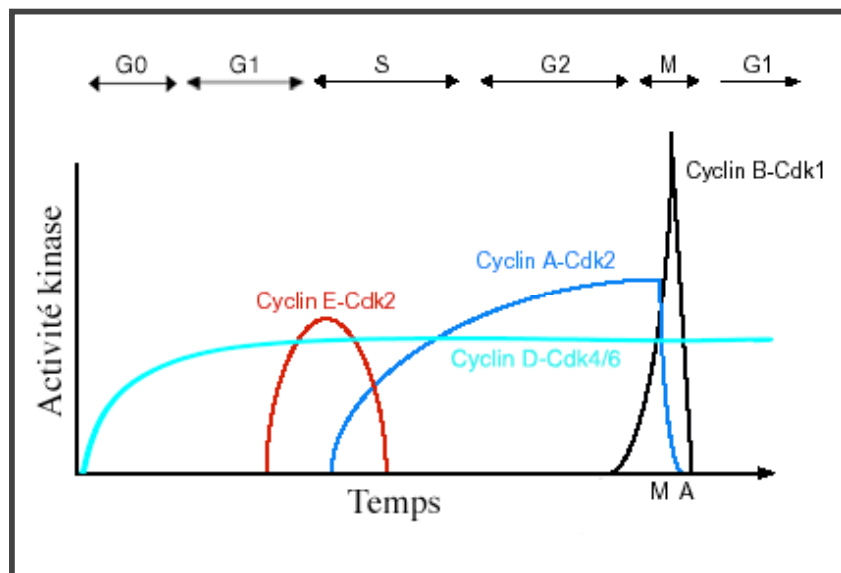


Figure 3 Variation de l'activité des complexes Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire

Synthèse

L'addition de facteurs de croissance permet aux cellules quiescentes de rentrer dans le cycle cellulaire en activant la transcription des cyclines D via la voie Ras/Raf/MAPK (Coqueret, 2002) (figure 4). Les gènes codant les cyclines E et A sont, quant à eux sous le contrôle des facteurs transcriptionnels E2F (introduction 1.2.1). Or, ce sont les complexes Cyclines D/Cdk qui permettent *in vivo* la libération des facteurs E2F. D'une manière générale, les Cyclines favorisent l'expression des Cyclines de la phase suivante.

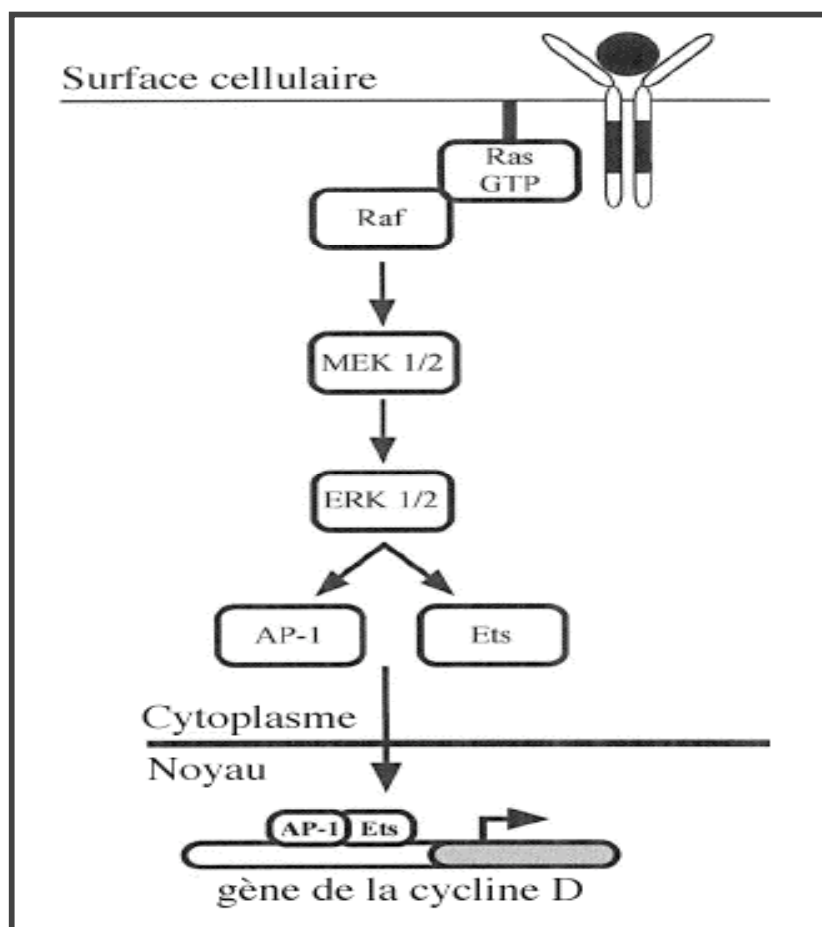


Figure 4 □ Induction de la transcription de la cycline D par la voie RAS/ERK

Dégradation

La dégradation des Cyclines régule négativement leur quantité à des points précis du cycle cellulaire. Par exemple, l'achèvement de la phase S nécessite la dégradation de la Cycline E alors que la sortie de la mitose requière la dégradation des Cyclines A et B. Chez les

eucaryotes, l'un des acteurs majeurs de la protéolyse intracellulaire est un système multi-enzymatique sophistiqué, appelé ubiquitine/protéasome. L'ubiquitinylation des protéines requiert l'activité séquentielle de trois enzymes. L'ubiquitine est d'abord activée et forme une liaison thioester avec une enzyme d'activation E1 (ubiquitin-activating enzyme). Elle est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, sur un membre d'une famille d'enzyme de conjugaison E2 (*Ubiquitin-Conjugating enzymes* ou UBC). Enfin, l'ubiquitine est greffée sur la protéine cible par l'intermédiaire d'une enzyme E3, l'ubiquitine ligase, qui permet la formation d'une liaison isopeptidique entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et une lysine du substrat. D'autres molécules d'ubiquitine sont ensuite ajoutées, formant des chaînes de polyubiquitine qui sont reconnues par le protéasome 26S, conduisant à la protéolyse du substrat. En interagissant à la fois avec l'enzyme E2 et le substrat, les enzymes E3 jouent un rôle principal dans la reconnaissance spécifique de la protéine cible. Parmi les ubiquitine ligases, deux complexes, l'APC (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) et le SCF (*Skp1-Cdc53/Cul1-F-box protein*) interviennent dans la dégradation de protéines du cycle cellulaire et notamment des Cyclines (Koepp *et al.*, 1999).

Le SCF est impliqué dans la dégradation des Cyclines de G1, les Cyclines D et les Cyclines E. Il est constitué de quatre sous-unités : un coeur composé de Skp1, Cdc53/Cul1 (Cullin), Rbx/Roc1 et un membre de la famille des protéines à boîte F (F-box protein). Ces dernières sont des sous-unités adaptatrices déterminant la spécificité du substrat. Dans le cas de la Cycline E, la protéine à boîte F est Cdc4/Fbw7 (figure 5).

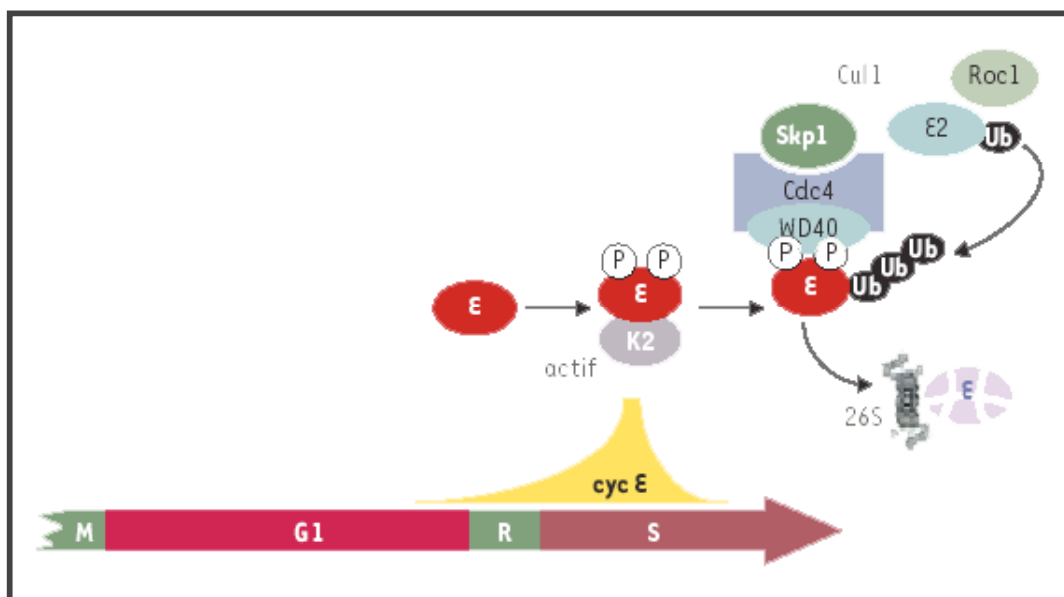


Figure 5 □ Dégradation de la Cycline E par le système ubiquitine-protéasome

L'APC, quant à lui, est nécessaire à la dégradation des Cyclines mitotiques, Cyclines A et B. Il s'agit d'un complexe d'au moins 10 sous unités dont la plupart ont été caractérisées. Cependant leur rôle précis au sein du complexe n'est pas connu. L'APC reconnaît comme substrat des protéines possédant une boîte D (Degradation box), mais la base de cette reconnaissance n'est pas connue. Elle pourrait être relayée par des protéines activatrices qui s'associent de façon stoechiométrique à l'APC et qui stimulent son activité. À ce jour, deux activateurs de l'APC ont été identifiés : les protéines Fizzy/Cdc20 et Fizzy-related/Cdh1/Hct1 qui contrôlent la dégradation des cyclines mitotiques (figure 6).

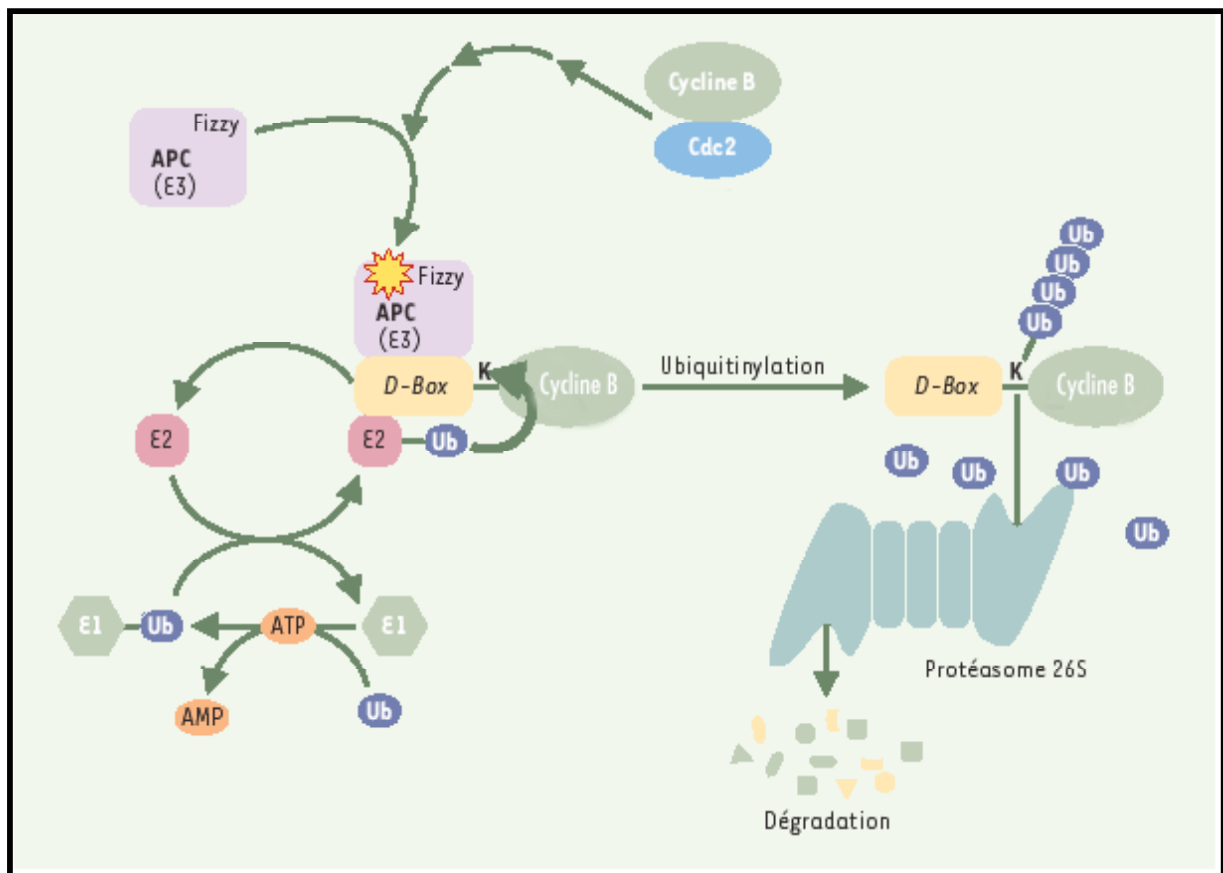


Figure 6 : Dégradation de la Cycline B1 par le système ubiquitine-protéasome

b) Localisation des Cyclines

La localisation subcellulaire des complexes Cdk/Cycline constitue un niveau de régulation supplémentaire de l'activité des Cdk. En effet, les complexes Cdk/Cycline doivent non seulement être assemblés et activés au bon moment, mais aussi transportés sur leur site d'action. Les Cyclines D, A et E semblent être de façon prédominante nucléaire lorsqu'elles sont examinées par immunofluorescence, sur des cellules fixées. Quant à la Cycline B, elle

s'accumule dans le cytoplasme pendant l'interphase, et entre seulement dans le noyau en début de mitose (Pines and Hunter, 1991). Cependant, des analyses sur cellules vivantes par vidéo microscopie montrent que les Cyclines E, B et A sont constamment en train de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau (Jackman *et al.*, 2002; Pines and Hunter, 1991). Ce mécanisme permettrait aux complexes Cdk/Cycline de phosphoryler leurs substrats cytoplasmiques et nucléaires, mais aussi certainement d'accéder à leurs régulateurs s'ils sont présents dans le même compartiment.

c) Modifications post traductionnelles

Les Cyclines et les Cdk sont sujettes à des modifications post traductionnelles par phosphorylation (figure 7). L'assemblage d'une Cdk avec la Cycline correspondante donne un complexe partiellement actif. La pleine activité des Cdk est atteinte seulement après phosphorylation de la Cdk sur un résidu thréonine, conservé, à proximité du site de fixation de l'ATP (T172 pour Cdk4/6, T161 pour Cdk1 et T160 pour Cdk2) (Morgan, 1995). Ce résidu thréonine est localisé dans une boucle d'acides aminés, appelée la boucle T, qui bloque l'accès de l'ATP au site catalytique. L'analyse structurale des complexes Cdk/Cycline indique que l'interaction Cdk/Cycline engendre un changement conformationnel de la Cdk, qui rend la boucle T plus accessible à la phosphorylation. Cette dernière entraîne un changement conformationnel supplémentaire, dans la boucle T, permettant au site catalytique d'être entièrement accessible pour l'ATP (Morgan, 1996; Pavletich, 1999) (figure 8). En plus de stimuler considérablement l'activité kinase, il a été suggéré que la phosphorylation de ce résidu thréonine augmente la stabilité du complexe Cdk/Cycline. La kinase catalysant cette phosphorylation a été désignée CAK (Cdk Activating Kinase). Elle est, elle-même, constituée d'une sous unité Cdk, Cdk7, et d'une sous unité de type Cycline, Cycline H.

La phosphorylation des Cdk peut aussi réguler négativement leur activité kinase. La phosphorylation inhibitrice a lieu en position aminoterminal de toutes les Cdk, spécifiquement aux résidus T14 et Y15 pour Cdk1, Y15 pour Cdk2 et Y17 pour Cdk4/6. La phosphorylation de ces sites entraîne l'inhibition des Cdk, même en présence de la phosphorylation activatrice par la CAK. Ces phosphorylations inhibitrices sont réalisées par les kinases Wee1 et Myt1 (Atherton-Fessler *et al.*, 1993; Morgan, 1995) (figure 9).

Les phosphorylations inhibitrices peuvent être éliminées par l'action des phosphatases de la famille de Cdc25 (Nilsson and Hoffmann, 2000). Cdc25A induit l'activation des complexes Cycline A/Cdk2 et Cycline E/Cdk2 alors que Cdc25B et C participent à l'activation de Cycline B/Cdk1.

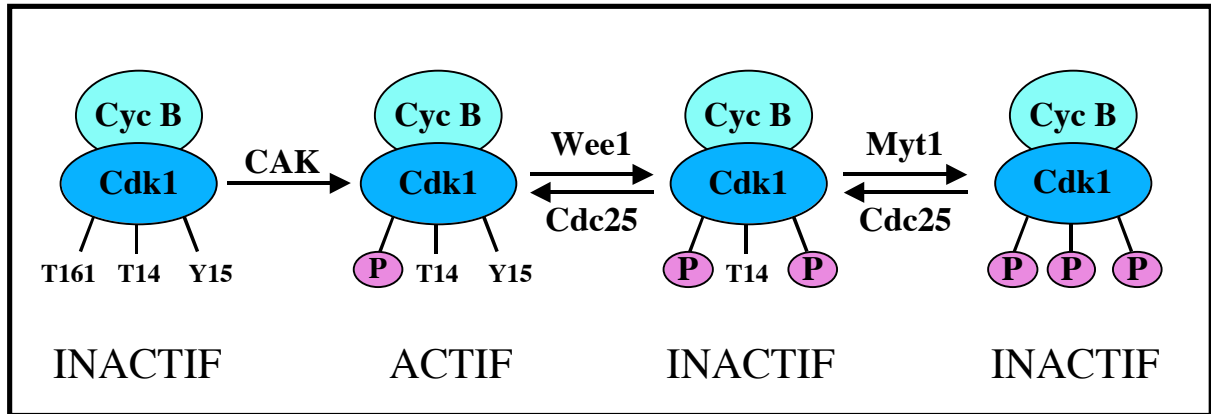


Figure 7 □ Régulation des complexes Cdk/Cycline par phosphorylation/déphosphorylation

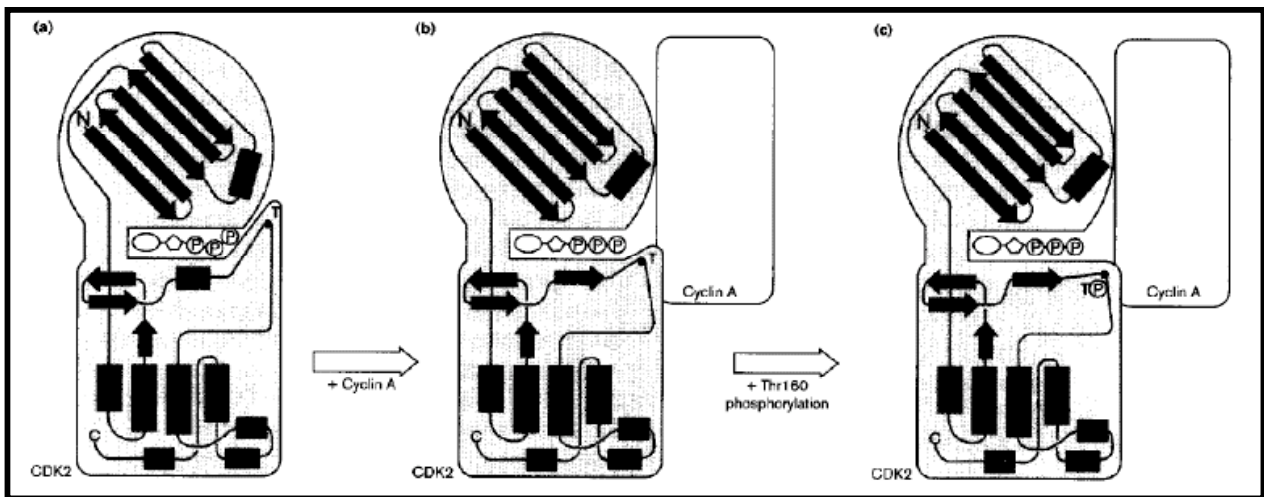


Figure 8 □ Représentation schématique de la structure de Cdk2.

- (a) Cdk2 monomérique inactif,
- (b) Cdk2 associée à la Cycline A inactif
- (c) Cdk2 associée à la Cycline A active

d) Activateurs et inhibiteurs des Cdk

Il existe un niveau de régulation supplémentaire des activités kinases des Cdk □ il fait intervenir des protéines activatrices, Cks (Cdc kinase subunit), ou des protéines inhibitrices, CKI (Cdk inhibitor).

Les Cks

Les Cks sont des petites protéines ubiquitaires de 9-13kDa, qui se lient directement aux complexes Cdk/Cycline (Pines, 1996). Elles ont été isolées chez *S. pombe* (p13/Suc1), et des homologues ont été identifiés chez *S. cerevisiae* (CKS1), l'homme (CksHs1 et CksHs2) et le Xenope (Xe-p9). Bien que ces protéines soient essentielles pour la viabilité des levures, leur fonction exacte n'est pas clairement définie. Pourtant, la plupart des analyses génétiques et biochimiques suggèrent que ces protéines sont essentielles en G1/S et en mitose.

Chez le Xenope, l'immunodépletion de Xe-p9 d'extraits interphasiques empêche l'entrée en mitose alors que l'immunodépletion d'extraits mitotiques induit un arrêt mitotique. Ces résultats suggèrent que les protéines Cks sont nécessaires pour l'entrée et la progression en mitose. Il a été montré, *in vitro*, que les Cks stimulent la phosphorylation des régulateurs mitotiques Cdc25, Wee1 et Myt1 par le complexe Cycline B/Cdk1 (Patra *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec le rôle des Cks dans l'entrée en mitose car ces phosphorylations activent les protéines Cdc25 tandis qu'elles inhibent les protéines Wee1 et Myt1. Les Cks ont également été impliquées dans l'activation de l'APC, en induisant la phosphorylation de la sous unité Cdc27 par le complexe Cycline B/Cdk1 (Patra and Dunphy, 1998). Les Cks sont donc importantes pour la dégradation de la Cycline B et d'autres régulateurs mitotiques, étape essentielle pour la sortie de mitose.

Chez la levure, l'absence de Cks entraîne un arrêt en mitose mais également en G1. Les Cks joueraient un rôle à la transition G1/S en agissant sur le complexe de dégradation SCF. En effet, il a été montré que Cks1 interagit avec Skp2, protéine de la famille à boîte F, favorisant ainsi la dégradation de l'inhibiteur de Cdk, p27 qui empêche l'entrée en phase S en inactivant les complexes Cycline E/Cdk2 (Ganoth *et al.*, 2001; Spruck *et al.*, 2001) □

Les CKI

Dans un tissu, une cellule reçoit constamment de multiples signaux, certains sont mitogènes d'autres anti-mitogènes. Ces données peuvent être apportées sous forme de facteurs

extracellulaires solubles, comme les facteurs de croissance et les hormones, ou sous forme de forces physiques, comme les interactions avec d'autres cellules ou avec le substratum. Ces signaux aboutissent à un mécanisme moléculaire qui permet à la cellule de continuer le cycle cellulaire ou de s'arrêter. Les CKI sont d'importants régulateurs□ce sont des inhibiteurs de Cdk, qui permettent à la cellule de sortir du cycle vers la quiescence ou de bloquer l'engagement dans une phase. Il existe deux familles de CKI□INK4 (*Inhibitor of Cdk4*) et CIP/KIP (*Cdk Inhibiting Protein*).

Les membres de la famille INK4□

En 1994, un gène suppresseur de tumeur, désigné MTS1 (*Multiple Tumor Suppressor*), a été localisé sur le chromosome humain 9p21. Aujourd'hui, ce gène sert de prototype pour la famille d'inhibiteurs INK4, il est appelé p16/INK4a. L'analyse détaillée de la région chromosomique 9p21 a permis de découvrir la présence d'un second suppresseur de tumeur MTS2, identifié indépendamment comme un membre de la famille INK4, p15/INK4b. Deux autres membres de cette famille de gènes ont ensuite été clonés□p18/INK4c et p19/INK4d (Roussel, 1999).

Le locus qui code INK4a permet l'expression d'une seconde protéine nommée p19/ARF (*Alternative Reading Frame*) chez les rongeurs et p14/ARF chez l'humain (Sharpless and DePinho, 1999). Les transcrits de ces protéines sont issus de deux promoteurs indépendants, ils contiennent un premier exon spécifique (exon 1□ ou exon 1□) suivi de deux exons communs E2 et E3. Ces exons sont traduits à partir de cadres de lecture différents, ce qui explique l'absence d'homologie de séquence entre ces deux protéines. p19/ARF est également un suppresseur de tumeur, mais ce n'est pas un inhibiteur de Cdk. Il interagit avec Mdm2 (HDM2 chez l'humain) bloquant ainsi la dégradation de sa cible principale, la protéine suppresseur de tumeur p53 (Sherr and Weber, 2000).

In vitro, les protéines de la famille INK4 ont des activités similaires. Lorsqu'on force leur expression, elles inhibent l'activité des Cdk4/6, entraînant un arrêt des cellules en G1 (Thullberg *et al.*, 2000). Les INK4, en se fixant sur les Cdk à l'opposé du site de fixation de la Cycline, induisent un changement conformationnel de la Cdk (Pavletich, 1999). Celui-ci altère le site de fixation de la Cycline et réduit l'affinité pour l'ATP. Ces deux mécanismes diminuent considérablement l'activité kinase des Cdk4/6. Ces observations supportent l'idée que la fixation des INK4 entraîne une diminution de l'affinité de la Cycline pour la CDK résultant en une augmentation du taux de dissociation du complexe Cdk/Cycline.

Les gènes de la famille des INK4 sont différemment exprimés pendant le développement de la souris. INK4c et INK4d sont largement et abondamment exprimés pendant l'embryogenèse et tout au long de la vie de l'adulte, alors que INK4a et INK4b ne sont pas exprimées avant la naissance et sont très faiblement détectées dans les souris âgées (Roussel, 1999).

Les membres de la famille KIP/CIP

Les trois membres de la famille CIP/KIP p21^{WAF1/CIP1/SID1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2} contiennent une séquence conservée dans leur région aminoterminal, qui est suffisante et nécessaire pour la fixation et l'inhibition des Cdk (Gartel and Tyner, 2002). Ces CKI se fixent aux Cyclines et aux Cdk individuellement, mais ils ont une plus forte affinité pour les complexes Cdk/Cycline. *In vitro*, ces inhibiteurs peuvent bloquer l'activité de tous les complexes Cdk/Cycline, bien qu'ils présentent certaines préférences pour les complexes contenant Cdk2. L'analyse structurale du complexe ternaire p27/Cycline A/Cdk2 montre que p27 interagit directement avec la Cycline A et Cdk2. p27 s'insère dans le site catalytique de Cdk2 induisant un changement conformationnel qui bloque le site de fixation de l'ATP (Morgan, 1996). Les similitudes de structures primaires entre les trois membres de la famille CIP/KIP suggèrent qu'ils interagissent tous de la même façon avec les complexes Cdk/Cycline. Il a également été montré que ces inhibiteurs peuvent empêcher l'activation des Cdk par la CAK (Sherr and Roberts, 1995). Bien que les CKI de la famille CIP/KIP aient été isolés en tant qu'inhibiteurs, ils ont aussi été détectés dans des complexes Cycline D/Cdk actifs. Labaer et ses collaborateurs ont montré que p21 et p27 facilitent la formation et stabilisent les complexes Cycline D/Cdk (LaBaer *et al.*, 1997). p27 s'associe principalement aux complexes Cycline D/Cdk lors de la progression dans le cycle cellulaire. Ceci constitue une réserve de p27 qui peut être mobilisée en présence de facteurs anti-prolifératifs. Par exemple, l'addition de TGF β (anti-mitogène dans certaines cellules) active l'expression de p15 qui se fixe spécifiquement aux complexes Cycline D/Cdk, induisant la libération de p27 qui va alors inhiber les complexes Cycline E/Cdk2 (Reynisdottir *et al.*, 1995).

Les trois membres de la famille CIP/KIP interviennent dans la régulation de la progression en G1/S bien que p21 pourrait également avoir un rôle en G2/M (Taylor and Stark, 2001; Vidal and Koff, 2000). p21 est induit en réponse à de nombreux stimuli mitogènes et à des dommages à l'ADN. Elle est fortement exprimée dans les cellules en différenciation et en sénescence. De plus, il a été montré que p21 contient dans sa région carboxyterminale un site de fixation pour la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), une sous unité de l'ADN polymérase α qui permet la réplication et la réparation de l'ADN. Au travers de son

interaction avec PCNA, p21 peut bloquer la synthèse d'ADN (Waga *et al.*, 1994). Plusieurs études ont suggéré que p21 pourrait aussi réguler le mécanisme de réparation de l'ADN par son interaction avec PCNA (Cooper *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1994; Umar *et al.*, 1996). p27 est détectée dans des cellules soumises à l'inhibition de contact ou carencées en sérum (Vidal and Koff, 2000). Son expression augmente lorsque les cellules deviennent quiescentes et diminue lorsque les cellules réentrent dans le cycle cellulaire. En effet, après stimulation des cellules par le sérum, p27 est phosphorylée par les complexes Cycline E/Cdk2 actifs à la transition G1/S. Skp2, protéine à boîte F du SCF, se lie alors à p27 et induit son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome 26S (Pagano *et al.*, 1995). p57 a été isolée sur la base de son homologie avec p21 et p27 et son expression présente une certaine spécificité tissulaire (Vidal and Koff, 2000).

1.1.4 Régulation des différentes phases du cycle cellulaire

a) L'entrée dans le cycle

La prolifération des cellules de mammifères est strictement régulée par des signaux externes qui contrôlent l'entrée et la sortie du cycle cellulaire en phase G1. En effet, les cellules peuvent sortir du cycle et entrer en phase de quiescence si les conditions extérieures ne sont pas optimales pour la prolifération. Par exemple, l'absence de facteurs de croissance ou de contacts cellule-matrice extracellulaire induit l'entrée en quiescence. De même, lorsque les cellules sont confluentes, elles cessent de proliférer par inhibition de contact.

Les facteurs de croissance et l'adhérence des cellule à la matrice extracellulaire

La prolifération cellulaire est régulée par les facteurs de croissance solubles et les protéines de la matrice extracellulaire qui se fixent respectivement aux récepteurs tyrosine kinase et aux intégrines. La matrice extracellulaire et les facteurs de croissance coopèrent pour activer la prolifération cellulaire, l'absence de contact cellule-matrice ou de facteurs de croissance suffit pour inhiber la prolifération. La structure transmembranaire des intégrines et des récepteurs tyrosine kinase leur permet d'être des transducteurs de signaux de la surface de la cellule vers le cytoplasme. Ces deux types de récepteurs partagent d'ailleurs une partie des voies de signalisations cytoplasmiques à travers l'activation des membres de la famille des GTPases Rho et Ras. Il s'ensuit alors l'activation d'une cascade de protéine de type MAPKKK/MAPKK/MAPK comme Raf/MEK1/Erk et PI3K/PDK1/AKT (figure 9). En général, ces cascades conduisent à la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour

l'entrée en division. Mais, elles peuvent également inhiber ou au contraire induire la dégradation de protéines importante pour la progression dans le cycle cellulaire.

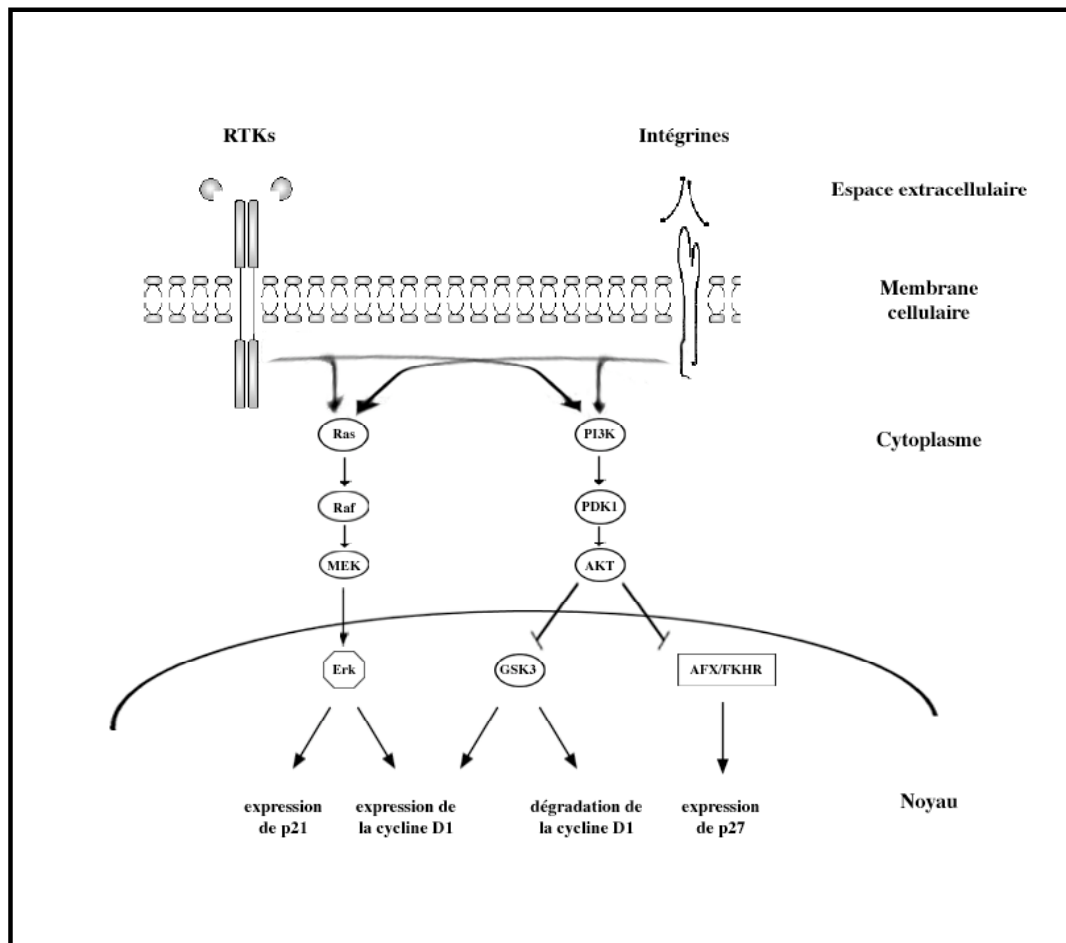


Figure 9 : Régulation de la transition G0/G1 via les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) et les intégrines

Cas de la Cycline D

La Cycline D1 joue un rôle primordial dans l'entrée en prolifération. Et de façon intéressante, l'ARNm et la protéine sont synthétisés, uniquement si les cellules quiescentes sont stimulées par des facteurs mitogènes en présence d'adhésion cellule-matrice (Bohmer *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1996). Il a été montré que l'expression de la Cycline D1 est intimement liée à l'activation de Erk. La voie Ras/Raf/MEK/Erk active directement la transcription du gène de la cycline D1 (Lavoie *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1997) (figure 9). Cependant, Erk doit être activé, en synergie, par les récepteurs tyrosine kinases et les intégrines pour permettre une induction efficace de la cycline D1 (Roovers *et al.*, 1999). De plus, l'accumulation de la

Cycline D1 est contrôlée par la régulation de sa dégradation qui est également dépendante de la cascade Ras. La Cycline D1 a une demi-vie très courte (environ 20 minutes). Dès qu'elle s'associe à Cdk4, la Cycline D1 est phosphorylée sur le résidu T286 par GSK3 β (Glycogen Synthase 3 β), ce qui entraîne sa translocation dans le cytoplasme et sa dégradation par le protéasome (Diehl *et al.*, 1998). Cependant, GSK3 β peut être inhibée par phosphorylation par AKT. La voie PI3K/AKT, activée par les intégrines et les récepteurs tyrosine kinase, est donc importante pour la stabilité de la Cycline D1 et son accumulation (figure 9). Cependant, d'autres équipes ont proposé que PI3K serait aussi impliquée dans l'activation de la transcription de la cycline D1 (Gille and Downward, 1999; Takuwa *et al.*, 1999). En effet, GSK3 β joue également un rôle dans la dégradation de la β -caténine. Or, la β -caténine est un cofacteur du facteur de transcription TCF/LEF (*T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*), qui active la transcription de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans le contrôle de la prolifération comme la cycline D1, c-myc et jun (Aplin *et al.*, 1999; Kikuchi, 2000) (figures 9 et 10). La voie PI3K/AKT est donc doublement importante pour l'accumulation de la Cycline D1. En inhibant GSK3, elle permet d'une part l'activation de la transcription de la cycline D1 et d'autre part l'inactivation de la dégradation de la protéine.

Cas des CKI

p27 est fortement exprimée dans des cellules rendues quiescentes par privation de sérum ou par absence de contact avec la matrice. Par conséquent, l'activation des récepteurs RTK et des intégrines semble nécessaire à la diminution de l'expression de p27 (Assoian and Zhu, 1997). Des études récentes montrent que AKT, en aval de la PI3K, phosphoryle les facteurs de transcription de la famille de AFX/FKHR. La phosphorylation de ces facteurs de transcription induit leur translocation dans le cytoplasme et par conséquent l'absence d'activation de la transcription de p27 (Medema *et al.*, 2000) (figure 9). De plus, l'accumulation de la Cycline D1 permet la formation des complexes cycline D/Cdk4, 6. Ces complexes partiellement actifs phosphorylent pRb, qui commence alors à libérer les membres de la famille des E2F. Les E2F libres activent la transcription et donc l'accumulation de la Cycline E qui s'associe à Cdk2. La formation de ce nouveau complexe a au moins trois conséquences fonctionnelles. D'une part, il titre p27 en coopération avec le complexe Cycline D1/Cdk4, 6. D'autre part, Cycline E/Cdk2 phosphoryle p27, ce qui induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Pagano *et al.*, 1995; Vlach *et al.*, 1997). Enfin, Cycline E/Cdk2 phosphoryle pRb ce qui permet la pleine activation des E2F.

Au contraire de p27, p21 n'est pas exprimée en quiescence, mais elle est rapidement induite après stimulation des cellules avec du sérum. Son expression chute ensuite, coïncidant avec l'activation du complexe Cycline E/Cdk2 en fin de G1 (Bosch *et al.*, 1998; Bottazzi *et al.*, 1999). L'induction de p21, en début de G1, est dépendante de l'activation de la voie MEK/Erk (figure 9). L'activation de Erk, par les récepteurs RTK, uniquement, peut être suffisante pour activer la transcription de p21 (Bottazzi *et al.*, 1999).

Le rôle des CKI, p21 et p27, s'est compliqué lorsqu'il a été mis en évidence que ces CKI favorisent la formation des complexes Cycline D1/Cdk4, 6 (Cheng *et al.*, 1999a; LaBaer *et al.*, 1997). De plus, p21 et p27 sont présents dans des complexes Cycline D1/Cdk4, 6 actifs (Cheng *et al.*, 1999a). À l'inverse des complexes Cycline D1/Cdk 4, 6/p27, les complexes Cycline E/Cdk2/p27 sont inactifs (Sherr and Roberts, 1999). Il semble que les complexes Cyclines D1/Cdk4, 6 actifs titrent p27 et p21 permettant l'activation des complexes Cycline E/Cdk2 en fin de G1.

Les molécules d'adhésion cellule-cellule

L'inhibition de contact est le mécanisme fréquemment invoqué pour expliquer la diminution du taux de croissance quand les cellules entrent en contact avec d'autres cellules voisines. La perte de la capacité des cellules à entrer en inhibition de contact est habituellement associée aux taux de croissance anormale des cellules cancéreuses. En culture, les cellules "normales" entrent en inhibition de contact lorsqu'elles arrivent à confluence, elles quittent alors le cycle cellulaire pour entrer en quiescence. En dépit de l'importante utilisation du concept d'inhibition de contact, le mécanisme moléculaire de ce phénomène reste largement méconnu. De nombreuses données suggèrent que les cadhérines jouent un rôle direct dans l'inhibition de contact (figure 10). Les cadhérines sont des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellule-cellule. Les interactions entre les molécules de cadhérines de cellules voisines entraînent la liaison des fibres d'actine du cytosquelette aux cadhérines via des complexes protéiques contenant la β -caténine, l' α -caténine et la vinculine (Aplin *et al.*, 1999). Les cadhérines peuvent réguler la voie de signalisation qui dépend de la β -caténine en contrôlant dynamiquement le "pool" de β -caténine libre capable d'activer la transcription des gènes cibles de TCF/LEF (Fagotto *et al.*, 1996). En présence de nombreux contacts cellule-cellule, la majorité de la β -caténine est liée, donc séquestrée par les cadhérines, ce qui l'empêche d'activer les gènes cibles de TCF/LEF et pourrait conduire à l'arrêt de la prolifération. Cependant, il n'a pas été démontré que cette voie est directement responsable de l'arrêt de la prolifération par inhibition de contact.

D'autres part, il a été proposé que l'inhibiteur de Cdk, p27, est impliqué dans l'arrêt de la prolifération dépendant des cadhérines N et E (Levenberg *et al.*, 1999; St Croix *et al.*, 1998). Mais, contrairement au mécanisme liant les cadhérines à la régulation de l'expression de la cycline D1, le mécanisme moléculaire menant à l'accumulation de p27 n'est pas encore connu. Il a été proposé que l'adhésion dépendante de la E-cadhérine régule indirectement le niveau d'expression et la prolifération en inhibant l'activation des récepteurs RTK par les facteurs de croissance (St Croix *et al.*, 1998).

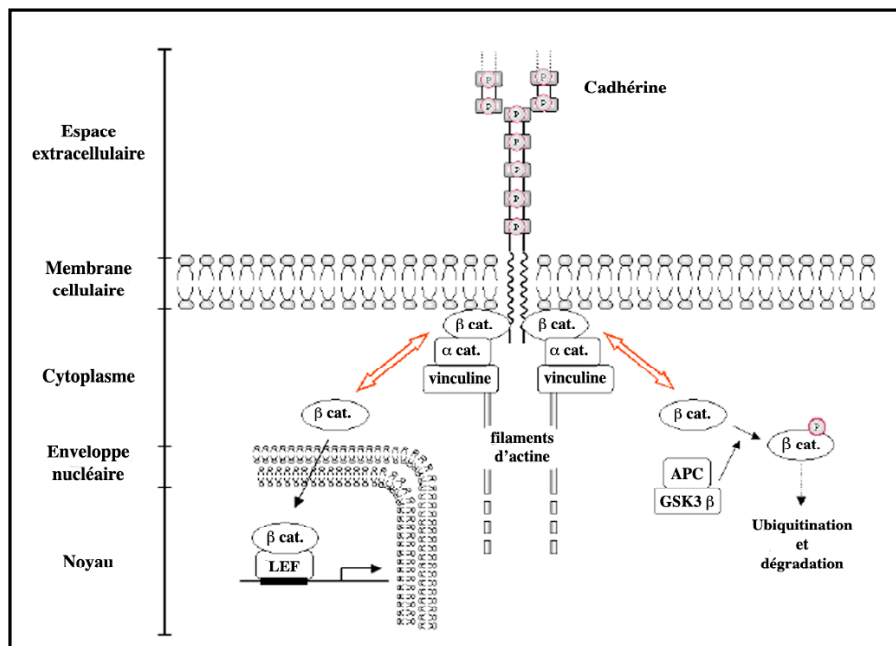


Figure 10 : Action des cadhérines dans le contrôle de la prolifération

b) La réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est le processus permettant à une cellule d'obtenir une copie complète et fidèle de l'information génétique avant la division cellulaire. Le mécanisme de l'initiation de la réplication a été initialement proposé à partir d'une étude sur le modèle bactérien *Escherichia coli* par Jacob et ses collaborateurs (Jacob and Brenner, 1963). Un site d'initiation de la réplication avec une séquence nucléotidique bien déterminée a pu être mis en évidence et a été appelé origine de réplication (ori). Les petits génomes de bactéries et de virus répliquent leur génome à partir d'une origine de réplication unique. Par contre, dans les grands génomes des cellules eucaryotes pour assurer une duplication précise et efficace, l'initiation a lieu au niveau de multiples origines réparties le long des chromosomes. Chez *S. cerevisiae*, ces origines de réplication, appelées ARS (Autonomously Replicating Sequences), sont

également bien caractérisées et possèdent des séquences très conservées entre elles (Marahrens and Stillman, 1992). Mais, chez les eucaryotes supérieurs la situation est plus complexe. Le nombre d'origine de réplication est beaucoup plus important, leur taille devient variable et il n'existe plus de séquence consensus. La réplication des loci codant la β globine et la dihydrofolate réductase reste aujourd'hui la plus étudiée (Gilbert, 2001).

Formation des complexes pré-réplicatifs (pré-RC)

L'initiation de la réplication débute, par la formation d'un complexe pré-réplicatif (pré-RC) au niveau des origines de réplication pendant la phase G1 du cycle cellulaire (Bell and Dutta, 2002) (figure 11). Le complexe Orc (*Origin Recognition Complex*) formé de six sous unités (Orc1-6) fixe l'ATP avant de se lier sur les origines de réplication. Puis, il recrute deux facteurs essentiels, l'ATPase Cdc6 et Cdt1. Ces deux protéines permettent l'accrochage des 6 protéines du complexe MCM (MCM 2-7, *Mini-Chromosome Maintenance*). Ce complexe possède une activité hélicase, mais celle-ci est inactive au sein du pré-RC pendant la phase G1. Chez *S. cerevisiae*, une autre protéine, MCM10/Dna43, est présente dans le pré-RC et est nécessaire pour le recrutement des MCM (Homesley *et al.*, 2000).

Les mécanismes empêchant la reréplication

L'assemblage des pré-RC, une fois et une seule fois pendant le cycle cellulaire, représente le principal mécanisme qui empêche la reréplication. La compétence à former des pré-RC est perdue dès l'initiation de la réplication et est régulée par les Cdk qui permettent l'activation des pré-RC présents mais bloquent la formation de nouveaux pré-RC (Nguyen *et al.*, 2001; Woo and Poon, 2003). Par conséquent, la formation des pré-RC ne peut avoir lieu que lorsque les activités kinase Cdk1 et Cdk2 sont absentes, c'est-à-dire pendant la fenêtre de temps allant de la fin de la mitose à la fin de la phase G1. Au moins quatre mécanismes empêchent que plusieurs cycles réplicatifs se succèdent en phase S, G2 et M. Tout d'abord, les Cdks actives phosphorylent les MCM, Cdc6 et Orc, inhibant ainsi l'assemblage d'autres complexes pré-RC. La phosphorylation par Cycline A/Cdk2 de Cdc6 provoque son inactivation en induisant soit sa dégradation (chez la levure; (Elsasser *et al.*, 1999)) soit son export hors du noyau (chez les mammifères; (Petersen *et al.*, 1999)) (figure 11).

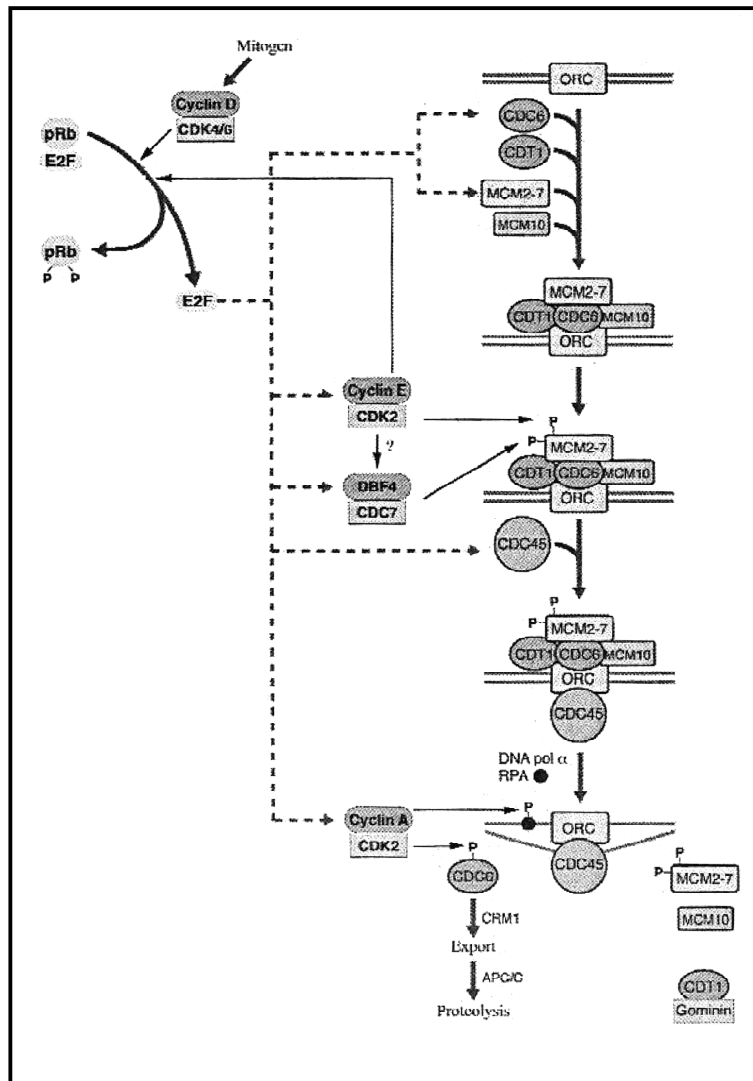


Figure 11: Contrôle moléculaire de la réplication

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'inactivation des MCM par les Cdk. Dans le premier, la phosphorylation des MCM par Cyclin A/Cdk2 inhiberait directement l'activité hélicase du complexe (Ishimi *et al.*, 2000). Dans le second, la phosphorylation des MCM par les complexes Cdk/cycline chez la levure entraînerait l'exportation du complexe hors du noyau (Labib *et al.*, 1999). Dans le dernier, la phosphorylation par Cycline B/Cdk1 permettrait de détacher les MCM de la chromatine en mitose et d'empêcher leur réassociation à l'ADN (Fujita *et al.*, 1998). De même, il a été suggéré que la phosphorylation de Orc par Cycline A/Cdk1-2 provoquerait son décrochement de la chromatine et son exportation hors du noyau (Findeisen *et al.*, 1999; Laman *et al.*, 2001). Enfin, Cdt1 est la cible de la géminine, un inhibiteur protéique naturel de la réplication, qui apparaît dès le début de la phase S et qui reste présent en S, G2 et M pour empêcher le recrutement des MCM (Mihaylov *et al.*, 2002) (figure 11).

Initiation de la réplication - Rôle des kinases Cdc7 et Cdk2

Les complexes pré-RC doivent être activés par l'association de multiples autres protéines à la transition G1/S afin que la synthèse de l'ADN puisse commencer. La formation et l'activation de cette machinerie de synthèse de l'ADN sur l'origine sont contrôlées par au moins deux kinases: la DDK (*Dbf4* Dependant Kinase, Cdc7/Dbf4) et Cdk2 (Jares *et al.*, 2000; Woo and Poon, 2003). L'activité de ces deux kinases est nécessaire pour l'association au pré-RC de la protéine Cdc45 qui est un facteur essentiel pour le recrutement de la machinerie d'élongation de la réplication et notamment les ADN polymérase.

La kinase Cdc7 est recrutée dès G1 sur les origines chez le Xénope, mais elle est inactive. À la transition G1/S, elle est activée par la protéine régulatrice Dbf4, qui commence à s'accumuler, et phosphoryle les MCM, principalement MCM2 (Lei *et al.*, 1997) (figure 11). Cette phosphorylation induit un changement conformationnel des MCM qui peuvent alors s'associer à la protéine Cdc45 (Geraghty *et al.*, 2000). Chez le xénope et *S. pombe* contrairement à *S. cerevisiae*, la protéine MCM10 n'est pas requise dans la formation du pré-RC, mais pour le recrutement de Cdc45. Il a été récemment démontré que chez *S. pombe* MCM10 est nécessaire pour le recrutement de Cdc7/Dbf4 sur les pré-RC et pour stimuler la phosphorylation des MCM par cette kinase (Lee *et al.*, 2003). En effet, alors que MCM2 est efficacement phosphorylée par Cdc7/Dbf4 *in vitro*, elle devient un moindre substrat lorsqu'elle est dans le complexe MCM, ce qui n'est plus le cas en présence de MCM10.

Bien que Cdk2 soit indispensable à l'activation de la réplication, le rôle particulier des complexes Cycline A/Cdk2 et Cycline E/Cdk2 et leurs substrats ne sont pas clairement définis. Il a été effectivement montré que Cdk2 phosphoryle Orc, les MCM et Cdc6, mais ces phosphorylations semblent uniquement impliquées dans l'inhibition de la reréplication. En effet, les mutants non phosphorylables n'empêchent pas l'initiation de la réplication (Bell and Dutta, 2002). Cdc7 est aussi un substrat de Cdk2 et la mutation de l'un de ces sites de phosphorylation réduit son activité kinase (Masai *et al.*, 2000). Cependant, il n'a pas encore été démontré que la phosphorylation par Cdk2 active Cdc7 (figure 11). Néanmoins, l'activité Cdk2 est nécessaire pour le recrutement de Cdc45 comme Cdc7/Dbf4 (Mimura and Takisawa, 1998; Zou and Stillman, 1998; Zou and Stillman, 2000).

L'élongation et la terminaison de la réplication

Après le recrutement de Cdc45 au pré-RC, la chromatine est ouverte au niveau des origines par l'ADN hélicase (peut être les MCM) et la fourche de réplication se propage de façon bidirectionnelle, de part et d'autre de l'origine (Diffley and Labib, 2002). L'ADN simple brin

est stabilisé par les protéines RPA (*Replication Protein A*) qui appartiennent à la famille de protéine SSB (*Single Strand Binding protein*) (figure 12). L'ADN polymérase α -primase synthétise alors une amorce ARN-ADN requise aussi bien pour la réplication continue dans le sens 5'-3' du brin en avance, "leading strand", que pour la réplication discontinue dans le sens 3'-5' du brin retardé, "lagging strand", (figure 12). La réplication discontinue fait intervenir la synthèse de petits fragments d'ADN comportant une amorce d'ARN, appelés fragments d'Okasaki. Les enzymes qui assurent ensuite l'élongation sont les polymérases β et γ (figure 12). La synthèse d'ADN doit être extrêmement fidèle; il existe donc un certain nombre de protéines auxiliaires dont la fonction est d'assurer la processivité et la précision des polymérases. Parmi ces protéines, le RFC (*Replication Factor C*) permet l'échange de polymérases et le chargement de PCNA sur l'ADN double brin (figure 12). PCNA est un homotrimère qui forme un anneau autour de l'ADN et se fixe à l'ADN polymérase β , augmentant ainsi sa processivité. Les fragments d'Okasaki sont reliés par l'ADN ligase après la coupure de l'amorce d'ARN (figure 12). La dernière étape consiste à décaténer et désenrouler l'ADN néo-synthétisé ; ce sont les ADN topoisomérases I et II qui, en coupant respectivement le simple et double brin d'ADN, vont libérer les super tours en avant de la fourche de réplication (Duguet, 1997) (figure 12). La terminaison de la réplication a lieu lorsque les deux fourches de réplication de sens opposé se rencontrent et que les ADN naissant des deux fourches sont reliés.

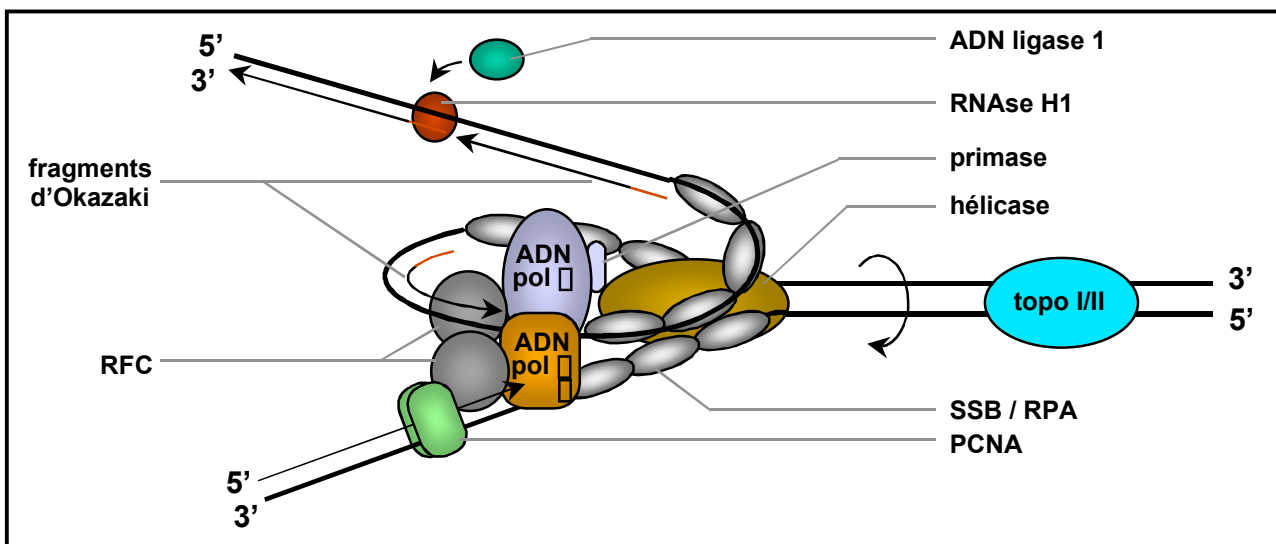


Figure 12 : Schématisation de la fourche de réplication chez les eucaryotes

c) La mitose

La mitose comporte 5 phases, décrites essentiellement sur la base de la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire. La prophase correspond à la fin de la condensation des chromosomes et la rupture de l'enveloppe nucléaire. La prometaphase est la période de formation du fuseau mitotique et du début de l'alignement des chromosomes. La métaphase est la phase d'alignement des chromosomes dans le fuseau, à équidistance des pôles. L'anaphase voit la disjonction des chromosomes et le mouvement de ceux-ci vers les pôles. Enfin, au cours de la télophase, les chromosomes ayant atteint les pôles du fuseau, décondensent, le fuseau disparaît, l'enveloppe nucléaire se reforme et la cytotédiérèse permet la formation de deux cellules filles (figure 13).

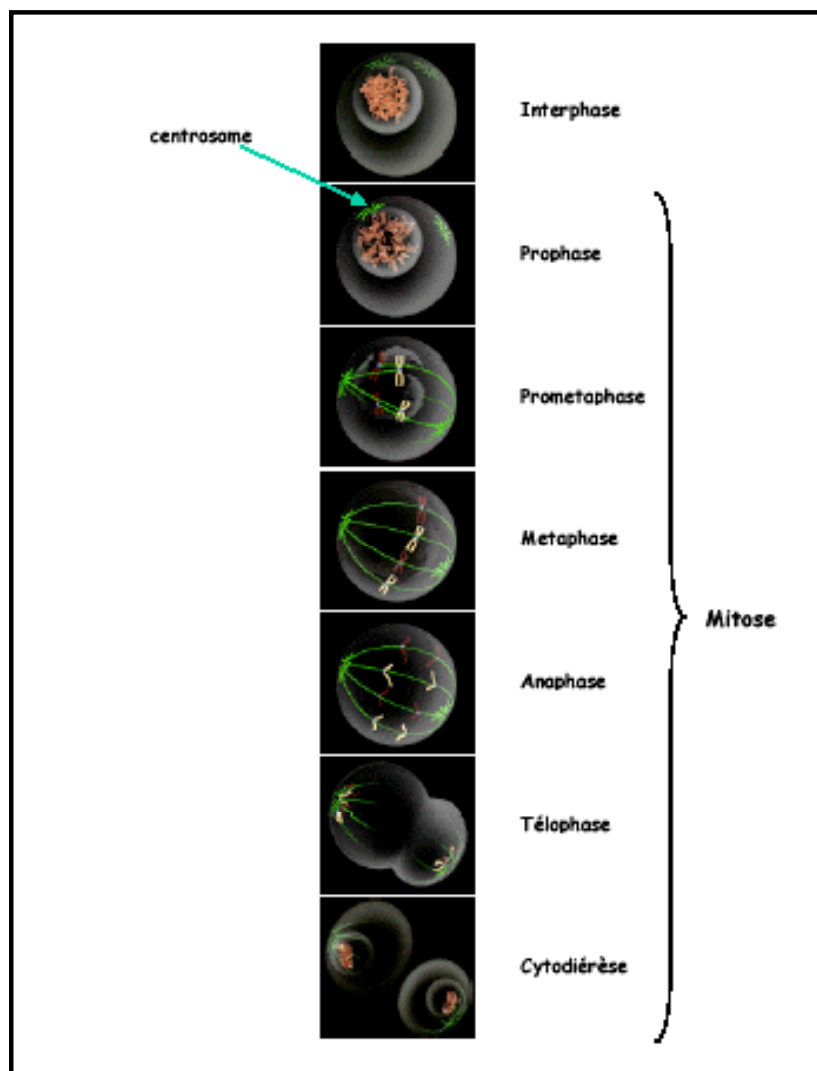


Figure 13 : les différentes phases de la mitose

La transition G2/M

La phase G2 est présentée comme une phase de préparation à la mitose, mais elle est très peu caractérisée. Néanmoins, elle est marquée par le début de la condensation des chromosomes. Les fonctions du complexe Cycline A/Cdk1, actif en G2, sont encore inconnues. Cependant, il semblerait qu'il participe à l'activation du complexe Cycline B/Cdk1 qui est le principal régulateur de l'entrée en mitose (Furuno *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1992). Les cellules sont irréversiblement engagées vers la mitose dès l'activation des complexes Cycline B/Cdk1. Dans la plupart des cellules, ces complexes sont de deux types selon la nature de la sous unité Cycline, B1 ou B2, celles-ci diffèrent par leur extrémité terminale. La Cycline B2 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi, indépendamment du cycle cellulaire, et serait nécessaire pour initier le désassemblage de l'appareil de Golgi (Draviam *et al.*, 2001). Le gène codant la cycline B1, contrairement à celui de la cycline B2, est essentiel car son invalidation conduit à la mortalité des souris *in utero* (Brandeis *et al.*, 1998). Pendant l'interphase, la Cycline B1 fait la navette entre le cytoplasme et le noyau et elle s'accumule brusquement dans le noyau en prophase où elle se lie à l'appareil mitotique.

La Cycline B1 est synthétisée à partir de la phase S, s'accumule pendant la phase G2 et s'associe à Cdk1. Les complexes Cycline B1/Cdk1 phosphorylés par la CAK, sont inactivés au fur et à mesure de leur formation par la phosphorylation inhibitrice des résidus T14 et Y15 par les kinases Wee1 et Myt1 (Lee *et al.*, 2001; McGowan and Russell, 1993; Rothblum-Oviatt *et al.*, 2001). Quatre mécanismes sont responsables de l'activation du complexe Cycline B/Cdk1 lorsque la cellule est prête à entrer en mitose.

- Tout d'abord, les kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 sont inactivées à la transition G2/M par phosphorylation (Booher *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1995). De plus, Tome-1 (*Trigger of Mitotic Entry*), associée à Skp1, permet la dégradation par le protéasome de Wee1 phosphorylée en fin de G2 (Ayad *et al.*, 2003).

- Par ailleurs, les deux résidus T14 et Y15 de Cdk1, sont déphosphorylés par les phosphatases Cdc25. Les fonctions respectives des trois Cdc25 n'ont pas encore été clairement établies. Cdc25B et C sont connues comme des régulateurs mitotiques. Il semblerait que Cdc25B amorce l'activation des complexes Cycline B/Cdk1, qui à leur tour activent Cdc25C, créant ainsi un système d'amplification nécessaire pour l'engagement irréversible en mitose (Nilsson and Hoffmann, 2000). La kinase polo, Plk1 (*Polo Like Kinase*), peut également activer par phosphorylation Cdc25C (Kumagai and Dunphy, 1996). Il

a d'ailleurs été montré que la Plk1 est requise pour l'hyperphosphorylation de Cdc25C et pour l'activation de Cycline B/Cdk1 à la transition G2/M (Abrieu *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998). Enfin, Cdc25A semblait plutôt impliquée dans l'activation de Cdk2 et donc dans l'entrée en phase S. Cependant, il a été mis en évidence que Cdc25A est phosphorylée par les complexes Cycline B/Cdk1 à la transition G2/M, ce qui prévient sa dégradation par le protéasome. La stabilisation de Cdc25A lui permet de maintenir son activité, au cours de la mitose, et d'activer les complexes Cycline B/Cdk1 (Mailand *et al.*, 2002).

- La phosphorylation de la Cycline B est nécessaire à l'activation de Cdk1 par Cdc25 (Peter *et al.*, 2002). Il a été suggéré que la phosphorylation de la Cycline B1 par des kinases comme Plk1 faciliterait l'association Cycline B1/Cdc25C et par conséquent l'activation de Cdk1.

- La localisation subcellulaire des complexes Cycline B/Cdk1 et de leurs régulateurs participe à la régulation de la mitose. En effet, seule une régulation spatio-temporelle appropriée des complexes Cycline B/Cdk1 permet la coordination entre les évènements nucléaires (rupture de l'enveloppe nucléaire et condensation des chromosomes) et les évènements cytoplasmiques (désorganisation de l'appareil de Golgi et formation du fuseau mitotique). Par conséquent, l'étude des mécanismes responsables de la distribution subcellulaire de la Cycline B et de ces régulateurs est importante pour mieux comprendre la régulation de la transition G2/M. Les différents régulateurs sont capables d'activer, uniquement, la fraction de complexes Cycline B/Cdk1 auxquels ils peuvent accéder. Ainsi, Wee1 qui est nucléaire et Myt1 qui est associée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi inactivent différentes populations de complexes Cycline B/Cdk1 avant l'entrée en mitose. De même, Cdc25C est cytoplasmique pendant l'interphase et entre dans le noyau juste avant la mitose alors que Cdc25B est uniquement cytoplasmique. Enfin, Plk1 est à la fois nucléaire et cytoplasmique (Pines, 1999). Par ailleurs, il a été montré récemment que l'activation des complexes Cycline B/Cdk1 commence au niveau des centrosomes (Jackman *et al.*, 2003). Plk1 également présente au niveau des centrosomes peut y activer la Cycline B et Cdc25C par phosphorylation, ce qui favorise leur interaction et l'accumulation du complexe Cycline B/Cdk1 activé aux centrosomes. De même, Aurora-A est capable de phosphoryler et d'activer Cdc25B au niveau des centrosomes (Dutertre *et al.*, 2004). Il a également été observé une localisation transitoire des complexes Cycline A/Cdk1 aux centrosomes en début de mitose (Bailly *et al.*, 1992). Tous ces résultats laissent penser que toutes ces protéines pourraient participer à l'activation des complexes Cycline B/Cdk1 aux centrosomes qui constitueraient une structure au sein de laquelle est réalisée l'intégration des processus qui

interviennent dans l'entrée en mitose (Doree, 2003; Dutertre *et al.*, 2004; Jackman *et al.*, 2003).

De plus, les mécanismes de régulation de la localisation des complexes Cycline B/Cdk1 contrôlent son accès à divers substrats qui sont responsables des différents aspects de la mitose. Il est connu depuis longtemps que la Cycline B1 est cytoplasmique en interphase alors qu'elle devient nucléaire en prophase. L'étude de mutants de délétion de la Cycline B1 a mis en évidence un signal de rétention cytoplasmique (CRS, *Cytoplasmic Retention Signal*) situé dans la partie N-terminale de la protéine. Cette séquence est responsable de la localisation cytoplasmique de la Cycline B1 en interphase car en absence de celle-ci la Cycline B1 est nucléaire (Pines and Hunter, 1994). D'autres études plus récentes indiquent que la Cycline B1 fait constamment la navette entre le cytoplasme et le noyau et que la localisation cytoplasmique de la Cycline B1 pendant l'interphase résulte plutôt d'un import nucléaire constant et d'un rapide re-export nucléaire. Cet export est dû à la présence d'un signal d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*), identifié dans la séquence CRS, capable de lier le facteur d'export nucléaire CRM1 (Hagting *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). La régulation de la localisation de la Cycline B1 semble contrôlée par deux mécanismes distincts. Le premier est responsable de l'augmentation rapide de l'import nucléaire tandis que deuxième permet l'inhibition de l'export à la transition G2/M. Mais, tous les deux sont dépendants de l'état de phosphorylation de la Cycline B1. Il existe quatre sites de phosphorylation, conservés, dans le CRS de la Cycline B1 (sur Cycline B1 humaine : Ser126, 128, 133 et 147). La mutation de ces sites en Alanine empêche l'accumulation de la Cycline B1 dans le noyau alors que leur mutation en glutamate (qui mime une phosphosérine) l'augmente (Li *et al.*, 1997a). Yang et ces collaborateurs ont montré que la mutation des sites en glutamate empêche la liaison entre le CRS et CRM1 (Yang *et al.*, 1998). Plus récemment, il a été montré que seule la phosphorylation sur le résidu Ser 133 (équivalent du résidu Ser 147 chez l'homme) est nécessaire pour inhiber l'export de la Cycline B1, et donc faciliter son accumulation nucléaire à la transition G2/M (Yang *et al.*, 2001a). Par contre, la phosphorylation des quatre résidus sérine de la Cycline B1 est requise pour l'augmentation rapide de son taux d'import nucléaire lors de l'entrée en mitose (Hagting *et al.*, 1999). Plusieurs kinases participent à la phosphorylation de la Cycline B1 et donc à la localisation nucléaire de la protéine en prophase, citons comme exemple, la Plk1, Cdk1 et Erk2 (Borgne *et al.*, 1999; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2002).

Les événements précoces de mitoses

La condensation des chromosomes

La condensation des chromosomes est parmi les premiers événements morphologiques de la division qui aient été décrits, et elle est associée à la phosphorylation massive de nombreuses protéines impliquées dans la structure de la chromatine. L'entrée en mitose est accompagnée par une hyperphosphorylation de l'histone de liaison H1 qui est directement impliquée dans la structure de la chromatine (Introduction 1.2.3). Il semblerait que cet événement soit sous la dépendance du complexe Cycline B/Cdk1 (Langan *et al.*, 1989). En raison des caractéristiques temporelles de la phosphorylation de l'histone H1, il a longtemps été postulé que cette modification était responsable de la condensation des chromosomes en mitose (Bradbury, 1992; Roth and Allis, 1992). Or, des expériences menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que ce processus n'était pas affecté par l'absence de l'histone H1 (Ohsumi *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1995), ni par l'absence de sa phosphorylation (Guo *et al.*, 1995). Par conséquent, la fonction de cette modification reste inconnue. De manière analogue à l'hyperphosphorylation de l'histone H1, la phosphorylation de l'histone H3 semble aussi constituer un marqueur universel de la mitose (Hendzel *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2000; Kaszas and Cande, 2000; Van Hooser *et al.*, 1998). Deux familles de kinases, NIMA et Aurora, qui interviennent spécifiquement en mitose, ont été décrites comme phosphorylant l'histone H3 (De Souza *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2000).

La condensine et la topoisomérase II sont les principaux responsables du phénomène de condensation chromosomique et toutes deux sont régulées par phosphorylation (Escargueil *et al.*, 2000; Sutani *et al.*, 1999). La topoisomérase II est nécessaire au recrutement de Cdk1 sur l'ADN et est associée à l'initiation du remodelage de la chromatine de mitose (Escargueil *et al.*, 2001). La condensine crée des super-enroulements positifs de la molécule d'ADN de façon ATP dépendante. Les complexes Cycline B/Cdk1 semblent essentiels pour la fonction de la condensine ; ils permettent sa translocation dans le noyau chez *S. pombe* (Sutani *et al.*, 1999) et participent directement à son activation par phosphorylation de certaines de ses sous unités chez le *Xenope* (Kimura *et al.*, 1998; Kimura and Hirano, 2000). Il a été montré que, *in vitro* et *in vivo*, la condensine se fixe sur les chromosomes via les histones H3 présentes dans les nucléosomes (Ball *et al.*, 2002). Par ailleurs, la condensine co-localise avec les histones H3 phosphorylées et son chargement sur les chromosomes coïncide avec la phosphorylation des histones H3 sur la serine 10, réaction catalysée par la protéine Aurora B (Schmiesing *et al.*, 2000). De plus, la déplétion d'Aurora B par RNAi diminue la quantité de condensine

chargée sur les chromosomes (Giet and Glover, 2001). Cependant, d'autres travaux argumentent contre ce lien direct entre la phosphorylation de H3 et le recrutement de la condensine.

La rupture de l'enveloppe nucléaire

Pendant l'interphase, l'enveloppe nucléaire est stabilisée par une structure appelée la *lamina* nucléaire. Cependant, en début de mitose, cette structure est désassemblée à la suite de l'hyperphosphorylation de la lamine. Bien que la lamine puisse être phosphorylée par de nombreuses kinases *in vitro*, la majeure kinase ciblant la dépolymérisation de la lamine *in vivo* est Cdk1 associée à la Cycline B1 (Nigg, 1995). Le désassemblage de la *lamina* réduit la stabilité de l'enveloppe nucléaire, mais ne suffit pas à la rupture de l'enveloppe. Toutefois, les autres mécanismes nécessaires à ce phénomène restent inconnus.

La formation du fuseau mitotique

Le cycle des centrosomes

Le centrosome est le principal centre organisateur de microtubules (MTOC, *Microtubule-Organizing Center*), il assure la formation du fuseau mitotique, mais il joue également un rôle à la transition G1/S. Le centrosome est une structure complexe constituée de deux centrioles disposés perpendiculairement l'un à l'autre et entourés de matériel péricentriolaire (PCM, *Pericentriolar Material*). Parallèlement à la réplication d'ADN, la cellule duplique son centrosome et comme le génome, les centrosomes sont répartis dans chaque cellule fille à l'issue de la mitose. Sur le plan morphologique, ce cycle des centrosomes est bien décrit, mais les connaissances sur les mécanismes moléculaires de sa régulation restent très parcellaires. La réplication du centrosome passe par plusieurs phases : duplication, maturation, et séparation qui sont hautement régulées par des protéines spécifiques (figure 14). Ce mécanisme est couplé au cycle cellulaire.

Le premier lien établi entre la réplication des chromosomes et **la duplication des centrosomes** provient de travaux démontrant que Cdk2 est requis pour ces deux évènements clés de la phase S (Lacey *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999). Les complexes Cycline E/Cdk2 et Cycline A/Cdk2 semblent tous deux impliqués ; cependant leurs contributions spécifiques et la plupart de leurs cibles restent à être déterminées (Meraldi *et al.*, 1999). Néanmoins, il a été montré que Cycline E/Cdk2 participe à la duplication des centrosomes en phosphorylant notamment la nucléophosmine et la protéine CP110 (Chen *et al.*, 2002; Okuda

et al., 2000). Alors que le rôle de CP110 et de sa phosphorylation est inconnu, il a été mis en évidence que la phosphorylation de la nucléophosmine induit sa dissociation du centrosome, ce qui déclenche la duplication du centriole. Ce mécanisme pourrait constituer un système de "licensing" de la duplication du centrosome de la même façon que les pré-RC pour la réplication du génome, ce qui assurerait la coordination entre ces deux processus et limiterait la duplication une fois par cycle (Okuda, 2002). Cycline E/Cdk2 phosphoryle et active, en la stabilisant, une autre kinase appelée Mps1 qui est essentielle à la duplication du centrosome chez la levure *S. cerevisiae* (Winey and O'Toole, 2001). Cependant, les substrats de Mps1 n'ont pas été identifiés et son rôle dans la duplication du centrosome chez l'humain est très controversé (Fisk *et al.*, 2003; Fisk and Winey, 2001; Stucke *et al.*, 2002).

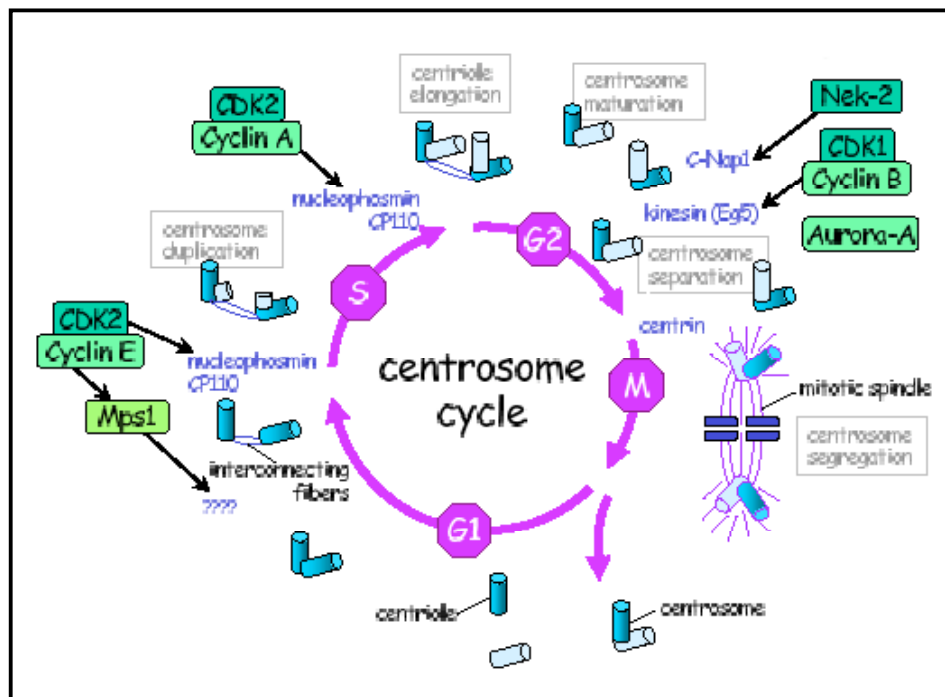


Figure 14 : Le cycle de réplication du centrosome

La maturation des centrosomes fait référence au recrutement de protéines supplémentaires au niveau du PCM, et en particulier du γ -TuRCs (γ Tubuline Ring Complex), qui a lieu juste avant l'entrée en mitose (Palazzo *et al.*, 2000). L'augmentation de la quantité de γ -tubuline dans les centrosomes est accompagnée d'une forte croissance de l'activité de nucléation des centrosomes. Les deux kinases Plk1 (Lane and Nigg, 1996; Sunkel and Glover, 1988) et Aurora-A (Berdnik and Knoblich, 2002; Hannak *et al.*, 2001), ainsi que la protéine phosphatase 4 (Helps *et al.*, 1998; Sumiyoshi *et al.*, 2002) ont été directement impliquées

dans la régulation de la maturation, mais les substrats de ces enzymes attendent d'être identifié.

La séparation des centrosomes dupliqués en deux MTOC distincts a lieu à la transition G2/M en deux étapes. La première étape est indépendante des microtubules, la cohésion entre les deux centrioles parentaux est détruite. Dans la seconde, les deux centrioles sont séparés à travers l'action de protéines motrices dépendantes des microtubules. La protéine C-Nap1 (Centrosomal Nek2 Associated Protein 1) joue un rôle important dans la cohésion entre les deux centrioles parentaux (Mayor *et al.*, 2000). Elle est liée aux deux centrioles parentaux et cette association est régulée par phosphorylation. L'état de phosphorylation de C-Nap1 dépend d'au moins deux protéines : la kinase Nek2 (NIMA Related Kinase 2) et la famille de phosphatase de type 1 (PP1) (Fry *et al.*, 1998; Helps *et al.*, 2000). Tant que l'activité de Nek2 est tenue en échec par PP1, la cohésion entre les deux centrioles persiste. Cependant, en début de mitose, PP1 est inactivée, probablement par Cdk1, et donc l'activité de Nek2 prédomine. Par conséquent, la cohésion est perdue et les deux centrioles peuvent être séparés par les protéines motrices dépendantes des microtubules (Faragher and Fry, 2003; Mayor *et al.*, 2002). L'une d'elles Eg5 est régulée par au moins deux kinases, Cdk1 et Aurora A (Blangy *et al.*, 1995; Giet *et al.*, 1999). Alors que les conséquences de la phosphorylation de Eg5 par Aurora ne sont pas connues, la phosphorylation par Cycline B/Cdk1 est nécessaire pour l'association de Eg5 au fuseau (Blangy *et al.*, 1997; Sawin and Mitchison, 1995).

Le fuseau mitotique

Les microtubules sont des assemblages non-covalents d'hétérodimères de tubulines α et β . En fin de prophase, on assiste à une redistribution spectaculaire de la tubuline intracellulaire qui s'organise en un fuseau de microtubules, sous le contrôle des centrosomes dupliqués, orientés perpendiculairement au futur plan de clivage. Les chromosomes établissent une connexion avec les microtubules qui émanent des pôles du fuseau. Cette connexion se fait au cours de la rencontre entre les microtubules et une structure associée au chromosome, appelée kinétochore. Tous les chromosomes doivent être attaché et correctement aligné au centre du fuseau avant de pouvoir être répartis en deux lots identiques. Puis, tirés par chacun des deux pôles du fuseau, les chromatides soeurs vont se diriger vers les pôles du fuseau et se répartir en deux lots identiques.

L'anaphase - La séparation des chromatides soeurs

Après la réplication, les deux copies homologues du génome, les chromatides, restent associés grâce à des complexes protéiques connus sous le nom de cohésines. Ces complexes sont formés de quatre sous unités : Scc1, Scc3, Smc1 et Smc3 (Scc pour *Sister Chromatid Cohesion* et Smc pour *Structural Maintenance of Chromosomes*). Le début de l'anaphase est caractérisé par la séparation simultanée de toutes les chromatides soeurs, elle résulte d'une perte de la cohésion entre les chromatides soeurs plutôt qu'à une augmentation des forces exercées par le fuseau mitotique sur les chromosomes. Des études chez la levure ont révélé que la séparation des chromatides soeurs dépend de la dégradation d'un inhibiteur, appelé sécurine, par protéolyse dépendante de l'ubiquitine (Nasmyth *et al.*, 2000; Yanagida, 2000). Cet inhibiteur empêche la protéase, séparase, de détruire la cohésion entre les chromatides par clivage protéolytique de la sous unité Scc1 de la cohésine (Uhlmann *et al.*, 2000). Bien que cette voie de régulation ait été conservée durant l'évolution, la situation est plus complexe chez les vertébrés où deux mécanismes différents semblent impliqués dans la destruction de la cohésion entre les bras des chromosomes et les centromères (figure 15).

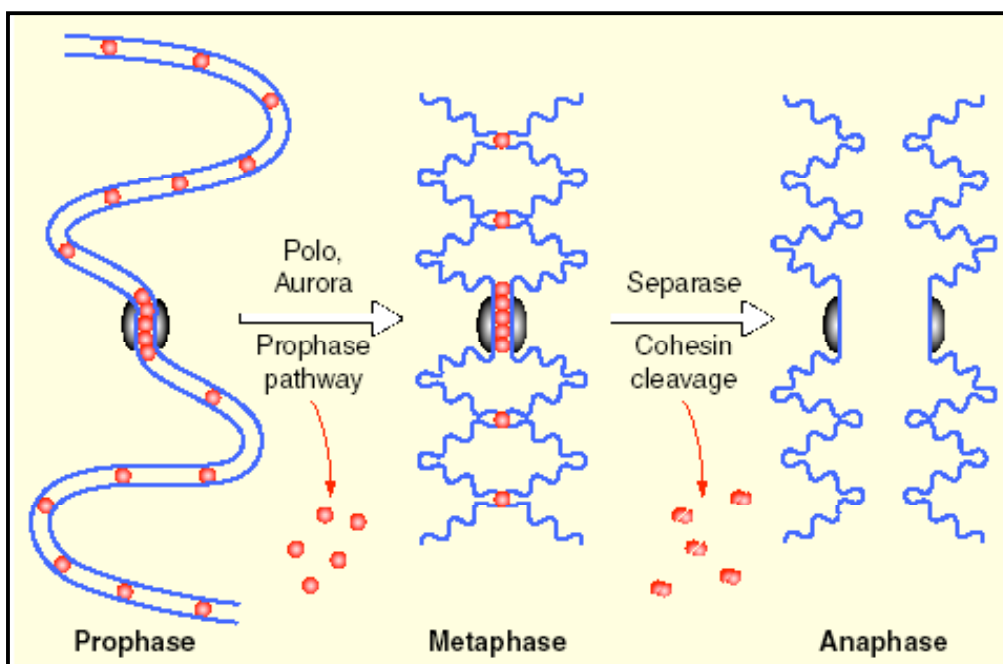


Figure 15 : Mécanisme de séparation des chromatides soeurs chez les vertébrés

La majorité de la cohésine est retirée des bras des chromosomes pendant la prophase lors de la condensation des chromosomes. Cette première vague d'élimination de la cohésine ne dépend pas de l'APC et reste encore malconnue. Cdk1 et la Polo kinase peuvent phosphoryler la cohésine *in vitro*, ce qui diminue son affinité pour la chromatine (Losada *et al.*, 2000; Sumara *et al.*, 2002). Cependant l'activité Cdk1 ne semble pas nécessaire pour la dissociation de la cohésine *in vivo*, contrairement à celle de la Polo kinase et d'Aurora B (Losada *et al.*, 2002; Sumara *et al.*, 2000). La quantité de cohésine restant au niveau des centromères est éliminée à la transition métaphase-anaphase via l'APC, probablement selon le même mécanisme que chez la levure (Waizenegger *et al.*, 2000). Il est important que la séparase soit régulée afin que la séparation des chromatides soeurs n'ait pas lieu prématurément et qu'elle s'achève efficacement en début d'anaphase. Un des régulateur clé est la sécurine qui est impliquée dans deux niveaux de régulation de la séparase. La sécurine inhibe la séparase en empêchant son accès à la cohésine et en la bloquant dans une interaction intermoléculaire qui est probablement critique pour l'activation de la protéase (Hornig *et al.*, 2002). En effet, il a été montré que la sécurine est nécessaire pour l'accumulation de la séparase dans le noyau mais aussi pour permettre à la séparase de devenir pleinement active après la dégradation de la sécurine en début d'anaphase (Agarwal and Cohen-Fix, 2002; Hornig *et al.*, 2002; Jallepalli *et al.*, 2001). Par ailleurs, la phosphorylation de la sécurine par les Cdks mitotiques augmente considérablement son affinité pour la séparase (Agarwal and Cohen-Fix, 2002). Cependant, la sécurine n'est pas le seul régulateur de la séparase. La phosphorylation de la sous unité Scc1 de la cohésine par la Polo kinase facilite son clivage par la séparase, favorisant ainsi la protéolyse de la cohésine encore liée aux chromosomes en métaphase (Alexandru *et al.*, 2001; Hornig and Uhlmann, 2004). Un autre mécanisme de régulation de la séparase, indépendant de la sécurine a été mis en évidence chez le *Xenopus*. Le complexe Cycline B/Cdk1 peut phosphoryler et inhiber directement la séparase. Une phosphatase, encore inconnue, doit alors déphosphoryler la séparase, lorsque l'activité Cycline B/Cdk1 diminue en Anaphase, pour que la séparase devienne active (Stemmann *et al.*, 2001). Enfin, la séparase peut s'autocliner, entraînant son inactivation après l'anaphase (Waizenegger *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002).

La sortie de la mitose - Rôle de l'APC

L'APC n'est pas uniquement responsable de la dégradation d'inhibiteurs de l'entrée en anaphase, il est aussi important pour la protéolyse d'autres protéines, notamment les cyclines mitotiques (Cycline A et Cycline B) et de plusieurs kinases mitotiques (les Polo kinase, les kinases de la famille NIMA et les kinases Aurora). Cependant, la dégradation de ces

différents substrats n'a pas lieu en même temps, impliquant une fine régulation de l'APC. Dans les cellules somatiques, deux formes de l'APC sont séquentiellement activées par l'association de deux protéines distinctes Cdc20 et Cdh1 (figure 16). L'APC/Cdc20 est actif à la transition métaphase/anaphase alors que l'APC/Cdh1 l'est de la fin de la mitose jusqu'en phase G1 du cycle suivant. Plusieurs mécanismes contrôlent l'activation de l'APC et par conséquent l'ordre de disparition des différents acteurs mitotiques. L'activité de l'APC/Cdc20 est dans un premier temps inhibée par Emi1, une protéine qui est elle-même dégradée en début de mitose par le SCF, suite à sa phosphorylation par Cycline B1/Cdk1 (Margottin-Goguet *et al.*, 2003). La destruction d'Emi1 permet l'activation de l'APC/Cdc20 en prométaphase qui peut alors dégrader la Cycline A (figure 16). Cependant, la dégradation de la Cycline B et de la sécurine est toujours inhibée et ce jusque l'alignement correcte des chromosomes en prométaphase. Ce mécanisme implique la protéine Mad2, sensible à l'attachement des microtubules aux kinétochores, qui séquestre Cdc20 (figure 17). L'interaction Mad2/Cdc20 semble être régulée par plusieurs kinases dont Plk et Aurora sans que les détails de cette régulation soient connus (Musacchio and Hardwick, 2002). L'APC pourrait également être régulé par phosphorylation de plusieurs de ces sous unités (Peters *et al.*, 1996) (figure 17). Il a été montré que Cdc20 se fixe et active préférentiellement l'APC phosphorylé (Kramer *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000). Au moins deux kinases phosphorylent l'APC, Cdk1 et Plk1, mais d'autres kinases pourraient également être impliquées (Kraft *et al.*, 2003). Enfin, l'APC/Cdh1 est inhibé de la phase S jusqu'en fin de mitose suite à la phosphorylation de Cdh1 par les différents complexes Cycline/Cdk (Kramer *et al.*, 2000). Chez *S. Serevisiae*, l'activation de l'APC/Cdh1 corrèle avec la déphosphorylation de Cdh1 par Cdc14 qui est activé uniquement lorsque le fuseau mitotique est correctement orienté (Visintin *et al.*, 1998). La destruction de la Cycline B permet la chute de l'activité Cdk1, ce qui entraîne la disparition du fuseau mitotique, la décondensation des chromosomes, la reformation de l'enveloppe nucléaire, le déclenchement de la cytokinèse et la transition vers la phase G1 (Irniger, 2002).

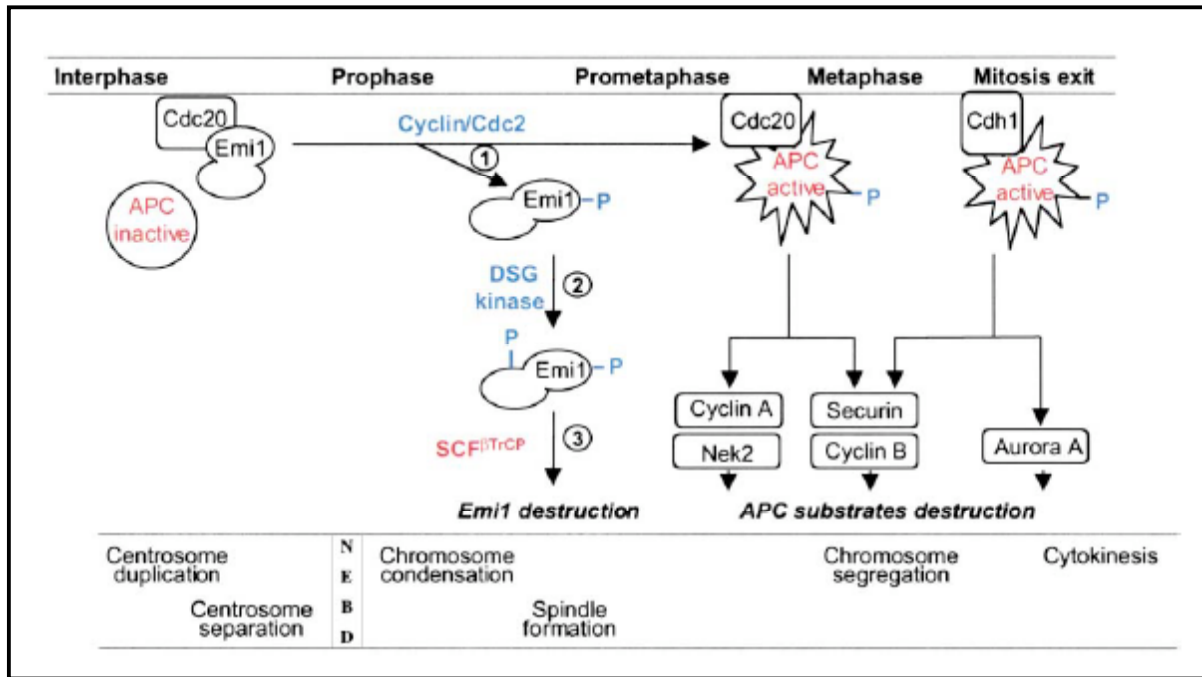


Figure 16 : Dégradation des différents acteurs mitotiques via l'APC au cours de la mitose

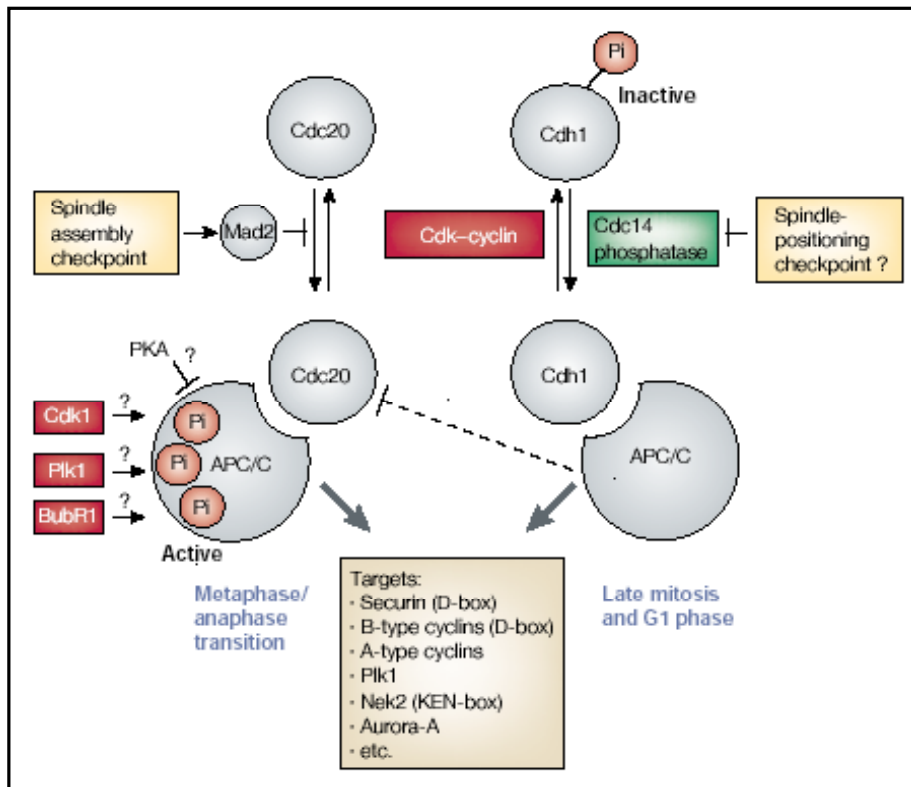


Figure 17 : Régulation des deux formes de l'APC par phosphorylation

1.2 REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

1.2.1 Les complexes Rb /E2F

a) Les protéines de la famille RB

Fonction

Le gène du Rétinoblastome (Rb) fut le premier gène suppresseur de tumeur identifié (Knudson, 1978). Il fut isolé à partir de tumeurs d'enfants atteints d'une maladie rare, le Rétinoblastome. Les mutations affectant le gène du Rétinoblastome sont fréquentes, non seulement dans le Rétinoblastome, mais aussi dans d'autres types de cancers comme l'ostéosarcome, le cancer du sein ou le cancer de la prostate (Classon and Harlow, 2002). Son rôle fondamental de gène suppresseur de tumeur s'illustre également par le fait que la protéine pRb peut être fonctionnellement inactivée par hyperphosphorylation constitutive dans des tumeurs ne présentant pas de mutations du gène (Sherr, 1996). De plus, les oncoprotéines virales impliquées dans la transformation cellulaire comme E1A de l'adénovirus, l'antigène T de SV40 et E7 du papillomavirus HPV-16, se lient et inactivent pRb (Classon and Harlow, 2002; Munger and Howley, 2002).

La protéine pRb joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire, et notamment son expression conduit à un arrêt en phase G1 (Weinberg, 1995). Sa fonction dépend en partie de son interaction avec les facteurs de transcription de la famille des E2F (Dyson, 1998; Harbour and Dean, 2000b). Les sites E2F sont présents dans les promoteurs de nombreux gènes dont les produits sont importants dans la progression du cycle cellulaire, et pRb réprime la transcription de ces gènes à travers ses interactions avec les E2F (Dyson, 1998; Harbour and Dean, 2000b).

pRb appartient à une famille de protéines appelées les "pocket proteins". Cette famille comprend également les protéines p107 et p130 qui partagent certaines propriétés biologiques. Entre autres, elles se lient aux oncoprotéines virales, aux facteurs E2F et inhibent l'activation transcriptionnelle de gènes sous contrôle des E2F (Dyson, 1998; Harbour and Dean, 2000c). Leur expression forcée induit comme pour pRb, à un arrêt de la croissance cellulaire (Claudio *et al.*, 1994). Cependant, il existe des différences significatives entre les protéines de la famille de pRb. Par exemple, elles se lient à des protéines différentes et en

particulier à des membres différents de la famille des E2F *in vivo* (Harbour and Dean, 2000b; Mulligan and Jacks, 1998; Nevins, 1998). De plus, elles ont des cinétiques d'association avec les E2F, spécifiques, qui dépendent des phases du cycle cellulaire. p130 prédomine dans les cellules quiescentes, p107 se lie majoritairement aux E2F en phase S où elle est fortement exprimée et pRb se fixe aux E2F dans les cellules quiescentes et en prolifération (Nevins, 1998). L'analyse de souris déficientes pour p130, p107 ou pRb montre également que ces protéines ont des rôles distincts. Tandis que pRb est essentielle au développement embryonnaire, l'absence de p130 ou p107 dans des souris de même fonds génétique, n'a aucune conséquence sur la viabilité des souris. Par contre, les souris déficientes pour p107 et p130 ne sont pas viables. Ces résultats suggèrent que p107 et p130 ont des fonctions biologiques redondantes alors que pRb possède des fonctions biologiques uniques (Mulligan and Jacks, 1998). De plus, la perte de p130 et p107, contrairement à celle de pRb, n'augmente pas l'incidence tumorale. Cette dernière observation et l'absence de mutation de p107 et p130 dans les tumeurs humaines indiquent que contrairement à pRb, p130 et p107 ne sont pas des suppresseurs de tumeurs (Mulligan and Jacks, 1998).

Structure

Les protéines de la famille de pRb contiennent plusieurs domaines fonctionnels (figure 18). Les domaines A et B sont hautement conservés, ils interagissent pour former la poche centrale, d'où le nom de "pocket" protéines. Ces domaines sont critiques pour la fonction de suppresseur de tumeur de pRb. En effet, la plupart des mutations de pRb entraînent la destruction de cette poche. Le domaine B permet la fixation de protéines renfermant un motif LXCXE, présent dans les oncoprotéines virales et les histones déacétylases (figure 18 et introduction 1.2.3). Les E2F ne possèdent pas de motif LXCXE, elles se lient aux "pocket" protéines par un site distinct qui implique plusieurs points de contact dans la poche et la partie carboxyterminale. Ceci permet aux E2F de recruter sur les promoteurs des complexes formés de pRb et d'autres protéines, qui ont un motif LXCXE.

Inactivation des protéines de la famille pRb par phosphorylation

La fonction des "pocket" protéines est régulée par phosphorylation au cours du cycle cellulaire (figure 18). La forme hyperphosphorylée (inactive) prédomine dans les cellules en prolifération, tandis que la forme hypophosphorylée (active) est abondante dans les cellules quiescentes ou différenciées. Les principales kinases impliquées dans la phosphorylation des "pocket" protéines sont les Cdk. pRb est le substrat de Cdk4, Cdk6, Cdk2 et Cdk1. Lors de la

progression dans le cycle cellulaire, l'activation ordonnée des Cdk mène à une phosphorylation séquentielle des "pocket" protéines. La phosphorylation inactive les «pocket» protéines, entraînant la dissociation des complexes Rb/E2F et donc permettant l'expression des gènes régulés par les E2F (Harbour *et al.*, 1999). Cependant, pour p130, le mécanisme d'inactivation est un peu différent. En effet, p130 est majoritairement phosphorylée par le complexe Cycline D/Cdk4 en début de phase G1, ce qui induit sa dégradation par le protéasome et donc contribue à l'activation des gènes réprimés par p130/E2F (Tedesco *et al.*, 2002).

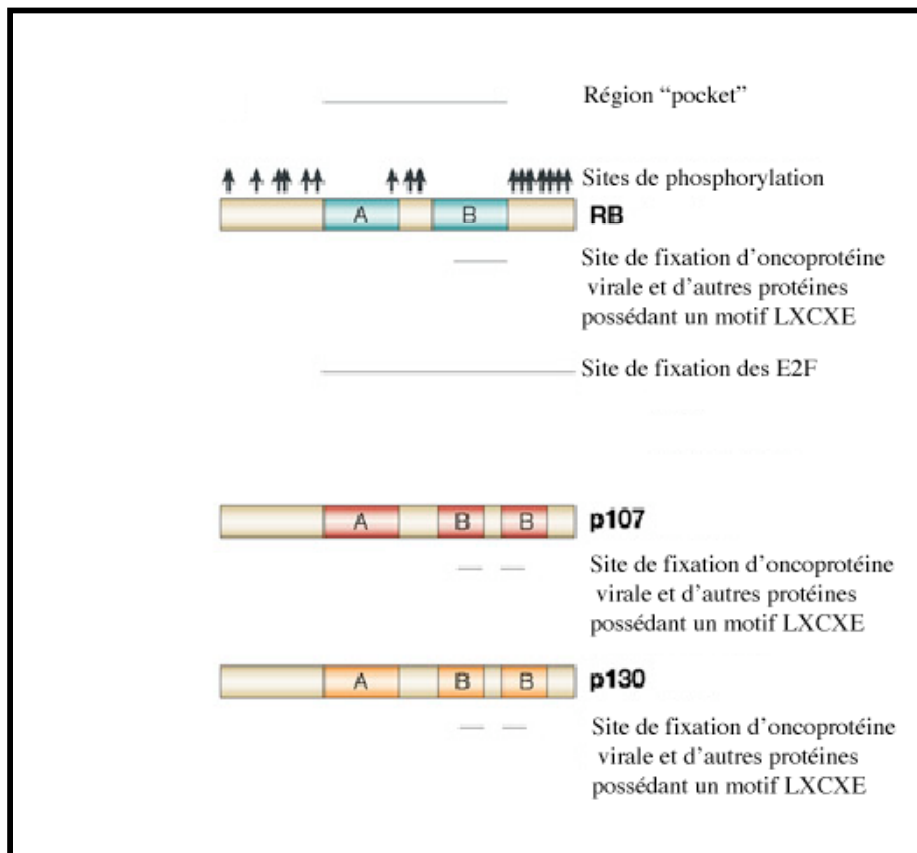


Figure 18 □ Diagramme schématisé des «pocket» protéines □

b) Les facteurs de transcription de la famille des E2F

Fonction

La famille des E2F contient 6 membres (E2F1-6) qui diffèrent selon leur propriété transcriptionnelle et leur interaction potentielle avec les "pocket" protéines (Stevaux and Dyson, 2002) (figure 19). E2F 1, 2 et 3 sont considérés comme des activateurs de la transcription, alors que E2F4, 5 et 6 fonctionnent comme des répresseurs (Trimarchi and

Lees, 2002). pRb se lie préférentiellement à E2F1-3, bien qu'il s'associe aussi à E2F4. p130 s'associe principalement à E2F4 et E2F5, tandis que p107 s'associe uniquement avec E2F4. Enfin, E2F6 n'interagit pas avec les "pocket" protéines. Biologiquement, E2F1-3 sont nécessaires pour la progression dans le cycle cellulaire alors que E2F4-5 sont requis pour l'établissement de la quiescence et la différenciation terminale.

Selon le modèle actuel, il existerait deux types de complexes selon l'état de prolifération des cellules. Dans les cellules quiescentes, les promoteurs des gènes sous contrôle des E2F sont occupés exclusivement par les complexes E2F4/p130 réprimant la transcription. Par contre, lorsque les cellules entrent dans le cycle cellulaire et progressent en G1, les complexes E2F4/p130 sont remplacés par les activateurs E2F1-3 (Rayman *et al.*, 2002 □ Takahashi *et al.*, 2000). Cependant, ce modèle ne fait pas l'unanimité et est très controversé. En effet, d'autres travaux indiquent que certains promoteurs ne suivraient effectivement pas ce modèle de régulation transcriptionnelle relayée par les E2F (Wells *et al.*, 2000). Il a donc été suggéré que plusieurs types de complexes pourraient se former sur un même promoteur et que la nature des complexes identifiés dépendrait entre autres, de la lignée cellulaire étudiée et de la technique de synchronisation des cellules (figure 19).

Structure

Les facteurs de transcription de la famille E2F contiennent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription. Le domaine de fixation à l'ADN des E2F, seul, a une très faible affinité pour sa séquence consensus, par contre, les hétérodimères formés d'un membre des E2F et d'une protéine DP (*Dimerisation Partner*) s'y lient avec une forte affinité. Le domaine d'activation de la transcription contient le site de fixation pour les "pocket" protéines. Par conséquent, la fixation des "pocket" protéines sur les E2F inhibe directement la fonction transactivatrice des E2F.

Les gènes cibles des E2F

Les gènes sous le contrôle des facteurs de transcription E2F/DP sont très nombreux et possèdent des rôles très variés comme la régulation du cycle cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire programmée, l'apoptose (Ren *et al.*, 2002 □ Stevaux and Dyson, 2002). Les gènes cibles des E2F sont impliqués dans la plupart des phases du cycle cellulaire □ la transition G1/S, la réplication de l'ADN et la mitose. Cependant, ils jouent également un rôle important dans les mécanismes de surveillance, appelés points de contrôle (ou checkpoint) et dans les mécanismes de réparations de l'ADN (figure 20).

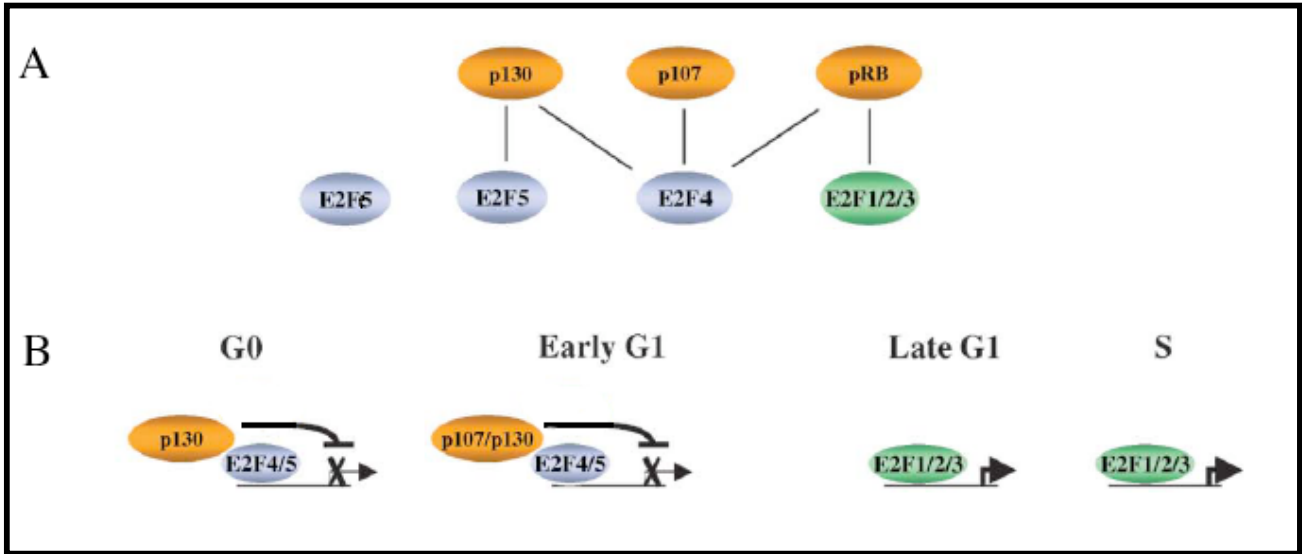


Figure 19 □ Nature des complexes «pocket» protéines/E2F au cours du cycle cellulaire
 A) Interactions préférentielles entre les «pocket» protéines et les E2F
 B) Modèle décrivant la régulation transcriptionnelle des gènes cibles des E2F

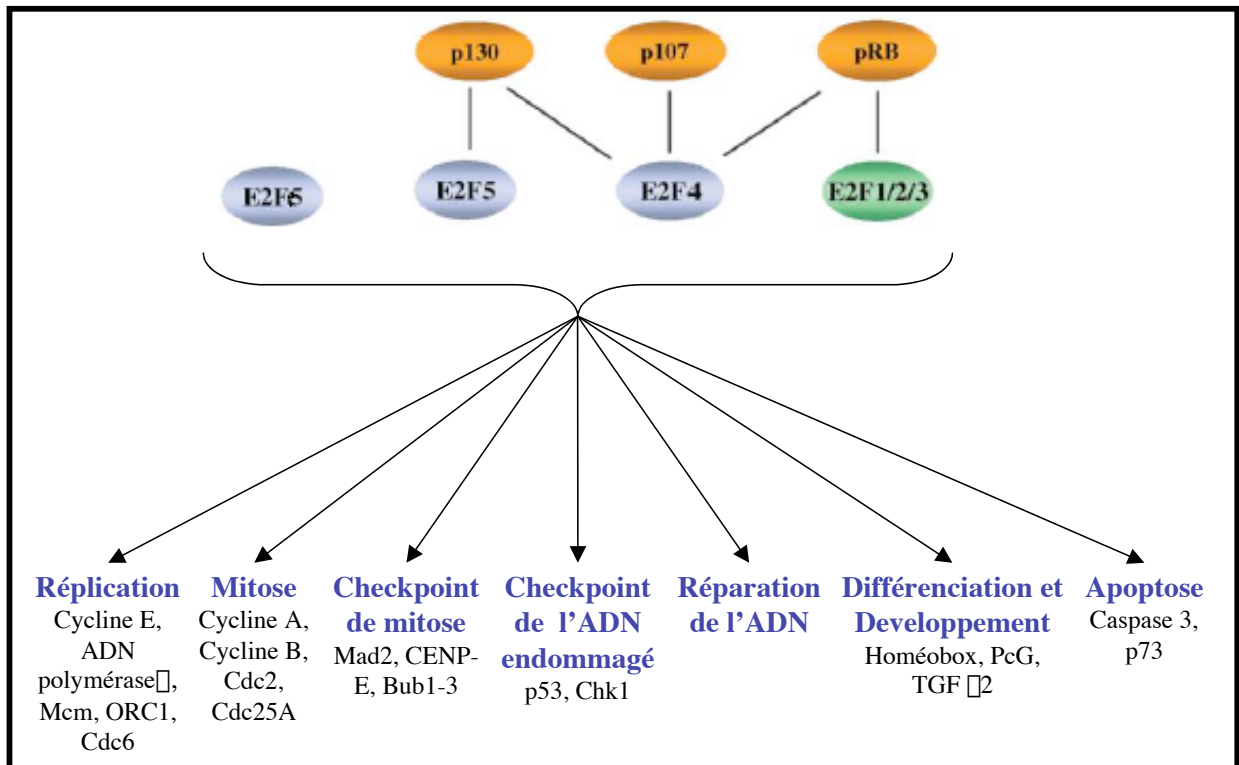


Figure 20 □ Mécanismes cellulaires régulés par les complexes «pocket» protéines/E2F

1.2.2 Le facteur de transcription c-Myc

a) *La régulation de la transcription par c-Myc*

Le gène *c-myc* a été identifié comme l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-myc* de rétrovirus aviaires (Vennstrom *et al.*, 1982). Plus tard, il a été montré que l'activation constitutive de ce proto-oncogène par translocation chromosomique était impliquée dans la progression du lymphome humain de Burkitt (Spencer and Groudine, 1991). Plus récemment, il a été mis en évidence que la plupart des cellules cancéreuses humaines et plus particulièrement celles issues de tumeurs agressives et peu différenciées présentaient une expression élevée ou une dérégulation de *c-myc* (Nesbit *et al.*, 1999). Enfin, d'autres études ont démontré que l'expression élevée de *c-Myc*, *in vivo* et *in vitro*, conférait un avantage prolifératif aux cellules tumorales (Adams *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1983). *c-Myc* appartient à la famille *Myc* qui comprend cinq membres S-, B-, N-, L-, *c-Myc*, mais seulement les trois derniers sont des oncoprotéines.

c-Myc est un facteur de transcription de la famille bHLH-LZ (*basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper*). Il doit interagir avec un autre facteur de transcription de la famille bHLH-LZ, Max, pour se fixer spécifiquement à la séquence d'ADN CACGTG, et plus largement CANNTG, appelée boîte E et activer la transcription de promoteurs adjacents (figures 21 et 22) (Pelengaris *et al.*, 2002). Contrairement à Max, *c-Myc* contient un domaine transactivateur (TAD). Ce dernier est formé de deux régions hautement conservées, MBI et MBII, qui permettent à *c-Myc* de recruter plusieurs cofacteurs dont des histones acétyltransférases (via TRRAP et TIP48/49) et des protéines de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (via Ini1/hSNF5) (figures 21 et 22 et introduction 1.2.3). Par ailleurs, des mutations dans le domaine transactivateur ou dans le domaine bHLH-LZ (qui permet l'association avec Max et l'ADN) de *c-Myc* abolissent son activité transcriptionnelle et oncogénique (Amati *et al.*, 1993; Amati *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1990).

Max peut former des hétérodimères avec d'autres protéines à domaine bHLH-LZ appartenant à la famille Mad (Mad1-4) (Grandori *et al.*, 2000). Comme *c-Myc*, Mad doit former des dimères avec Max pour se fixer à la boîte E. Mais contrairement aux complexes *c-Myc/Max*, les complexes Mad/Max répriment activement la transcription (figure 21).

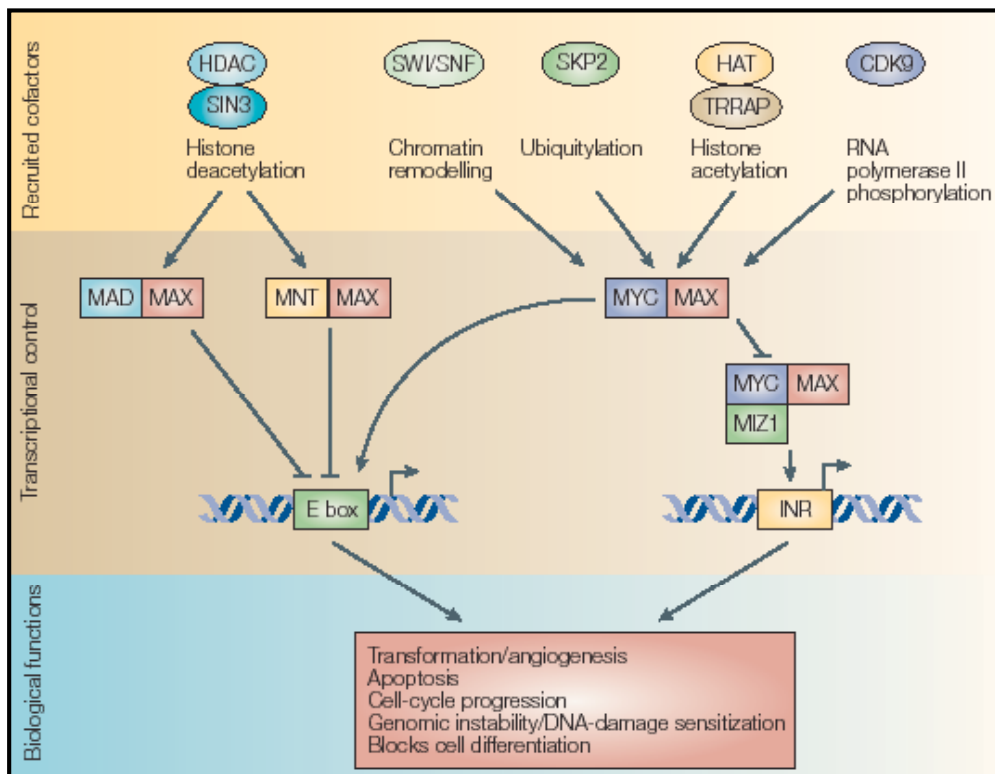


Figure 21 □ Mécanisme de régulation transcriptionnelle par c-Myc

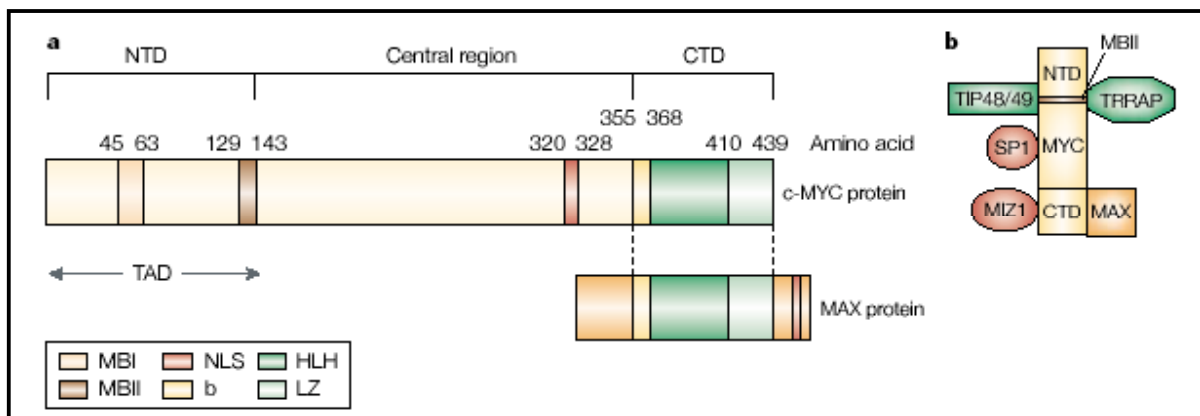


Figure 22 □ Les différents domaines fonctionnels de la protéine c-Myc
 a) Structure des protéines c-myc et Max
 b) Les différentes protéines interagissant avec c-myc

Par conséquent, il a été proposé que ces complexes Mad/Max avaient comme fonction de bloquer l'activité transcriptionnelle et oncogénique de c-Myc (Pelengaris *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que la répression transcriptionnelle des complexes Mad/Max faisait intervenir des co-répresseurs à activité histones déacétylases recrutées par Mad (Eisenman, 2001) (figure 21 et introduction 1.2.3). Enfin, deux nouvelles protéines apparentées à la famille Mad, Mnt (Rox) et Mga se fixent à Max et répriment la transcription des gènes avec une boîte E (Baudino and Cleveland, 2001).

En plus de sa capacité à activer la transcription, c-Myc peut aussi directement réprimer la transcription (Wanzel *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes de répression sont peu connus. Seul le cas de deux gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire, les CKI Ink4b (p15) et Waf1 (p21) sont bien décrits. Cette répression par c-Myc n'a pas lieu via la boîte E, mais pourtant elle implique l'hétérodimère Myc/Max, qui s'associe au facteur activateur de la transcription Miz1 ou Sp1 (Gartel *et al.*, 2001; Staller *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003) (figures 21 et 22b). Dans le cas du gène codant pour p15, l'interaction Myc/Max avec Miz1 bloque l'association de Miz1 avec son co-activateur p300, ce qui empêche l'activation de la transcription.

b) Les gènes cibles de c-Myc

c-Myc et la prolifération cellulaire

Dans un premier temps, il a été mis en évidence que l'expression de c-Myc corrèle, *in vitro*, avec l'état prolifératif des cellules. Dans des cellules quiescentes en culture, c-myc n'est pas transcrit. Cependant, sa transcription est rapidement activée après stimulation des cellules avec des facteurs de croissance via probablement le facteur de transcription TCF/LEF. c-Myc est ensuite faiblement exprimé tout au long du cycle cellulaire (Persson *et al.*, 1985; Rabbitts *et al.*, 1985). La concentration cellulaire de c-Myc est extrêmement contrôlée et régulée à différents niveaux. Lorsque les cellules entrent dans le cycle cellulaire, l'accumulation de c-Myc résulte non seulement d'une activation de la transcription du gène, mais également d'une stabilisation de l'ARNm (Blanchard *et al.*, 1985; Bonniou *et al.*, 1988; Veyrone *et al.*, 1997) et de la protéine (Spencer and Groudine, 1991). c-Myc a une demi-vie courte (environ 30 minutes) dans des cellules en croissance exponentielle ; il est dégradé via la voie ubiquitine/protéasome en fonction de son état de phosphorylation. Alors que la phosphorylation de c-Myc par Erk stabilise la protéine, celle par GSK3 entraîne sa dégradation (Sears *et al.*, 2000). De la même façon qu'*in vitro*, le niveau d'expression de c-

Myc, *in vivo*, est lié à l'état prolifératif des cellules. c-Myc est détecté dans de nombreux tissus, mais il n'est pas exprimé dans les cellules arrêtées dans le cycle ou en différenciation terminale alors qu'il est fortement exprimé dans des cellules qui prolifèrent activement (Schmid *et al.*, 1989).

D'autre part, il a été suggéré que c-Myc joue un rôle important dans le contrôle de la division cellulaire puisque l'inactivation bi-allélique de c-myc chez la souris est létale au stade embryonnaire (Davis *et al.*, 1993). De plus, la délétion de c-Myc dans des fibroblastes de Rat entraîne une augmentation du temps de doublement de population des cellules (Mateyak *et al.*, 1997; Schorl and Sedivy, 2003). Enfin, la surexpression de c-Myc dans des fibroblastes quiescents permet l'entrée dans le cycle cellulaire et favorise la transition G1/S (Santoni-Rugiu *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1995). Cette propriété de c-Myc à promouvoir la progression dans le cycle cellulaire, apparaît comme résulter de sa capacité à activer les complexes Cycline E/Cdk2 (Santoni-Rugiu *et al.*, 2000).

Il a récemment été montré que c-Myc pourrait activer la transcription des gènes CCND2 (qui code pour la cycline D2) et Cdk4 (Bouchard *et al.*, 1999; Hermeking *et al.*, 2000). Par ailleurs, la surexpression de c-Myc dans des fibroblastes qui n'expriment pas la cycline D2, ne conduirait pas à l'activation des complexes cycline E/Cdk2 (Perez-Roger *et al.*, 1999). Il a donc été proposé que lorsque c-Myc est surexprimé, les complexes Cycline D/Cdk4 nouvellement synthétisés, séquestrent rapidement les CKI p21 et p27, ce qui permettrait l'activation des complexes Cycline E/Cdk2 libres (Perez-Roger *et al.*, 1999; Vlach *et al.*, 1996).

Toutefois, c-Myc interviendrait aussi directement sur la quantité d'inhibiteurs de Cdk dans la cellule, en contrôlant soit leur transcription soit leur dégradation. D'une part, c-Myc pourrait directement réprimer la transcription de p21, p27 et p15 (Gartel *et al.*, 2001; Staller *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001b). D'autre part, c-Myc activerait la transcription de Cull1, un composant du complexe ubiquitine ligase SCF/SKP2 qui est impliqué dans la dégradation de p27 (O'Hagan *et al.*, 2000a). Tous ces résultats permettent de comprendre comment c-Myc est capable de lever un bloc imposé par les inhibiteurs de Cdk p27 et p21 (Vlach *et al.*, 1996).

Enfin, c-Myc activerait la transcription des E2F et de la protéine Id2 (Adams *et al.*, 2000; Lasorella *et al.*, 2000). Cette dernière s'associe physiquement avec la forme active, hypophosphorylée des protéines de la famille pRb, ce qui les empêche d'inhiber les E2F. Par conséquent, c-Myc permettrait l'activation de la transcription des gènes cibles des E2F. Parmi les nombreux gènes impliqués dans la transition G1/S et activés par les E2F, on trouve

entre autres la cycline E et Cdc25A. Cependant, il n'est toujours pas clair si Myc peut également activer directement la transcription de ces deux gènes (Galaktionov *et al.*, 1996; Santoni-Rugiu *et al.*, 2000).

De nombreuses équipes se sont intéressées aux différentes fonctions de c-Myc lors des transitions G0/G1 et G1/S, mais jusqu'à aujourd'hui très peu de travaux ont concerné le rôle potentiel de c-Myc en G2 et en mitose. Pourtant, c-Myc semble nécessaire pendant la phase G2 car sa déplétion dans des fibroblastes de rat conduit à un allongement de cette phase, comme pour la phase G1 (Mateyak *et al.*, 1997). De plus, la surexpression de c-Myc dans des cellules "normales" semble induire un point de contrôle, dépendant de p53, qui permet l'arrêt des cellules en G2/M. Néanmoins, il a été montré que Myc peut conduire les cellules arrêtées en G2/M à rédupliquer leur génome sans avoir à effectuer la mitose (Felsher *et al.*, 2000; Li and Dang, 1999). Cette capacité de c-Myc à découpler la réplication du génome et la mitose, lorsqu'il est surexprimé, pourrait contribuer à induire de l'instabilité génomique (Li and Dang, 1999; Mai *et al.*, 1996a; Mai *et al.*, 1996b). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre le rôle et le mécanisme d'action de c-Myc dans l'instabilité génomique.

c-Myc et la croissance cellulaire

En plus des effets de Myc sur la prolifération, il a été suggéré que Myc régule la croissance cellulaire. Par exemple, la surexpression d'un mutant dominant négatif de c-Myc chez la drosophile permet l'obtention d'individus plus petits, phénotype "minute" (Gallant *et al.*, 1996; Schreiber-Agus *et al.*, 1997). De même, les embryons présentant une invalidation bi-allélique ainsi que les souris avec une invalidation mono-allélique de c-myc sont plus petits (Trumpp *et al.*, 2001). Cependant, il n'est pas clair si les effets de c-Myc sur la croissance et la prolifération sont liés ou indépendants. Certains proposent que c-Myc active la prolifération en induisant la croissance cellulaire alors que d'autres proposent que c-Myc stimule la croissance de l'individu en contrôlant la prolifération cellulaire (Trumpp *et al.*, 2001). Enfin, d'autres études montrent que Myc a des effets indépendants sur les deux processus, la prolifération et la croissance (Johnston *et al.*, 1999; Pusch *et al.*, 1997).

Selon Trumpp et ces collaborateurs, c-Myc n'est pas directement impliqué dans la croissance cellulaire, il contrôle plutôt l'entrée ou la sortie des cellules dans le cycle cellulaire et par conséquent c-Myc détermine la taille de l'organe ou de l'individu en agissant sur le nombre total de cellules présentes (Trumpp *et al.*, 2001). Pourtant, d'autres équipes démontrent que c-Myc agit directement sur la croissance cellulaire. La surexpression de c-Myc *in vivo* et *in*

in vitro dans différents types cellulaires comme les lymphocytes, les hépatocytes et les kératinocytes conduit à l'augmentation de leur taille (Gandarillas *et al.*, 2000; Iritani and Eisenman, 1999; Schuhmacher *et al.*, 1999). Cet effet pourrait s'expliquer par le fait que c-Myc est capable d'induire l'endoréplication qui est souvent associée à une augmentation de la taille cellulaire (Gandarillas *et al.*, 2000; Pierce *et al.*, 2004; Traas *et al.*, 1998). Cependant, la croissance cellulaire provoquée par la surexpression de c-Myc peut être indépendante du cycle cellulaire car elle concerne toutes les cellules quelle que soit leur position dans le cycle (Iritani and Eisenman, 1999). Finalement, les études faites chez la drosophile, ont permis de mieux comprendre le rôle de c-Myc dans la croissance et la prolifération. Le phénotype "minute" d'autres mutants que c-Myc a été identifié comme un défaut d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la synthèse de protéines, avec en particulier des gènes codant les protéines ribosomales (Johnston *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2004). Depuis, il a été montré que c-Myc contrôle la synthèse protéique via la régulation de la transcription et du processing des ARNr, de la transcription et de la traduction des protéines ribosomales et enfin de l'initiation de la traduction (Schmidt, 1999). Mais c-Myc semble également nécessaire à la régulation de la transcription d'enzymes du métabolisme (Boxer and Dang, 2001).

Les autres gènes cibles de c-Myc

En plus de la prolifération et la croissance, c-Myc pourrait avoir de nombreuses autres fonctions notamment dans l'apoptose, l'adhésion, la différenciation (Pelengaris *et al.*, 2002). Dans le but de comprendre les différents rôles de c-Myc, beaucoup de travaux ont porté sur l'identification des gènes cibles de c-Myc. Aujourd'hui, avec le développement de nouvelles techniques et en particulier des microarrays, il a été listé plus de 600 gènes cibles potentiels de c-Myc (Coller *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Menssen and Hermeking, 2002; O'Hagan *et al.*, 2000b; Schuhmacher *et al.*, 2001). Afin de déterminer uniquement les cibles directes de c-Myc, d'autres chercheurs ont plutôt cherché à identifier les sites de fixation de c-Myc sur tout le génome, en utilisant la technique d'immunoprécipitation de chromatine couplé à du microarray (Fernandez *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2003). Une base de données, résumant tous les résultats obtenus sur c-Myc a été créé et reste en libre accès sur Internet (Zeller *et al.*, 2003). Toutefois de nombreuses données sont issues d'expériences réalisées sur des surexpressions de c-Myc, elles pourraient donc se révéler fausses dans des conditions physiologiques. Finalement, tous ces travaux sont importants pour la compréhension des fonctions de c-Myc dans la cellule, mais ils devront conduire à des études supplémentaires pour déterminer le véritable rôle de c-Myc qui reste toujours mystérieux.

1.2.3 Régulation de la transcription par la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique est organisé en une structure complexe constituée d'ADN et de protéines appelée chromatine. Cette structure permet l'importante compaction de l'ADN nécessaire pour introduire les deux mètres du génome humain dans un noyau de quelques micromètres de diamètre. Néanmoins, l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant les fonctions de la chromatine comme la réplication, la réparation, la recombinaison et la transcription. Ainsi l'organisation dynamique de la structure chromatinienne pourrait influencer, potentiellement, toutes les fonctions du génome. Les travaux de ces dernières années montrent que la structure de la chromatine joue en effet un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes eucaryotes (Narlikar *et al.*, 2002). Le mécanisme d'initiation de la transcription ne peut avoir lieu que si la double hélice d'ADN est ouverte ainsi les facteurs de transcription ont accès à leurs sites spécifiques et l'ARN polymérase peut être recruté. La structure de la chromatine permet donc soit la répression soit l'activation de la transcription en fonction de l'état d'accessibilité de l'ADN.

a) La structure de la chromatine

Le nucléosome

La digestion partielle de l'ADN organisé en chromatine génère des fragments de 150 pb, caractérisés par des images en "échelle" après migration électrophorétique (figure 23C). La régularité de cette structure a ensuite été confirmée par analyse en microscopie électronique, révélant une chromatine constituée de particules régulièrement espacées, dont l'aspect rappelle celui d'un "collier de perles" (Oudet *et al.*, 1975) (figure 23B). Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine. Il est composé d'un "cœur" et d'une région de liaison (ou région internucléosomale) qui relie les nucléosomes adjacents (figure 23A). Le "cœur", dont la structure est très conservée parmi les espèces, est composée de 146 pb d'ADN enroulées selon environ 1,7 tour autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B (Kornberg, 1974; Kornberg and Thomas, 1974) (figure 23A). La longueur de la région d'ADN internucléosomale varie selon l'espèce, le type cellulaire et le type de protéines internucléosomales qui y sont incorporées (histones ou non histones) (van Holde and Zlatanova, 1999).

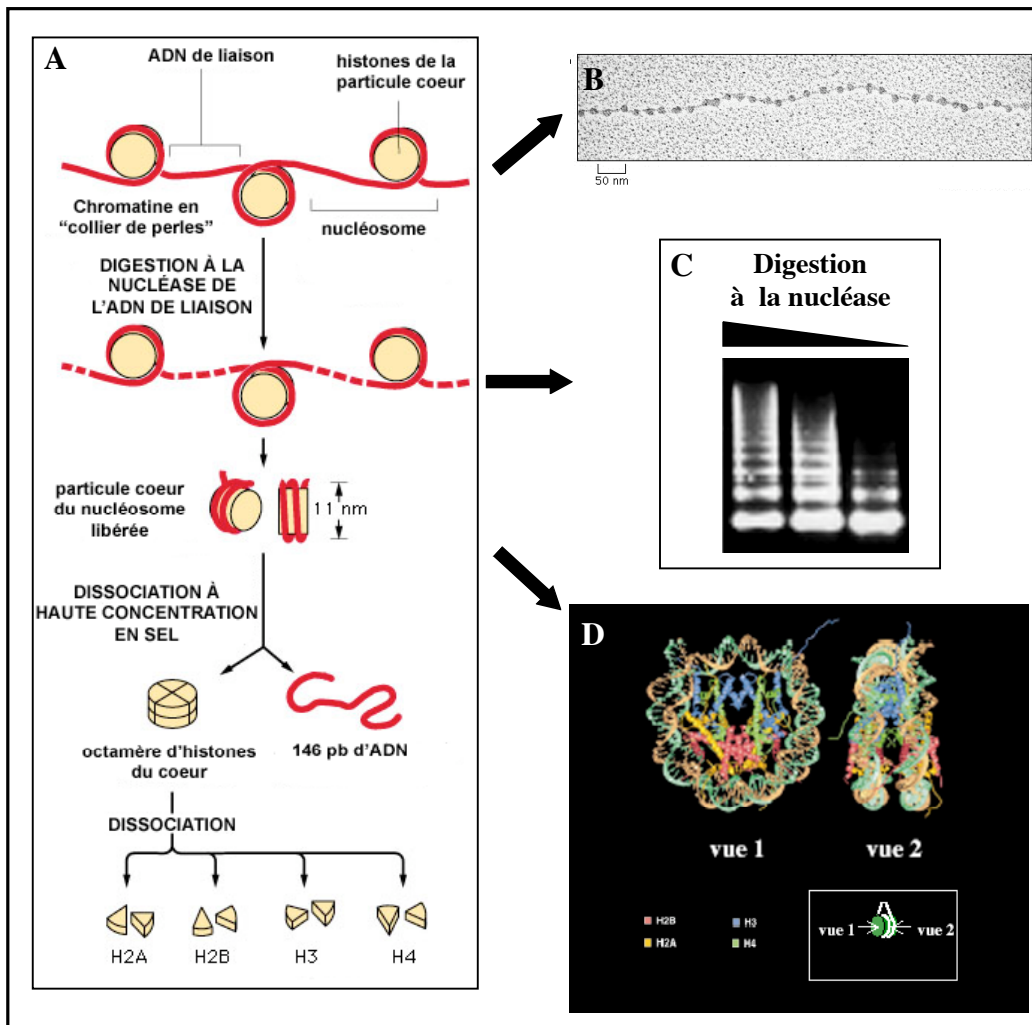


Figure 23: La structure du nucléosome

A) Nature de la chromatine.

B) Observation en microscopie électronique de la chromatine en "collier de perles".

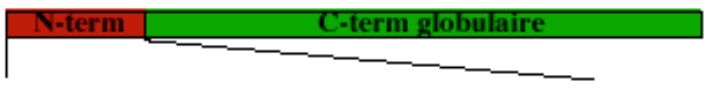
C) Digestion partielle de l'ADN à la nucléase observée sur gel d'agarose.

D) Représentation de la structure d'un nucléosome.

Les histones de la particule "cœur"

Les histones du cœur, H3, H4, H2A et H2B, sont de petites protéines, basiques, très conservées au cours de l'évolution. Ces protéines sont organisées en deux domaines distincts. Le domaine C-terminal adopte une structure très conservée, appelée motif de repliement de type histone ("histone fold motif") qui se compose de trois hélice α reliées par deux boucles, L1 et L2 (Arents *et al.*, 1991) (figure 23D). Ce motif α 1-L1- α 2-L2- α 3 intervient dans les

interactions entre histones au sein du nucléosome et possède trois sites de liaison à l'ADN (sites indépendants de la séquence d'ADN) (Luger *et al.*, 1997; Luger and Richmond, 1998). En revanche, le domaine N-terminale (appelé "queue N-terminale") de ces histones est plus variable et est dépourvu de structure secondaire (figure 24). Ces domaines, dirigés vers l'extérieur du nucléosome, interagissent avec l'ADN autour du nucléosome (Wolffe and Hayes, 1999). Ils n'interviennent pas dans l'assemblage du nucléosome, proprement dit *in vitro* (Dong *et al.*, 1990; Hayes *et al.*, 1991). Par contre, ils jouent un rôle dans l'assemblage de structure d'ordre supérieur au nucléosome en permettant l'interaction avec d'autres nucléosomes (Garcia-Ramirez *et al.*, 1992; Garcia-Ramirez *et al.*, 1995; Tse and Hansen, 1997; Tse *et al.*, 1998). Les queues N-terminales sont particulièrement riches en résidus lysine et arginine et donc très basiques. Elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant affecter leurs charges mais aussi l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéines/protéines avec le nucléosome (figure 25).



			<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="background-color: red; color: white; padding: 2px 5px;">N-term</div> <div style="background-color: green; color: white; padding: 2px 5px;">C-term globulaire</div> </div>
H3	136 aa	15 kDa	¹ ARTKQ TARK STGGK APRK QLATKA ARK SAP ³⁰ ...
H2A	130 aa	14.3 kDa	¹ SGR GK QGGK ARAKAK TRSS RAGL ²³ ...
H2B	126 aa	13.9 kDa	¹ PEPS K SAPAP KKG S K AITKAQ KKD G KKR KRS RK ³⁴ ...
H4	103 aa	11.3 kDa	¹ SGR GK GGK G LG K GGAK R HR K VLR ²³ ...

Figure 24: Structure primaire des histones du nucléosome.
Les queues N-terminales des histones sont riches en résidus basiques (marqués en rouge)

Les histones internucléosomales ou histones de liaison

Les histones internucléosomales, H1 et H5, sont les protéines qui s'associent à la région d'ADN de liaison entre deux nucléosomes (figure 26). Contrairement aux histones de la particule "cœur", elles sont peu conservées parmi les espèces. Chez les eucaryotes supérieurs, elles sont composées de trois domaines: un domaine central globulaire non polaire, essentiel pour les interactions avec l'ADN, et deux extrémités N- et C- terminales non structurées, hautement basiques, et soumises à des modifications post-traductionnelles. Les histones internucléosomales joueraient un rôle dans l'espacement des unités nucléosomales et dans la

compaction de l'ADN au sein du nucléosome en créant une région d'interaction entre les nucléosomes adjacents (An *et al.*, 1998; Bednar *et al.*, 1998; Carruthers *et al.*, 1998).

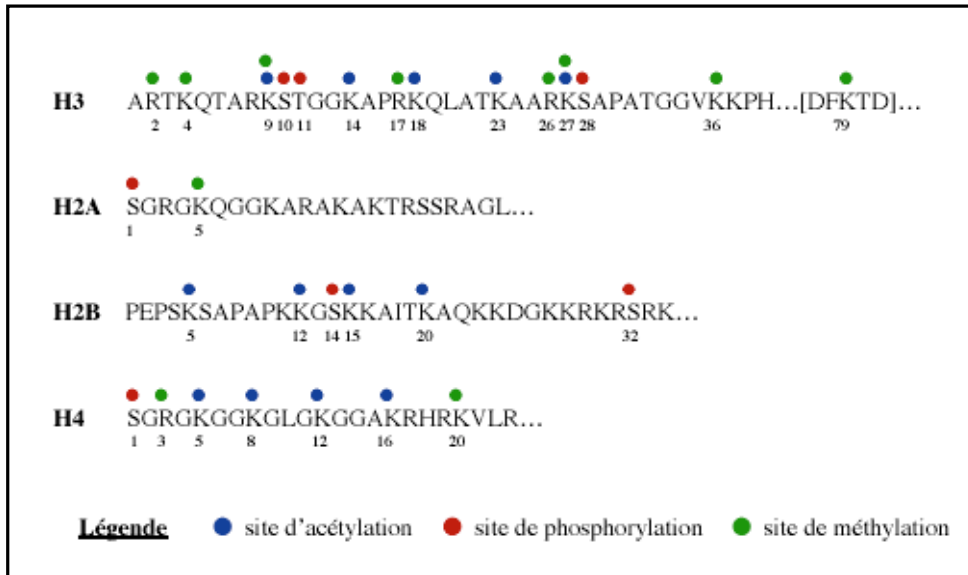


Figure 25: Modifications connues des extrémités N-terminales des histones du nucléosome.

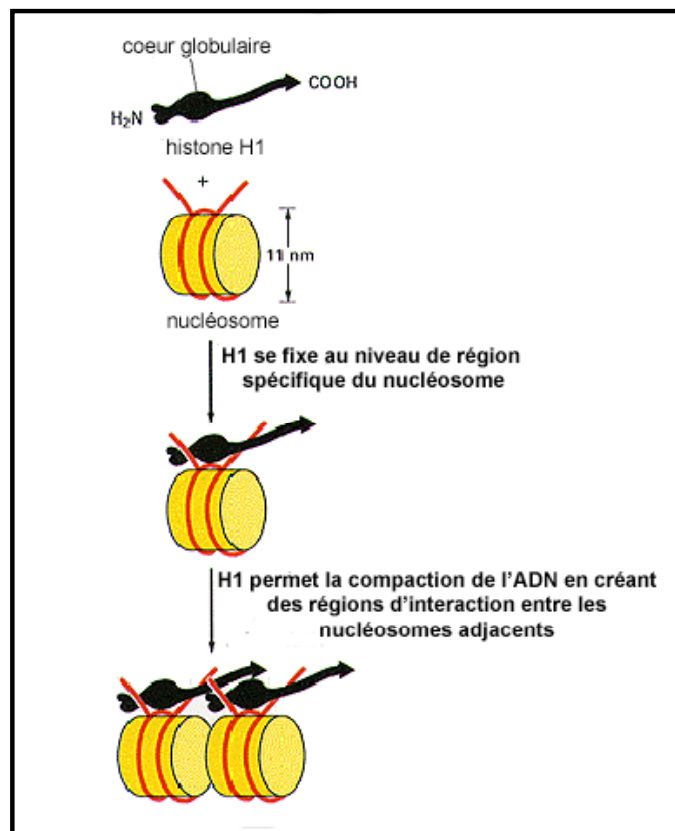


Figure 26: Rôle de l'histone H1 dans la formation de la chromatine

Les différentes étapes dans l'assemblage de la chromatine

L'assemblage de l'ADN en chromatine comprend plusieurs étapes qui commencent par la formation de son unité fondamentale, le nucléosome, et finissent par des niveaux d'organisation supérieurs en domaines spécifiques dans le noyau. Les différents degrés d'organisation de la chromatine sont décrits schématiquement dans la figure 27. La première étape comprend la mise en place sur l'ADN, d'un tétramère d'histones (H3-H4)₂ nouvellement synthétisées, ce qui forme la particule sub-nucléosomale. Ensuite, deux dimères H2A-H2B viennent s'adjoindre pour donner le nucléosome. Lors de l'étape de maturation, les nucléosomes sont régulièrement espacés pour former le nucléofilament de 11 nm. L'incorporation des histones internucléosomales est accompagnée par le repliement du nucléofilament en fibre de 30 nm. Finalement, plusieurs repliements successifs conduisent à des niveaux d'organisation supérieurs. Le niveau de condensation le plus élevé est atteint au sein des chromosomes métaphasiques afin de faciliter leur ségrégation lors de la mitose. Pendant l'interphase, les nucléosomes sont moins régulièrement organisés, mais la chromatine est agencée en territoires fonctionnels.

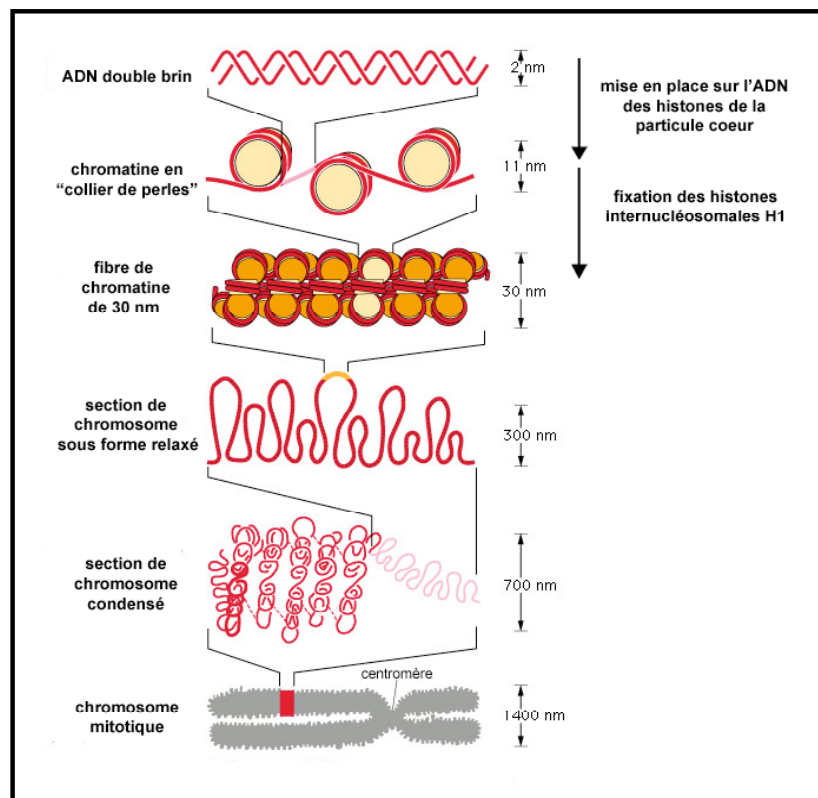


Figure 27: Les différents degrés d'organisation de la chromatine

Les territoires fonctionnels de la chromatine

Au sein du noyau interphasique, la chromatine a été divisée en euchromatine et hétérochromatine. L'hétérochromatine a été définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire tandis que l'euchromatine apparaît décondensée pendant l'interphase. De plus, le niveau de condensation de la chromatine au sein de l'hétérochromatine est supérieur à celui de l'euchromatine. L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole tandis que l'euchromatine est répartie à l'intérieur du nucléoplasme. On distingue: l'hétérochromatine constitutive qui contient peu de gènes, formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères, de l'hétérochromatine facultative qui contient des régions codantes pouvant adopter les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine (comme le chromosome X inactif chez la femelle des mammifères). La répartition euchromatine/hétérochromatine influence localement le statut transcriptionnel des gènes (Dundr and Misteli, 2001). Des études ont mis en évidence des relocalisations spatiales en fonction de l'évolution de la transcription. À titre d'exemple, dans des lymphocytes B de souris en cours de différenciation, certains gènes sont relocalisés près de l'hétérochromatine centromérique, ce qui a pour effet d'éteindre la transcription (Brown *et al.*, 1997). Cependant, bien que des repositionnements hors des zones hétérochromatiniennes soient observés, ils ne sont pas suffisants pour permettre l'activation transcriptionnelle.

Des études par microscopie électronique montrent que la synthèse d'ARN s'effectue majoritairement sur de l'ADN condensé. *In vitro*, une transcription peut être reconstituée sur une matrice nucléosomale mais avec une efficacité moindre que sur un ADN nu (Widom, 1997). La présence de nucléosomes sur l'ADN peut constituer un obstacle pour la transcription en entravant la fixation d'activateurs ou de facteurs de transcription, le démarrage et l'élongation de la transcription. Cependant, la réalisation d'une transcription efficace sur une matrice nucléosomale indique que celle-ci doit être considérée comme une structure dynamique susceptible d'être remaniée et de se réarranger localement. L'équilibre entre condensation et accessibilité de l'ADN et la capacité d'une cellule à le réguler constitue donc un niveau crucial du contrôle de l'expression des gènes. Il existe deux types de complexe qui peuvent réguler l'accessibilité de l'ADN en contrôlant la structure de la chromatine. Le premier, les complexes dépendants de l'ATP sont capables de modifier la position des nucléosomes et de créer des conformations où l'ADN est accessible sur la surface de

l'octamère d'histones (Vignali *et al.*, 2000). Par conséquent, ces complexes permettent d'exposer ou de cacher certaines régions d'ADN. Le second type de complexes modifie de façon covalente la partie N-terminale des histones, partie exposée à la surface des nucléosomes. Ils peuvent ajouter ou retirer des fonctions chimiques qui perturbent la structure des nucléosomes (Narlikar *et al.*, 2002). Plusieurs observations suggèrent que ces deux types de complexes remodelant la chromatine sont liés à la régulation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération. Récemment, il a d'ailleurs été montré que certains de ces complexes interagissent directement avec les protéines de la famille de pRb, relayant ainsi la répression transcriptionnelle de gènes régulés par les E2F (Harbour and Dean, 2000a).

b) Transcription et modifications covalentes des histones

La plupart des travaux relatifs au rôle de la chromatine ont essentiellement porté sur les extrémités N-terminales des histones, cruciales à la régulation de l'état de compaction de la chromatine (Cheung *et al.*, 2000a). En effet, il est connu depuis longtemps que de nombreux résidus de ces queues sont soumis à diverses modifications post-traductionnelles, telles que, l'acétylation (Gregory *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001), la phosphorylation (Gurley *et al.*, 1973; Mahadevan *et al.*, 1991), la méthylation (Bannister *et al.*, 2002) (figure 25), mais également l'ubiquitination (Sun and Allis, 2002), l'ADP-ribosylation (Huletsky *et al.*, 1985) et la sumoylation (Shiio and Eisenman, 2003) qui ne seront pas traitées ici.

Acétylation et déacétylations des histones

Parmi les modifications chimiques possibles sur les histones, l'acétylation/déacétylation est la plus documentée. Il y a plus de trente ans qu'une corrélation a été établie entre le niveau d'acétylation des histones et l'activité transcriptionnelle des cellules eucaryotes (Allfrey *et al.*, 1964). En effet, les domaines euchromatiniens, transcriptionnellement actifs, sont hyperacétylés tandis que les domaines hétérochromatiniens, inactifs, sont hypoacétylés (Hebbes *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1998; Sealy and Chalkley, 1978). Un lien direct a été apporté par la découverte que de nombreux coactivateurs possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) (Brownell *et al.*, 1996; Kuo and Allis, 1998; Kuo *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1996), alors que les répresseurs possèdent quant à eux une activité histone déacétylase (HDAC) (Alland *et al.*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Taunton *et al.*, 1996). Malgré le nombre croissant de résultats donnant un rôle important à l'acétylation des histones dans la régulation de la transcription, les mécanismes mis en jeu restent très flous. Il s'avère que ce

sont les résidus lysines présents au niveau des régions amino-terminales des histones qui sont les cibles des acétyltransférases et des déacétylases (Rundlett *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998a). Le modèle le plus argumenté, propose que l'acétylation neutraliserait les charges positives des lysines des histones, déstabilisant la structure de la chromatine, et facilitant ainsi la fixation de facteurs de transcription sur leur séquence cible. D'ailleurs, il a été montré que l'acétylation peut altérer la stabilité de la fibre de chromatine de 30 nm (McGhee *et al.*, 1983) et inhiber la condensation des chromosomes (Annunziato *et al.*, 1988). Il semble que la première conséquence de l'acétylation soit une perte d'interaction avec l'ADN nucléosomal, l'ADN de liaison ou de l'interaction entre les nucléosomes adjacents (Hong *et al.*, 1993).

Les HAT

Les HAT sont des enzymes qui peuvent transférer un groupe acétyl de l'acétylcoenzyme A sur un résidu lysine. Si les lysines des régions amino-terminales des histones semblent être les cibles principales de nombreuses HAT, d'autres protéines non-histones sont aussi acétylées. Il existe deux types de HAT. Les HAT de type B sont cytoplasmiques et acétylent les histones néo-synthétisées, avant leur entrée dans le noyau et donc avant leur incorporation dans la chromatine. Les histones H3 et H4 acétylées s'associent en complexe trimérique avec le facteur CAF-1 (Chromatin Assembly Factor-1), pour être transportées vers le noyau, et déposées lors de la phase S, sur l'ADN en cours de réplication (Mello and Almouzni, 2001). Quant aux HAT de type A, elles sont nucléaires et seraient responsables du changement dans l'activité transcriptionnelle de certains gènes. Actuellement, un grand nombre de protéines à activité HAT ont été identifiées. Cependant, les plus étudiées restent Gcn5 de *S. cerevisiae* (Kuo *et al.*, 1996) et p300/CBP (Bannister and Kouzarides, 1996) qui ont été initialement décrites comme coactivateurs transcriptionnels. Toutes les HAT caractérisées *in vivo*, ont été trouvées associées dans des complexes multiprotéiques. En outre, il a été suggéré que des composants additionnels étaient nécessaires à l'action de Gcn5 sur la chromatine car la protéine recombinante Gcn5 ne pouvait acétyler que les histones libres et non celles de nucléosomes. Le groupe de J. Workman a ainsi isolé deux complexes à activité HAT chez la levure : les complexes SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acétyltransférase) et ADA. Ces deux complexes contiennent la sous unité Gcn5, porteuse de l'activité HAT, et sont capables d'acétyler les histones dans les nucléosomes. Deux autres complexes possédant une sous unité à activité HAT, autre que Gcn5, ont été isolés chez la levure (Grant *et al.*, 1997). Il s'agit de NuA4 (Nucleosomal Acetyltransferase of histone H4) et de NuA3 (Nucleosomal Acetyltransferase of histone H3) (Grant *et al.*, 1997). Les sous unités à activité HAT de ces complexes sont

respectivement Esa1 et Sas3. Chez l'homme, plusieurs complexes à activité HAT ont été identifiés. Trois d'entre eux présentent des homologies avec le complexe SAGA de la levure. Le premier isolé est le complexe PCAF, dont l'unité catalytique est PCAF (*p300/CBP Associated Factor*) (Ogryzko *et al.*, 1998). Deux autres complexes possédant l'homologue humain de Gcn5 ont été isolés. Il s'agit tout d'abord du complexe STAGA (*Spt3-TAFII31-Gcn5-L acétylase*) (Martinez *et al.*, 1998) et du complexe TFTC (*TBP-Free-TAFII-containing Complex*) (Wieczorek *et al.*, 1998).

Les HDAC

Les histones acétyltransférases (HAT) sont associées à un grand nombre de facteurs de transcription, elles agissent comme des coactivateurs transcriptionnels en permettant l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription. À l'inverse, les histones déacétylases (HDAC) sont associées à différents répresseurs transcriptionnels (Kuo and Allis, 1998).

La protéine humaine HDAC1 est la première histone déacétylase à avoir été isolée (Taunton *et al.*, 1996). Son homologue chez *S. cerevisiae*, la protéine Rpd3, est nécessaire à la régulation de la transcription de nombreux gènes (Vidal and Gaber, 1991). La réunion des informations biochimiques sur HDAC1 et génétiques sur Rpd3 a fourni la première connexion entre répression de la transcription et déacétylation des histones. Chez les eucaryotes supérieurs, les HDAC sont réparties dans trois classes distinctes (I, II et III) sur la base de leurs similitudes de séquences avec les HDAC de levure Rpd3, HDA1 et SIR2, respectivement (Khochbin *et al.*, 2001). La première classe contient les protéines humaines HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 alors que la classe II renferme les protéines humaines HDAC5 HDAC6, HDAC7 et HDAC9. Le troisième groupe de déacétylases est constitué de sept protéines SIRT1 à 7. Les histones déacétylases font partie de complexes multiprotéiques. Par exemple, les complexes Sin3/HDAC et NuRD/Mi2/NRD contiennent les protéines HDAC1 et HDAC2. Les autres composants du complexe détermineraient la spécificité de substrat. Les HDAC peuvent être recrutées sur l'ADN et réprimées la transcription par l'intermédiaire de deux types de facteurs, soit des répresseurs transcriptionnels soit des protéines se liant à l'ADN méthylé.

Plusieurs interactions entre des répresseurs transcriptionnels et des complexes HDAC ont été mises en évidence. Par exemple, trois des HDAC connues (HDAC1-3) interagissent avec pRb et forment des complexes répresseurs HDAC/pRb/E2F qui sont recrutés sur les promoteurs régulés par les E2F. Récemment, l'importance de la déacétylation des histones dans le contrôle du cycle cellulaire a été soulignée. Les histones H3 et H4 des promoteurs régulés par les E2F sont hypoacétylés dans les cellules quiescentes alors qu'ils deviennent hyperacétylés

en fin de phase G1 et en phase S (Takahashi *et al.*, 2000). Le recrutement des HDAC par pRb reverse l'acétylation des histones au niveau du promoteur et mène à une répression active du promoteur (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Enfin, l'inhibition des HDAC par la trichostatine A empêche la répression de pRb sur certains gènes, suggérant un rôle important des HDAC dans la fonction de pRb (Zhang *et al.*, 2000). D'autre part, le complexe Sin3 a été identifié comme un cofacteur du répresseur transcriptionnel hétérodimérique Mad-Max (Ayer and Eisenman, 1993; Schreiber-Agus *et al.*, 1995). Sin3 est recruté par le dimère Mad-Max fixé sur les sites du facteur de transcription c-Myc. Depuis, plusieurs groupes ont montré que l'activité enzymatique HDAC du complexe Sin3 est nécessaire à la répression par Mad-Max (Hassig *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997).

Les complexes à activité HDAC peuvent également réprimer de la transcription, du fait de leur recrutement par des protéines se liant à l'ADN méthylé. Depuis longtemps, on savait que l'ADN était méthylé sur le carbone en position 5 de résidus cytosines, présents dans les dinucléotides CpG. Chez les vertébrés, 60 à 90% des dinucléotides CpG sont méthylés. Beaucoup de CpG non méthylés sont situés dans des régions appelées îlots CpG qui regroupent un grand nombre de promoteurs fonctionnels. Inversement, de nombreuses études ont corrélé la méthylation de l'ADN à une inactivation transcriptionnelle (Razin and Riggs, 1980). Cependant, le mécanisme moléculaire impliqué restait inconnu. Récemment, il a été montré que MeCP2 (*Methyl CpG binding Protein 2*), une protéine qui se lie spécifiquement à l'ADN méthylé interagit avec le complexe Sin3/HDAC (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs d'histones déacétylases lève la répression médiée par MeCP2. Enfin, le complexe NuRD/Mi2/NRD est aussi impliqué dans la répression transcriptionnelle de l'ADN méthylé car il est capable d'interagir avec l'ADN méthylé via la protéine MBD2 (*Methyl-CpG Binding Domain protein 2*) (Zhang *et al.*, 1999).

Phosphorylations des histones

La phosphorylation des histones, comme leur acétylation, modifie leur charge. Cependant, contrairement à l'acétylation, la fonction de la phosphorylation des histones n'est pas clairement définie. La phosphorylation catalysée par les histone-kinases (HK), consiste en une réaction de transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine ou thréonine. Il est établi depuis bientôt 30 ans que le niveau global de phosphorylation des histones fluctue de manière très marquée au cours du cycle cellulaire (Bradbury *et al.*, 1973), ce qui se caractérise par des pics de phosphorylation de l'histone H3 au cours de la mitose (Gurley *et al.*, 1978). Cette phosphorylation affecte la sérine 10 de l'histone H3 et a été impliquée dans la condensation (Hendzel *et al.*, 1997; Van Hooser *et al.*, 1998) et dans la

cohésion des chromosomes (Kaszas and Cande, 2000). Cependant le rôle direct de cette phosphorylation dans ces mécanismes a été remis en cause (de la Barre *et al.*, 2001).

La phosphorylation des histones H3 sur la sérine 10 a aussi été impliquée dans l'activation transcriptionnelle. Chez les mammifères, la stimulation de cellules quiescentes par des facteurs de croissance conduit à la phosphorylation des nucléosomes présents sur les gènes précoces *c-fos* et *c-myc*. Cette phosphorylation est concomitante à l'activation transcriptionnelle de ces deux gènes (Chadee *et al.*, 1999; Mahadevan *et al.*, 1991). De plus, cette phosphorylation de l'histone H3 est restreinte à une petite fraction d'histones H3 qui sont aussi hautement acétylées (Barratt *et al.*, 1994).

La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 module l'activité d'acétylation sur la lysine 14 de l'histone H3 (figure 28). Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que certains gènes dont l'activation est dépendante de l'histone acétyltransférase Gcn5 sont également dépendants de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (Lo *et al.*, 2000). La mutation de cette sérine en alanine affaiblit la transcription de ce groupe de gènes. D'autre part, l'activité de Gcn5 est stimulée si la sérine 10 est préalablement phosphorylée (Cheung *et al.*, 2000b). Il existe donc des coopérations entre les différentes machineries de modifications des histones qui permettent de réguler leurs activités.

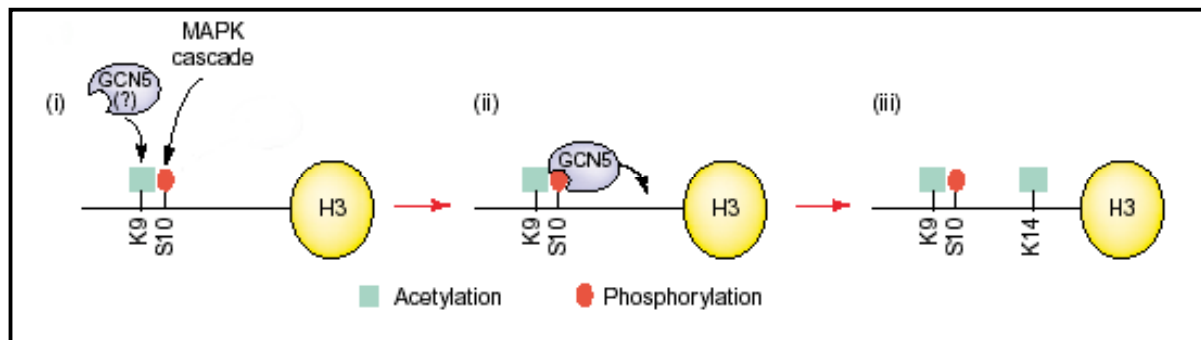


Figure 28: Coopération entre les voies de phosphorylation et d'acétylation des histones dans l'activation de la transcription des gènes

- i) L'histone H3-K9 serait acétylé par l'HAT Gcn5 avant la phosphorylation de l'histone H3-S10 induite par la voie MAPK
- ii) La phosphorylation de l'histone H3-S10 augmente l'affinité de fixation de Gcn5 pour la queue N-terminale de l'histone H3
- iii) Gcn5 acétyle H3 sur K14 ce qui induit la transcription du gène

Méthylations des histones

La méthylation des histones consiste en une réaction de transfert d'un groupement méthyle, apporté par une molécule de S-adenosyl-méthionine (SAM), vers un résidu lysine ou arginine. Ces réactions sont catalysées par les histones méthyltransférases (HMT). Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne modifie pas la charge globale des histones. Pourtant, comme

l'acétylation, la méthylation des histones a été corrélée à la régulation de la transcription. Cependant, la méthylation des histones n'a pas comme conséquence systématique une activation transcriptionnelle. Le résidu affecté, son emplacement, le nombre de méthylation ainsi que la combinaison avec d'autres modifications covalentes des histones déterminent l'effet transcriptionnel activateur ou répresseur.

Les premières histones méthyltransférases agissant sur les résidus lysine à avoir été isolées sont les protéines Suv39H1 humaine et murine (Aagaard *et al.*, 1999). Ces protéines méthylent *in vitro* la lysine 9 de l'histone H3 (Rea *et al.*, 2000). Plusieurs familles d'histones méthyltransférases ont maintenant été identifiées. Chaque famille présente une spécificité de substrat (histone et résidu) (Kouzarides, 2002) et contient un motif SET nécessaire à l'activité (Rea *et al.*, 2000). La méthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 est reconnue par le répresseur transcriptionnel HP1 et peut entraîner la formation d'hétérochromatine, transcriptionnellement inactive (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Les protéines Suv39H1 et HP1 sont également impliquées dans la répression transcriptionnelle de l'euchromatine (sans toutefois induire la formation d'hétérochromatine). En effet, il a été montré que pRb interagit *in vivo* avec ces deux protéines et peut donc les recruter directement sur le promoteur de la cycline E afin de réprimer son expression (Nielsen *et al.*, 2001).

L'histone H3 peut également être méthylée sur la lysine 4. Cette modification est catalysée par la HMT Set-1 chez *S. cerevisiae* (Briggs *et al.*, 2001), et par Set-9 chez l'Homme (Nishioka *et al.*, 2002). Contrairement à la méthylation de la lysine 9, la méthylation de la lysine 4 est restreinte à l'euchromatine, et semble liée à une activation transcriptionnelle via deux mécanismes (Bernstein *et al.*, 2002; Nishioka *et al.*, 2002; Strahl *et al.*, 1999) (figure 29). D'une part, cet événement de méthylation sur K4 empêche l'interaction entre le facteur de désacétylation NuRD et la queue de l'histone H3 (Nishioka *et al.*, 2002). D'autre part, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 inhibe *in vitro* la méthylation par Suv39H1 de la lysine 9 de l'histone H3 (Nishioka *et al.*, 2002). Cependant, d'après d'autres travaux, la méthylation de la lysine 4 semble également nécessaire à l'inhibition de certains loci, comme les télomères et les loci portant les gènes codant pour l'ARN ribosomal (ADNr) (Briggs *et al.*, 2001). Cette dualité d'effets n'est pas encore très claire, et il est possible que l'effet activateur ou répresseur de cet événement de méthylation dépende également de la présence d'autres modifications.

Il existe trois degrés distincts de méthylation d'un résidu lysine: la mono-, la di- et la triméthylation. Par la génération d'anticorps permettant la discrimination entre les formes di et triméthylée de la lysine 4 de l'histone H3, il a récemment été mis à jour une spécificité fonctionnelle de ces degrés de modification: tandis que la tri-méthylation n'est présente que sur les gènes actifs, la di-méthylation est présente indifféremment sur les gènes actifs et inactifs. D'après les auteurs de ces travaux, le degré de méthylation du résidu lysine 4 pourrait constituer un indicateur du degré de transcription (Santos-Rosa *et al.*, 2002).

Enfin, des protéines arginine méthyltransférases (PRMT) ont également ont été isolées. PRMT1 et PRMT4 (aussi appelée CARM1) sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle; elles jouent notamment un rôle de coactivateurs des récepteurs nucléaires (Bauer *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001). Par contre, PRMT5 agit comme un corépresseur. Elle est notamment impliquée dans la répression transcriptionnelle du gène de la cycline E et du gène cible de c-myc, cad (Carbamoyl-phosphate synthase-Aspartate carbamoyltransférase-Déhydroorotase) (Fabrizio *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2003).

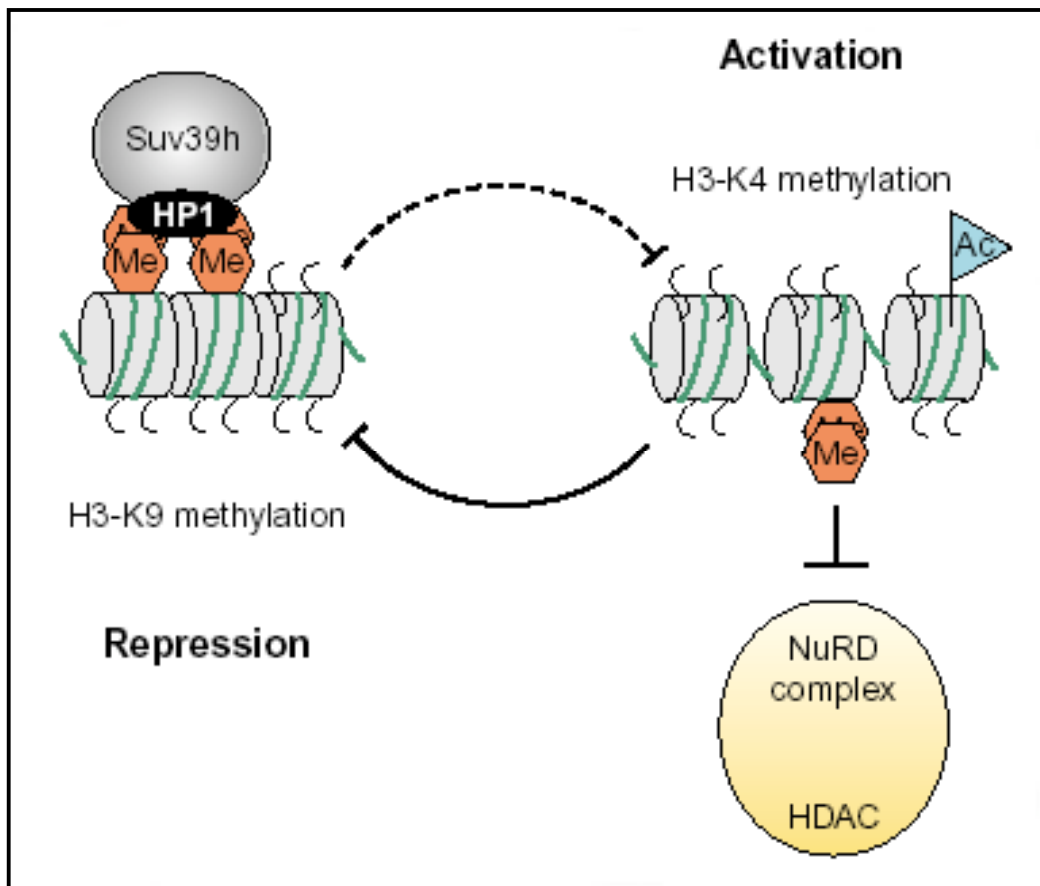


Figure 29: Les méthylations H3-K9 et H3-K4 ont des effets opposés sur la transcription
Suv39H1 méthyle H3 sur K9. Cette modification est reconnue par HP1 qui induit la formation d'une structure nucléosomale plus compacte, qui inhibe la transcription. Au contraire, la méthylation H3-K4 empêche les effets inhibiteurs du complexe NuRD et de Suv39H1

c) Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP

Les complexes remodelant la chromatine de façon ATP dépendante sont également d'importants complexes pour la régulation de la structure de la chromatine (Vignali *et al.*, 2000). *In vitro*, ces complexes possèdent plusieurs types d'activités□ils peuvent altérer la

structure du nucléosome, modifier la position des nucléosomes sur l'ADN et catalyser le transfert de nucléosomes d'une région de l'ADN vers une autre (Peterson and Workman, 2000; Vignali *et al.*, 2000). Cependant, les mécanismes impliqués *in vivo* dans le remodelage de la chromatine par ces complexes ne sont pas clairement définis.

Les complexes de remodelage sont classés en fonction de leur sous unité catalytique en quatre groupes : SWI/SNF, ISWI et MI-2/CHD. La figure 30 montre une représentation schématique des ATPases Swi2/Snf2, ISWI, Mi-2/CHD. Leur domaine ATPase conservé présente des similitudes de séquences avec les ADN hélicases mais il ne possède pas d'activité hélicase. Il est également intéressant à noter que chaque type d'ATPase possède un domaine particulier. Les ATPases de type Snf2/swi2 possèdent un bromodomaine, motif protéique de 110 acides aminés qui reconnaît les histones acétylées. Les ATPases de type Iswi ont un domaine SANT (pour Swi3 Ada2 N-CoR TFIIB), module de liaison à l'ADN retrouvé dans des protéines remodelant la chromatine. La famille Mi-2 est quant à elle, caractérisée par la présence d'un chromodomaine, motif constitué d'une cinquantaine de résidus qui se lie aux histones méthylées. La figure 30 présente les différents complexes isolés chez la levure, la drosophile et l'homme. Le nombre de sous unités de ces différents complexes varie énormément. Il est probable que plusieurs sous unités servent de plate-forme d'interaction, elles seraient donc impliquées dans le ciblage de l'activité de ces complexes (Phelan *et al.*, 1999). Tous ces complexes ont des activités différentes et agissent vraisemblablement selon des modes distincts.

La famille SWI/SNF

Les complexes SWI/SNF chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le complexe SWI/SNF (pour mating type *Switching/Sucrose Non Fermenting*) est le premier complexe de remodelage de la chromatine à avoir été isolé. L'ATPase qui le caractérise est swi2/snf2. Plusieurs composants de ce complexe ont été originellement identifiés dans des cribles génétiques chez la levure comme des régulateurs positifs de la transcription du gène de l'endonucléase HO (gènes de la famille SWI) ou de l'invertase SUC2, requise pour la croissance sur saccharose (gènes de la famille SNF) (Winston and Carlson, 1992). Des études génétiques et biochimiques ont par la suite montré que ces différentes protéines forment un même complexe, composé d'au moins 11 sous unités et d'une masse moléculaire d'environ 2 MDa (Cote *et al.*, 1994) (figures 30 et 31).

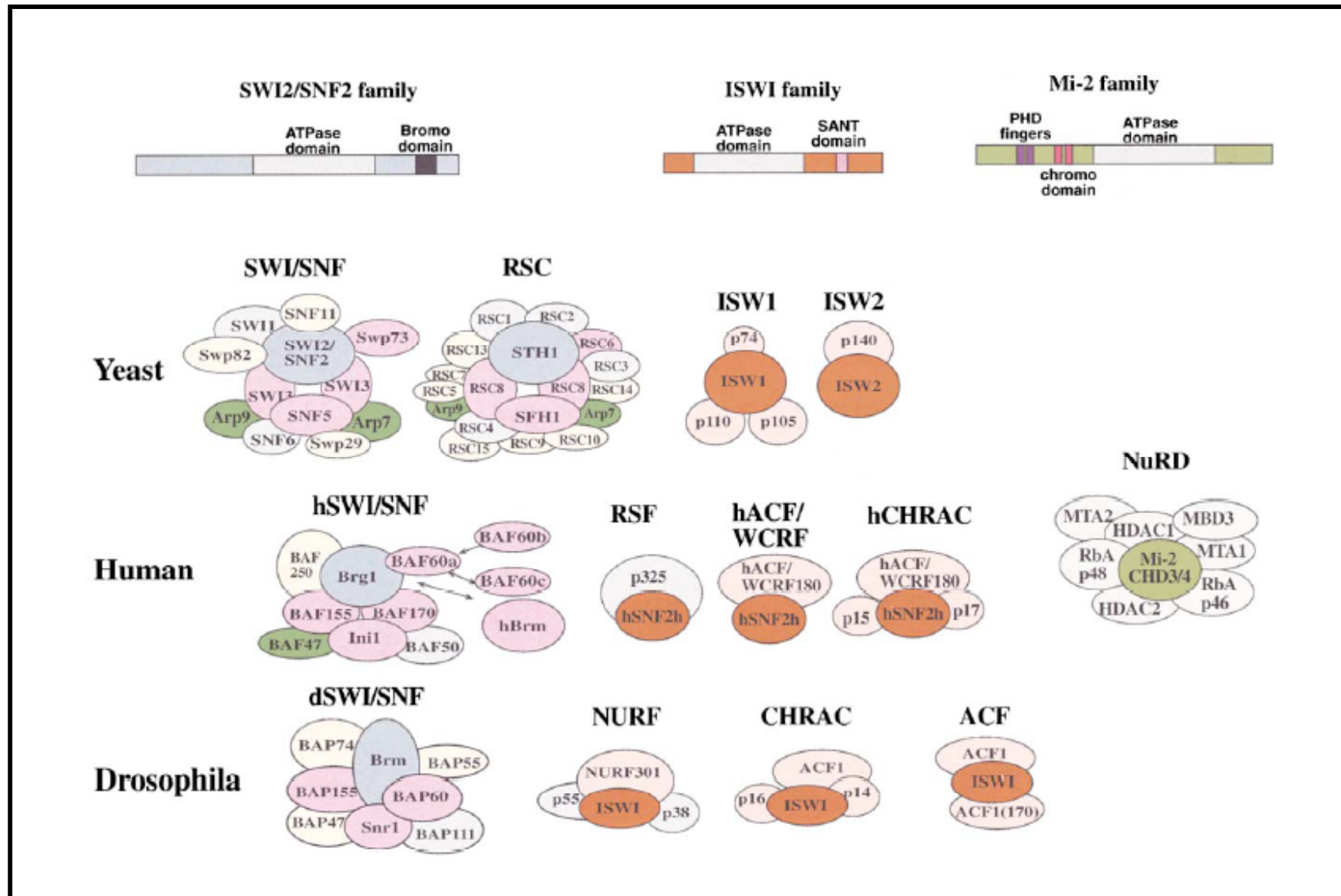


Figure 30: Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP

<i>S. cerevisiae</i> [†]			<i>Drosophila</i>	Human [†]				
Swi/Snf	RSC	RSCa	BRM	hSwi/Snf-A (BAF)	hSwi/Snf-B (PBAF)	HBrm	hBrg1 (I)	hBrg1 (II)
Swi1/Adr6			ELD/Osa	BAF 250 / p270 and hEld/Osa1		BAF250/p270	BAF250/p270	BAF250/p270
Swi2/Snf2	Sth1/Nps1	Sth1/Nps1	BRM	Brg1	Brg1	Brg1	Brg1	Brg1
Swi3	Rsc8/Swh3	Rsc8/Swh3	BAP155/ MOIRA	BAF170 and BAF155	BAF170 and BAF155	BAF170 and BAF155	BAF170 and BAF155	BAF170 and BAF155
Snf5 Snf6 Snf11 Swp29/Tfg3/ Anc1/Taf30	Sth1	Sth1	SNR1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1
Swp73	Rsc6	Rsc6	BAP60	BAF60a	BAF60a	BAF60§	BAF60§	
Swp82								
Arp9/Swp59	Arp9/Rsc12	Arp9/Rsc12	BAP55	BAF53	BAF53	BAF53§	BAF53§	BAF53§
Arp7/Swp61	Arp7/Rsc11	Arp7/Rsc11	BAP47/ ACT1/2	β-actin	β-actin			
	Rsc1 or Rsc2	Rsc1 or Rsc2			Polybromo/ BAF180			
	Rsc4,5,7,9,10, 13-15 Rsc3 and Rsc30	Rsc4,5,7,9,10, 13-15	BAP111 BAP74		BAF57	BAF57	BAF57	BAF57
						p220 p66 mSIN3A HDAC1 HDAC2 RbAP48	p220 p66 mSIN3A HDAC2*	p66 HDAC2* RbAP48*

Figure 31 Les complexes remodelant la chromatine de la famille SWI/SNF. Les sous-unités homologues par leur séquence et/ou leur fonction sont groupées horizontalement. La liste des complexes SWI/SNF humains a été obtenue de purifications biochimiques.

Chez *S. cerevisiae*, SWI/SNF n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Les mutations dans les différentes sous unités donnent des phénotypes très variés (défauts de croissance, incapacité à utiliser certaines sources de carbone, défauts dans le changement de type sexuel). Des études récentes par puces à ADN ont montré que SWI/SNF n'a pas un rôle général dans la transcription. Il n'est requis (directement ou indirectement) pour la transcription que de 3 à 6 % des gènes selon les études (Holstege *et al.*, 1998; Sudarsanam *et al.*, 2000). De plus, SWI/SNF a un rôle positif et négatif sur la transcription. Les gènes régulés par SWI/SNF sont répartis sur tout le génome, suggérant que ce complexe affecte la structure de la chromatine localement et non sur de larges domaines chromatiniens (Holstege *et al.*, 1998; Sudarsanam *et al.*, 2000).

Des expériences de sensibilité de la chromatine à la digestion par des nucléases sur le gène *SUC2* ont démontré la "fonction chromatinienne" de SWI/SNF. L'activation de la transcription du gène s'accompagne d'un changement du profil de digestion. Des mutations dans les gènes codant les sous unités Snf2 ou Snf5 abolissent à la fois l'induction transcriptionnelle et la modification de la structure chromatinienne du gène *SUC2*. Celles-ci sont en partie rétablies lorsque la quantité d'histones H2A et H2B est artificiellement

diminuée (Hirschhorn *et al.*, 1992; Wu and Winston, 1997). Ces observations suggèrent que les nucléosomes sont déplacés, permettant ainsi l'accès de la machinerie de transcription. Il a d'ailleurs été montré que le complexe SWI/SNF est capable de stimuler la fixation d'un activateur transcriptionnel dérivé de Gal4. De plus, il a été établi que SWI/SNF est capable d'utiliser l'ATP pour modifier le positionnement et la structure des nucléosomes (Kingston and Narlikar, 1999).

S. cerevisiae exprime aussi un complexe SWI/SNF "like": RSC (Remodel the Structure of Chromatin). Ce complexe d'environ 1MDa a été isolé chez la levure sur la base du haut degré d'homologie avec le complexe SWI/SNF et en particulier entre leurs sous unités catalytiques Sth1 et Swi2/Snf2 (Cairns *et al.*, 1996) (figures 30 et 31). Le complexe RSC est composé d'au moins 18 sous unités (Cairns *et al.*, 1996) dont trois (en plus de Sth1) sont homologues à des protéines du complexe SWI/SNF. De plus, RSC contient deux protéines apparentées à l'actine, Arp7/Rsc11/Swp61 et Arp9/Rsc12/Swp59 qui sont également présentes dans le complexe SWI/SNF. Cependant, plusieurs différences existent entre les complexes RSC et SWI/SNF. Notamment, le complexe RSC est essentiel pour la croissance mitotique et serait au moins dix fois plus abondant dans la cellule que SWI/SNF. Enfin, contrairement aux complexes SWI/SNF de levure, le complexe RSC n'est pas été copurifié avec l'ARN polymérase II (Cairns *et al.*, 1996; Neish *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1996).

Le complexe RSC a également été impliqué dans le contrôle de la transcription. Le mutant *nps1-105* (mutant de la sous unité catalytique Sth1) présente un taux de sporulation réduit et un retard dans le déclenchement de la méiose. Ce phénotype s'accompagne de défauts d'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes méiotiques précoces comme *IME2*, *SPO11* et *SPO13*. Il a donc été proposé que RSC serait nécessaire à l'activation de l'expression de gènes au moment de l'initiation de la méiose (Yukawa *et al.*, 1999). D'autre part, Moreira et Holmberg ont montré que RSC est impliqué dans le contrôle de la transcription du gène *CHA1* (Moreira and Holmberg, 1999) qui est fortement induit lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérine. Lorsque les protéines Sth1 ou Rsc8 sont déplétées, l'expression du gène *CHA1* dans des cellules non induites est comparable à celle des cellules induites. Or, cette dépression de *CHA1* a été corrélée avec des modifications de la structure chromatinienne du promoteur. L'induction de la transcription du gène *CHA1* s'accompagne normalement d'un déplacement du nucléosome situé sur la boîte TATA du promoteur *CHA1*. Cependant, dans les cellules déplétées pour Sth1 ou Rsc8, ce nucléosome est absent quelles que soient les conditions de croissance. RSC serait donc essentiel pour maintenir dans une conformation répressive la chromatine au niveau du promoteur de *CHA1*. De plus, des

expériences de sensibilité à la digestion par la DNase I montre que ce complexe est capable *in vitro* de remodeler de manière ATP dépendante la structure de la chromatine (Cairns *et al.*, 1996). Tous ces résultats suggèrent un rôle de RSC dans la régulation de la transcription à travers un remodelage de la chromatine.

D'autres études ont démontré une implication du complexe RSC dans le cycle cellulaire et plus particulièrement lors la transition G2/M. Différents mutants des sous unités du complexe RSC sont bloqués à la transition G2/M suite à l'activation du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (Angus-Hill *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 1998). De plus, les mutants de Sth1 sont plus sensibles aux drogues déstabilisant les microtubules et présentent des anomalies de ségrégation des chromosomes (Chai *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2003; Tsuchiya *et al.*, 1998). Par ailleurs, une étude récente a montré que RSC interagit avec les centromères, les bras des chromosomes et la cohésine (Hsu *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). Alors que son association avec les centromères est constitutive, son interaction avec les bras des chromosomes est régulée au cours du cycle cellulaire. Les auteurs suggèrent que RSC est nécessaire pour le recrutement de la cohésine sur les bras des chromosomes et donc qu'il joue un rôle dans la séparation des chromosomes mitotiques (Huang *et al.*, 2004).

Les complexes SWI/SNF des eucaryotes supérieures

Le complexe SWI/SNF de la levure est le premier complexe d'une famille de facteurs contenant une ATPase de type à Swi2/Snf2 à avoir été isolé. Ensuite, de nombreux complexes similaires ont été identifiés dans plusieurs autres organismes comme la drosophile, le nématode, le xenope, le poulet, la souris et l'humain. Chez la drosophile, l'homologue de swi2/snf2, Brm (*Brahma*) est présent dans un complexe très similaire au SWI/SNF de la levure (figures 30 et 31). Dans les cellules mammifères, la situation est plus complexe. Ces cellules contiennent deux ATPases de type Swi2/Snf2, hBrm (SNF2 \square) et Brg1 (SNF2 \square , *Brm Related gene*). De plus, des études biochimiques ont identifié différents variants du complexe SWI/SNF de mammifère qui contiennent tous des homologues du complexe SWI/SNF de la levure. Trois complexes humains ont été purifiés à partir de deux fractions chromatographiques distinctes de cellules HeLa (figure 31) (Wang *et al.*, 1996a; Wang *et al.*, 1996b)). La première fraction contient deux complexes de compositions protéiques identiques, en dehors de leur sous unité ATPase qui est soit Brg1, soit Brm. Ces deux complexes ont des propriétés biochimiques voisines et sont tous les deux nommés SWI/SNF-A ou BAF (*Brg1 Associated Factor*). La deuxième fraction ne comporte qu'un seul complexe,

SWI/SNF-B ou PBAF (*PolyBromo Associated Factor*), dont l'ATPase est Brg1 (Xue *et al.*, 2000). Les formes A et B contiennent chacune des sous unités spécifiques. Il a été proposé que le complexe SWI/SNF-B serait l'homologue humain de RSC en raison des fortes similitudes entre les protéines Rsc 1, 2 et 3 de la levure avec Baf180 présent uniquement dans le complexe SWI/SNF-B (Xue *et al.*, 2000).

Bien qu'elles présentent 75% d'identité, les ATPases Brg1 et Brm ne semblent pas avoir les mêmes rôles biologiques. L'inactivation du gène *brg1* induit une létalité embryonnaire qui rappelle le caractère essentiel du complexe RSC. D'autre part, cela suggère que les deux ATPases Brm et Brg1 ne sont pas interchangeables et que les trois complexes SWI/SNF ne sont pas redondants. Toutefois, l'inactivation du gène *brg1* est possible dans certains types cellulaires, ce qui indique que sa fonction n'est pas requise de manière absolue dans tous les types cellulaires (Muchardt and Yaniv, 2001). Contrairement à Brg1, les souris avec une invalidation bi-allélique du gène *brm* sont viables. Cette inactivation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la protéine Brg1, ce qui évoque un mécanisme de compensation entre les deux formes de complexes SWI/SNF-A pour pallier l'absence de l'ATPase Brm. Toutefois, les cellules *brm* *-/-* présentent des défauts de contrôle du cycle cellulaire. Chez les mammifères, les complexes SWI/SNF jouent un rôle majeur dans le contrôle de la structure chromatinienne et dans la régulation du cycle cellulaire. Le développement de plusieurs types de cancers sont liés à des dysfonctionnements de SWI/SNF (Muchardt and Yaniv, 1999a; Muchardt and Yaniv, 1999b). Par exemple, la grande majorité des tumeurs rhabdoïdes, un des cancers pédiatriques les plus agressifs, est associée à des événements de délétion du gène *SNF5/INI1*, une des sous unités des complexes SWI/SNF humains (Roberts *et al.*, 2000; Versteeg *et al.*, 1998).

Les complexes de la famille ISWI

La famille ISWI est caractérisée par la protéine Iswi (*Imitation swi*) qui a été isolée chez la drosophile. Cette protéine présente de forte similitude avec Swi2/Snf2 mais contient un motif de type SANT à la place du bromodomaine présent dans la protéine Swi2. Le motif SANT est un motif de liaison à l'ADN fréquemment trouvé dans des protéines liées à la chromatine (Aasland *et al.*, 1996). Les différents complexes de la famille ISWI sont (figure 30): NURF (*NUcleosome Remodeling Factor*), CHRAC (*Chromatin Remodeling and Assembly Complex*) et ACF (*ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor*) chez la drosophile ; ISW1 et ISW2 chez la levure ; RSF (*Remodeling and Spacing Factor*), WCRF (*Williams syndrome transcription factor Chromatin Remodeling Factor*), CHRAC et NoRC (*Nucleolar Remodeling*

Complex) chez l'humain (Langst and Becker, 2001). Il est intéressant à noter la présence de la même ATPase dans plusieurs complexes de compositions différentes. Des études indiquent que les complexes CHRAC, ACF et ISW2 peuvent moduler l'espacement des nucléosomes *in vitro* (Tsukiyama and Wu, 1997; Varga-Weisz *et al.*, 1997) alors que les facteurs NURF et ISW1 ne le peuvent pas. Par ailleurs, la protéine Iswi, produite de manière recombinante, possède une activité intrinsèque de remodelage, elle peut assembler des nucléosomes et catalyser le transfert d'un nucléosome du centre de la matrice vers son extrémité. Au sein de CHRAC, Iswi catalyse la réaction inverse en transférant les nucléosomes préférentiellement des extrémités vers le centre de la matrice (Langst *et al.*, 1999). Il a été démontré que la protéine Acf1 qui fait partie des complexes ACF et CHRAC permet d'augmenter très fortement l'activité d'Iswi mais également de modifier ces propriétés intrinsèques de remodelage (Eberharter *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 1999). En conclusion, bien que tous ces complexes possèdent l'ATPase Iswi, leurs activités sont différentes. L'activité d'Iswi dépend des autres protéines du complexe.

Les complexes de la famille ISWI ont comme les complexes SWI/SNF un rôle important dans le contrôle de la prolifération. Les souris portant une inactivation bi-allélique pour le gène *snf2h* (homologue humain d'Iswi), meurent à un stade péri-implantatoire. Les expériences réalisées sur les blastocystes indiquent que la perte de *Snf2h* induit un arrêt de la croissance et la mort cellulaire (Stopka and Skoultschi, 2003). D'autres travaux ont montré que la déplétion d'Acf1 ou de *Snf2h* par RNAi, inhibe spécifiquement la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique, engendrant un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire en fin de phase S. L'utilisation de drogues permettant la décondensation de l'hétérochromatine permet de reverser l'effet de la déplétion de ces deux protéines. Tous ces résultats suggèrent que le complexe Acf1-*Snf2h* est nécessaire à la réplication dans les régions où la chromatine est hautement condensée (Collins *et al.*, 2002).

Les complexes de la famille Mi-2/CHD

L'ATPase fondatrice de cette famille est la protéine humaine Mi-2 (ou CHD3/4) qui a été précédemment décrite comme un autoantigène dans la dermatomyosite (Wade *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998b). Cette protéine fait partie de la famille de protéines CHD (Chromo Helicase DNA-binding), elle possède deux chromodomaines (figure 30). Elle appartient au complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylating*) (Tong *et al.*, 1998; Xue *et al.*, 1998) et son activité ATPase est modulée par les autres protéines du complexe comme pour d'autres complexes de remodelage (Wang and Zhang, 2001) (figure 30). Le complexe NuRD

contient également la protéine Mta1 (*Metastasis associated gene 1*), dont la surexpression dans les cellules cancéreuses est liée à une invasion métastatique (Toh *et al.*, 1997; Toh *et al.*, 1994). Néanmoins, la particularité de ce complexe est, qu'en plus de son activité de remodelage de la chromatine, il possède une activité déacétylase. La présence des histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 dans ce complexe, suggère qu'il est impliqué dans la répression transcriptionnelle. D'ailleurs, ce complexe interagit également avec MBD2, une protéine à activité déméthylase de l'ADN, qui se lie à l'ADN méthylé (Wade *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Les auteurs proposent que MBD2 recrute NuRD sur l'ADN méthylé pour permettre la répression transcriptionnelle.

d) L'activité de remodelage et l'activité de pRb

Rôles des complexes de remodelage dépendants de l'ATP dans la fonction de pRb

Les complexes SWI/SNF semblent liés au contrôle de la prolifération via entre autre la répression des gènes régulés par les E2F (Muchardt and Yaniv, 2001). Des chercheurs ont mis en évidence que des mutations sur les gènes codant des sous unités des SWI/SNF accentuaient le phénotype de drosophile surexprimant dE2F. Ceci suggérait que l'activité des complexes SWI/SNF, remodelant la chromatine, pouvaient être importants dans la voie dE2F/dRb (Staebling-Hampton *et al.*, 1999). D'autres équipes ont ensuite montré que les homologues humains de Swi2/Snf2, Brm et Brg1, pouvaient interagir avec les protéines de la famille de pRb (Strober *et al.*, 1996). Cependant, Brg1 ne semble pas interagir avec pRb au niveau du site de fixation LXCXE, permettant ainsi à pRb de recruter les SWI/SNF et les HDAC au sein d'un même complexe (Zhang *et al.*, 2000). pRb peut également se lier à Brm et E2F, suggérant qu'un complexe SWI/SNF-Rb-E2F peut se former sur les sites E2F des promoteurs (Trouche *et al.*, 1997). Enfin, plusieurs publications récentes soutiennent que les complexes SWI/SNF sont importants dans la fonction de pRb. En effet, la surexpression de Brg1 et Brm induit un arrêt de la croissance cellulaire et cet arrêt est dépendant de l'interaction de ces protéines avec pRb. De plus, Brm et Brg1 facilitent l'inhibition, relayée par pRb, de l'activité transcriptionnelle des E2F (Trouche *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000 234). Enfin, les formes dominantes négatives de Brm et Brg1 empêchent l'inhibition de croissance induite par pRb (Dunaief *et al.*, 1994; Strobeck *et al.*, 2000).

Action concertée entre HDAC et SWI/SNF dans la fonction de pRb

On peut se demander s'il existe une coopération *in vivo* entre les différents complexes remodelant la chromatine, en l'occurrence les HDAC et les SWI/SNF, sinon pourquoi pRb s'associerait aux HDAC et aux SWI/SNF. Bien que ces questions restent sans réponse, des résultats récents ont proposé un modèle où ces deux complexes remodelant la chromatine interagiraient dans leur action avec pRb (Zhang *et al.*, 2000) (figure 32).

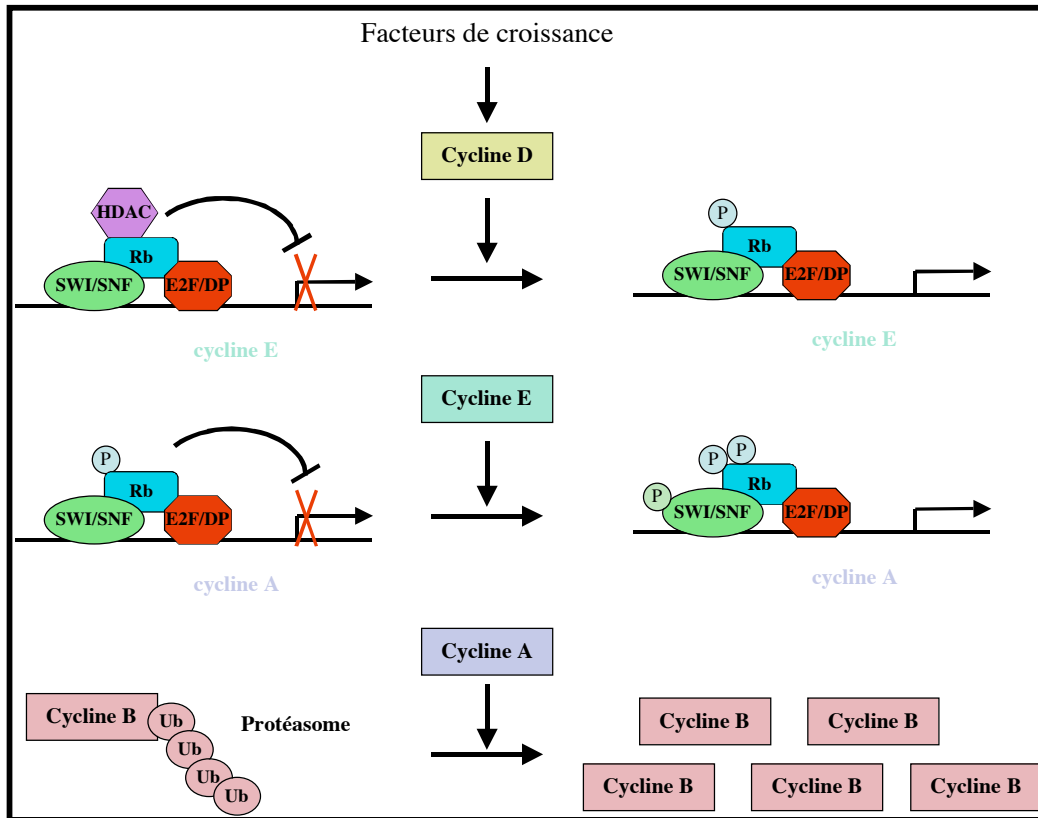


Figure 32 □ Modèle de régulation de l'expression des cyclines par les complexes SWI/SNF-Rb-HDAC

Il semblerait qu'il existe plusieurs complexes corépresseurs distincts faisant intervenir pRb. Ces derniers cibleraient des gènes différents dans différentes phases du cycle. Le complexe trimérique HDAC-pRb-SWI/SNF permettrait la répression des gènes cibles des E2F dans les cellules quiescentes. La phosphorylation de pRb par les complexes cycline D/Cdk4 pendant la phase G1 entraînerait la dissociation de HDAC avec pRb-SWI/SNF. Au contraire du complexe Rb-HDAC, le complexe Rb-SWI/SNF n'est pas détruit et il permettrait l'expression de la cycline E et la progression en phase S. Par contre, il continuerait à réprimer la transcription de la cycline A et de cdc2, inhibant l'entrée en mitose. À la transition G1/S, la

Cycline E s'accumule, le complexe Cycline E/Cdk2 devient actif et inhibe l'activité du complexe pRb-SWI/SNF en phosphorylant Brg1 (Shanahan *et al.*, 1999). Ceci permettrait l'expression de la cycline A et de cdc2 et donc la progression des cellules en phase M.

Une autre publication récente a suggéré un rôle indirect de pRb et des E2F dans la régulation de l'expression de la Cycline B1 et par conséquent dans l'entrée en mitose (Lukas *et al.*, 1999). Ils montrent que le complexe Cycline A/Cdk2 phosphoryle la sous unité Cdh1 de l'APC, bloquant l'activité ubiquitine ligase qui normalement permet la dégradation de la Cycline B1. L'inhibition de l'expression de la cycline A par les complexes Rb-SWI/SNF conduit à l'activation de l'APC et donc à la dégradation de la Cycline B1. Par contre, l'expression de la cycline A en phase S mène à l'inhibition de l'APC par le complexe Cycline A/Cdk2 et donc à l'accumulation de la Cycline B1. La perte de pRb-SWI/SNF permet également l'augmentation de l'expression de cdc2. Ensemble, l'augmentation de l'expression de la Cycline B1 et de Cdc2 conduit à l'accumulation de complexes Cycline B1/Cdc2 qui sont nécessaires à l'entrée en mitose.

1.3 L'EPIDERME

D'après les ouvrages suivants :

- Molecular Biology of the Skin, Darmon M and Blumenberg, Eds. (Academic Press, San Diego, 1993).
- Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin, Goldsmith LA, Ed. (Oxford Univ. Press, New York, 1992).
- The keratinocyte Handbook, Leigh I, Lane B and Watt F, Eds. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994)
- Biologie de la peau, Peyrefitte G, Ed. (Masson 3ième édition, 1997)
- Biologie de la peau humaine, Colette Dezutter-Dambuyant Ed. (Collection séminaire d'enseignement INSERM-COBIP 2003)

1.3.1 Morphologie de la peau

La peau est l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain, elle représente une surface moyenne de 1,5 à 2 m² et environ 8% de la masse corporelle. Son épaisseur, de l'ordre du millimètre, varie selon la région anatomique. Elle ne mesure que le moins de 1mm au niveau des paupières à 5mm voir plus au niveau des paumes et des plantes. Alors que nombre d'insectes ont rangé leurs tissus vitaux à l'intérieur d'une carapace, l'homme se contente d'une petite pellicule de quelques millimètres pour isoler squelette, muscles et organes du monde extérieur. Pourtant, cette peau molle et mince remplit admirablement bien son rôle protecteur grâce à sa structure en mille-feuilles imperméables, résistante et souple, peuplée d'organites spécialisés dans l'alerte, la défense ou la réparation.

La peau est constituée de trois couches superposées. La couche la plus superficielle, l'épiderme, est un épithélium pavimenteux (figure 33). La couche moyenne, le derme, est un tissu conjonctif de soutien, innervé, vascularisé et dans lequel sont implantées les annexes cutanées épidermiques (figure 33). Enfin, la couche la plus profonde, l'hypoderme, est un tissu adipeux.

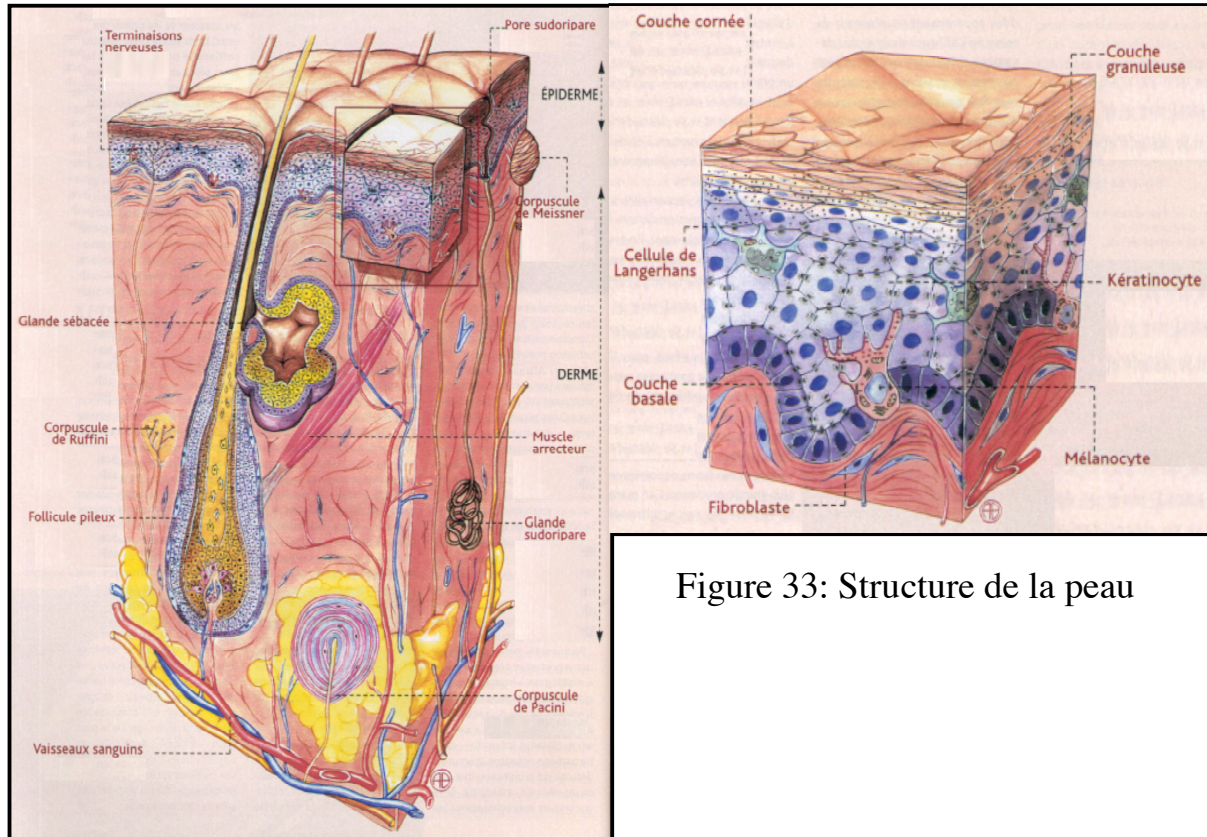


Figure 33: Structure de la peau

a) L'épiderme

L'épiderme, couche la plus superficielle de la peau est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Il ne contient ni vaisseau sanguin ni lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Il est constitué de quatre populations cellulaires différentes, chacune ayant des fonctions spécifiques (figure 33). Les kératinocytes prédominent à plus de 90% et sont responsables de la formation de l'épithélium stratifié. Ils sont ainsi nommés en raison de leur fonction essentielle : la synthèse de filaments intermédiaires constitués de kératines, qui confèrent à la peau toute sa rigidité. Afin de se protéger du soleil, la peau dispose d'une population de cellules appelée mélanocytes. Ils représentent seulement 5% de la population et reposent au fond de l'épiderme sur la membrane basale. Ils sécrètent la mélanine, qui est transférée aux kératinocytes où elle s'agglutine autour des noyaux pour les protéger des radiations ultraviolettes. L'épiderme forme également une véritable barrière contre les bactéries et les micro-organismes indésirables. Il utilise un bactéricide, le sébum, qui est sécrété par les glandes sébacées du derme, lubrifie les poils et la couche cornée de l'épiderme. De plus, des cellules dendritiques du système immunitaire, les cellules de Langerhans, sont disséminées dans tout l'épiderme. Elles interceptent les antigènes qui

auraient pu traverser la couche cornée et les emmènent jusqu'aux ganglions lymphatiques pour les présenter aux lymphocytes. Ces cellules, très mobiles, font la navette via le système lymphatique, des ganglions lymphatiques à l'épiderme. Bien qu'elles représentent moins de 4% de la population totale de l'épiderme, ces cellules font de la peau un organe important du système immunitaire. Enfin, les cellules de Merkel sont rares (moins de 1%) et irrégulièrement réparties, mais toujours dans la couche basale. Ce sont des cellules nerveuses qui permettent la perception de stimuli vibratoires. L'épiderme est par ailleurs caractérisés par la formation des annexes épidermiques ou appendices cutanés que sont les follicules pileux, les ongles, les poils, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. Bien que ces structures s'invaginent profondément jusque dans le derme, elles proviennent de l'épiderme et ont la même origine embryonnaire.

b) La jonction dermo-épidermique

Les cellules épidermiques forment des crêtes épidermiques qui se projettent dans le derme, et inversement les papilles dermiques sont des invaginations de l'épiderme dans le derme. Ces deux structures complémentaires accroissent la surface de contact, d'attachement et d'échange entre le derme et l'épiderme. La jonction dermo-épidermique de la peau est la région complexe qui permet d'assurer la cohésion entre le derme et l'épiderme, mais elle contrôle aussi le passage de molécules et de cellules migrantes ou invasives (cellules du système immunitaire, par exemple) entre les deux compartiments.

Du point de vue structural, elle comprend, de la superficie à la profondeur : les hémidesmosomes situés au pôle basal des kératinocytes basaux, une membrane basale et une région dense sous-basale située dans le derme superficiel (Burgeson and Christiano, 1997; Eady *et al.*, 1994) (figure 34). La membrane basale ou lame basale, d'épaisseur de 100nm environ, est formée de deux feuillets distincts en microscopie électronique : la *lamina lucida* et la *lamina densa* (Timpl, 1989). La *lamina lucida* est une structure dynamique, majoritairement composée de laminines 1 et 5 alors que la *lamina densa* est une couche réticulée, plus fibreuse, formée de collagène IV et VII, mais elle renferme également les laminines 5, 6 et le nidogène (Timpl, 1989) (figure 34).

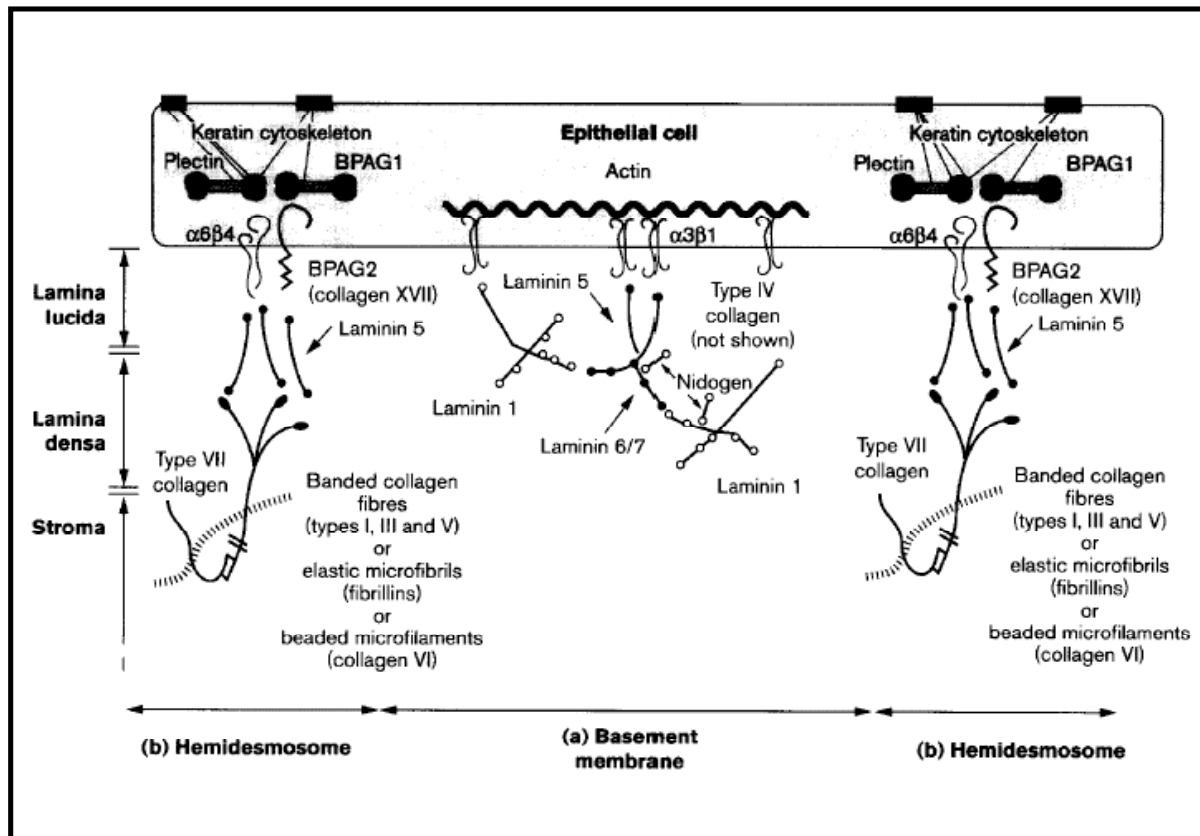


Figure 34: Structure de la jonction dermo-épidermique

Les **hémidesmosomes** sont des complexes multi-protéiques qui permettent l'ancrage des kératinocytes à la membrane basale. Ils relient des éléments du cytosquelette des kératinocytes à la matrice extracellulaire du derme, par l'intermédiaire de quatre classes de protéines (Borradori and Sonnenberg, 1996; Burgeson and Christiano, 1997).

- Les protéines de la plaque dense, accolées à la membrane plasmique des kératinocytes, forme un complexe d'attachement pour les kératines 5 et 14. Parmi les éléments de la plaque dense se trouve : l'antigène "majeur" de la pemphigoïde bulleuse (BP230 ou BPGA1) et la plectine (antigène HD1) (Borradori and Sonnenberg, 1996; Burgeson and Christiano, 1997) (figure 34).

- Les protéines transmembranaires agissent comme des récepteurs en établissant un lien entre le cytoplasme et la matrice extracellulaire. Ces molécules, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et l'antigène "mineur" de la pemphigoïde bulleuse (BPGA2 ou BP180 ou collagène XVII) relient la plaque dense à la membrane basale (Borradori and Sonnenberg, 1996; Burgeson and Christiano, 1997) (figure 34). À la différence de l' $\alpha 6 \beta 4$, l'intégrine $\alpha 1$ n'est pas impliquée dans la formation des hémidesmosomes. Elle est présente au niveau des points d'adhésion

focaux qui relient les filaments d'actines des kératinocytes basaux à la membrane basale, via les laminines (figure 34). Par contre, ces deux types d'intégrines sont exclusivement exprimés dans les kératinocytes de la couche basale (Fuchs *et al.*, 1997; Watt, 2002).

- Les molécules de la membrane basale terminent ce complexe d'adhésion. La laminine 5 s'organise en fins filaments d'ancrage à partir de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et traverse la *lamina lucida* pour s'insérer dans la *lamina densa*. Dans cette dernière, la laminine 5 s'associe aux fibrilles d'ancrage, formées pour l'essentiel de collagène VII, qui interagit avec la charpente de la *lamina densa*, le collagène IV (Borradori and Sonnenberg, 1996; Burgeson and Christiano, 1997).

- Les protéines de la lame réticulaire du derme fournissent aux cellules un solide système d'enracinement en profondeur dans le derme. Les fibrilles d'ancrage continuent dans le derme où elles s'entrecroisent avec des fibres interstitielles de collagène I et III, renforçant ainsi l'amarrage de la membrane épidermique au derme superficiel

Une déficience d'un ou plusieurs composants des hémidesmosomes, notamment de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, entraîne de graves problèmes de cohésion entre le derme et l'épiderme, caractérisés par un décollement de l'épiderme dans le cas de l'épidermolyse bulleuse (Borradori and Sonnenberg, 1996; Murgia *et al.*, 1998).

c) *Le derme*

Le derme forme la plus épaisse des couches de la peau. Équivalant au cuir des animaux, ce tissu conjonctif de soutien renferme des fibres de collagènes et d'élastines, respectivement responsables de la fermeté et de l'élasticité de la peau. À l'origine de ces deux éléments constitutifs de la matrice extracellulaire, les fibroblastes, véritables cellules "architectes", synthétisent des enzymes comme des collagénases permettant de dégrader, renouveler et réorganiser la matrice. Le derme héberge également les annexes épidermiques ou appendices cutanés comme les follicules pileux (racines nourricières des poils), les glandes sébacées (productrices de sébum) et les glandes sudoripares (qui sécrètent la sueur) (figure 33). De la même façon que l'épiderme, le derme abrite des cellules du système immunitaire, nécessaires pour protéger l'organisme contre les infections, comme les macrophages, les mastocytes et les globules blancs. Ces cellules transitent par le seul réseau lymphatique de la peau, celui du derme. On y trouve aussi trois sortes de capteurs sensoriels. Tout au fond, les corpuscules de Pacini, ovoïdes, permettent de ressentir les vibrations. Un peu plus haut, les corpuscules de Ruffini sont sensibles à la chaleur. Enfin, juste sous l'épiderme se tiennent les corpuscules de Meissner impliqués dans la sensation tactile (figure 33). Enfin, le derme est irrigué par un

riche réseau de vaisseaux sanguins qui approvisionne en nutriments les cellules de l'épiderme mais contribue également à la thermorégulation de l'organisme. Cette zone de la peau riche en bouquets capillaires, terminaisons nerveuses et glandes sudoripares assurent, en effet, le maintien de la température corporelle. En réponse à des variations de température détectées par les fibres nerveuses à terminaison "libres" dans le derme et l'épiderme, ainsi que par les corpuscules de Ruffini, les vaisseaux sanguins du derme vont rétablir l'équilibre par thermogénèse (production de chaleur) ou thermolyse (déperdition de chaleur). Ainsi le refroidissement local provoque le frisson et la vasoconstriction qui permet une diminution du flux sanguin cutané et donc minimise les pertes thermiques. Alors que le réchauffement induit la sudation et la vasodilatation (accroissement du flux sanguin) qui favorisent le transfert de chaleur à l'environnement.

d) L'hypoderme

L'hypoderme ne constitue pas à proprement parler une couche de la peau, mais il lui sert d'appui. Riche en cellules graisseuses, regorgeant de lipides, il fait office de coussin graisseux amortisseur de chocs qui se moule sur les muscles et les os sous-jacents. Étant un tissu adipeux, il est constitué d'adipocytes, responsables du métabolisme des triglycérides et des acides gras qui constituent une véritable réserve énergétique pour l'organisme. L'hypoderme abrite d'ailleurs à lui seul environ la moitié des graisses stockées par l'organisme. Enfin, l'hypoderme joue un rôle d'isolant thermique.

1.3.2 Programme de différenciation des kératinocytes

Dans l'épiderme, les kératinocytes suivent un programme de différenciation terminale spécifique. Ce mécanisme comprend deux phénomènes simultanés : une migration verticale des cellules filles issues de la division des cellules basales et une migration horizontale accompagnés de changement dans le profil d'expression des kératines (Fuchs, 1993; Fuchs and Byrne, 1994; Watt, 1989) (figure 35). Au cours de la migration vers la surface de l'épiderme, les kératinocytes subissent de nombreuses modifications, histologiquement observables, qui sont spécifiques du niveau de différenciation cellulaire. L'épiderme peut ainsi être divisé en quatre compartiments représentant les stades successifs de la différenciation des kératinocytes (Fuchs, 1993; Watt, 1989) (figure 36).

Kératines de type I	Kératines de type II	Distribution
K5	K14, K15	Kératinocytes des couches basales des épithéliums stratifiés
	K19	Sous-population de kératinocytes des couches basales de l'épiderme, cellules de Merkel
K1	K10	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de l'épiderme
K2e	K9	Kératinocytes des couches les plus différenciées de l'épiderme
	K9	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des épidermes palmo-plantaire
K3	K12	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de la cornée
K4, K2p	K13	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des muqueuses orales
K6a-f	K16, K17	Kératinocytes des annexes cutanées Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des épithéliums hyperprolifératifs
K8, K7	K18, K20	Kératinocytes des épithéliums simples
Ha1-7	Hb1-7	Cheveux, ongles, papilles filiformes de la langue

Figure 35: Distribution tissulaire et cellulaire des différentes kératines

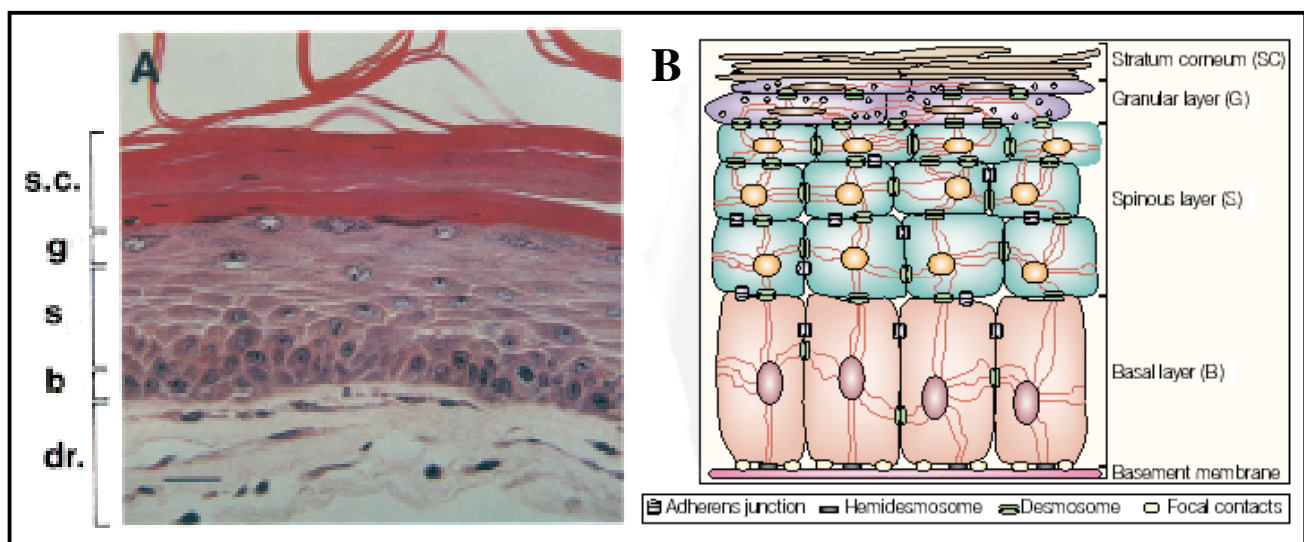


Figure 36: Morphologie de l'épiderme
 A) Section de peau marquée à l'éosine et à l'hématoxyline
 B) Représentation schématique de l'épiderme

a) *La couche basale ou germinative (Stratum Germinativum)*

Couche la plus profonde de l'épiderme, elle est constituée d'une rangée unique de cellules cubiques avec un noyau volumineux doté d'un nucléole proéminent. Les cellules basales expriment spécifiquement les kératines K5 et K14 (figure 35). Ces filaments intermédiaires sont reliés aux hémidesmosomes qui ancrent les cellules à la jonction dermo-épidermique et aux desmosomes qui joignent les cellules entre elles. Ces deux types d'adhésion sont extrêmement importantes pour la cohésion de la peau.

Les desmosomes sont un type de jonction intercellulaire, comme les jonctions d'adhérences, à l'exception qu'elles sont essentiellement retrouvées dans les tissus épithéliaux. Alors que les jonctions d'adhérence impliquent les cadhérines classiques de type I (N-, E-, M-, H, R et P-cadhérines), les desmosomes recrutent spécifiquement les cadhérines de type II ou cadhérines desmosomiales, qui sont la desmogléine (DSG1-3) et la Desmocoline (DSC1-3). Celles-ci interagissent avec des protéines cytoplasmiques de la famille Armadillo qui comprend la plakoglobine (PG, β caténine) et les plakophilines (PKP1-4). Ces dernières permettent l'ancrage des filaments intermédiaires de kératines par l'intermédiaire des protéines de la famille des plakines, incluant l'envoplakine (EVPL), la periplakine (PPL), la plectine et la desmoplakine (DP) (Garrod *et al.*, 2002; Getsios *et al.*, 2004; Green and Gaudry, 2000). La nature des différentes protéines au sein des desmosomes change lorsque les kératinocytes migrent vers la surface de la peau (Green, Gaudry, 2000; Getsios, Huen, 2004) (figure 37). Néanmoins, les desmosomes utilisent le même modèle que les jonctions d'adhérences où les microfilaments d'actine sont titrés par un complexe tripartite cadhérine/ β caténine/ γ caténine (figure 38). Par ailleurs, il semble exister une véritable interdépendance entre ces deux types de jonctions car en absence de desmosome dans les épithéliums, l'adhésion cellule/cellule est détruite, même celle sous la dépendance des jonctions d'adhérences (Hatsell and Cowin, 2001; Lenox *et al.*, 2000; Vasioukhin *et al.*, 2001). La perte des jonctions intercellulaires conduit à divers processus pathologiques tels que le cancer ou les maladies acantholytiques, comme les maladies de Hailey-Hayley et de Darier (Garrod *et al.*, 2002; Green and Gaudry, 2000).

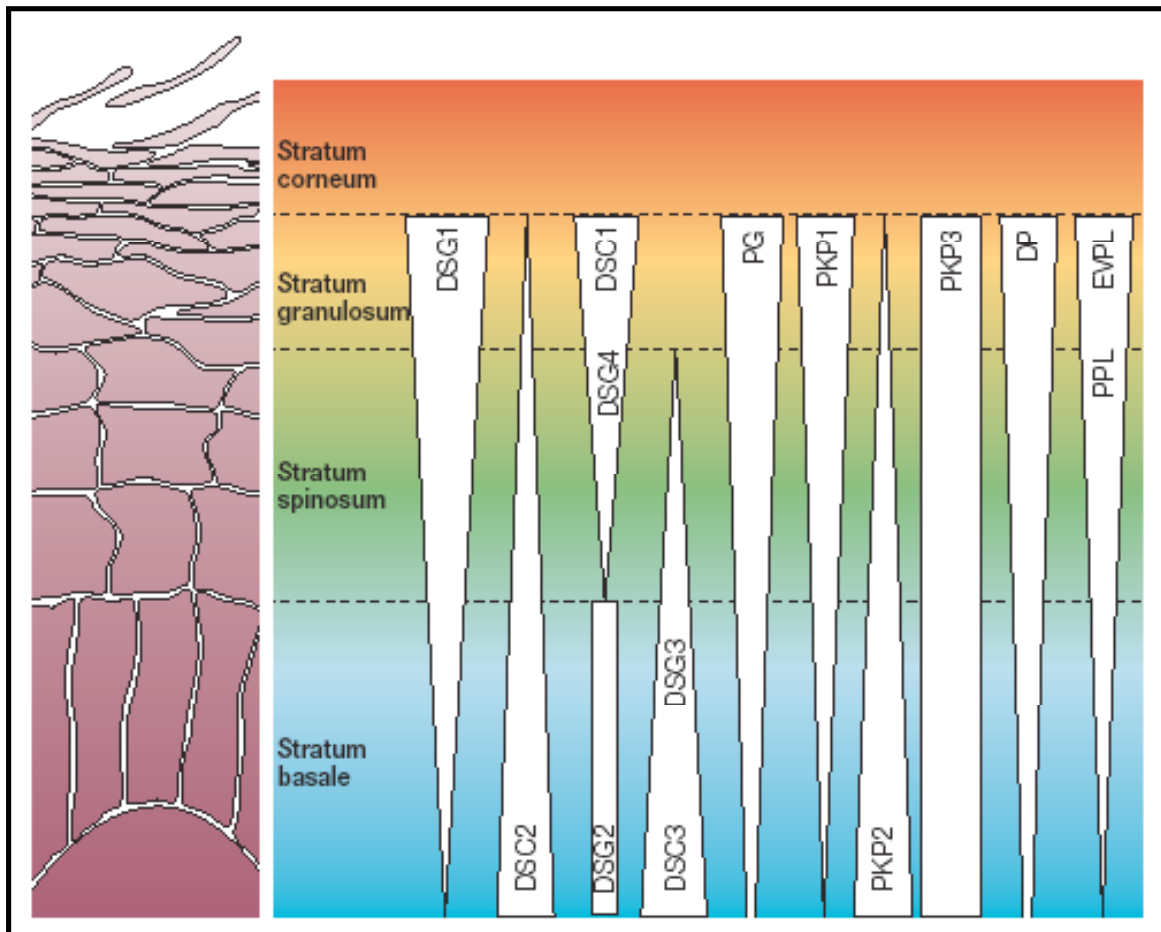


Figure 37: Protéines desmosomales présentes dans les différentes couches de l'épiderme

DSG, desmogléine; DSC, desmocoline; PG, plakoglobine; PKP, plakophiline; DP, desmoplakine; EVPL, envoplakine; PPL, periplakine.

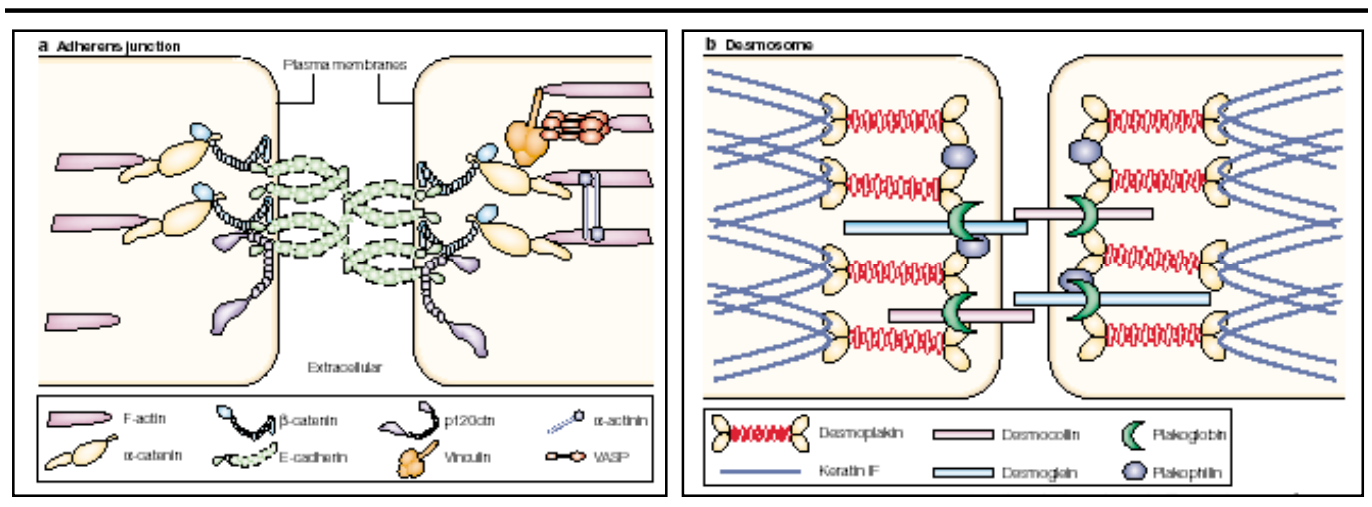


Figure 38: Les jonctions cellule/cellule de l'épiderme

- a) Jonction d'adhérence
- b) Desmosome

La couche basale est l'unique couche où les kératinocytes peuvent se diviser en condition normale. Mais elle renferme deux types de populations avec des destins prolifératifs différents □ les cellules souches et les cellules d'amplification transitoire (TAC, *Transit Amplifying Cell*).

Les cellules souches

Elles possèdent un cytoplasme primitif sans produit de différenciation avec un rapport volume nucléaire □ cytoplasmique élevé. Elles sont dotées d'abondants mélanosomes (vésicule de mélanine) qui protègent leurs noyaux des ultraviolets. Elles assurent le renouvellement constant de l'épiderme à partir duquel les cellules différenciées desquament tous les jours. Elles ont donc la capacité de se diviser un nombre illimité de fois, mais elles se divisent très peu souvent. Enfin, les cellules souches qui subissent une mitose peuvent donner naissance à d'autres cellules souches pour assurer le renouvellement du compartiment souche ou produire des cellules filles différenciées □ cellule à amplification transitoire (Potten and Loeffler, 1990; Watt, 1998; Watt, 2001; Watt, 2002; Watt and Hogan, 2000).

Les cellules à amplification transitoire

Les cellules à amplification transitoire sont destinées à se différencier. En effet, elles vont subir trois à quatre cycles rapides de division cellulaire pour engendrer une population importante de kératinocytes qui vont sortir irréversiblement du cycle cellulaire et se différencier de façon terminale en migrant dans les couches supérieures (Potten and Loeffler, 1990; Watt, 1998; Watt, 2001; Watt, 2002; Watt and Hogan, 2000).

b) La couche épineuse ou corps muqueux de Malpigi (Stratum Spinosum)

Cette couche tire son nom par la présence de nombreux desmosomes qui joignent les cellules et leur donnent un aspect épineux lorsque les membranes cytoplasmiques se rétractent au cours des préparations histologiques. Elle est formée de trois à six couches d'épaisseur en fonction de sa localisation. D'ailleurs, les cellules des différentes couches présentent des changements morphologiques. Celles localisées plus profondément sont polyédriques avec un gros noyau et peuvent présenter des mitoses (cellules à amplification transitoire) alors que celles en position plus superficielle, davantage différenciées, montrent un accroissement de leur taille ainsi qu'un aplatissement. Les kératinocytes de la couche épineuse, quoique plus différenciées que les cellules basales, possèdent encore une batterie d'organelles

fonctionnelles. Ces cellules sont en synthèse active de protéines, en particulier de kératines K1 et K10 qui vont remplacer les types 5 et 14 de la couche basale (figure 35). Ces filaments intermédiaires sont plus abondants et mieux organisés que dans les cellules basales, se présentent en faisceaux (tonofilaments) autour du noyau et s'attachent aux desmosomes. Les nombreuses indentations entre les kératinocytes augmentent considérablement la surface de contact entre les kératinocytes et procurent en plus des desmosomes une grande résistance. Ces cellules de plus en plus matures migrent alors vers la couche supérieure.

c) *La couche granuleuse (Stratum Granulosum)*

La couche granuleuse se présente comme une couche de deux ou trois rangées de cellules aplaties. Elle constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme. Le volume cellulaire s'accroît alors que le noyau conserve environ les mêmes dimensions. Cette couche doit son nom aux nombreux corps lamellaires et granules de kératoyaline présents dans le cytoplasme des kératinoctes.

Les granules de kératohyaline sont des agrégats de protéines insolubles (Watt, 1989). Il en existe de deux types : - les granules L, de formes rondes, sont composés d'un précurseur de l'enveloppe des cellules de la couche cornée (enveloppe cornée), la loricine (figure 39 et 40). Son nom provient du latin *lorica* qui signifie coquille (Kalinin *et al.*, 2002). - Les granules F, de formes irrégulières contiennent le précurseur de la filagrine, la profilagrine, qui est étroitement associée à la kératinisation de la couche cornée (Kalinin *et al.*, 2002; Watt, 1989). La filagrine agrège les filaments de kératines pour qu'ils forment des microfibrilles, d'où son nom *filament aggregating activity*. D'autres composants de l'enveloppe des cellules de la couche cornée vont progressivement s'accumuler. Par exemple, l'involucrine, du nom latin *involucrum* qui signifie enveloppe, commence à apparaître dans la couche épineuse et s'accumule dans la couche granuleuse (Kalinin *et al.*, 2002; Watt, 1989) (figure 40). Il en est de même pour les transglutaminases, dépendantes des ions Ca^{2+} , qui catalysent la formation de l'enveloppe protéique de la couche cornée (Kalinin *et al.*, 2002; Watt, 1989) (figure 39).

Les corps lamellaires (kératinosomes ou corps d'Oadland) sont des petits organites ovalaires sécrétoires qui proviennent de l'appareil de Golgi et se présentent sous l'aspect d'un empilement de lamelles ceinturées par une membrane (Kalinin *et al.*, 2002; Watt, 1989). Ils renferment des phospholipides et des glycolipides qui sont transformés en céramides, cholestérol et acides gras. Cette substance sera déversée par exocytose dans les espaces intercellulaires de la couche cornée qui apparaîtront alors comme remplis d'une sorte de

ciment intercellulaire (figure 39). Ce dernier assure une grande cohésion entre les kératinocytes de la couche cornée et rend l'épiderme totalement imperméable.

Ces deux types d'organelles au métabolisme actif prennent donc une part importante dans les dernières étapes de la différenciation (Watt, 1989).

d) La couche cornée

Lors du passage de la couche granuleuse à la couche cornée et dans le cadre de la différenciation terminale, les kératinocytes meurent selon un processus particulier de mort programmée qui est différent de l'apoptose (Gandarillas, 2000). Les kératinocytes de la couche cornée prennent alors le nom de cornéocytes ou squames. Ils sont complètement aplatis, leur noyau et les organites cellulaires ont totalement disparu. Leur cytoplasme est rempli de macrofibrilles formées à partir des filaments de kératines et des grains de kératohyaline. Alors que les filaments intermédiaires représentent généralement 1% de la totalité des protéines ; ils peuvent devenir très abondants, atteignant 30% dans les kératinocytes de la couche basale et près de 85% dans les cornéocytes. Les membranes plasmiques sont devenues très denses et épaisses car l'enveloppe cornée s'est formée sur leurs surfaces internes (figures 39 et 40). Cette enveloppe est une véritable coque rigide et résistante. Elle est constituée de plusieurs protéines précurseurs liées entre elles, comme l'involucrine, la loricrine, la cystatine \square , l'élafine, les cornifines, la filagrine et la kératine 10 (Kalinin *et al.*, 2002) (figure 40). Les desmosomes sont aussi profondément modifiés, ils prennent le nom de cornéodesmosomes (figure 39). En surface de la couche cornée, les cornéocytes se détachent de l'épiderme (desquamation) après la lyse du ciment intercellulaire et des cornéodesmosomes.

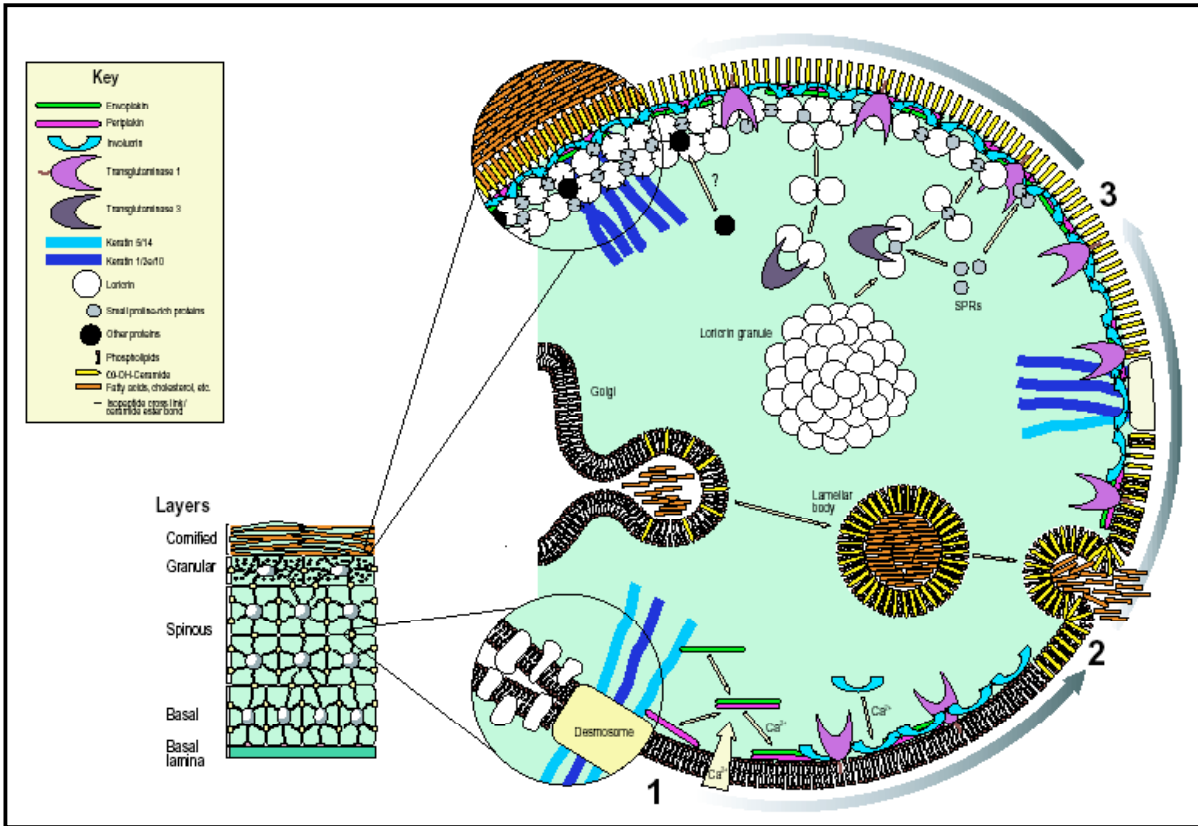


Figure 39: Les différentes étapes de la formation de l'enveloppe cornifiée

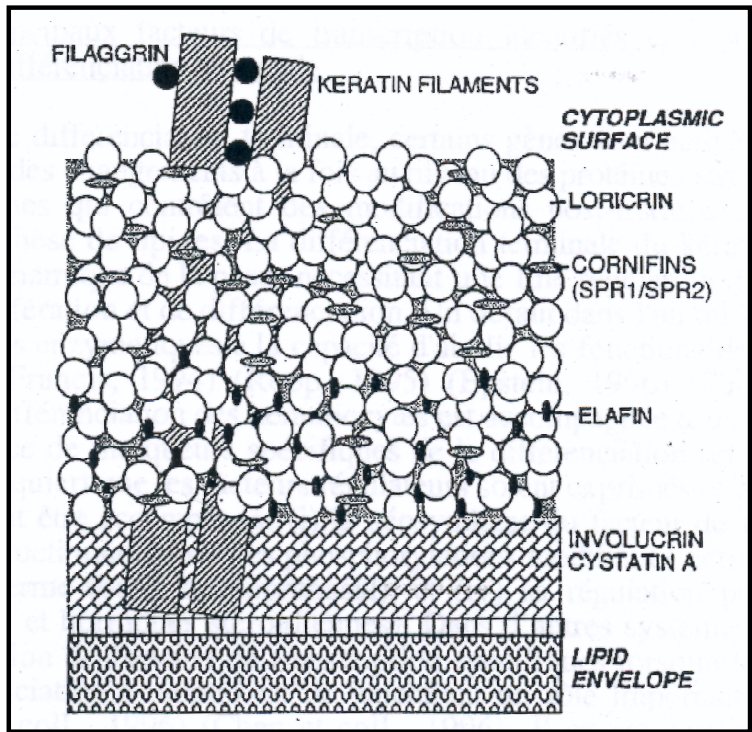


Figure 40: Assemblage des précurseurs de l'enveloppe cornée

1.4 OBJECTIFS DE LA THESE

1.4.1 Objectif général de la thèse

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes moléculaires qui contrôlent la prolifération cellulaire. La régulation de la prolifération est extrêmement importante car elle permet la formation d'un organisme d'une grande complexité, de plusieurs milliards de cellules; à partir d'une cellule oeuf unique. De plus, elle est nécessaire pour apporter le nombre de cellules strictement suffisant pour remplacer les cellules de l'organisme qui meurent chaque jour. Enfin, une division anarchique des cellules peut conduire au développement de maladies comme le cancer.

1.4.2 Étude du mécanisme de répression de la cycline A

Le cycle cellulaire est le processus qui permet à une cellule de se diviser en deux cellules filles identiques. Des études ont montré que le passage d'une phase du cycle cellulaire à la suivante est directement contrôlé par des protéines kinases, associées à des cyclines spécifiques. Parmi ces cyclines, la Cycline A est impliquée dans la progression de la phase S et dans la transition G2/M. De façon cohérente avec son rôle dans le cycle cellulaire, l'ARNm et la protéine s'accumulent seulement à la transition G1/S et se maintiennent jusqu'en début de mitose (Sherr, 1996). La cycline A est essentielle puisque son invalidation est létale à un stade embryonnaire précoce chez la souris (Murphy *et al.*, 1997). De plus, la cycline A est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses. La régulation de l'expression de la cycline A, et en particulier sa répression en G0/G1 est indispensable au déroulement correct du cycle cellulaire. Des expériences de détection d'empreinte génomique *in vivo* sur le gène de la cycline A ont révélé la présence de plusieurs sites de fixation de protéines régulatrices. Alors que les sites de fixation d'activateurs sont liés de façon constitutive, les deux sites de fixation de répresseurs, CHR (Cell cycle gene Homology Region) et CCRE (Cell Cycle Responsive Element), sont occupés de façon périodique en G0/G1, lorsque le gène de la cycline A est réprimé (Zwicker *et al.*, 1995). De plus, la mutation de l'un de ces deux sites suffit à conduire à une levée de la répression du gène en G0/G1 (Zwicker *et al.*, 1995). Cependant, les répresseurs qui occupent ces sites restent mal connus. Mais, néanmoins, des complexes de remodelage de la chromatine, SWI/SNF, ont pu être détectés sur le promoteur de la cycline A (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003). L'objectif de mon travail de thèse fut donc

de déterminer le rôle des facteurs de remodelage de la chromatine dans le mécanisme de répression de la cycline A pendant les phases G0/G1 du cycle cellulaire. Comme de nombreux travaux proposaient que l'activité transcriptionnelle des gènes étaient corrélée à des modifications de la structure chromatinienne du gène (Narlikar *et al.*, 2002), mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à déterminer si l'activité transcriptionnelle de la cycline A était liée à des changements de l'architecture nucléosomale de son promoteur. J'ai ensuite regardé le rôle des deux sites répresseurs CCRE et CHR dans la structure chromatinienne du promoteur de la cycline A et quels pouvaient être les facteurs de remodelage qui étaient recrutés sur ces séquences.

Pour ce travail, nous avons choisi comme modèle cellulaire, des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, Mouse Embryonic Fibroblaste). Le cycle cellulaire étant une des premières cibles affectées lors des processus de transformation oncogéniques, il paraissait essentiel d'étudier la régulation de la cycline A dans des cellules primaires non transformées comme les MEF. De plus, ces cellules s'arrêtent très bien en quiescence par privation de sérum et réentrent ensuite de façon synchrone dans le cycle cellulaire. Pour déterminer le rôle des sites répresseurs sur la structure nucléosomales du promoteur de la cycline A, nous avons choisi d'utiliser des lignées cellulaires SWISS 3T3 ayant intégré dans leur génome une copie exogène du promoteur de la cycline A, sauvage ou muté sur un des sites répresseurs, en amont d'une cassette d'expression pour la luciférase. Ces cellules ont l'avantage d'être également facilement synchronisables. De plus, l'expression de la luciférase n'est pas toxique contrairement à la surexpression de la cycline A qui peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire et des problèmes de division (den Elzen and Pines, 2001; Furuno *et al.*, 1999; Geley *et al.*, 2001).

1.4.3 Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire

Nous avons démontré dans notre première publication que le facteur de remodelage Brm était nécessaire pour la répression de la transcription du gène de la cycline A. De plus, il avait été montré que les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF, Brm et Brg1, sont impliqués dans la régulation de la transcription d'autres cyclines via leur interaction avec les protéines de la famille de pRb (Muchardt and Yaniv, 2001). Enfin, il a été observé que les protéines Brm et Brg1 étaient mutées, absentes ou faiblement exprimées dans des lignées cellulaires issues de cancer (Muchardt and Yaniv, 2001; Wong *et al.*, 2000). C'est pourquoi dans une deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée au rôle global de Brm dans le cycle cellulaire. Nous avons donc comparé la progression dans le cycle cellulaire de cellules

sauvages ou dépourvues de Brm. Pour ceci, j'ai utilisé des cellules 3T3 brm +/+ et brm -/-, obtenues par un processus de transformation cellulaire "3T3" effectuée sur des MEF provenant de souris invalidées pour le gène brm (Reyes *et al.*, 1998). Nous avons déterminé les vitesses de progression dans les différentes phases du cycle cellulaire, le profil d'expression de divers régulateurs du cycle cellulaire (notamment les Cyclines, les Cdks, les CKI, et les protéines de la famille pRb), mais aussi l'activité kinases associées aux différentes Cyclines; Enfin, j'ai comparé la taille des deux types de cellules et déterminé sa variation au cours du cycle cellulaire.

1.4.4 Contrôle de l'équilibre prolifération/différenciation de cellules de la peau, les kératinocytes

Chaque jour des cellules de l'organisme meurent et doivent être remplacées par un mécanisme de prolifération puis de différenciation. Cet équilibre prolifération/différenciation est très important car il permet le maintien de l'homéostasie. Ce phénomène est d'ailleurs extrêmement contrôlé, tout dérèglement pouvant conduire au développement de maladies dont le cancer. Cependant, les mécanismes de régulation impliqués restent mal connus. Dans ce qui a historiquement occupé la première partie de ma thèse, j'avais choisi d'étudier ces mécanismes dans le modèle de la peau. Dans ce système, l'équilibre prolifération/différenciation permet d'apporter le nombre de cellules nécessaires pour remplacer les kératinocytes qui se décrochent chaque jour de la peau, de telle façon que celle-ci garde une structure normale, lisse, d'épaisseur constante. La perte de l'équilibre prolifération/différenciation dans la peau entraîne le développement de maladie comme des carcinomes et le psoriasis. Deux types de population de kératinocytes peuvent proliférer, ils se retrouvent dans la couche basale de l'épiderme: les cellules souches qui sont généralement quiescentes, ont la capacité de se diviser un nombre illimité de fois pouvant ainsi assurer le renouvellement constant de la peau; les cellules TAC qui sont les cellules filles des cellules souches, se divisent uniquement 3 à 4 fois, très rapidement, avant de perdre leur capacité à se diviser en entrant en différenciation terminale lorsqu'elles migrent vers les couches supérieures de la peau (Watt, 1989). Les kératinocytes représentent un système intéressant car ils présentent de nombreux avantages. Des cellules primaires peuvent être isolés de peau humaine normales (issues de circoncision ou de sein suite à une intervention de chirurgie esthétique) ou de souris normales ou modifiées génétiquement, et maintenues en culture *in vitro* assez facilement. Il existe, par ailleurs, de nombreuses dermatoses bénignes ou malignes

où l'homéostasie est perturbée (carcinomes, psoriasis, atopie, Ichthyose...), elles sont facilement accessibles par biopsie. Les kératinocytes isolés en culture peuvent être modifiés génétiquement et des gènes d'intérêts peuvent être introduits par infections rétrovirales (Gandarillas and Watt, 1997). De plus, il est possible *in vitro* d'induire de façon synchrone et massive l'entrée en différenciation des kératinocytes. Il existe plusieurs modèles: l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire qui est un activateur de l'assemblage des cadhérines et donc de la stratification (Dazard *et al.*, 2000); la mise en suspension des kératinocytes où l'interaction cellule-matrice extracellulaire est rompue mimant les premières étapes de la migration vers la périphérie, des kératinocytes en cours de différenciation (Dazard *et al.*, 2000) et l'expression de l'oncogène c-myc (Gandarillas and Watt, 1997). D'autre part, il est possible de reconstituer de la peau *in vitro* avec des kératinocytes normaux ou modifiés génétiquement afin d'analyser les conséquences sur le plan phénotypique (morphologique, cellulaire et biochimique) (Dazard *et al.*, 2000). Cette peau reconstruite peut être greffée sur des animaux immunocompétents ce qui permet de combiner une approche *in vitro* et *in vivo*. Enfin, les différentes populations de kératinocytes (cellules souches, cellules TAC et cellules terminalement différenciées) peuvent être triées, grâce à leur propriété d'adhésion afin de les étudier séparément (Dazard *et al.*, 2000). Mon projet de thèse a été de déterminer les mécanismes qui contrôlent cet arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation. Dans ce but, nous avons étudié par cytométrie en flux la progression des cellules en différenciation dans le cycle cellulaire, analysé l'expression de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, la composition des complexes Cdk/Cyclines et l'activité kinase associée aux différentes cyclines et enfin j'ai suivi les effets de l'inhibition de l'activité des complexes Cdk/Cyclines sur l'état de différenciation des kératinocytes.

III. RESULTATS

2.1 PUBLICATION 1 : MECANISME DE REPRESSION DU GENE DE LA CYCLINE A EN QUIESCENCE

2.1.1 Introduction

Le gène de la cycline A est un gène essentiel puisque son inactivation bi-allélique est létale à un stade embryonnaire précoce chez la souris (Murphy *et al.*, 1997). De plus, son expression est dépendante de l'état du cycle cellulaire. En effet, l'ARNm de la cycline A apparaît à la transition G1/S et son niveau est au maximum en phase S (Sherr, 1996). La répression de ce gène en phase G0/G1 est indispensable au déroulement correct du cycle cellulaire. Des expériences de détection d'empreinte génomique *in vivo*, sur le gène de la cycline A ont révélé la présence de plusieurs sites de fixation de protéines régulatrices. L'un de ces sites, nommé CCRE (*Cell Cycle Responsive Element*), est occupé de façon périodique en G0/G1 lorsque le gène de la cycline A est réprimé (Huet *et al.*, 1996). De plus, la mutation de ce site résulte en une complète dérégulation du gène de la cycline A en G0/G1, confirmant le caractère répresseur du CCRE (Zwicker *et al.*, 1995). En aval de ce site, un autre élément dont la mutation abolie la répression du gène de la cycline A a été identifié. Il a été appelé CHR (*Cell cycle gene Homology Region*) par homologie avec d'autres promoteurs des gènes *b-myb*, *cdc2* et *cdc25c* (Zwicker *et al.*, 1995). Néanmoins, les complexes protéiques qui se fixent sur ces deux sites répresseurs restent mal connus.

L'expression cyclique de la cycline A, i.e. répression du gène en début du cycle et activation en fin de phase G1, fait de ce gène une cible potentielle pour les complexes Rb/E2F. La découverte du site CCRE et de sa fonction, a laissé supposer aux auteurs qu'il pouvait s'agir d'un site "dégénéré" de liaison aux protéines de la famille E2F (Zwicker *et al.*, 1995). Cependant, les résultats restent jusqu'à aujourd'hui contradictoires sur les protéines de la famille des E2F et de pRb effectivement recrutées par le site CCRE (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 2002; Rayman *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2000; Zerfass-Thome *et al.*, 1997). Néanmoins, des études dans le laboratoire ont montré que pRb est indispensable à la répression de la cycline A (Philips *et al.*, 1998; Philips *et al.*, 1999). Contrairement aux E2F et pRb, la présence des complexes de remodelage de la chromatine sur les promoteurs cycline D1, E et A semble être globalement admise (Strobeck *et al.*, 2000, Zhang, 2000 #234; Zhang *et al.*, 2002). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé que: INI1/hSNF5 était trouvée sur le gène de la cycline D1 (Zhang *et*

al., 2002); Brm était recrutée sur le gène de la cycline A lorsque les cellules étaient arrêtées ou en différenciation (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003); et Brg1 était présent sur le promoteur de la cycline E dans des cellules quiescentes (Dahiya *et al.*, 2001) et sur le promoteur de la cycline A dans des cellules en croissance exponentielle (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003).

Afin de déterminer le rôle des facteurs de remodelage de la chromatine sur le promoteur de la cycline A, nous avons, dans un premier temps, étudié l'architecture chromatinienne du gène de la cycline A. Puis, nous avons tenté d'établir si l'activité transcriptionnelle du gène était lié à des changements de l'architecture nucléosomale de son promoteur. Ensuite, nous avons recherché si la séquence bipartite CHR-CCRE pouvait avoir un rôle dans la structure chromatinienne du gène de la cycline A. Enfin, nous avons essayé de déterminer quels étaient les facteurs de remodelage de la chromatine qui pouvaient être recruté sur cette séquence CHR-CCRE.

2.1.2 Résultats

Nous avons montré que l'activité transcriptionnelle de la cycline A est liée à des changements de l'architecture nucléosomale de son promoteur. Nous avons déterminé que deux nucléosomes sont présents sur le promoteur de la cycline A, au niveau des sites d'initiation de la transcription, lorsque les cellules sont quiescentes et que le gène est inactif. Inversement, lorsque les cellules entrent en phase S, l'activation de la transcription du gène s'accompagne de l'enlèvement des deux nucléosomes. D'autre part, nous avons mis en évidence que la séquence bipartite CHR-CCRE est nécessaire au positionnement et au maintien des deux nucléosomes sur le promoteur de la cycline A pendant les phases G0/G1 du cycle cellulaire. Enfin, nous avons identifié la protéine Brm comme le facteur de remodelage de la chromatine spécifiquement recruté sur le promoteur de la cycline A par la séquence bipartite CHR-CCRE lorsque le gène est inactif. Finalement, l'étude de cellules dépourvues du gène *brm*, a montré que, lorsque ces cellules entrent en quiescence, le promoteur de la cycline A n'est plus réprimé et les deux nucléosomes normalement présents sur le promoteur sont alors absents.

2.1.3 Conclusion

Ces résultats suggèrent que Brm est responsable de la répression du gène de la cycline A vraisemblablement par la mise en place ou le maintien d'une structure chromatinienne particulière, en l'occurrence deux nucléosomes situés sur les sites d'initiation de la transcription. Nous proposons que l'inhibition de la transcription du gène de la cycline A

puisse avoir lieu par le simple fait d'un encombrement stérique comme cela a déjà pu être suggéré dans d'anciens travaux d'Imbalzano (Imbalzano *et al.*, 1994). Ces résultats montent pour la première fois de façon évidente, le rôle du remodelage de la chromatine dans le déroulement correct du cycle cellulaire.

Cyclin A Repression in Quiescent Cells Is Associated with Chromatin Remodeling of Its Promoter and Requires Brahma/SNF2 α

Marjorie Coisy,^{1,3} Virginie Roure,^{1,3}
Magali Ribot,¹ Alexandre Philips,¹
Christian Muchardt,² Jean-Marie Blanchard,¹
and Jean-Christophe Dantone^{1,*}

¹Institut de Génétique Moléculaire
CNRS, UMR 5535

1919 Route de Mende
34293 Montpellier cedex 5

²Institut Pasteur
25 rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15
France

Summary

Cell cycle-dependent expression of *cyclin A* is controlled by transcriptional repression in early phase of the cell cycle. In this study, we directly examine the chromatin structure of the mouse *cyclin A* promoter through in vivo micrococcal nuclease footprinting. We describe here that *cyclin A* repression is associated with two positioned nucleosomes and that histones progressively lose DNA contact synchronously with gene activation. This particular nucleosomal organization is disrupted by mutations of the *cyclin A* bipartite repressor sequence. Moreover, the same sequence recruits the chromatin remodeling factor Brahma/SNF2 α (Brm) onto the *cyclin A* promoter. Accordingly, *cyclin A* proximal promoter is not wrapped around nucleosomes and not repressed in quiescent cells lacking Brm. These results provide molecular explanations for the transcriptional repression state of *cyclin A*, as well as insights into the action of Brm chromatin remodeling factor as cell cycle regulator.

Introduction

Progression through the different phases of the cell division cycle is controlled by a family of protein kinases, whose specific activities depend on the association with protein partners named cyclins. Several types of cyclins have been identified across the cell cycle phases. Cyclin A, as a regulatory partner of cell cycle-dependent kinases cdk2 and cdc2, acts in the S and G2/M phase. Consistent with its phase-specific function, the *cyclin A* gene is periodically transcribed. Cyclin A mRNA levels increase at the G1/S boundary and reach peak level in S phase (Sherr, 1996). We have previously analyzed the expression of *cyclin A* in primary human and rodent cells (Bartlat et al., 1993; Philips et al., 1998; Plet et al., 1997). Subsequently, we performed studies to delineate functional DNA sequences present in the mouse *cyclin A* promoter (Bartlat et al., 1995; Huet et al., 1996). In vivo genomic DMS footprinting has revealed the presence of putative protein binding elements downstream of the

major transcription initiation sites. One of these sequences, termed the cell cycle responsive element (CCRE) (Bartlat et al., 1995; Huet et al., 1996; Philips et al., 1998; Plet et al., 1997) or the cell cycle-dependent element (CDE) (Zwicker et al., 1995a), is periodically occupied in G0/early G1 when transcription of *cyclin A* is switched off. In addition, mutation of the CCRE/CDE resulted in a complete deregulation in G0/G1, suggesting that a repressor was binding to this element, consistent with previous data obtained on the human *cyclin A* promoter (Schulze et al., 1995; Zwicker et al., 1995a). 3' to the CCRE/CDE resides a second element whose mutation also abolished *cyclin A* repression in G0/G1 (Zwicker et al., 1995a). Interestingly, this sequence, together with the CCRE/CDE, was found to be shared by other genes, such as b-myb, cdc2, and cdc25C, and was therefore named cell cycle gene homology region (CHR).

Transcription of genes involved in cell cycle control requires coordinated activation and repression of specific sets of transcription factors, among which the E2F/DP family constitutes a thoroughly studied archetype (Stevaux and Dyson, 2002; Trimarchi and Lees, 2002). The activity of E2F/DP transcription factors is regulated by their association with pocket proteins of the Rb family that includes Rb (the retinoblastoma tumor suppressor gene product) and two related proteins p107 and p130 (Mulligan and Jacks, 1998). *Cyclin A* belongs to a group of genes whose transcription is repressed in G0/early G1 and derepressed prior to entry into S phase. These genes are therefore potential targets for E2F/DP-mediated repression processes. Whereas E2F-containing complexes have been reported to interact with CCRE/CDE (Liu et al., 1998; Schulze et al., 1995; Zeffass-Thome et al., 1997), CHR binding activity has not been clearly identified yet (Liu et al., 1997, 1998; Philips et al., 1999a). In human fibroblasts arrested by serum starvation, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments revealed that E2F4 and p130 are present at all promoters under scrutiny, including *cyclin A* (Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000). A more recent study found E2F6 at E2F-regulated promoters during G0 rather than E2F4 (Ogawa et al., 2002). Electromobility shift assays suggested that the *cyclin A* promoter is bound by an E2F complex containing p107 rather than p130 (Schulze et al., 1995; Zeffass-Thome et al., 1997) or by E2F family members other than E2F1, E2F4, and E2F5 (Huet et al., 1996). Moreover, some ChIP experiments failed to identify *cyclin A* as a specific target of E2F4 (Weinmann et al., 2002) whereas others succeeded (Ren et al., 2002). Finally, Rb was also found on *cyclin A* promoter upon cell cycle arrest (Dahiya et al., 2001; Narita et al., 2003). It is unclear whether these differences are due to cell type, arrest conditions, ChIP procedures, or oligonucleotides used.

The chromatin remodeling factor SWI/SNF has recently come into focus concerning expression of cyclins (Martens and Winston, 2003). First, the SWI/SNF complex was shown to be necessary for Rb-mediated repression of *cyclin E*, *cyclin A* (Strobeck et al., 2000;

*Correspondence: dantone@igm.cnrs-mop.fr

³These authors contributed equally to this work.

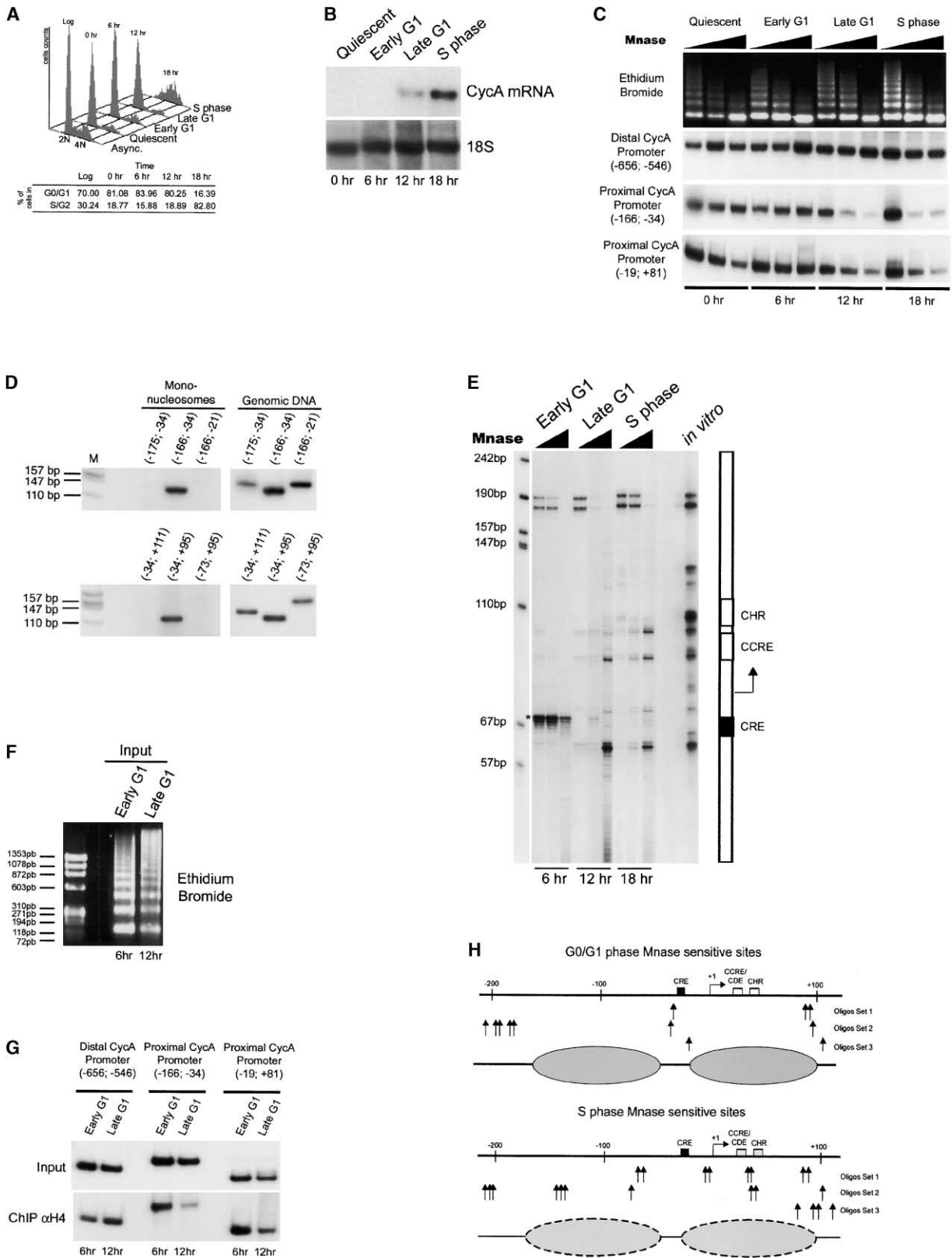


Figure 1. Nucleosomal Structure of the *Cyclin A* Proximal Promoter Is Cell Cycle Regulated

(A) DNA content analysis by flow cytometry of MEF cells. Time indicates hours after release from serum starvation (0, 6, 12, and 18 hr) or asynchronous cells in exponential growth (log). Lower table indicates percentages of cells in each phase of the cell cycle.
(B) Northern blot analysis indicating RNA levels.

Zhang et al., 2000), and *cyclin D1* (Zhang et al., 2002). Moreover, the potential tumor suppressor prohibitin, which represses the activation function of E2Fs, was shown to recruit SWI/SNF to particular E2F-dependent promoters (Wang et al., 2002). ChIP experiments have revealed the presence of several components of the SWI/SNF complex on different cyclin's promoters. INI1/hSNF5 was found on *cyclin D1* and its ectopic expression causes cell cycle arrest (Zhang et al., 2002). Brahma/SNF2 α (Brm), one of the catalytic subunits of the different SWI/SNF complexes, is found to occupy the *cyclin A* promoter upon cell cycle arrest (Dahiya et al., 2001; Kadam and Emerson, 2003). Furthermore, Brg1/SNF2 β (Brm related gene 1), the other possible catalytic subunit of SWI/SNF complexes, is recruited onto the *cyclin E* promoter in quiescent cells (Dahiya et al., 2001) and on *cyclin A* promoter in proliferating cells (Dahiya et al., 2001; Kadam and Emerson, 2003). Interestingly, both Brm and Brg1 proteins interact with all three members of the Rb family (Strober et al., 1996). These results provide strong evidence that SWI/SNF is directly involved in cell cycle control. They also provide a potential functional explanation for the downregulation or mutations of SWI/SNF component observed in numerous cancers (Klochendler-Yeivin et al., 2002).

Here, we show that the chromatin structure of the murine *cyclin A* promoter is tightly regulated and cell cycle dependent. Moreover, we present evidences that the previously identified repressor sequences, CCRE/CDE and CHR, needed for *cyclin A* repression in quiescent cells, are also required for organizing the chromatin structure specific of the inactive *cyclin A* promoter. Furthermore, we show that Brm is directly recruited onto the *cyclin A* promoter via the repressor sites in quiescent cells. Finally, Brm-deficient cells have deregulated *cyclin A* expression, associated with an impaired nucleosomal structure on the *cyclin A* proximal promoter.

Results

Cyclin A Promoter Structure Is Altered upon Gene Activation/Repression

We first determined whether *cyclin A* expression is associated with a particular chromatin structure. Toward this end, we particularly focused on the nucleosomal organization of the murine *cyclin A* promoter between positions -200 to $+100$ (further called proximal promoter), since this DNA segment had previously been found to be necessary and sufficient for maximal activity and cell cycle regulation of the promoter (Huet et al., 1996). We used primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that

exhibit a tightly regulated cell cycle-dependent expression of *cyclin A*. MEFs were efficiently arrested in a diploid stage (2N) by serum starvation and passed synchronously through S phase between 12 and 18 hr after serum stimulation (Figure 1A). As expected, *cyclin A* messenger RNA appeared just before S phase entry (12 hr after serum stimulation), indicating that *cyclin A* gene repression was relieved (Figure 1B). This prompted us to investigate the nucleosomal structure of the *cyclin A* promoter during cell cycle progression. To this aim, we used the *Micrococcus* nuclease (MNase) whose activity is hampered by the presence of nucleosomes.

We first analyzed the sensitivity of the *cyclin A* promoter to increasing concentrations of MNase by polymerase chain reaction (PCR) targeting either the distal or the proximal *cyclin A* promoter (Figure 1C, upper panel). We previously identified a short region of the distal *cyclin A* promoter, from -656 to -546 , that neither harbored increasing sensitivity upon increasing amount of MNase nor showed any variations in its sensitivity to MNase at any stage of the cell cycle (Figure 1C, Distal CycA panel). This result suggested that this part of the distal promoter was constitutively protected from MNase digestion, validating its use as an internal control. Since the activity of the *Micrococcus* nuclease has been described to be impaired by the presence of nucleosomes, we could thus hypothesize that at least one nucleosome was positioned on the -656 to -546 region of the distal *cyclin A* promoter throughout the cell cycle. Similarly, we identified two regions into the proximal *cyclin A* promoter that did not harbor any changes in their sensitivity to increasing MNase amount in quiescence and early G1 state (Figure 1C, Proximal CycA panels). However, in contrast to the distal promoter region, this particular insensitivity was abrogated 12 and 18 hr after serum stimulation (Figure 1C). Importantly, these times corresponded to *cyclin A* mRNA emergence (Figure 1B) and thus suggested that *cyclin A* transcriptional activation was linked to an increasing accessibility of its promoter to *Micrococcus* nuclease. Therefore, the reduced accessibility observed in quiescence and early G1 state led us to think that DNA was protected from MNase by the existence of tightly bound histones. This prompted us to carefully examine the length of the protected area, to see whether it was consistent with the possible presence of two nucleosomes positioned onto the proximal promoter. To this aim, we looked for the maximal length of *cyclin A* proximal promoter that could be efficiently amplified by PCR performed on mononucleosomes. In this case, we used as template the fraction from quiescent cells digested with

(C) MNase sensitivity of *cyclin A* promoter. Ethidium bromide panel corresponds to 1 μ g of each MNase-digested fraction. Lower panels correspond to autoradiography of PCR products.

(D) PCR-mediated identification of mononucleosome limits in quiescent cells. Panels correspond to autoradiography of PCR products, from either mononucleosome template or genomic DNA template.

(E) MNase sensitive sites mapping of *cyclin A* proximal promoter using oligos set 1 (see Experimental Procedures).

(F) Ethidium bromide staining of the native chromatin fractions used for immunoprecipitation with anti-histone H4.

(G) Autoradiography of PCR amplification products of extracted input fractions (input) and immunoprecipitated with anti-histone H4 fractions (ChIP α H4).

(H) Overview of the micrococcal nuclease-sensitive sites within the *cyclin A* proximal promoter. Arrows correspond to the identified MNase-sensitive sites in quiescent/early G1 and S phase state. The two nucleosomes present in quiescent/early G1 state are indicated below. The lower diagram represents the loss of histones-DNA contacts occurring in late G1/S phase stage, upon gene activation.

the highest MNase concentration, which contained mainly mononucleosomes (see Figure 1C, upper panel). Interestingly, in the region immediately upstream from the initiation site of transcription, the main fragment efficiently detectable on mononucleosomal template had a length of 132 nucleotides (from -166 to -34), whereas all the different sets of oligonucleotides gave similar signals when PCR were performed on genomic DNA (Figure 1D, upper panel). This result clearly suggested that MNase sensitive sites were present between -175 and -166 and between -34 and -21 positions. Since the template was constituted by mononucleosomal DNA fragments, these positions might correspond to the boundaries of a nucleosome situated upstream of the initiation site of transcription. Moreover, we also identified a protected region of 129 nucleotides, from -34 to +95 positions, surrounding the main start site of transcription (Figure 1D, lower panel). In addition, the loss of signal observed with oligonucleotide upstream of the -34 position indicates a possible nucleosome boundary between nucleotides -34 to -73 (Figure 1D, lower panel). Interestingly, this perfectly matched with the 3' boundary around nucleotide -34, observed with the nucleosome located on the upper part of the *cyclin A* proximal promoter (see above). Taken together, these data were highly consistent with the presence of two nucleosomes positioned onto the *cyclin A* proximal promoter when gene activity is shut down in quiescent cells.

Since we were not able to amplify a significant region within the proximal promoter in late G1 and S phase state (Figure 1C and data not shown), we further mapped and compared the MNase sensitive sites on the *cyclin A* proximal promoter in early G1, late G1, and S phase states. To this goal, we adapted the LM-PCR protocol and used different murine *cyclin A*-specific oligonucleotides primer sets. The results indicated that *cyclin A* promoter was highly protected from micrococcal digestion during the early stages of the cell cycle (Figure 1E, Early G1 lane). Interestingly, this region fitted with the previously identified region, from -34 to +95, protected from MNase in quiescence (Figure 1D). Moreover, the existence of one micrococcal sensitive site only in vivo (Figure 1E, asterisk) is consistent with the presence of a nucleosome boundary. Intriguingly, this site corresponded perfectly with the limit delineated by PCR, around nucleotide located at position -34 (Figure 1D). These results specially strengthened the idea that transcriptional repression of *cyclin A* was associated with a tight nucleosomal structure preventing DNA digestion by MNase. In contrast, upon activation of the gene in late G1, the proximal promoter became accessible to nuclease to a degree barely distinguishable from that of naked DNA (Figure 1E, compare lanes 12 hr and 18 hr to in vitro digestion). Moreover, the entire *cyclin A* proximal promoter revealed the same broad MNase protected area in late G1 and a loss of this protection, correlated with an activation of the promoter (data not shown). Although the *Micrococcus* nuclease activity has been described to be impaired by the presence of nucleosomes, we could not absolutely exclude that the variations observed on the proximal promoter were due to changes in the promoter occupancy by DNA binding factors. However, in vivo DMS footprinting has only revealed the cyclic presence of protein onto the CCRE/

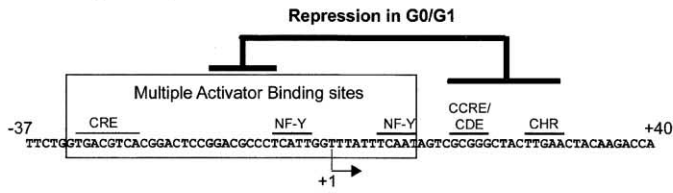
CDE and CHR, which are specifically occupied in quiescence and early G1 state, whereas all other footprints detected were constitutively present throughout cell cycle progression (Huet et al., 1996; Zwicker et al., 1995b). All together these data raised the intriguing possibility that MNase protection observed in quiescent cells was due to the presence of two nucleosomes stably positioned onto the proximal *cyclin A* promoter and, consequently, that histones at the promoter progressively lose DNA contact upon remodeling during gene activation.

It was therefore essential to determine if histones were present on the inactive *cyclin A* promoter and then the fate of these histones on the remodeled *cyclin A* promoter. To this aim we resorted to the technique of chromatin immunoprecipitation (ChIP) under native conditions with an antibody raised against the core histone H4. Since the proximal promoter became sensitive to MNase upon gene activation (see Figure 1C), nuclei were submitted to mild MNase digestion in order to get equivalent signals in the input fractions from early G1 cells and from late G1 cells. Importantly, ethidium bromide staining of the further isolated chromatin showed that both fractions had a similar pattern of digestion (Figure 1F). In addition, the distal and the proximal promoter regions gave similar signals between early G1 and late G1 input fractions when amplified with the appropriate oligonucleotides sets (Figure 1G, input panel). This result confirmed that comparable amounts of the different *cyclin A* promoter regions were present in both early and late G1 input fractions and, thus, validated the further variations observed in the immunoprecipitated fractions. Interestingly, the ChIP early G1 fraction showed an enrichment of proximal promoter regions respectively to the distal promoter region (Figure 1G, ChIP α H4 panel). At variance with the early G1, the late G1 ChIP fraction lost almost completely the proximal promoter targets whereas the distal promoter region was still present at high levels (Figure 1G, ChIP α H4 panel). Since both ChIP fractions presented patterns different from the input ones, we could rule out the possibility of an unspecific binding. In conclusion, these results strongly suggest that *cyclin A* gene transcriptional repression in quiescence and early phase of the cell cycle is associated with the presence of two positioned nucleosomes on its proximal promoter (summarized in Figure 1H). Furthermore, activation of the gene occurs simultaneously with a progressive loss of DNA contact with histones (Figure 1H, lower diagram).

Cyclin A Repressor Sites Confer Low Accessibility to Micrococcal Nuclease in G0/G1

Previous studies have delineated several sequences on the mouse *cyclin A* promoter that carry either activation or repression functions (Huet et al., 1996; Zwicker et al., 1995a). It has been established through genomic DMS footprinting that activator sites were occupied constitutively, whereas repressor sites were transiently bound during the G0/G1 phase (Figure 2A). This led us to investigate the role of these repressor sites in the nucleosomal organization of the murine *cyclin A* promoter. For this, we isolated three stably transfected swiss 3T3 cell lines carrying a wild-type or mutated exogenous *cyclin A* promoter upstream of a luciferase expression cassette

A Mouse Cyclin A promoter



B Swiss 3T3 cell lines

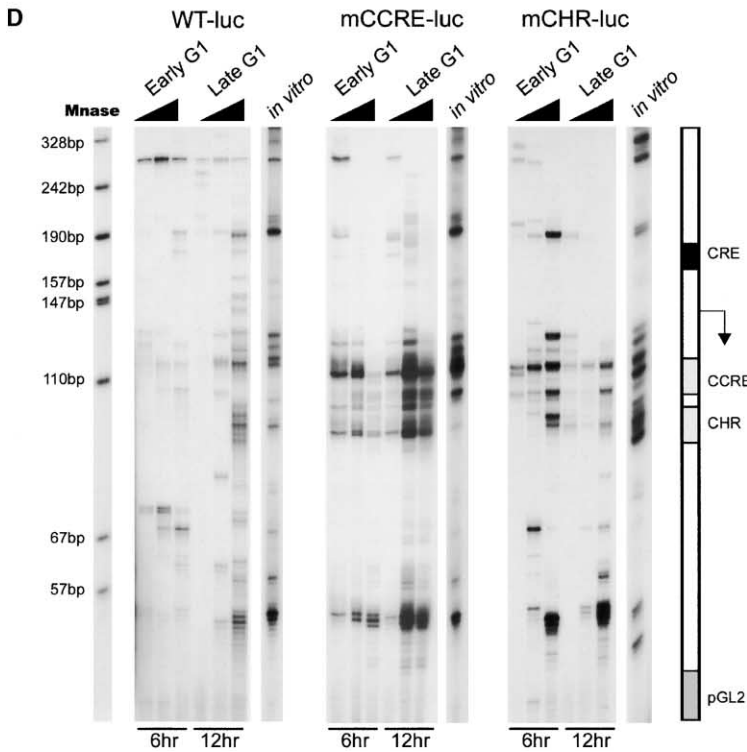
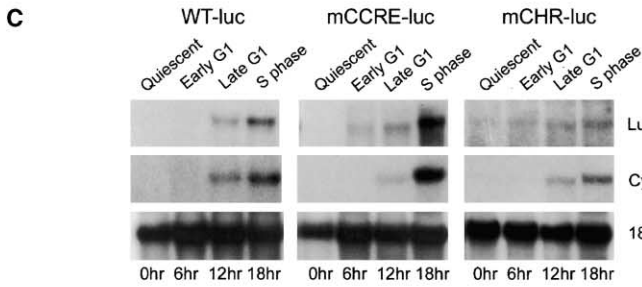
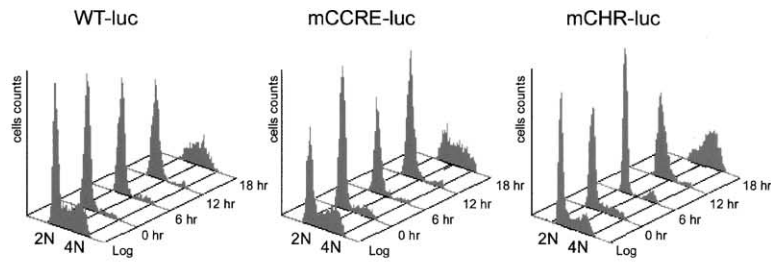


Figure 2. Micrococcal Nuclease Sites Mapping of Exogenous Cyclin A Promoters

(A) Overview of functionally identified sequences within the *cyclin A* promoter. (B) DNA content analysis by flow cytometry of 3T3 cells stably carrying a luciferase expression cassette under the control of the *cyclin A* wild-type, CCRE-mutated, and CHR-mutated promoters. Time indicates hours after release from serum starvation (0, 6, 12, and 18 hr) or asynchronous cells in exponential growth (log). (C) Northern blot analysis of RNA levels. (D) Mapping of MNase-sensitive sites within the exogenous *cyclin A* promoters.

(see Experimental Procedures). FACS analysis of DNA content revealed that all three cell lines could be rendered quiescent upon serum starvation and synchronously reentered the cell cycle, like their original swiss 3T3 counterpart (Figure 2B). We then examined the activity of exogenous and endogenous *cyclin A* promoters. We first noted that endogenous *cyclin A* messenger RNA appeared 12 hr after serum stimulation to reach a peak at 18 hr, confirming that all cell lines have conserved a perfectly controlled cell cycle (Figure 2C, *cycA* mRNA panels). However, the luciferase transcripts revealed striking differences between the three exogenous *cyclin A* promoters. Whereas, as expected, the luciferase mRNA under the control of the wild-type *cyclin A* promoter displayed the same profile as endogenous *cyclin A* mRNA (Figure 2C, compare luc mRNA and *cycA* mRNA panels in wt-luc strain), the luciferase mRNA produced from the exogenous promoters bearing mutations in the CCRE or CHR elements exhibited an interesting early expression (Figure 2C, luc mRNA panels). These results suggested that exogenous mutated *cyclin A* promoters were no longer able to stably repress luciferase expression in early phases of the cell cycle.

It was therefore essential to establish whether this was correlated with a chromatin structure fully accessible to MNase. To address this possibility, we examined the nucleosomal structure of these exogenous promoters through their sensitivity to MNase and mapped the MNase sensitive sites in early and late G1 states. As expected, the wild-type exogenous promoter presented a wide protected region in early G1 phase, which disappeared 12 hr after serum stimulation, simultaneously with the emergence of luciferase mRNA and, thus, with gene activation (Figures 2D and 2C, wt-luc panel). Surprisingly, no significant MNase protection was observed on CCRE- and CHR-mutated promoters either in early G1 or in late G1 phases (Figure 2D, mCCRE-luc and mCHR-luc panels). These results clearly allow us to associate the presence of repressor sites to the presence of a tight nucleosomal structure onto the *cyclin A* proximal promoter in quiescence and early phases of the cell cycle. Consequently, these data strongly suggest that *cyclin A* downregulation is linked to an active remodeling of its promoter.

Cyclin A Repressor Sites Recruit Chromatin Remodeling Factor Brahma/SNF2 α

The promoter remodeling associated with the *cyclin A* repression led us to investigate the possibility that *cyclin A* repressor sequences recruit a chromatin remodeling activity. To identify the chromatin remodeling factor potentially held by the CCRE and CHR repressor sites, we sought to isolate CCRE and CHR binding activities by pull-down assays using the *cyclin A* promoter. Since low accessibility to MNase, observed in G0/G1 on *cyclin A* proximal promoter, was likely to be due to the presence of nucleosomes (see above), we thus used a *cyclin A* promoter reconstituted around a nucleosome for affinity purification (Figure 3A). This structure was incubated with a whole-cell extract, and bound proteins were determined by Western blot (Figure 3B). Interestingly, Brm, the catalytic subunit of the SWI/SNF complex, was recruited on wild-type *cyclin A* promoter, while only a trace

amount of the protein was detected on the mutated templates (Figure 3B). To confirm that this result was not due to different amounts of DNA template, we used antibodies against the histones H3 and H4 as pull-down controls. The presence of constant levels of histones H3 and H4 revealed that binding of Brm was specific of the DNA sequences (Figure 3B). In contrast, Brg1 did not bind to either wild-type or mutated *cyclin A* promoters (Figure 3B). It was therefore essential to extend these results to living cells. Toward this end, we performed chromatin immunoprecipitation experiments using the swiss 3T3 cell lines described earlier, transfected with vectors expressing either the HA-tagged Brm or the HA-tagged Brg1 protein. This approach allowed us to analyze the status (presence or absence) of both the endogenous and the various versions of the exogenous *cyclin A* promoters within the same immunoprecipitated fractions. To this aim, we especially worked under conditions of low-level expression of exogenous HA-Brm or HA-Brg1 proteins (see Experimental Procedures and Figure 3C). Under these conditions, we did not observe any measurable cell cycle arrest or flat cell formation (data not shown). This permitted us to render cells quiescent by serum starvation prior to chromatin immunoprecipitation. Importantly, HA-tagged Brm or HA-tagged Brg1 proteins had similar expression levels in all three cell lines (Figure 3C). Chromatin immunoprecipitation with an anti-HA antibody showed that Brm associated with both endogenous and exogenous wild-type *cyclin A* promoters but not with the CCRE- or CHR-mutated promoters (Figure 3D, Quiescent panel). Furthermore, Brg1 was not recruited to *cyclin A* promoter in quiescent conditions (Figure 3D, Quiescent panel). Surprisingly, we were not able to detect any Brm or Brg1 binding to endogenous or exogenous promoters in exponentially growing cells (Figure 3D, Expo. panel). Taken together, these results indicate that the *cyclin A* repressor sequences recruit the chromatin remodeling factor Brahma/SNF2 α . Moreover, this recruitment occurs *in vivo*, as judged by the ChIP technique, but only when cells are quiescent and thus when repressor sequences are essential for *cyclin A* repression. It was therefore tempting to hypothesize that Brahma/SNF2 α is necessary to efficiently repress *cyclin A* transcription at least in quiescent cells.

Cyclin A Is Constitutively Expressed in Brahma/SNF2 α -Deficient Cells

Since Brm-deficient cells exist (Reyes et al., 1998), it was essential for us to look at the expression of cyclin A in these cells. We first investigated the expression of cyclin A in exponentially growing Brm^{-/-} 3T3 cells (Reyes et al., 1998). It was noteworthy that both cell lines had the same percentage of cells in S/G2 (Figure 4A, propidium iodide panel). However, almost 90% of Brm^{-/-} cells were labeled with anti-cyclin A antibody, whereas only 60% of Brm^{+/+} cells expressed cyclin A (Figure 4A, cyclin A panel). To further test if *cyclin A* repression was relieved during the early stages of the cell cycle, we arrested cells by low-serum conditions. Importantly, 3T3 Brm^{-/-} cells underwent cell cycle arrest as efficiently as the original wild-type cells, and both cell lines presented approximately 80% of cells in a

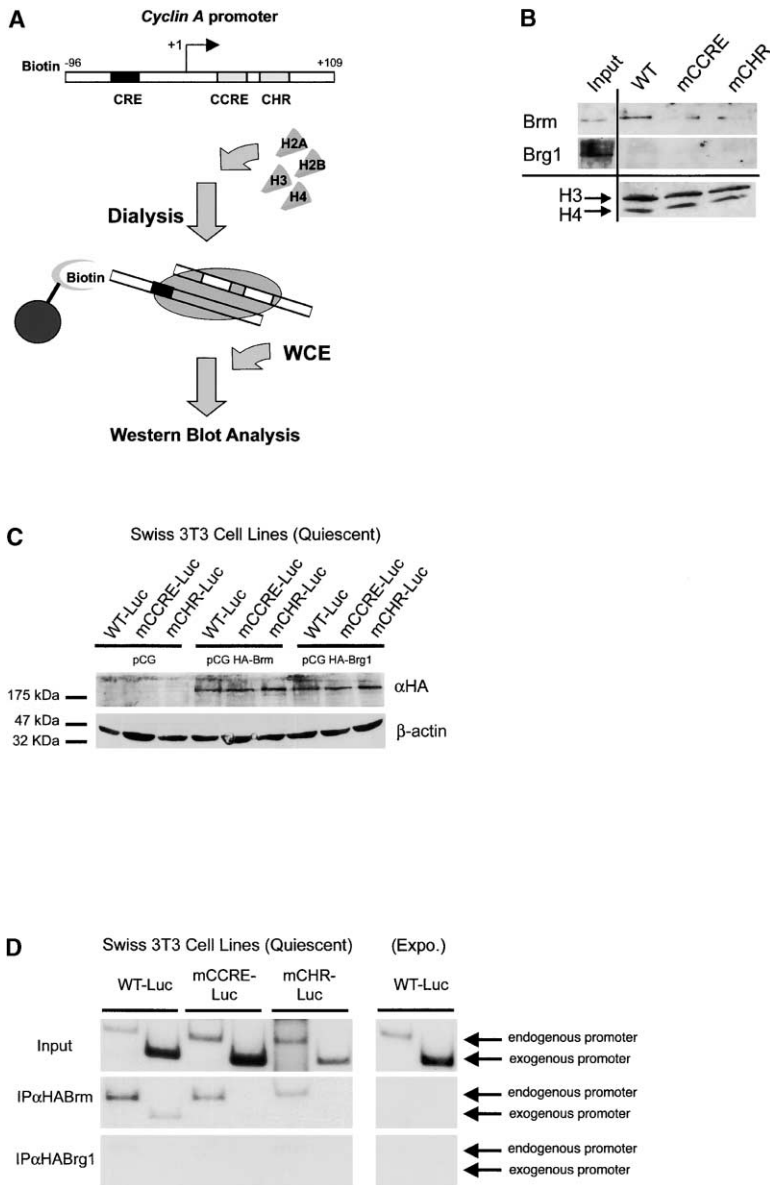


Figure 3. Identification of Chromatin Remodeling Activity Recruited to the *Cyclin A* Promoter

(A) Diagram of the nucleosome reconstitution procedure using biotinylated *cyclin A* promoters.

(B) Western blot of complexes trapped by the *cyclin A* promoter assembled into a nucleosome. Antibodies used are indicated on the left. Input lane corresponds to 1/20 of the whole-cell extract fraction.

(C) Western blot analysis of the expression of transfected HA-Brm and HA-Brg1.

(D) Chromatin immunoprecipitation of HA-tagged Brm and Brg1 in quiescent (Quiescent) or in exponentially growing cells (Expo.). Endogenous (365 bp) and exogenous (320 bp) *cyclin A* promoters are indicated on the right.

2N diploid state (Figure 4B, propidium iodide panel). In contrast, immunocytometry revealed that more than 40% of $Brm^{-/-}$ -arrested cells were labeled with anti-cyclin A antibody (Figure 4B, cyclin A panel). To confirm these results, we further looked for cyclin A specifically labeled nuclei by immunofluorescence microscopy. Upon low-serum culture, 20% of wild-type cells had a nuclear specific expression of cyclin A, consistent with the percentage of cells in S/G2 state (Figure 4B, propidium iodide panel, and Figure 4C). In contrast, 80% of $Brm^{-/-}$ nuclei were labeled with anti-cyclin A antibody even though only 20% of cells were in S/G2 phase as reflected by their DNA content (Figures 4C and 4B, propidium iodide panel). Then, we checked whether cyclin A overexpression in $Brm^{-/-}$ cells was not due to a defect in the cyclin A degradation pathway. Since cyclin A is normally degraded in mitosis to ensure correct chromosome separation, we looked by immunofluorescence at the fate of cyclin A protein in mitotic $Brm^{+/+}$ and $Brm^{-/-}$

cells. Interestingly, cyclin A signal disappeared during mitotic process in Brm -deficient cells and, moreover, with the same kinetic as cyclin A signal in wild-type cells (Figure 4D, arrows in $Brm^{+/+}$ and $Brm^{-/-}$ panels). This result indicated that cyclin A degradation pathway was fully functional in $Brm^{-/-}$ cells. Taken together, these data demonstrate that the inactivation of Brm leads to a deregulated expression of cyclin A and, furthermore, that this aberrant expression is probably due to the absence of gene repression.

Brahma/SNF2 α -Deficient Cells Fail to Repress *cyclin A* Promoter in Quiescence

Since the lack of Brm led to the unusual expression of *cyclin A*, it was interesting to look at the transcriptional activity and the nucleosomal structure of its promoter in $Brm^{-/-}$ cells. Toward this end, $Brm^{+/+}$ and $Brm^{-/-}$ cells were exposed to serum starvation. As previously shown (Figure 4B), both cell lines were efficiently ar-

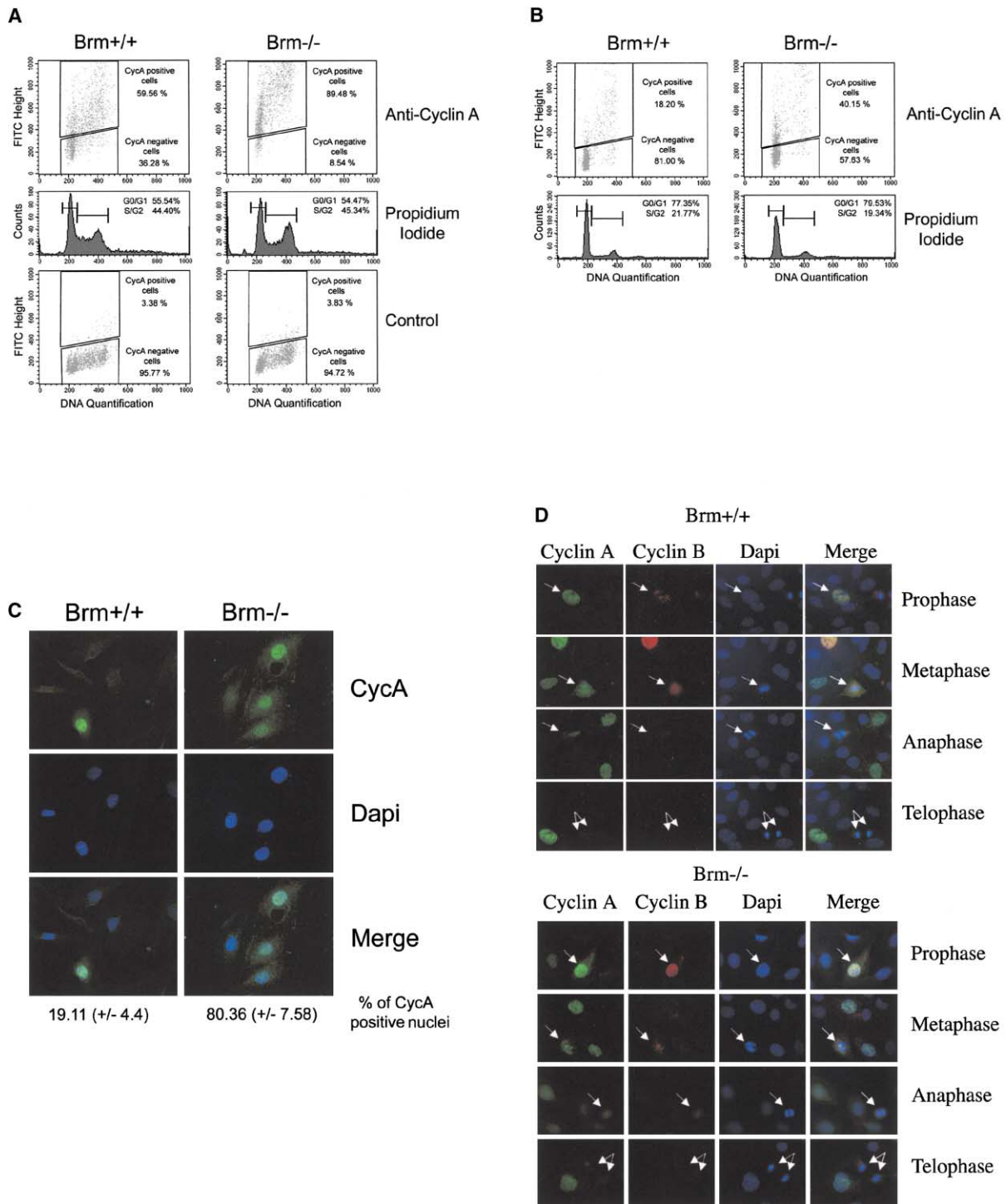


Figure 4. Cyclin A Expression in Brm^{-/-} Cells

(A) FACS analysis of cyclin A expression in exponentially growing Brm^{+/+} and Brm^{-/-} cells.

(B) As in (A), but in serum-starved quiescent cells.

(C) Immunofluorescence detection of cyclin A expression in quiescent Brm^{+/+} and Brm^{-/-} cells. The percentage of nuclei showing cyclin A staining corresponds the mean of four independent experiments of 100 nuclei each. The SD is indicated in brackets.

(D) Immunofluorescence detection of cyclin A and cyclin B in mitotic Brm^{+/+} and Brm^{-/-} cells. Arrows point the different mitotic figures.

rested in a diploid stage (2N), and interestingly, both passed synchronously through S phase between 12 and 18 hr after serum stimulation (Figure 5A). As expected,

cyclin A protein appeared in late G1 phase in Brm^{+/+} cells, whereas it could be detected throughout the cell cycle in Brm^{-/-} cells (Figure 5B). Similarly, these cells

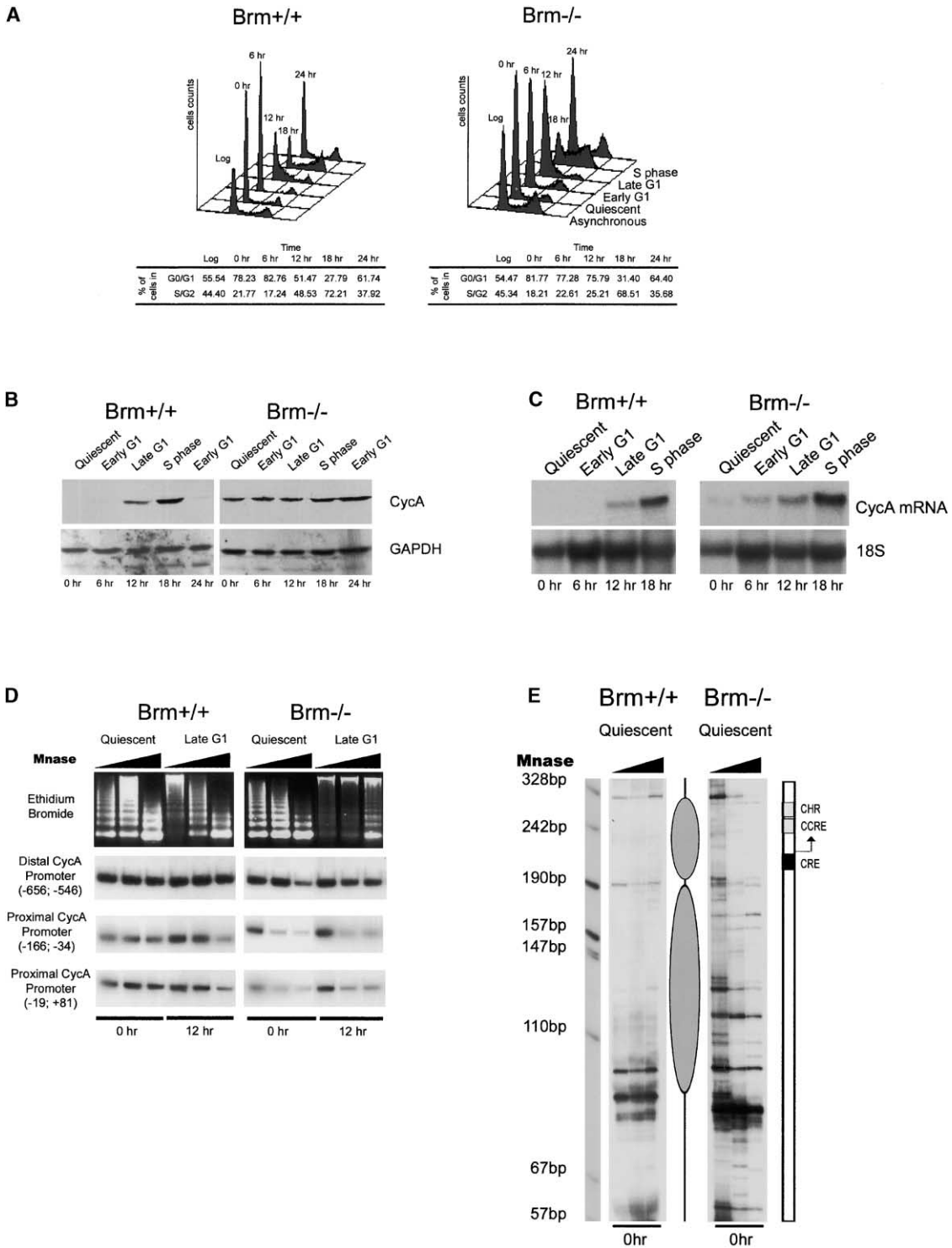


Figure 5. Lack of *Cyclin A* Repression and Nucleosomal Structure of *Cyclin A* Proximal Promoter in Brm-Deficient Cells
(A) DNA content analysis by flow cytometry of Brm^{+/+} and Brm^{-/-} cells. Time indicates hours after release from serum starvation (0, 6, 12, and 18 hr) or asynchronous cells in exponential growth (log). Lower table indicates percentages of cells in each phase of the cell cycle.
(B) Western blot analysis of cyclin A expression.
(C) Northern blot analysis of RNA levels.
(D) MNase sensitivity of *cyclin A* promoter. Ethidium bromide panel corresponds to 1 μ g of each MNase-digested fraction. Lower panels correspond to autoradiography of PCR products.
(E) MNase sensitive sites mapping of *cyclin A* proximal promoter using oligos set 2 in quiescent Brm^{+/+} and Brm^{-/-} cells.

had a cyclin A mRNA present in early phase of the cell cycle (Figure 5C, *Brm*^{-/-} panel). We then analyzed the sensitivity of the *cyclin A* promoter to MNase by polymerase chain reaction targeting either the distal or the proximal *cyclin A* promoter. While the distal *cyclin A* promoter did not present any MNase sensitivity during cell cycle progression of *Brm*^{+/+} cells, the proximal promoter exhibited an increased sensitivity to MNase upon gene activation (Figure 5D, *Brm*^{+/+} panel). Importantly, this result was similar to what we observed in primary MEF cells (see above, Figure 1C), suggesting that cell cycle regulation of MNase sensitivity of the *cyclin A* proximal promoter is a general mechanism conserved among cell lines. Surprisingly, we did not observe any protection from MNase digestion onto both parts of the *cyclin A* proximal promoter in *Brm*-deficient cells arrested by serum starvation as well as cells in late G1 state (Figure 5D, *Brm*^{-/-} panel). In addition, the distal *cyclin A* promoter did not exhibit any significant increase in MNase sensitivity (Figure 5D, *Brm*^{-/-} panel), indicating that what we observed with the proximal promoter was not due to a general effect of *Brm* deletion. These data demonstrate that the proximal promoter is constitutively accessible for MNase and further suggest that a tight nucleosomal structure is lacking onto the *cyclin A* proximal promoter in *Brm*^{-/-} cells. To confirm this hypothesis, we then mapped the MNase sensitive sites present on the *cyclin A* proximal promoter in quiescent *Brm*^{+/+} and *Brm*^{-/-} cells. Interestingly, wild-type cells showed two protected areas on the *cyclin A* proximal promoter (Figure 5E, *Brm*^{+/+} panel) consistent with those observed in MEF cells (Figure 1). Moreover, these regions correspond to the two positioned nucleosomes previously identified between -166 to -34 and -34 to +95 on the *cyclin A* proximal promoter when the gene is repressed (Figure 1). In contrast, *Brm*^{-/-} cells did not show any protection to MNase digestion, clearly demonstrating that these cells were unable to maintain a tight nucleosomal structure onto the *cyclin A* proximal promoter (Figure 5E, *Brm*^{-/-} panel). All together these results strongly suggest that *Brm* is necessary to maintain, at least in quiescent cells, the proximal *cyclin A* promoter tightly wrapped around two histone octamers.

Discussion

Our studies reveal here two significant features of *cyclin A* regulation. First, we have shown that *cyclin A* transcription during the cell cycle is associated with changes in micrococcal nuclease sensitivity and thus to modifications of the nucleosomal structure of its proximal promoter. Second, we present evidences that the chromatin remodeling factor Brahma/SNF2 α is directly recruited to *cyclin A* promoter and promotes *cyclin A* repression in quiescent cells.

Cyclin A Repression Mechanisms

Previous studies have shown that *cyclin A* expression depends on the cell cycle phase. More precisely, this cyclic expression is due to an active repression during early phases of the cell cycle (Henglein et al., 1994; Huet et al., 1996). Here, we show that this repression is associated with a low accessibility of DNA to nuclease

and suggest that two nucleosomes are positioned on the *cyclin A* proximal promoter when it is inactive. However, the lengths of the regions protected from MNase digestion vary according to the technique we used. While the PCR allows us to efficiently amplify a DNA fragment of 129 nucleotides between positions -34 to +95 (Figure 1D), the MNase sensitive sites mapping shows a protection of approximately 110 to 120 bp for the same region surrounding the CCRE/CDE and CHR sites (Figure 1E). Since it is likely that these minor differences are due to technical pitfalls, the physiological relevance of both results will need further investigation. Interestingly, both approaches identify at position -34 the possible boundary between two nucleosomes. In addition, it is noteworthy that stable nucleosome particles with perfect core histones octamer and 120 bp are frequently isolated by MNase digestion of chromatin (Bakayev et al., 1977). Finally, the chromatin immunoprecipitation under native conditions revealed at least the presence of the histone H4 onto the *cyclin A* proximal promoter in early G1. Taken together, these observations clearly suggest the existence of two stably positioned nucleosomes on the downregulated *cyclin A* promoter in vivo. We assume that transcriptional repression occurs when promoter DNA is tightly wrapped around nucleosomes. In this case, one common mechanism proposed for this repression is that nucleosomes limit the access of transcription initiation factors to DNA (Imbalzano et al., 1994). It is noteworthy that the nucleosomes cover all the identified transcription start sites on the *cyclin A* promoter. Interestingly, several studies have pointed out the activator function of SWI/SNF remodeling factor, but recent works have highlighted SWI/SNF complexes as possible direct repressors of transcription (Martens and Winston, 2003). We demonstrated here that *Brm* is recruited onto the *cyclin A* proximal promoter in quiescent cells. However, we have not yet identified all the factors required for the *cyclin A* repression, and we cannot completely exclude the possibility that chromatin remodeling machineries other than the SWI/SNF complex are also involved. Nonetheless, we propose here that *Brm* is necessary to position or maintain two nucleosomes onto the *cyclin A* proximal promoter in quiescence.

Upon reentry into the cell cycle, the *cyclin A* promoter is no longer protected from micrococcal nuclease digestion, indicating that DNA is partially relaxed from the core nucleosome structure forming so-called "persistently altered nucleosomes" or that nucleosomes are entirely removed. In addition, we did not detect any nucleosome sliding, but we cannot exclude the possibility that nucleosomes slid beyond the *cyclin A* promoter range studied. Moreover, all the three mechanisms (relaxed state, nucleosome removing, or sliding) have been described to explain transcriptional activation on promoters wrapped around nucleosomes (Aalfs and Kingston, 2000; Boeger et al., 2003; Imbalzano, 1998; Lomvardas and Thanos, 2001). Nevertheless, the complete definition of the molecular mechanisms that regulate *cyclin A* relief of repression will require further work.

Our results demonstrate that the previously identified repressor sites CCRE and CHR are necessary for maintaining a tight nucleosome structure on the promoter in quiescent cells. This enforces the idea that these two

nucleosomes play an essential role in repressing *cyclin A* in G0/G1 phase. Moreover, transcripts initiated from a *cyclin A* promoter mutated on either CCRE or CHR sites are present earlier in the cell cycle after serum refeeding but accumulate at lower levels than in cells entering S phase. Since this could be the result of the lack of serum, it would be interesting to quantify in our cell lines the level of expression of exogenous transcripts upon cell cycle arrest induced by either p16(INK4a) ectopic expression or confluent cell culture conditions. Finally, the slight differences between CCRE- and CHR-mutated promoters might shed light on the different functions of these two sites. Some authors have proposed that E2F4 is recruited to the *cyclin A* promoter leading to repression during early stages of the cell cycle (Schulze et al., 1995; Takahashi et al., 2000). However, we were unable to detect any E2F4 binding dependent on CCRE and CHR sites (Huet et al., 1996) (data not shown). Thus, the proteins that bind these repressor sites still remain to be clearly identified. Nevertheless, we show in this study that this bipartite repressor site recruits the chromatin remodeling factor Brm under serum starvation conditions. This is consistent with two other studies in which Brm is found on the *cyclin A* promoter upon growth arrest induced by either cell differentiation or ectopic expression of p16(INK4a) (Dahiya et al., 2001; Kadam and Emerson, 2003). It is noteworthy that both works failed to detect the presence of Brm on *cyclin A* promoter in proliferating cells. Similarly, we were not able to see such a binding in the same conditions. It is not clear whether this is due to the heterogeneity of an exponentially growing population or whether Brm is involved in *cyclin A* repression only in quiescent cells. In contrast to Brm, endogenous Brg1 was found on *cyclin A* promoter only in proliferating cells (Dahiya et al., 2001; Kadam and Emerson, 2003). These data raise the intriguing possibilities that *cyclin A* repression in early G1 phase of exponentially growing cells occurs through different mechanisms than in quiescent state. However, the role of Brg1 with respect to *cyclin A* promoter expression remains to be investigated.

Brm and Cell Cycle Control

Our results reveal that Brm is necessary for *cyclin A* repression during the early phases of the cell cycle. However, the weak phenotype observed in mice lacking Brm led to the suggestion that Brg1 could in part replace Brm (Reyes et al., 1998). Here, the deregulated expression of cyclin A in Brm^{-/-} cells allowed us to identify a specific function of Brm that can not be compensated for by Brg1. Moreover, the premature expression of cyclin A may explain in part the phenotype observed in Brm^{-/-} cells that proliferate with G1 phase are moderately shorter than observed with their wild-type counterparts (Reyes et al., 1998) (data not shown). Nevertheless, these cells have a longer G2/M phase (data not shown), perhaps as a consequence of cyclin A accumulation that delays mitosis until complete degradation of the protein (Tin Su, 2001). It must be noted that Brm-deficient mice displayed normal morphogenesis in all examined tissues, suggesting that *cyclin A* repression is not necessary for proper differentiation. Recently, it has

been reported that repression of *cyclin A* mediated by Rb only requires a SWI/SNF-dependent repression activity without histone deacetylase activity (Siddiqui et al., 2003; Zhang et al., 2000). Furthermore, Rb^{-/-} MEFs, in contrast to p107^{-/-} and p130^{-/-} cells, fail to repress *cyclin A* expression in quiescence, indicating that the retinoblastoma protein plays an essential role in *cyclin A* gene regulation (Philips et al., 1998). We have previously shown that Rb-mediated repression needs a functional CCRE site (Philips et al., 1999b), and chromatin immunoprecipitation experiments have revealed the presence of Rb on the *cyclin A* promoter upon p16/INK4a induction (Dahiya et al., 2001). All together these data underscore the role of Brm in Rb-mediated *cyclin A* repression. Interestingly, Brm overexpression leads to cell cycle arrest (Strober et al., 1996), suggesting that Brm is rate limiting for Rb-mediated cell cycle arrest. In contrast, the lack of Brm in several human tumor-derived cell lines may result in a cell cycle-independent expression of *cyclin A*.

Experimental Procedures

Cell Culture and Strains

Cells were grown in DMEM containing 10% heat-inactivated calf serum or left 48 hr in DMEM 0.2% serum to become quiescent. Swiss 3T3 cells were transfected using FuGENE 6 transfection reagent according to the manufacturer's conditions (Roche) with 1 µg of luciferase vectors as described in Philips et al. (1999a) mixed with 100 ng of pcDNA3 vector. After G418 selection (1 mg/ml), individual clones were selected based on the existence of a luciferase activity in exponentially growing cells. Here, we only described three clones, each carrying respectively a wild-type *cyclin A* promoter, a CCRE-mutated, and a CHR-mutated *cyclin A* promoter, but comparable results have been obtained with at least one other clone for each construct (data not shown). Southern blot analysis revealed that cell lines containing wt, mutated CCRE, and mutated CHR promoter have, respectively, 1, 2, and 1 copy of the exogenous DNA (data not shown).

Northern Blot

RNA analysis was done essentially as described in Boulon et al. (2002).

In Vivo *Micrococcus* Nuclease Digestion

The entire nuclei preparation procedure was performed at 4°C. Cells were washed with cold PBS and lysed in homogenization buffer (Tris [pH 7.5] 15 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, sucrose 5%, NP40 0.2%, and PMSF 0.1 mM) with five strokes in a Kontes all-glass Dounce homogenizer (A type pestle). Cell nuclei were recovered by centrifugation at 1400 × g for 5 min, washed in buffer (Tris [pH 7.5] 15 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM), and resuspended in same buffer supplemented with CaCl₂ 1 mM and NP40 0.2%. Nuclei were then submitted to limited digestion with micrococcal nuclease (USB), for 5 min at 30°C (respectively, 0.02, 0.1, and 0.5 units for 2 × 10⁵ MEF nuclei). Reactions were stopped by addition 1/10 volume of stop solution (EDTA 0.11 mM, EGTA 0.11 mM, SDS 10%) and submitted to Proteinase K digestion (20 µg) for 1 hr at 37°C. Digested DNA was phenol/chloroform extracted, precipitated, and resuspended in TE 0.1×. Micrococcal digestion was controlled on agarose gel (data not shown, and Figures 1C or 5D) and further used for micrococcal sensitivity assay performed by direct PCR or micrococcal sensitive sites footprinting by a LM-PCR-based procedure (see below).

Micrococcal Sensitivity Assay

For PCR amplification, 10 ng of micrococcal-digested DNA were used. Reaction mixture is composed of 20 µl of 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM ammonium sulfate, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 0.25 pmol/µl each oligonucleotides, 0.2 mM

each of dNTPs, 1 unit of TAQ DNA polymerase (Invitrogen), and 1 μ Ci of [α - 32 P]dCTP. Amplification follows: 5 min at 94°C followed by 30 cycles; 94°C for 30 s, 51°C or 57°C for 1 min, and 72°C for 2 min, and a final extension step of 5 min at 72°C. Half of the PCR product was electrophoresed on 6% PAGE, 0.5 \times TBE, and visualized by autoradiography of the dried gels. Previous experiments established that these PCR conditions are within the linear range of amplification. The following oligonucleotides were used for amplification of distal promoter: (–656; –546) 5'-GCTGAATTTCTGTAGTACAC-3' (sense) and 5'-CCCGCATTCCAGTAACTAC-3' (antisense); proximal promoter: (–175) 5'-CCTATGAGGCTACAGATC-3' (sense), (–166) 5'-CTACAGATCCACTGAGCAGAGA-3' (sense), (–34) 5'-AGAAGCGCGGTCGCGCGA-3' (antisense), (–21) 5'-CCGTACGTCAACAGAGCGC-3' (antisense), (–73) 5'-AAGATTCCTCGGGCCCTCGCTCG-3' (sense), (–34) 5'-TCTGGTGACGTACGGACTCCGGA-3', (+95) 5'-GCGGGAGGAGCGTAGAGCC-3' (antisense) and (+111) 5'-GGAGCAGAGGCTGCAGGCG-3' (antisense). Hybridization temperature was 51°C for the six first oligonucleotides couples and 57°C for the last ones.

Micrococcal Nuclease Sensitive Sites Mapping

For 1 hr at 37°C, 1 μ g of micrococcal-digested DNA was phosphorylated with 5 units of T4 kinase (Invitrogen) in 10 μ l of 1 \times forward reaction buffer (Invitrogen) and 1 mM ATP. Reaction was stopped by incubation at 65°C for 20 min. Then, 10 μ l of T4 DNA ligase 5 \times buffer (Invitrogen) was added to the reaction as well as 100 pmol (5 μ l of 20 pmol/ μ l) of asymmetric Link2/Link4-annealed linker DNA (minus strand Link2, 5'-GCGGTGACCCGGAGATCTGAATTC-3'; plus strand Link4, 5'-GAATTCAGAT-3'), 2.5 μ l of H₂O, and 3 μ l of T4 DNA ligase (1 unit/ μ l, Invitrogen). Reaction was incubated overnight at room temperature. Ligation products were precipitated by adding 1/3 of volume of 7.5 M ammonium acetate and 2 volumes of cold ethanol. Pellets were washed with 70% ethanol and resuspended in 50 μ l of PCR reaction mixture containing 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM ammonium sulfate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, and 0.25 pmol/ μ l each of promoter-specific primer 1 (PS1) and linker 2 oligonucleotides, 0.2 mM each of dNTPs, and 2.5 units of TAQ DNA polymerase (Invitrogen). PCR amplification conditions were as follows: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final extension step of 5 min at 72°C. Then, 7.5 μ l of the PCR reaction were mixed with 2.5 μ l of a labeling buffer (67 mM Tris-HCl [pH 8.8], 16 mM ammonium sulfate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 0.2 mM each of dNTPs, 1 unit of TAQ DNA polymerase (Invitrogen), and 0.15 pmol of 32 P-end-labeled promoter-specific primer 2 (PS2). PCR/labeling conditions follow: 5 min at 94°C followed by 5 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were precipitated by adding 80 μ l of 0.3 M sodium acetate, 10 μ g of transfer RNA (tRNA), and 3 volumes of cold ethanol. Pellets were washed with 70% ethanol and resuspended in 10 μ l of loading buffer (95% formamide, 10 mM EDTA, 20 mM NaOH, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) and denatured 3 min at 95°C. A 5 μ l volume of each sample was loaded onto a 6% sequencing gel and electrophoresed at 40 W. Dried gels were analyzed by autoradiography. For endogenous *cyclin A*, the following promoter-specific oligonucleotides were used: set 1, PS1: 5'-CTGTAAGATTCGTCGGGCCTTCG-3', PS2: 5'-AAGATTCCTCGGGCCTTCGCTCG-3', (Figure 1E); set 2, PS1: 5'-TTCACCCCTTAGCTGAGGCGAAGGC-3', PS2: 5'-GCGGAAGGCTGACACCTCGAGGCC-3' (Figure 5E); set 3 PS1: 5'-TCTTCTGATGACGAGCAGAGCAGGG-3', PS2: 5'-AGCGAAGGAGGCTGAGCCGAT-3'. For exogenous *cyclin A* (Figure 2D), PS1: 5'-CCATTTTACCAACAGTACCGAATG-3', PS2: 5'-TACCGAATGCCAAGCTTCTGCAGG-3'.

ChIP on Native Chromatin Fragments

For 5 min at 4°C, 10 \times 10⁶ of MEF cells, 6 or 12 hr after serum stimulation, were washed once with PBS, trypsinized, and harvested by centrifugation of 1200 \times g. The cells were resuspended in 1 ml of ice-cold buffer 1 (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 15 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 3.6 ng/ml Aprotinin, 5 mM Na-Butyrate). Then, 1 ml of ice-cold buffer 2 (buffer 1 with 0.3% NP-40) was added, the mixture was mixed

gently, and placed on ice for 10 min. We layered 1 ml of cell suspension on 8 ml of buffer 3 (buffer 1 with 1.2 M sucrose). The nuclei were harvested by centrifugation for 20 min at 10,000 \times g and resuspended in 1 ml of MNase digestion buffer (0.32 M sucrose, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM PMSF, 5 mM Na-Butyrate). Nuclei were incubated 3 min at 37°C with 10 units of micrococcal nuclease (USB); the digestion was stopped by adding EDTA to a final concentration of 20 mM. After centrifugation at 13,000 \times g for 10 min at 4°C, the supernatant, which contains the soluble fraction of chromatin digested by the MNase, was conserved for chromatin immunoprecipitation. We phenol/chloroform extracted 1 μ g of chromatin fraction and the quality of digestion was checked on agarose gel (Figure 1G). The volume of supernatant was completed to 1 ml at the final concentrations of 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 20 mM Na-Butyrate, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF. Immunoprecipitation was performed by incubating fractions with 10 μ l of anti-histone H4 antibody (Cell Signaling #2592) overnight at 4°C on a rotating wheel. Then, 50 μ l of protein A Sepharose beads (Amersham) were added and incubated for a further 4 hr at 4°C. Following incubation, the beads were washed once with solution A (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM EDTA, 5 mM Na-Butyrate, 75 mM NaCl), once with solution B (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM EDTA, 5 mM Na-Butyrate, 125 mM NaCl), and once with solution C (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM EDTA, 5 mM Na-Butyrate, 175 mM NaCl). To elute the chromatin, the beads were incubated 15 min on a rotative machine (20 rpm) with 0.5 ml of elution buffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 20 mM Na-Butyrate, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1% SDS). The DNA was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated with 0.25 M NaCl, 10 μ g of glycogen, and 3 volumes of cold ethanol. DNA was resuspended in 25 μ l of Tris/EDTA (pH 7.5). Immunoprecipitated DNA was quantified and 10 ng was used for PCR amplification. PCR conditions and primers are described above in the section 'Micrococcal Sensitivity Assay.'

Nucleosome Reconstitution

Human histones were purified from 293T cells as previously described (Chadee et al., 1999), except that after acetone precipitation the histones were resuspended in 7 M Guanidium HCl, Tris [pH 7.5] 20 mM, DTT 10 mM, and dialysed overnight against NaCl 2 M, Tris [pH 7.5] 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoethanol 5 mM at 4°C. Nucleosome reconstitution was performed exactly as described in Brand et al. (2001). *Cyclin A* promoter fragments were amplified by PCR with biotinylated 5'-CCTCAGGCTCCCGCCCTGAAGATT-3' and 5'-GCGGGAGGAGCGTAGAGCCC-3'. Reconstituted promoters attached to magnetic beads were incubated 1 hr at room temperature with 80 μ g of whole-cell extracts prepared from either MEF cells arrested by serum starvation or human Kit 225 cells grown in RPMI 10% serum and arrested by absence of IL-2 over 72 hr. Incubation buffer contains 10 mM HEPES-KOH [pH 7.8], 50 mM KCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM DTT, and 0.25 mg/ml BSA. Then beads were washed 3 times with 1 ml of incubation buffer, 0.01% NP40. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot.

Immunoblots

For protein expression level, cells plated on 10 cm cell culture dishes were directly resuspended in 400 μ l of 1 \times Laemmli loading dye. Proteins were separated by SDS-PAGE (7% or 12%) and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking and incubating with antibodies, blots were finally subjected to enhanced chemiluminescence substrate (Lumi-Light, Roche, or SuperSignal West Femto, Pierce) following the supplier's protocol. The following primary antibodies were used: anti-HA 12CA5 (Roche), anti- β -actin (Sigma), anti-Brm (Reyes et al., 1998), anti-Brg1 (2E12, Euromedex), anti-histone-H3 (Upstate, 06-755), anti-histoneH4 (Cell Signaling, #2592), anti-cyclin A (C 4710, Sigma), and anti-GAPDH (Philips et al., 1998). As secondary antibodies, we used anti-mouse IgG peroxidase conjugated (A9917, Sigma) and anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (NA934, Amersham Biosciences). Fractions were further equilibrated upon their expression of GAPDH or β -actin.

ChIP

Approximately 10⁶ cells were plated on a 10 cm cell culture dish. After 12 hr, cells were transfected with 2 μ g of empty plasmid or

plasmid expressing HA-tagged Brm or HA-tagged Brg1, using FuGENE 6 transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Roche). Medium was changed 6 hr after transfection, and 24 hr after transfection cells were cultured in 0.2% serum DMEM for 48 hr. ChIPs were performed as previously described (Boulon et al., 2002), except that immunoprecipitation was done with 2 μ g of anti-HA-Biotin (Roche) and 100 μ g of Dynabeads[®] M-280 streptavidin (Dyna). For PCR amplification, 5 μ l of immunoprecipitated DNA was used. Reaction mixture is composed in 25 μ l of 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16 mM ammonium sulfate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1.5 mM MgCl₂, 10% DMSO, 0.25 pmol/ μ l each oligonucleotides, 0.2 mM each of dNTPs, 1 unit of TAQ DNA polymerase (Invitrogen), and 1 μ Ci of [α -³²P]dCTP. Amplification follows: 5 min at 94°C followed by 28 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min, and 72°C for 2 min, and a final extension step of 5 min at 72°C. Half of the PCR product was electrophoresed on 6% PAGE, 0.5 \times TBE and visualized by autoradiography of the dried gels. Previous experiments established that these PCR conditions are within the linear range of amplification. The following oligonucleotides were used for amplification of endogenous *cyclin A* promoter: 5'-GCTGAATTTCTGTAGTACAC-3' (sense)/5'-GGAGCAGAGGCTGCAGGCG-3' (antisense), and exogenous *cyclin A* promoter: 5'-GGCGAAGGCTGACACCTCGAGGCC-3' (sense)/5'-AACTGAGCTAACATAACCCGGGAGG-3' (antisense).

Immunostaining and Flow Cytometry

Cells were trypsinized, collected by centrifugation (1200 \times g, 5 min at 4°C), washed once with PBS, and fixed in cold 70% ethanol overnight at -20°C, with vortexing for the first minute. After washing with PBS, cells were resuspended in staining solution (PBS, 20 μ g/ml Dnase-free Rnase, 25 μ g/ml of propidium iodide) and incubated at room temperature for 30 min. Cells were analyzed by flow cytometry on a Becton Dickinson FACScan. For simultaneous analysis of cell cycle and *cyclin A* expression, cells were trypsinized, washed once with PBS, and fixed with ethanol as above. Cells were washed twice with PBS/0.5% FCS and incubated at 4°C for 5 min in cold PBS/0.25% Triton X-100. Permeabilized cells were harvested after addition of PBS/10% FCS (wash buffer), washed once, and incubated for 1 hr at room temperature with anti-cyclin A antibodies (1/500, sc-596, Santa Cruz) in wash buffer/0.05% Tween 20. After one wash, cells were incubated for 1 hr at room temperature in the dark with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:100, Jackson ImmunoResearch). All labeled cells were washed again and resuspended in staining solution (PBS, 20 μ g/ml Dnase-free Rnase, 25 μ g/ml of propidium iodide). The analysis was performed using a FACScan analyzer with CellQuest software (Becton Dickinson).

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips, washed twice with PBS, fixed with PBS containing 3.8% formaldehyde for 10 min, and permeabilized with cold methanol for 5 min. After washing with PBS, cells were incubated for 1 hr at 37°C with anti-cyclin A antibody (1:500, sc-596, Santa Cruz) or anti-cyclin B1 GNS1 antibody (1:100, sc-245, Santa Cruz), then washed in PBS and incubated for 1 hr at 37°C with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:100, Jackson ImmunoResearch) or Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (1:1000, Sigma). After washing with PBS, coverslips were mounted with 90% glycerol, 10% PBS 10 \times , 1 mg/ml p-phenylenediamine, and 100 μ g/ml DAPI. Images were acquired on a DMRA microscope using 40 \times lens. Digital images were recorded with a 12-bit C4795-NR CCD camera (Hamamatsu).

Acknowledgments

We are grateful to X. Huet and J. Rech for reagent; M.L. Vignais and E. Fabrizio for helpful discussions; C. Sardet and B. Bell for critical reading of this manuscript; G. Crabtree for BAF155 and BAF170 antibodies; and D. Umlauf for sharing technical knowledge in native chromatin immunoprecipitations. This work was supported by grants from the CNRS and La Ligue contre le Cancer. M.C. was funded by a fellowship from La Ligue contre le Cancer. C.M. was supported by a grant from Association pour la Recherche sur le Cancer.

Received: October 20, 2003

Revised: May 3, 2004

Accepted: May 4, 2004

Published: July 1, 2004

References

- Aalfs, J.D., and Kingston, R.E. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem. Sci.* 25, 548-555.
- Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G., and Varshavsky, A.J. (1977). Nucleosomes and subnucleosomes: heterogeneity and composition. *Cell* 11, 619-629.
- Barlat, I., Fesquet, D., Brechot, C., Henglein, B., Dupuy d'Angeac, A., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1993). Loss of the G1-S control of cyclin A expression during tumoral progression of Chinese hamster lung fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 4, 105-113.
- Barlat, I., Henglein, B., Plet, A., Lamb, N., Fernandez, A., McKenzie, F., Pouyssegur, J., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1995). TGF-beta 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways. *Oncogene* 11, 1309-1318.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., and Kornberg, R.D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell* 11, 1587-1598.
- Boulon, S., Dantonel, J.C., Binet, V., Vie, A., Blanchard, J.M., Hipskind, R.A., and Philips, A. (2002). Oct-1 potentiates CREB-driven cyclin D1 promoter activation via a phospho-CREB- and CREB binding protein-independent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 22, 7769-7779.
- Brand, M., Moggs, J.G., Oulad-Abdelghani, M., Lejeune, F., Dilworth, F.J., Stevenin, J., Almouzni, G., and Tora, L. (2001). UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *EMBO J.* 20, 3187-3196.
- Chadee, D.N., Hendzel, M.J., Tyllipski, C.P., Allis, C.D., Bazett-Jones, D.P., Wright, J.A., and Davie, J.R. (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274, 24914-24920.
- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M., and Dean, D.C. (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell* 8, 557-569.
- Henglein, B., Chenivresse, X., Wang, J., Eick, D., and Brechot, C. (1994). Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5490-5494.
- Huet, X., Rech, J., Plet, A., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1996). Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 16, 3789-3798.
- Imbalzano, A.N. (1998). SWI/SNF complexes and facilitation of TATA binding protein:nucleosome interactions. *Methods* 15, 303-314.
- Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R., and Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.
- Kadam, S., and Emerson, B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377-389.
- Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C., and Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 73-79.
- Liu, N., Lucibello, F.C., Engeland, K., and Muller, R. (1998). A new model of cell cycle-regulated transcription: repression of the cyclin A promoter by CDF-1 and anti-repression by E2F. *Oncogene* 16, 2957-2963.
- Liu, N., Lucibello, F.C., Korner, K., Wolfrum, L.A., Zwicker, J., and Muller, R. (1997). CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res.* 25, 4915-4920.
- Lomvardas, S., and Thanos, D. (2001). Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell* 106, 685-696.
- Martens, J.A., and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 136-142.
- Mulligan, G., and Jacks, T. (1998). The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet.* 14, 223-229.

- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132–1136.
- Philips, A., Huet, X., Plet, A., Le Cam, L., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1998). The retinoblastoma protein is essential for cyclin A repression in quiescent cells. *Oncogene* 16, 1373–1381.
- Philips, A., Chambeyron, S., Lamb, N., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1999a). CHF: a novel factor binding to cyclin A CHR corepressor element. *Oncogene* 18, 6222–6232.
- Philips, A., Huet, X., Plet, A., Rech, J., Vie, A., and Blanchard, J.M. (1999b). Anchorage-dependent expression of cyclin A in primary cells requires a negative DNA regulatory element and a functional Rb. *Oncogene* 18, 1819–1825.
- Plet, A., Huet, X., Algarte, M., Rech, J., Imbert, J., Philips, A., and Blanchard, J.M. (1997). Relief of cyclin A gene transcriptional inhibition during activation of human primary T lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules. *Oncogene* 14, 2575–2583.
- Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 16, 933–947.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.* 16, 245–256.
- Reyes, J.C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C., and Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *EMBO J.* 17, 6979–6991.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11264–11268.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.
- Siddiqui, H., Solomon, D.A., Gunawardena, R.W., Wang, Y., and Knudsen, E.S. (2003). Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7719–7731.
- Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 684–691.
- Strobeck, M.W., Knudsen, K.E., Fribourg, A.F., DeCristofaro, M.F., Weissman, B.E., Imbalzano, A.N., and Knudsen, E.S. (2000). BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7748–7753.
- Strober, B.E., Dunaief, J.L., Guha, and Goff, S.P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1576–1583.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14, 804–816.
- Tin Su, T. (2001). Cell cycle: how, when, and why cells get rid of cyclin A. *Curr. Biol.* 11, R467–R469.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11–20.
- Wang, S., Zhang, B., and Faller, D.V. (2002). Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J.* 21, 3019–3028.
- Weinmann, A.S., Yan, P.S., Oberley, M.J., Huang, T.H., and Farnham, P.J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev.* 16, 235–244.
- Zerfass-Thome, K., Schulze, A., Zwerschke, W., Vogt, B., Helin, K., Bartek, J., Henglein, B., and Jansen-Durr, P. (1997). p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 407–415.
- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79–89.
- Zhang, Z.K., Davies, K.P., Allen, J., Zhu, L., Pestell, R.G., Zagzag, D., and Kalpana, G.V. (2002). Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5975–5988.
- Zwicker, J., Gross, C., Lucibello, F.C., Truss, M., Ehlert, F., Engeland, K., and Muller, R. (1995a). Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1. *Nucleic Acids Res.* 23, 3822–3830.
- Zwicker, J., Lucibello, F.C., Wolfrum, L.A., Gross, C., Truss, M., Engeland, K., and Muller, R. (1995b). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J.* 14, 4514–4522.

2.2 PUBLICATION 2 : LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE

2.2.1 Introduction

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une famille de protéines kinases dont l'activité dépend de leur association avec leurs partenaires, les Cyclines. Il a été montré que les facteurs de remodelage de la chromatine SWI/SNF, Brm et Brg1, sont directement impliqués dans la régulation de l'expression des cyclines via leur interaction avec les protéines de la famille de pRb. Nous avons en particulier démontré que Brm était nécessaire pour la répression de la transcription de la cycline A en G0/G1. Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien entre les membres de la famille SWI/SNF et le cycle cellulaire. De plus, il a été observé que les protéines Brm et Brg1 pouvaient présenter des mutations ou bien que leurs expressions étaient dérégulées dans de nombreuses lignées cellulaires issues de tumeurs (Muchardt and Yaniv, 2001; Wong *et al.*, 2000). En outre, il a été montré que l'expression de la protéine Brm et non celle de Brg1 est perdue après transformation de cellules par ras. Et de façon intéressante, la surexpression de Brm dans ces cellules est suffisante pour conduire à la réversion du phénotype (Muchardt *et al.*, 1998).

Afin de comprendre pourquoi Brm est absent dans de nombreuses lignées cancéreuses et quel est son rôle exact dans le contrôle du cycle cellulaire, nous avons décidé d'étudier plus en détail la prolifération des cellules dépourvues du gène *brm*.

2.2.2 Résultats

Nous montrons que dans les cellules dépourvues de *brm*, de nombreuses protéines du cycle cellulaire sont dérégulées. En particulier, les Cyclines E et A sont exprimées de façon constitutive dans ces cellules, même en absence de sérum. Cependant, ces cellules ne sortent pas plus vite de quiescence car les activités des complexes Cycline E/Cdk2 et Cycline A/Cdk2 sont inhibées par les CKI p21 et p27. Par contre, ces cellules ont un cycle cellulaire accéléré, notamment parce qu'elles progressent plus rapidement à travers la phase S. Néanmoins, nous mettons également en évidence que les cellules *brm* ^{-/-} ont une phase G2/M légèrement plus longue. D'autre part, nous avons observé que les cellules *brm* ^{-/-} sont également plus grosses dans les phases G0/G1. Nous proposons que ceci pourrait être la conséquence d'une dérégulation de l'oncogène *c-myc* en absence de sérum. Enfin, nous avons pu remarquer

quelques problèmes lors de la séparation des chromosomes en mitose et l'apparition d'instabilité génomique dans les cellules dépourvues de brm.

2.2.3 Conclusion

La perte de brm conduit à accélérer la progression des cellules dans le cycle cellulaire en jouant principalement sur le déroulement de la phase S. Cependant les cellules brm $-/-$ présentent une mitose rallongée et des aberrations chromosomiques. Or ceci pourrait être la conséquence de l'expression constitutive de trois oncogènes la Cycline E, la Cycline A et c-Myc. Tous ces résultats permettent de mieux comprendre pourquoi des mutations du facteur de remodelage, Brm, sont observées dans de nombreux cancers.

Role for Brm in Cell Growth Control

Marjorie COISY-QUIVY,¹ Virginie ROURE,¹ Christian MUCHARDT,² Jean-Marie BLANCHARD¹ and Jean-Christophe DANTONEL^{1,*}

¹ Institut de Génétique Moléculaire, CNRS, UMR 5535, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

² Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75724 Paris cedex 15, France

* Correspondence: dantonel@igmm.cnrs.fr

Abstract

The chromatin remodeling factor SWI/SNF has recently been implicated in cell cycle control. In this study, we directly examine the function of one of the catalytic subunits of this complex, the Brahma/SNF2 β protein (Brm), and we describe the effects of Brm deletion in mouse fibroblasts. Interestingly, we observe a general acceleration of the cell cycle independent of the cell cycle re-entry phase. Nonetheless quiescent *brm*^{-/-} cells present an abnormal expression of cell cycle regulators such as cyclin E and A. We demonstrate that p27 and p21 inhibitors offset high levels of both cyclins by reducing cyclin-dependent kinase activities and thus delaying cell cycle re-entry in *brm*^{-/-} cells. In addition, transit through S phase is faster in these cells in contrast to the G2/M phase which is slightly slower. Finally, we show that *brm* deletion leads to G0/G1 oversized cells and genomic instability. These results provide novel explanations for Brm downregulation or mutations observed in several human tumor cell lines.

Introduction

The SWI/SNF is a multimeric chromatin remodeling complex important for gene regulation. It consists of 10-12 proteins that form a 2 MDa complex. First identified in yeast, the SWI/SNF complex is highly conserved among eukaryotes (1). This multisubunit complex regulates transcription through its ability to remodel chromatin. Specifically, the SWI/SNF complex has been shown to alter nucleosome structure by disrupting histone-DNA interactions in an ATP-dependent manner (2, 3). The mechanism of SWI/SNF action involves wrapping/unwrapping of DNA around nucleosomes and sliding of nucleosomes (4). SWI/SNF complexes have been well characterized as transcriptional activators but substantial evidence had also shown that SWI/SNF represses transcription directly (5). In mammals, SWI/SNF interacts with a wide variety of proteins and regulates several processes such as differentiation and cell cycle regulation (6). Mammalian SWI/SNF complexes are present in diverse biochemical forms, indicating that they may play different functions (7). Each of these complexes contains one of the two subunits that carry out the ATP-dependent helicase activity, Brahma/SNF2 α (Brm) or Brg1/SNF2 β (Brg1 related gene 1), and a variable subunit composition of Brg1-associated factors (BAFs). Brm and Brg1 are highly homologous ATPases, yet they appear to direct very different cellular pathways. Inactivation of Brg1 by homologous recombination in mouse is embryonic lethal at pre-implantation stage but tumors are detected in heterozygous animals (8). In contrast, mice lacking a functional Brm gene are viable. However, the mice show increase body weight and a clear deregulation of cellular growth control (9). Moreover, Brm-deficient mouse fibroblasts do not arrest their cell cycle in response to UV irradiation (9). Interestingly, Brm and Brg1 are frequently downregulated, silenced or mutated in malignant cells, including cells derived from bladder, lung and prostate tumors (10-13). Brm is also systematically downregulated in rhabdoid tumors lacking SNF5/INI1/SMARCB1/BAF47, one of the subunits of the SWI/SNF complex (14). In addition, overexpression of Brm or Brg1, in Brm/Brg1-deficient tumor cells leads to cell cycle arrest and flat cell formation (15-17). Like deficient cells, wild-type cells are not tolerant to overexpression of Brm (18, 19).

Progression through the different phases of the cell division cycle is controlled by a family of protein kinases, whose specific activities depend on the association with protein partners named cyclins. The cyclin-dependent kinases (cdks) and their regulatory cyclin subunits promote passage through each phase of the cell division cycle (20). D-type cyclins participate mainly to the quiescence/G1 phase transition and to the transit to the early G1 phase. E-type

cyclins control G1/S transition with a crucial role after cells escape from a quiescent state (21). Cyclin A2 is involved in the G1/S transition and the transit into S phase when associated with cdk2 kinase, and the G2/M transition when associated with cdc2. Finally, B-type cyclins contribute to the completion of the G2 phase and Mitosis. The activation of cyclin-cdk complexes is strictly regulated at various levels. Transcription of genes involved in cell cycle control requires the coordinated activation and repression of specific sets of transcription factors, among which the E2F/DP family constitute a thoroughly studied archetype (22). Activity of E2F/DP transcription factors is regulated by their association with pocket proteins of the Rb family that includes pRb (retinoblastoma tumor suppressor gene product), and two related proteins p107 and p130 (23). The SWI/SNF complex appears to affect the cell cycle control machinery at several levels. Several studies have demonstrated interactions between the SWI/SNF complex and the cell cycle machinery. First, Brm and Brg1 interact in vitro with the proteins of retinoblastoma family and can cooperate with pRb to induce G1-growth arrest in Brm/Brg1-deficient cells (16, 17, 24). In addition, Brm was also shown to interact with pRb for repression of E2F-mediated transcription (25, 26). CHIP experiments have revealed the presence of several components of the SWI/SNF complex on different cyclin promoters. INI1/hSNF5 was found on *cyclin D1* and its ectopic expression, like Brm and Brg1, causes cell cycle arrest (27). Brm is found to occupy the *cyclin D1* and *cyclin A* promoters upon cell cycle arrest (28, 29), and Brg1 is recruited onto the *cyclin E* promoter in quiescent cells (29) and on the *cyclin A* promoter in proliferating cells (28, 29). However, Brg1 growth-arresting activity has been found to be controlled to some extent by cyclin E through a mechanism apparently independent of Rb (30). Furthermore, cell cycle arrest promoted by prohibitin, a cell growth suppressor, which represses the activation function of E2Fs, requires Brm and Brg1 to particular E2F-dependent promoters (31). A recent report also indicates that transcriptional regulation by the tumor suppressor p53 requires an intact SWI/SNF complex (32). More directly, Brg1 has been shown to function as a transcriptional repressor of the AP1 family member *c-fos* (33). Finally, we have demonstrated that Brm controls cyclin A gene repression directly by modulating the positions of nucleosomes covering the promoter, and thus, we have provided for the first time a mechanism that links the chromatin remodeling activity carried out by Brm to the control of the cell cycle progression (34).

Despite strong evidence of a role for Brm in cell cycle regulation, the absence of spontaneous tumor formation in Brm-deficient mice has led some authors to hypothesize that Brg1 could compensate for Brm deletion. However we have shown that *cyclin A* is derepressed in cells

deficient for Brm. This result shows at least one function that cannot be performed by Brg1 in place of Brm, but also raises the intriguing question of how these cells compensate for the lack of cyclin A early repression. We therefore investigated cell cycle progression in Brm deficient cells. We found that *brm*^{-/-} cells largely respond to serum starvation and leave cell cycle but, surprisingly, they do not re-enter the cell cycle faster than their wild-type counterparts. In addition to cyclin A, we found that Brm-deficient cells also presented a premature expression of cyclin E and early phosphorylation of pRb. However, typical markers of quiescence, such as p27 and p130 were highly expressed in *brm*^{-/-} cells in the absence of serum. Analysis of the various cyclin-dependent kinase activities throughout the cell cycle led us to think that *brm*^{-/-} cells compensate for the premature expression of cyclin E and A with a strong inhibition of their associated kinase activities by either p27 or p21. However, we show that Brm-deficient cells clearly have a faster cell cycle than wild-type cells through an accelerated transit into the S phase. In contrast, they also remain slightly longer in G2/M phase. Interestingly, we present evidence that serum starved *brm*^{-/-} cells are larger and present a higher complexity than the wild-type cells. This correlates with the presence of the cell growth control oncogene c-Myc in the absence of serum. Finally, and more intriguingly, we show that Brm-deficient cells present abnormal nuclei, e.g. micronuclei and budding nuclei, and manifest chromosomal instability.

Results

The lack of Brahma does not affect cell cycle re-entry

We have previously shown that the absence of the chromatin remodeling factor Brahma/SNF2 β leads to abnormal expression of cyclin A in quiescence (34). However *brm*^{-/-} cells were still able to arrest in the absence of serum. This apparent contradiction compelled us to further investigate the state of *brm*^{-/-} cells arrested by serum starvation. It was essential to determine whether this cell cycle arrest corresponded to the entry of these cells in a well-defined quiescent state. To this aim, we assumed that the presence of cyclin A in quiescent *brm*^{-/-} cells can shorten re-entry into the cell cycle when cells are released from serum starvation. Thus, we first determined the percentage of cells in each phase of the cell cycle in absence of serum and after release from serum starvation, by measuring the incorporation of bromo-deoxyuridine (BrdU) and DNA content. It was noteworthy that cell population starved of serum for 48 hours displayed an increase of the G0/G1 population, confirming that the lack of serum clearly induced a cell cycle arrest in wild type and Brm-deficient cells (Figure 1A and lower panels). However, the lack of Brm led to slight differences. While 90% of the wild-type cells left the cell cycle in a diploid stage, only 75% of *brm*^{-/-} cells were in a 2N state upon serum starvation. Moreover approximately 8% of the *brm*^{-/-} cells were still incorporating BrdU in absence of serum, and 15% of these cells were arrested in a 4N state (Figure 1A). To explain such differences, it was tempting to assume that Brm-deficient cells were not efficiently arrested by the lack of serum, but had rather a cell cycle slowing down. Indeed, if these cells were in a G1 like state rather than in a quiescent state, we could infer that these cells would have re-entered the cell cycle more quickly than their wild-type counterpart. Surprisingly, like the wild-type cells, 6 hours after adding serum, *brm*^{-/-} cells did not incorporate significant amount of BrdU, whereas 12 hours after serum stimulation, both cells lines showed significant BrdU labeling (figure 1A). However, it is noteworthy that more Brm-deficient cells were in S phase than wild-type cells, i.e. approximately 25% compared to 16% (Figure 1A). As the cells continued their cell cycle, they started to reach the G2/M phase around 18 hours after serum stimulation. Interestingly, we then observed almost 30% of *brm*^{-/-} cells in the G2/M window, whereas only 17% of *brm*^{+/+} cells had reached this state (Figure 1A). This difference was in agreement with data observed 12 hours after serum stimulation, when the cells entered S phase. It was then tempting to assume that there were more *brm*^{-/-} cells incorporating BrdU at this time because these cells had entered S phase

earlier than the wild-type cells. To confirm this hypothesis we looked more thoroughly at the percentage of cells synthesizing DNA between 6 to 12 hours after serum stimulation. We first noticed that neither cell line showed an increase of BrdU incorporation until 9 hours after serum stimulation (Figure 1B). A major difference appeared after 10 hours when *brm*^{+/+} cells progressively entered S phase, whereas *brm*^{-/-} cells reached the S phase one hour later (Figure 1B). However, this difference was no longer sustained 12 hours after serum addition, when 25% of *brm*^{-/-} cells incorporated BrdU compared to 17% for *brm*^{+/+} cells (Figure 1B, see 12 hr points). These data suggested that *brm*^{-/-} cells had entered S phase. Taken together these results clearly indicate that *brm*^{-/-} cells do not have an altered quiescent state that allows them to shorten their entry into the cell cycle. Since we previously showed that deletion of Brm leads to cyclin A expression in the absence of serum (34), we assume that this abnormal expression neither dramatically affects cell cycle arrest due to serum starvation, nor confers a quicker rate of cell cycle re-entry.

Brm deletion leads to abnormal expression of cell cycle regulators in quiescence

At face value, our results suggested that cyclin A was not sufficient by itself to initiate the escape from quiescence. It was tempting to hypothesize that *brm*^{-/-} cells conserved a robust cell cycle control. We therefore looked at the fate of cell cycle regulators and specific quiescence markers in *brm*^{+/+} and in *brm*^{-/-} cells at different times following serum addition. Cyclin D1 is specific to cycling cells and it is therefore low or absent in quiescent cells. Accordingly, both cell lines exhibited weak expression of this cyclin in the absence of serum, followed by an induction of expression upon serum addition (Figure 2, Cyc D1 panel). However, *brm*^{-/-} cells showed strikingly lower cyclin D1 expression than *brm*^{+/+} cells throughout cell cycle re-entry (Figure 2, Cyc D1 panel). A downstream event of cyclin D1 activation is induction of cyclin E expression. Surprisingly, we observed abnormally high expression of cyclin E in quiescent *brm*^{-/-} cells despite the low level of cyclin D1 (Figure 2, Cyc E1 panel). It was noteworthy that cyclin E levels decreased after 18 hours of serum stimulation in *brm*^{-/-} cells, and were barely detectable in both cell lines, an additional 6 hours later (data not shown). This indicated that cyclin E processing was conserved in *brm*^{-/-} cells. Similarly to cyclin E, cyclin A presented a relief of repression in quiescent state (Figure 2, Cyc A2 panel), in agreement with our recent work concerning the role of Brm in *cyclin A* repression (34). Finally, G2/M specific cyclin B showed the same profile in both cell lines, and was not detectable until 18 hours after serum addition (Figure 2, Cyc B1 panel). This result was surprising considering the deregulation observed with the cyclins expressed prior to

cyclin B during cell cycle progression. However, cyclin B expression perfectly corresponded to the completion of the S phase in both cell lines, as determined by FACS analysis (Figure 1). We then determined the fate of the retinoblastoma protein (pRb) during cell cycle progression of Brm-deficient cells. As the major target of the cyclin-dependent kinases, pRb is weakly phosphorylated in quiescent state and then becomes highly phosphorylated through cell cycle progression. In agreement with previous work, wild-type cells exhibited only the hypophosphorylated form of pRb in quiescence and up to 6 hours after serum stimulation (Figure 2, pRb panel). Following cell cycle entry, 12 hours after serum addition, a low mobility form of the protein appeared, corresponding to a highly phosphorylated form. This became the major form of the protein 18 hours after serum stimulation, corresponding to the entry of cells into S phase (Figure 2, pRb panel). Interestingly, Brm-deficient cells showed both forms of the pRb protein, as well as an intermediate form throughout the cell cycle subsequent to serum addition (Figure 2, pRb panel). Nevertheless, pRb was mainly hypophosphorylated in quiescence and in the early stage of the cell cycle, whereas the hyperphosphorylated form of pRb was the major form present later in the cell cycle. In addition, the pRb related products p130 and p107 presented deregulated expression in Brm-deficient cells. Since p130 is a marker of quiescent cells, it was notable that the protein was expressed at a higher level in *brm*^{-/-} cells than in *brm*^{+/+} cells, and that the upper form was the major form in *brm*^{-/-} cells, in contrast to wild-type cells (Figure 2, p130 panel). Beyond the higher expression observed, p130 seemed to be down regulated upon cell cycle re-entry in both cell lines, suggesting that mechanisms that regulate p130 were conserved in the absence of Brm (Figure 2, p130 panel). Whereas p130 is expressed in quiescent state, p107 is specific of cycling cells. As expected, p107 appeared in *brm*^{+/+} cells 6 hours after serum refeeding, followed by lower mobility form, corresponding to a highly phosphorylated form of the protein. Interestingly, in Brm-deficient cells, p107 was not only detectable in the absence of serum, but also the only form detectable was the lower one, even after cells largely entered S phase (Figure 2, p107 panel). These data revealed two interesting characteristics of pRb family members. First, in contrast to pRb, expression of p130 and p107 was altered in *brm*^{-/-} cells, especially in quiescence, where both proteins were expressed at a higher levels. Second, similar to pRb, cell cycle-dependent post-transcriptional regulations were altered in the absence of Brm. Despite high levels of cyclin E and A expression in quiescent *brm*^{-/-} cells, the majority of the pRb protein remained hypophosphorylated until the cells entered S phase. Since pRb has been described to be a major target of cyclin-dependent kinases, the profile of the protein in *brm*^{-/-} cells suggested that cyclin-dependent kinase activities were partly

impaired in quiescence and early state of the cell cycle. We therefore looked at the cyclin-dependent kinase inhibitor p27, which is normally expressed when cells enter quiescence. Interestingly, both cell lines showed a high level of p27 upon low serum condition, followed by a progressive decrease of expression upon cell cycle re-entry (Figure 2, p27 panel). In addition, both cell types showed a similar level of expression of p27. These data indicated that quiescence-dependent expression of p27 was fully conserved in Brm-deficient cells. Taken together, our results demonstrate that the loss of Brm differently affects various cell cycle regulators. *Brm* deletion leads to a decrease in cyclin D1 expression, and a lack of cyclin E and A repression in the absence of serum. Since flow cytometry did not reveal any dramatic loss of cell cycle control in *brm*^{-/-} cells, it was tempting to assume that the low level of cyclin D1 also results in a low cyclin D1-dependent kinase activity, which consequently impedes cell cycle re-entry. However, it is noteworthy that p130, which has been shown to be involved in repression of E2F target genes in quiescence, is overexpressed in *brm*^{-/-} cells, suggesting that some genes essential for escaping quiescence are still efficiently repressed. In addition, our results demonstrate that p27 is normally expressed in quiescent *brm*^{-/-} cells, and thus suggest that this cdk inhibitor can execute its role and then bridle cyclin E- and cyclin A-dependent kinase activities crucial for S phase entry.

Brm deficient cells present a premature activation of cyclin-dependent kinases

Although we observed a marked deregulation of different cell cycle regulators like cyclins in quiescent Brm-deficient cells, we were not able to detect by flow cytometry any striking loss of cell cycle control in these cells. Analysis of expression levels of cell cycle regulators suggest that this can be due to either the low level of cyclin D1-dependent kinase activity, or the inhibition of cyclin-dependent kinase activities by p27. Since these two hypotheses are not exclusive, it was therefore necessary to directly measure the kinase activities associated with the different cyclins in *brm*^{-/-} cells. To this aim, we first measured phosphorylation of the pRb protein on serine 780. As this phosphorylation has been described to be directly dependent upon cyclin D1-cdk4 (35), it should be absent in quiescent cells. As expected the phospho-ser780 signal appeared 12 hr after serum stimulation in wild-type cells (Figure 3A). In contrast, *brm*^{-/-} cells showed pRb phosphorylated on serine 780 not only after serum stimulation but also in quiescence and early in the cell cycle (Figure 3A). These data clearly indicated that, despite the lower level of cyclin D1 expression in *brm*^{-/-} cells compared to *brm*^{+/+} cells (Figure 2), Brm-deficient cells presented a constitutive cyclin D1-dependent kinase activity. Since the lack of serum resulted in efficient cell cycle arrest in *brm*^{-/-} cells,

this result ruled out the possibility that these cells entered a canonical quiescent state. Nonetheless, this constitutive kinase activity did not seem sufficient to promote a rapid cell cycle re-entry in *brm*^{-/-} cells upon serum addition (Figure 1).

To elucidate this apparent contradiction, we further looked at cyclin E-dependent kinase activity, which is required for proper re-entry into the cell cycle after a quiescent state (21). We performed in vitro kinase assays on a histone H1 template, after immunoprecipitation with an antibody directed against cyclin E (see Experimental procedures). Interestingly, in *brm*^{-/-} quiescent cells, despite the presence of large amounts of cyclin E (Figure 2), the remaining associated kinase activity was strikingly low (Figure 3B). Surprisingly, this activity was barely distinguishable from that observed in wild-type quiescent cells. However, 6 hours after serum stimulation, we noticed a strong increase in cyclin E-dependent kinase activity in *Brm*-deficient cells whereas it remained approximately at basal levels in their wild-type counterpart (Figure 3B). Finally, in both cell lines, cyclin E-cdk2 kinase activity reached its peak 12 hours after serum addition. Since cyclin E was expressed at equivalent levels throughout the cell cycle of *brm*^{-/-} cells (Figure 2), this data raised the question of how cyclin E-dependent kinase activity was down regulated in quiescent *brm*^{-/-} cells. To this aim, we analyzed by western blot the cyclin E complexes isolated by immunoprecipitation. As expected we found cdk2 associated to cyclin E in *brm*^{+/+} cells 12 and 18 hours after serum stimulation (Figure 3C, Cdk2 panel). It is noteworthy that these times corresponded to the emergence of cyclin E in the cells (Figure 2). Interestingly, in *Brm*-deficient cells, where cyclin E is constitutively present (Figure 2), we found the kinase partner cdk2 associated to cyclin E in quiescence and all along the cell cycle (Figure 3C, Cdk2 panel). Taken together, these data suggested that cdk2 associated with cyclin E as soon as it accumulated, and ruled out the possibility that the relative lack of cyclin E-dependent kinase activity observed in *brm*^{-/-} quiescent cells was due to the absence of association between cyclin E and its kinase partner cdk2. This prompted us to investigate the presence of cdk inhibitors into the immunoprecipitated complexes. Importantly, we found that the cdk inhibitor p27, and not p21, was associated with the cyclin E-cdk2 complex in *brm*^{-/-} cells in quiescence and to a lesser extent 6 hours after serum stimulation (Figure 3C, p21 and p27 panels). These results indicate that the expression of cyclin E in serum starved *Brm*-deficient cells is offset by p27, which inhibits cdk2, and thus prevents premature entry into S phase.

These data might explain the relative inefficiency of *brm*^{-/-} cells in re-entering the cell cycle compared to their wild-type counterpart. However, several studies have revealed that in particular ways, cyclin A could overcome the lack of cyclin E, and therefore initiate S phase.

This led us to investigate cyclin A-dependent kinase activity throughout the cell cycle in both *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} cells. As expected cyclin A-dependent activity appeared 12 hours after serum stimulation, and reached a peak at 18 hours in *brm*^{+/+} cells (Figure 3D). Importantly, this corresponded exactly with the emergence of cyclin A (Figure 2), as well as with the end of G1 phase and the transit into S phase (Figure 1) of these cells. In contrast, Brm-deficient cells showed detectable activity in absence of serum, which increased upon serum addition, and peaked 18 hours after serum stimulation, similar to wild-type cells (Figure 3D). Interestingly, despite the constitutive presence of cyclin A in *brm*^{-/-} cells, its associated kinase activity remained noticeably repressed in the absence of serum and in the early phase of the cell cycle. As performed for cyclin E, we thus identified proteins associated with cyclin A (Figure 3E). We were surprised to immunoprecipitate trace amounts of cyclin A in quiescent *brm*^{+/+} cells (Figure 3E, CycA panel). It was noteworthy that this cyclin A was associated with *cdc2* (Figure 3E, Cdc2 panel), which controls the G2/M phase transit combined to, either cyclin A, or cyclin B. Moreover, *cdc2* was present in its hypophosphorylated inactive form (36) (Figure 3E, Cdc2 panel), and tightly bound to p27 and to p21 (Figure 3E, p27 and p21 panels). Taken together, these results suggested that the cyclin A complexes corresponded to those present in cells arrested in G2 phase after serum starvation (Figure 1). Interestingly, we also found cyclin A associated with *cdc2* 18 hours after serum stimulation but in this case with the phosphorylated active form of *cdc2* (Figure 3E, Cdc2 panel, lane 18 hr). In addition to its association with *cdc2*, cyclin A associated with *cdk2* like cyclin E, and importantly, this interaction occurred when cyclin A accumulated to high levels 12 to 18 hours after serum stimulation in *brm*^{+/+} cells (Figure 3E, Cdk2 panel). It is noteworthy that *cdc2* presented the same profile of association with cyclin A throughout the cell cycle, irrespective of the genotype of the cells (Figure 3E, Cdc2 panel). Since cyclin A associated with the inactive form of *cdc2* in serum starved *brm*^{-/-} cells, the remaining kinase activity observed was probably due to its association with *cdk2* (Figure 3E, Cdc2 panel). Importantly, we found *cdk2* associated with cyclin A in each states of the cell cycle of *brm*^{-/-} cells, suggesting that *cdk2* was not rate-limiting in these cells (Figure 3E, CycA and Cdk2 panels). Thus it seemed that, in Brm-deficient cells, overexpressed cyclin A was essentially associated with *cdk2* in serum starved cells, and 6 to 12 hours after serum stimulation (Figure 3E, Cdk2 panel). To make up for this interaction, we found p27 associated with cyclin A in serum starved *brm*^{-/-} cells, which could explain, like for cyclin E, the low level of cyclin A-dependent kinase activity observed (Figure 3E, p27 panel). In addition, 6 hours after serum stimulation, we observed the presence of p21, rather than p27, in cyclin A-*cdk2* complexes

(Figure 3E, p21 panel). This latter interaction might explain the slightly lower cyclin A-dependent kinase activity observed 6 hours after serum addition, compared to later times, despite the same level of cyclin A-cdk2 complexes. Finally, the cyclin A-associated kinase activity observed after 12 hours of serum addition reflected the amounts of cyclin A in the cells, and clearly showed the importance of cyclin A regulation. Together these data indicate that p27, and to a lesser extent p21, plays an important role in regulating cell cycle in Brm-deficient cells by reducing cyclin E- and cyclin A-dependent, kinase activities, thus preventing premature cell cycle entry.

Brm deletion shortens S phase and delays Mitosis

Though it has been reported that cells lacking Brm grow faster under tissue culture conditions (9), we did not detect faster re-entry into cell cycle. This apparent contradiction prompted us to determine whether *brm*^{-/-} cells reached mitosis earlier than their wild-type counterparts, after release from serum starvation. To address this question, we added serum to quiescent cells and subsequently measured the percentage of cells undergoing mitosis between 18 hours and 24 hours after serum stimulation (see Experimental Procedures). As expected, *brm*^{-/-} cells underwent mitosis one hour earlier than *brm*^{+/+} (Figure 4A), confirming previous studies suggesting that *brm*^{-/-} cells had a quicker cell cycle. These data also raised the intriguing question of which phase of the cell cycle is affected by the lack of Brm. To answer this question, we used drugs that specifically block cell cycle, to analyze the fate of unblocked cells. We first used aphidicolin, which inhibits entry and transit into S phase, to study the evolution of the G1 cell population (see Experimental Procedures and Figure 4B). Since cells were no longer able to enter S phase, we assumed that the increase of G1 cells was a direct consequence of cells escaping from mitosis. When the percentage of such G1 cells was plotted versus time following the aphidicolin block, the slope of the straight line obtained, represented the rate of mitosis escape (Figure 4C). Surprisingly, the *brm*^{-/-} cells showed a smaller slope than the wild-type cells, suggesting that *brm*^{-/-} cells harbored a delayed mitosis. While highlighting new functions for Brm, these data also demonstrated that the general cell cycle acceleration observed in *brm*^{-/-} cells was not due to a shortening of the G2/M phase. These puzzling results prompted us to measure the speed of transit through S phase. We used the ICRF drug, which blocks cells in G2/M, to determine the fate of cells that had incorporated BrdU and processed through their S phase (Figure 4D). Interestingly, Brm-deficient cells left S phase faster than *brm*^{+/+} cells. These data suggested that *brm*^{-/-} cells had a quicker S phase than their wild-type counterpart. All together these results demonstrate

that the lack of Brm leads to accelerated cell division, likely due to an increase of the speed at which cells transit through S phase.

Brm deficient-cells have an increased size in G0/G1

Despite deregulated cyclin expression, *brm*^{-/-} cells do not demonstrate a complete loss of cell cycle control. Interestingly, our results suggest that induction of p27 may compensate for these defects. However, cell cycle is also characterized by cell growth that is not directly dependent on cyclins. This led us to investigate the size of wild type and Brm-deficient cells according to their cell cycle state. To this aim we used flow cytometry to measure the forward scatter (FSC) and the side scatter (SSC) profiles of these cells, which are related to the size and to the complexity or granularity of the cells, respectively. We arrested cells by serum starvation, and then compared the size and the complexity of both type of cells present in the same compartment at different times following serum stimulation. We first compared cells arrested by low serum conditions and present in the G0/G1 window (Figure 1A). Surprisingly, *brm*^{-/-} cells showed a significant increase in size compared to their wild-type counterparts (Figure 5A, FSC 0hr panel). Brm-deficient cells also clearly revealed a greater complexity than *brm*^{+/+} cells (Figure 5A, SSC 0hr panel). Interestingly, 6 hours after serum addition, both cell types present in the G0/G1 window harbored the same FSC values, and thus the same size (Figure 5A, FSC 6hr panel), while *brm*^{-/-} cells kept a higher complexity at this state, as judged by the SSC curves (Figure 5A, SSC 6hr panel). Then, the difference in size between the two sets of cells vanished after 6 hours of serum stimulation (Figure 5A, FSC 12hr panels). Moreover, this match was definitely conserved as both type of cells progressed through the cell cycle (Figure 5A 18hr panels). It was noteworthy that the same phenomenon was observed with respect to the complexity of the cells, except that *brm*^{+/+} cells reached the complexity of *brm*^{-/-} cells later in the cell cycle, 18 hours after serum stimulation during their transit through S phase (Figure 5A SSC panels). These results suggested that, as wild-type cells re-entered the cell cycle after release from serum starvation, they grew progressively. In contrast, Brm-deficient arrested cells seemed to have already reached the size and the complexity they would have reached further in the cell cycle. Since the deletion of Brm led to the premature expression of various cyclins in low serum arrested cells, it was tempting to assume that the larger size of these cells deprived of serum was due to the presence of numerous proteins normally repressed in the absence of serum. Accordingly, it was interesting to look at the presence of factors that specifically affect cell size and that are absent in low serum conditions. This prompted us to look at the proto-oncogene c-Myc, a

major factor affecting growth and cell size, and more importantly, responding to serum conditions. As expected in wild-type cells, c-Myc was absent under low serum culture conditions and appeared upon serum addition (Figure 5B). In contrast, Brm-deficient cells expressed c-Myc in the absence of serum and did not show induction of expression upon serum addition (Figure 5B). Taken together, these data clearly indicate that the lack of Brm also results in a deregulated expression of c-Myc. We assume that the presence of c-Myc, in *brm*^{-/-} cells, contributes to the increase in cell size and complexity, especially when cells are starved of serum.

Brm deletion results in genomic instability

We have demonstrated that the lack of Brm differentially affects the phases of the cell cycle. We established that the DNA synthesis phase is accelerated and G2 phase and mitosis are delayed. Interestingly, den Elzen and Pines have shown that overexpression of cyclin A, at 1.5 fold the endogenous level, delays chromosome alignment and anaphase onset and thus mitosis (37). In addition, the lack of cyclin A degradation caused cells to arrest between prophase and metaphase with chromosome alignments defects. Therefore, it was tempting to assume that the G2/M delay observed in *brm*^{-/-} cells was due to a slight excess of cyclin A. To confirm this hypothesis we followed cell cycle division using the core histone H2B fused to GFP (38). We were first surprised to see micronuclei as well as nucleus budding or multinucleation in Brm deficient cells (Figure 6). We determined, in our experiments, that approximately 26% of *brm*^{-/-} cells presented nuclear abnormalities whereas only 1% of wild-type cells exhibited nuclear atypia (n=200 for each type of cells, Figure 6). It was noteworthy that the fraction of cells with such aberrant nuclei did not seem to vary with generational age of the cells (data not shown). In addition, *brm*^{-/-} cells did not show an increase in apoptosis (data not shown), indicating that the generation of micronuclei was not likely to be fatal in cellular replication. To elucidate the basis of these cellular abnormalities, we used time-lapse video-microscopy to visualize chromosomes in living cells.

Although Brm deficient cells presented a G2/M phase delay as judged by the FACS data (Figure 4C), the time-lapse experiments did not allow us to detect any significant differences between mitosis rate of *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} cells (data not shown). This could indicate that the differences between the two types of cells occurred during G2 rather than during mitosis. However, it was also possible that the difference of speed was not significant enough to be detected by the time-lapse technique. Nonetheless, 11 of the 23 mitotic events analyzed exhibited abnormalities principally during anaphase. After the separation of chromatids, we

were able in these cells to detect the presence of condensed DNA outside of both pools of chromosomes (Figure 7F and movies). Interestingly, the video-microscopy experiment suggested that this extra-DNA was likely to be incorporated in one cell and therefore constituted either micronuclei or nuclear lobulation (Figure 7H-I and movies). Since these micronuclei appeared in cells that had no detectable micronuclei before mitosis (Figure 7A), we assumed that this extra-DNA was a consequence of some defects in the disjunction of sister chromosomes. This hypothesis is strengthened by the observation of thin fluorescence signal between the segregating sister chromosomes (Movie 3). Interestingly this phenomenon is reminiscent of the phenotype observed in cells that overexpress cyclin A or have a defect in cyclin A degradation (39).

Taken together these data suggest that the lack of Brm generates genomic instability as judged by the presence of micronuclei and lobulated nuclei. This instability is likely to be the consequence of disjunction defects during anaphase, which can be caused by the deregulation of cyclin A expression. However, we cannot exclude that the absence of Brm affects either the expression of mitosis regulators or mitosis directly. It is therefore essential to clearly define the set of genes under the control of Brm.

Discussion

Our study reveals that Brm functions as a cell growth regulator in quiescence and that it is important for proper repression of cell cycle. Brm-deficient cells are still able to respond to serum starvation by arresting their cell cycle but exhibit a surprising expression of cyclin E and cyclin A. However, cyclin E- and cyclin A-dependent kinase activities are dramatically downregulated by cdk inhibitors p27, and to a lesser extent by p21. Interestingly, early presence of cyclin E and A does not shorten the G0/G1 phase but rather results in accelerated S phase transit and delayed mitosis. Beyond cell cycle effects, Brm deletion also leads to oversized quiescent cells and contributes to genomic instability.

Brm and cell cycle

Previous studies have demonstrated the role of the SWI/SNF complex in regulating cell cycle through its interaction with the pRb family of proteins. However it is not clear how Brm-containing and Brg1-containing SWI/SNF complexes discriminate between their specific targets. We show here that the lack of Brm leads to the relief of repression of several E2F target genes in the absence of serum. Beyond cyclin A, for which we recently demonstrated that the repression of the gene requires the direct recruitment of Brm (34), cyclin E and mitogenic activator c-Myc are also up regulated in the absence of serum. In such conditions we were able to detect Brm on the *cyclin E* promoter as well as on the *c-myc* promoter P2 (data not shown). Importantly, we cannot absolutely exclude that the presence cyclin E and c-Myc in the absence of serum was due to the alteration of the tightly regulated degradation process of these two proteins. However, we do not see an accumulation of both proteins upon serum induction, suggesting that regulatory loops are fully functional. Nevertheless, in order to understand the possible function of Brm on *cyclin E* and *c-myc* gene regulation, the chromatin structure of these two promoters should be investigated. Concerning *cyclin E*, it has been shown that its promoter is occupied by the Brm-counterpart Brg1 when cells stop cycling under exogenous p16 synthesis (29). Interestingly, *cyclin A* gene behaves the opposite way, since endogenous Brg1 is found on its promoter in place of Brm, in cycling cells (28, 29). These intriguing observations suggest that regulation of E2F target genes, including *cyclin E* and A, requires either Brm-containing or Brg1-containing SWI/SNF complexes, depending on the cell cycle pathway activated. In human fibroblasts arrested by serum starvation, chromatin immunoprecipitation experiments have revealed that E2F4 and p130 are present at all promoters under scrutiny, including *cyclin A* (40, 41). It is noteworthy that the

E2F4/p130 complex is mainly found in quiescent cells (42). This suggests that E2F4/p130 repression occurs mainly through Brm-containing SWI/SNF complexes. In contrast, upon p16 induction and cell cycle arrest, pRb appears on *cyclin E* and *cyclin A* promoters in addition to p130 and Brm (29). Interestingly, Brm and Brg1 interact in vitro with pRb, p107 and p130 (17). Further investigation is necessary to confirm that these differences are due to the conditions of cell cycle exit and not to cell type or to technical procedures.

In our experiments, the lack of Brm results in overexpression of p130 in quiescent cells as well as in cells re-entering the cell cycle. Since p130 overexpression leads to cell cycle arrest (43), this reveals first that *brm*^{-/-} cells are less sensitive to p130 overexpression and may indicate that p130 mediated cell cycle gene repression no longer occurs in these cells. Moreover, overexpression of Brm leads to similar cell cycle arrest as observed with overexpression of p130 (18). Thus, it would be interesting to determine whether tumors cells lacking Brm or other components of the SWI/SNF complex are still able to respond to cell cycle arrest induced by p130. Secondly, as a general feature, Brm lacking cells sustain higher expression levels of all three members of the pRb family at least in the absence of serum, suggesting a role for Brm in repressing these genes. Accordingly, the presence of Brm on their promoters, or at least the existence of a regulatory loop between pRb family members and Brm, should be investigated. It is noteworthy that the p130 promoter carries a repressor sequence similar to the *cyclin A* CCRE-CHR repressor sequence (44).

Beyond the relief of repression observed on E2F target genes, we also noted a downregulation of cyclin D1, spread from quiescence to cell cycle re-entry. Cyclin D1 as a SWI/SNF target is not surprising since chromatin immunoprecipitation experiments have revealed the occupancy of the cyclin D1 promoter by INI1/hSNF5, a core component of SWI/SNF complexes (27). However, previous studies have shown that the SWI/SNF complex may act as a repressor of *cyclin D1*, since exogenous expression of either INI1/hSNF5 or Brm results in the downregulation of the gene (15, 19, 27, 45). Interestingly, we demonstrate here that the lack of Brm also leads to a downregulation of cyclin D1. In order to elucidate this apparent contradiction about the function of Brm on cyclin D1, it is now important to carefully examine the stability of the cyclin D1 protein in *brm*^{-/-} cells, as well as the effect of overexpressing Brm in wild-type cells.

Although we observed an early phosphorylation of pRb likely to be carried out by cyclin D1 associated kinases, despite low levels of cyclin D1, it is noteworthy that the main form of pRb remains hypophosphorylated until cells enter S phase. Thus, we cannot exclude that this particular pattern is due to the presence of a small population of cells that are still cycling

despite the lack of serum. Interestingly, approximately 8% of *brm*^{-/-} cells incorporate BrdU in the absence of serum compared to only 4% of wild-type cells. Further investigation is necessary to determine the distribution of pRb phosphorylated on serine 780 within the quiescent population of *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} cells. Nevertheless, *brm*^{-/-} cells do not re-enter cell cycle faster than wild-type cells. This emphasizes two points, firstly cyclin D1-associated kinase activity is not sufficient in cells lacking *brm* to force cells to enter cell cycle. Secondly, serum stimulation does not reinforce cyclin D1-associated kinase activity, since cells lacking Brm do not re-enter the cell cycle faster than wild-type cells. To understand this phenomenon, it is noteworthy that p27 is normally expressed and regulated in serum starved *brm*^{-/-} cells. This may indicate that serum starvation leads to cell cycle arrest through at least two distinct pathways, one involving E2F factors, E2F target genes and Brm, and the other independent of Brm and involving regulation of p27.

We demonstrate here that p27, and to a lesser extent p21, inhibit cyclin E- and cyclin A-dependent kinase activities at an early stage of cell cycle re-entry. Thus, cyclin E- and cyclin A-associated kinase activities are comparable in both *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} cells, although the latter exhibit an early expression of cyclin E and cyclin A. Therefore, in contrast to cells overexpressing cyclin E or cyclin A, Brm-deficient cells do not exhibit a shorter G1 phase (46, 47). However, Brm-deficient cells have a faster transit into S phase. It is noteworthy that the absence of Brm, which results in premature expression of G1 and S phase cyclins, ultimately results in aberrant S and G2/M phases rather than G1 phase and cell cycle re-entry. This raises the intriguing possibility that remains to be investigated of how Brm, as chromatin remodeling factor, may influence the replication process.

SWI/SNF and cancer

We show here that Brm chromatin-remodeling factor is not necessary for cells to stop efficiently their cell cycle in the absence of serum. However, the lack of Brm leads to the early presence of cyclins and other cell cycle regulators, this indicates that Brm-deficient cells do not enter a canonical quiescent state under low serum conditions.

The first consequence is that a slightly higher percentage of cell resist to this strong cell cycle arrest. However, the lack of serum does not correspond to physiological conditions, thus it would be exciting to analyze the response of other cell cycle arrest effectors in Brm-deficient cells. It would be essential for instance to determine if *brm*^{-/-} embryonic fibroblasts are able to enter cellular senescence under cell culture conditions.

Since Brm-deficient mice are viable and do not develop tumors, we could assume that *brm* deletion is not a cause of cancer formation. However it may constitute a good advantage for cancer cells that divide faster. It is noteworthy that *brm*^{-/-} cells have deregulated expression of p107 and p130, and thus may be partly protected from tumor formation through a Brm-independent mechanism.

In addition, *brm*^{-/-} cells also show an intriguing genomic instability. We could assume that Brm plays an indirect role in mitosis by leading to a sustained expressing of cyclin A. The presence of non-degradable cyclin A, or overexpression of cyclin A lead, in drosophila to abnormal mitosis since cyclin A complete degradation is necessary to insure chromosome separation (39). Nevertheless, we cannot exclude that Brm is directly involved in the expression of members of the chromatin segregation machinery. These questions remain to be investigated. Furthermore, in order to understand why this genomic instability does not lead to tumor formation in mice lacking Brm, it would be interesting to determine if this instability is restricted to specific region of the genome. Finally, it has been reported that mice are less prone to develop epithelium tumors unless p53 and telomerase have been inactivated (48). The deletion of Brm has to be investigated in a p53^{-/-} and telomerase deficient mice background in order to understand the alteration of Brm observed in numerous human cancer cell lines.

Experimental Procedures

Cell culture

Cells were grown in DMEM containing 10% heat-inactivated calf serum or left 48 hours in DMEM 0.2% serum to become quiescent. Aphidicolin was used at 2.5 μM and ICRF-193 at 2 $\mu\text{g/ml}$.

Immunoblots

Cells were incubated for 30 min on ice in lysis buffer (100mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 1% NP40, 2.5mM NaPPi, 5mM NaF, 2.5mM β -glycerophosphate, 1mM DTT supplemented with protease inhibitors Boehringer) and centrifuged at 15000g 15 min. Supernatant protein concentrations were determined using the Bio-Rad Bradford reagent. For western blot analysis, 50 μg of cell extract were separated by SDS-PAGE (7% or 12%) and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking and incubating with antibodies, blots were finally subjected to enhanced chemiluminescence substrate (Lumi-Light, Roche or SuperSignal West Femto, Pierce) following the supplier's protocol. The following primary antibodies were used: anti-cyclin A (C 4710, Sigma); anti-cyclin B (sc-245, Santa Cruz); anti-cyclin E (C4976, Sigma) \square anti-cyclin D1 (556470, BD Biosciences); anti-cdc2 (C3085, Sigma); anti-cdk2 (sc-163, Santa Cruz); anti-PSTAIR (P-7962, Sigma); anti-p21 (sc-397, Santa Cruz); anti-p27 (sc-528, Santa Cruz); anti-pRb (554136, BD Biosciences); anti-p107 (sc-318, Santa Cruz); anti-p130 (sc-317, Santa Cruz), anti-pRb phospho-Ser 780 (9307, Cell Signaling), anti-c-Myc (9E10) and anti-GAPDH (49). As secondary antibodies, we used anti-mouse IgG peroxidase conjugated (A9917, Sigma) and anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (NA934, Amersham Biosciences).

In vitro kinase assays

Cell lysate (100 μg) was incubated for 2 h at 4°C with 5 μl cyclin E antibody (C4976, Sigma) or 10 μl cyclin A antibody (sc-751, Santa Cruz) and then incubated for 1 h at 4°C with 30 μl protein A-Sepharose beads. The immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and twice with kinase buffer (25mM HEPES pH 7.5, 15mM MgCl_2). The final pellet was resuspended in 25 μl of kinase buffer supplemented with 50 μM ATP, 500 μM DTT, 4 μg histone H1, and 2,5 μCi of γ - ^{32}P ATP. After incubation for 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition Laemmli sample buffer and heating 10 min at 37°C. The same

immunoprecipitates were used both for the determination of kinase activity and for immunoblot detection of various components. This was accomplished by a controlled partial transfer of SDS-11% PAGE gels. The resulting membrane was then used for phosphorylated histone H1 quantification with a phosphoimager and immunoblot analysis with indicated antibodies, whereas the gel was stained with coomassie blue and dried. For western blot analysis, when both immunoprecipitating and detecting antibodies were from the same origin, horseradish peroxidase-conjugated Immunopure protein A/G (32490, Pierce) was used.

Immunostaining and flow cytometry

Cells were trypsinized, collected by centrifugation, washed once with PBS and fixed in cold 70% ethanol over night at -20°C , with vortexing for the first minute. After washing with PBS, cells were treated with 2M hydrochloric acid for 20 min, then washed twice in Borax 0.1M and once in PBS, 10% FCS, 0.5% Tween 20, and incubated for 1 hour with anti-BrdU antibody (5 μl , 347580 Becton Dickinson). After two washes cells were incubated for 1 hr at room temperature in the dark with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:100, Jackson ImmunoResearch). All labeled cells were washed twice in PBS, 10% FCS, 0.5% Tween 20 and resuspended in staining solution (PBS, 20 g/ml Dnase-free Rnase, 25 g/ml of propidium iodide). Cells were analyzed by flow cytometry on a Becton Dickinson FACScan with CellQuest software (Becton Dickinson).

Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips, washed twice with PBS, fixed with PBS containing 3.8% formaldehyde for 10 min. After washing with PBS, cells were permeabilized in 0.1% triton 5 min. After washing, cells were incubated for 1h at 37°C with anti-phospho serine 10 histone H3 antibody (Cell Signaling 9704, 1:50 in PBS 3%BSA), then washed in PBS and incubated 1h at 37°C with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:100, Jackson ImmunoResearch). After washing with PBS, coverslips were mounted with 90% glycerol, 10% PBS 10X, 1mg/ml p-phenylenediamine, 100 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Images were acquired on a DMRA microscope using 40X lens. Digital images were recorded with a 12-bit C4795-NR CCD camera (Hamamatsu).

Time-Lapse Imaging

Time-lapse epifluorescence microscopy was performed on a Leica DM IRBE (Leica, Wetzlar, Germany) inverted microscope equipped with an automatic shutter and GFP filter sets, a 40X objective, sample heater (37°C), and a home-made CO₂ incubation chamber. To minimize bleaching and phototoxicity, fluorescence illumination was supplied by a halogen bulb (100 W). Images were captured with a MicroMax 1300 charge-coupled device camera (Princeton Instruments) driven by MetaMorph (version 4.11; Universal Imaging) imaging software, converted to TIF files that were edited with NIH Image and compiled into QuickTime movies. The exposure time was fixed to 500 ms.

Acknowledgements

We are grateful to L. Le Cam for reagent, P. Travo and S. Rossi from "The Montpellier Rio Imaging" for useful technical help, C. Sardet's lab and J-M. Blanchard's lab for helpful discussions, B. Bell and Felix J. Kim for critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from the CNRS and "La Ligue contre le Cancer". MC-Q was funded by a fellowship from "La Ligue contre le Cancer".

References

1. Peterson, C. L. and Workman, J. L. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, *10*: 187-192, 2000.
2. Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*, *96*: 389-392, 1999.
3. Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R. E. Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell*, *94*: 17-27, 1998.
4. Kassabov, S. R., Zhang, B., Persinger, J., and Bartholomew, B. SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell*, *11*: 391-403, 2003.
5. Martens, J. A. and Winston, F. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*, *13*: 136-142, 2003.
6. Klochendler-Yeivin, A., Muchardt, C., and Yaniv, M. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, *12*: 73-79, 2002.
7. Wang, W., Cote, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L., and Crabtree, G. R. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J*, *15*: 5370-5382, 1996.
8. Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G., and Magnuson, T. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, *6*: 1287-1295, 2000.
9. Reyes, J. C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C., and Yaniv, M. Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J*, *17*: 6979-6991, 1998.
10. Decristofaro, M. F., Betz, B. L., Rorie, C. J., Reisman, D. N., Wang, W., and Weissman, B. E. Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol*, *186*: 136-145, 2001.
11. Wong, A. K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., Ghaffari, S., Iliev, D., Penn, B., Woodland, A. M., Smith, R., Salada, G., Carillo, A., Laity, K., Gupte, J., Swedlund, B., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Lees, E. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res*, *60*: 6171-6177, 2000.

12. Reisman, D. N., Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W. K., and Weissman, B. E. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*, *63*: 560-566, 2003.
13. Reisman, D. N., Strobeck, M. W., Betz, B. L., Sciarrotta, J., Funkhouser, W., Jr., Murchardt, C., Yaniv, M., Sherman, L. S., Knudsen, E. S., and Weissman, B. E. Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression. *Oncogene*, *21*: 1196-1207, 2002.
14. Murchardt, C. and Yaniv, M. When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, *20*: 3067-3075, 2001.
15. Betz, B. L., Strobeck, M. W., Reisman, D. N., Knudsen, E. S., and Weissman, B. E. Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. *Oncogene*, *21*: 5193-5203, 2002.
16. Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., and Goff, S. P. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, *79*: 119-130, 1994.
17. Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, S., and Goff, S. P. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol*, *16*: 1576-1583, 1996.
18. Bourachot, B., Yaniv, M., and Murchardt, C. The activity of mammalian brm/SNF2alpha is dependent on a high-mobility-group protein I/Y-like DNA binding domain. *Mol Cell Biol*, *19*: 3931-3939, 1999.
19. Bourachot, B., Yaniv, M., and Murchardt, C. Growth inhibition by the mammalian SWI-SNF subunit Brm is regulated by acetylation. *Embo J*, *22*: 6505-6515, 2003.
20. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, *274*: 1672-1677, 1996.
21. Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H., and Sicinski, P. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, *114*: 431-443, 2003.
22. Cam, H. and Dynlacht, B. D. Emerging roles for E2F: Beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, *3*: 311-316, 2003.
23. Mulligan, G. and Jacks, T. The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet*, *14*: 223-229, 1998.

24. Strobeck, M. W., Knudsen, K. E., Fribourg, A. F., DeCristofaro, M. F., Weissman, B. E., Imbalzano, A. N., and Knudsen, E. S. BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*: 7748-7753, 2000.
25. Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M., and Kouzarides, T. RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*: 11268-11273, 1997.
26. Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*, *101*: 79-89, 2000.
27. Zhang, Z. K., Davies, K. P., Allen, J., Zhu, L., Pestell, R. G., Zagzag, D., and Kalpana, G. V. Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol Cell Biol*, *22*: 5975-5988, 2002.
28. Kadam, S. and Emerson, B. M. Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell*, *11*: 377-389, 2003.
29. Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M., and Dean, D. C. Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell*, *8*: 557-569, 2001.
30. Shanahan, F., Seghezzi, W., Parry, D., Mahony, D., and Lees, E. Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol*, *19*: 1460-1469, 1999.
31. Wang, S., Zhang, B., and Faller, D. V. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J*, *21*: 3019-3028, 2002.
32. Lee, D., Kim, J. W., Seo, T., Hwang, S. G., Choi, E. J., and Choe, J. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem*, *277*: 22330-22337, 2002.
33. Murphy, D. J., Hardy, S., and Engel, D. A. Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol Cell Biol*, *19*: 2724-2733, 1999.
34. Coisy, M., Roure, V., Ribot, M., Philips, A., Muchardt, C., Blanchard, J. M., and Dantanel, J. C. Cyclin A Repression in Quiescent Cells Is Associated with Chromatin Remodeling of Its Promoter and Requires Brahma/SNF2alpha. *Mol Cell*, *15*: 43-56, 2004.
35. Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H. K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S., and Taya, Y. The consensus motif

- for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *Embo J*, *15*: 7060-7069, 1996.
36. Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. I. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, *257*: 1958-1961, 1992.
 37. den Elzen, N. and Pines, J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol*, *153*: 121-136, 2001.
 38. Rajagopalan, H., Jallepalli, P. V., Rago, C., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, *428*: 77-81, 2004.
 39. Tin Su, T. Cell cycle: how, when and why cells get rid of cyclin A. *Curr Biol*, *11*: R467-469, 2001.
 40. Takahashi, Y., Rayman, J. B., and Dynlacht, B. D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev*, *14*: 804-816, 2000.
 41. Rayman, J. B., Takahashi, Y., Indjeian, V. B., Dannenberg, J. H., Catchpole, S., Watson, R. J., te Riele, H., and Dynlacht, B. D. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev*, *16*: 933-947, 2002.
 42. Attwooll, C., Denchi, E. L., and Helin, K. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *Embo J*, *23*: 4709-4716, 2004.
 43. Claudio, P. P., Howard, C. M., Baldi, A., De Luca, A., Fu, Y., Condorelli, G., Sun, Y., Colburn, N., Calabretta, B., and Giordano, A. p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res*, *54*: 5556-5560, 1994.
 44. Fajas, L., Le Cam, L., Polanowska, J., Fabbrizio, E., Servant, N., Philips, A., Carnac, G., and Sardet, C. A CDE/CHR-like element mediates repression of transcription of the mouse RB2 (p130) gene. *FEBS Lett*, *471*: 29-33, 2000.
 45. Versteeg, I., Medjkane, S., Rouillard, D., and Delattre, O. A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene*, *21*: 6403-6412, 2002.
 46. Ekholm-Reed, S., Mendez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., and Reed, S. I. Dereglulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol*, *165*: 789-800, 2004.

47. Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S. I. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol*, *15*: 4347-4352, 1995.
48. Artandi, S. E., Chang, S., Lee, S. L., Alson, S., Gottlieb, G. J., Chin, L., and DePinho, R. A. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, *406*: 641-645, 2000.
49. Philips, A., Huet, X., Plet, A., Le Cam, L., Vie, A., and Blanchard, J. M. The retinoblastoma protein is essential for cyclin A repression in quiescent cells. *Oncogene*, *16*: 1373-1381, 1998.

Figure legends

Figure 1: Loss of Brm does not dramatically alter quiescent state and cell cycle re-entry.

A DNA content and BrdU incorporation analysis by flow cytometry of *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} 3T3 cells. Time indicates hours after release from serum starvation (0, 6, 12, and 18hr). Lower tables indicate percentages of cells in each phase of the cell cycle or asynchronous cells in exponential growth (Log). B Percentage of BrdU positive cells after serum addition.

Figure 2: Brm deficient cells have abnormal expression of cell cycle regulators. Western blot analysis of expressions of cell cycle regulators. The time indicates hours after serum addition.

Figure 3: Cyclin-dependent kinase activities in Brm deficient cells. A Cyclin D1-dependent kinase activity determined by specific phosphorylation of serine 780 of the retinoblastoma protein. Time indicates hours after serum addition (0, 6, 12, and 18hr). B Cyclin E-dependent kinase activity settled by in vitro kinase assay. C Western blot analysis of Cyclin E-associated factors. D Cyclin A-dependent kinase activity settled by in vitro kinase assay. E Western blot analysis of Cyclin A-associated factors.

Figure 4: Cell cycle transit is altered in Brm deficient cells. A Mitotic Index. The percentage of mitotic cells corresponds to nuclei showing phospho-serine 10 histone H3 staining. Each value corresponds to the mean of four independent experiments of two hundred nuclei each. The error bars represent the SD values. Time indicates hours after release from serum starvation. B Diagram representing the experimental procedure. C Mitosis escape determined by the percentage of cells in G1 after aphidicolin block. The determination coefficients are 0.9731 and 0.9736 for *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} linear regressions respectively. D S phase transit evaluated by the percentage of cells in S phase following ICRF-193 block. The determination coefficients are 0.9707 and 0.9743 for *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} linear regressions respectively.

Figure 5: Brm deletion confers increase of G0/G1 cells size and c-Myc relief of repression in quiescence. A FACS analysis of Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) on synchronized *brm*^{+/+} and *brm*^{-/-} cells. Time indicates hours after serum addition. B

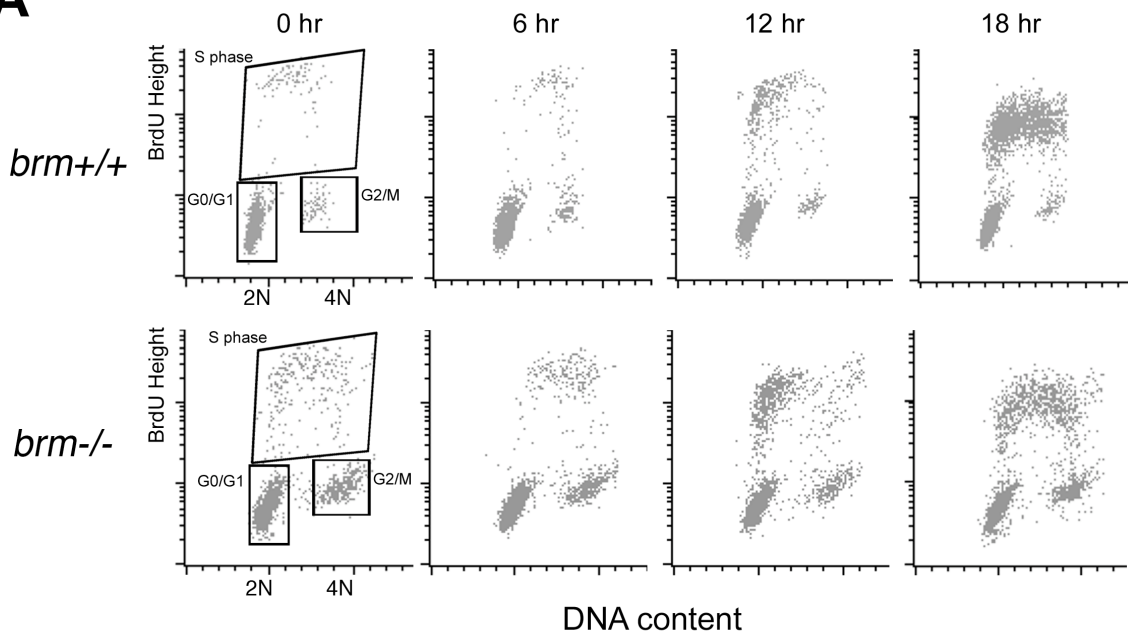
Western blot analysis of c-Myc expression. The time indicates hours after release from serum starvation.

Figure 6: Brm deletion leads to abnormal nuclei. A B C and D nuclei of *brm*^{-/-} cells stably expressing H2B-GFP. Arrows indicate either micronuclei or budding nuclei.

Figure 7: Brm deletion leads to chromosome segregation defect. Time lapse courses of *brm*^{-/-} cells stably expressing H2B-GFP. A Prophase, B Prometaphase (T), C Metaphase (T+4'), D Metaphase (T+8'), E Anaphase (T+12'), F Anaphase (T+16), G Telophase (T+24'), H Telophase (T+34'), I Interphase.

Figure 1

A



		<i>brm</i> ^{+/+}				
		Log	Time			
		0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	
% of cells in	G0/G1	47.50	90.99	91.31	77.34	44.23
	S	13.51	4.12	2.16	16.65	31.12
	G2/M	31.16	4.12	5.48	4.74	17.55

		<i>brm</i> ^{-/-}				
		Log	Time			
		0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	
% of cells in	G0/G1	39.53	75.45	75.33	60.59	44.38
	S	44.67	8.35	5.61	24.37	22.87
	G2/M	10.30	15.10	17.87	13.56	27.84

B

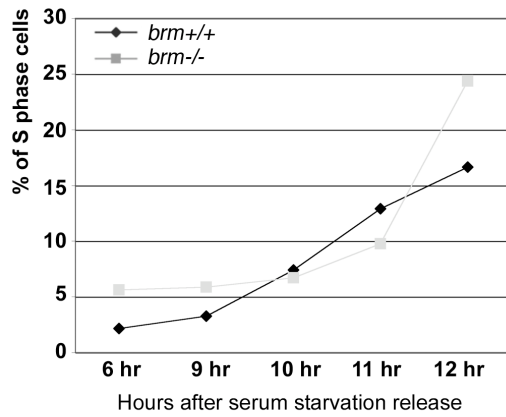


Figure 3

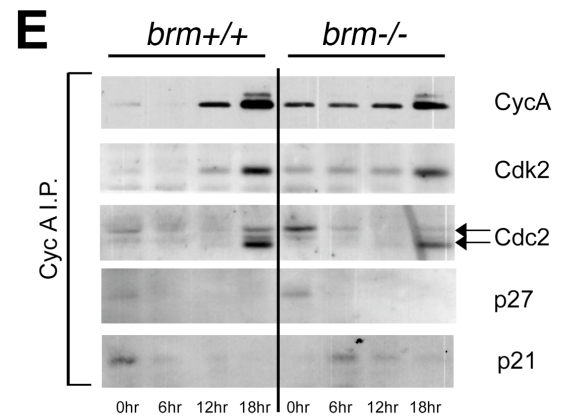
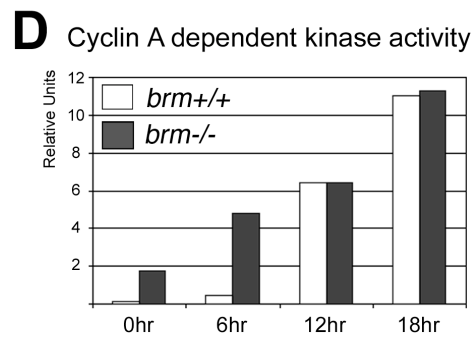
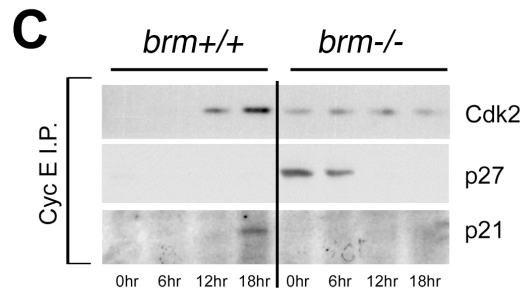
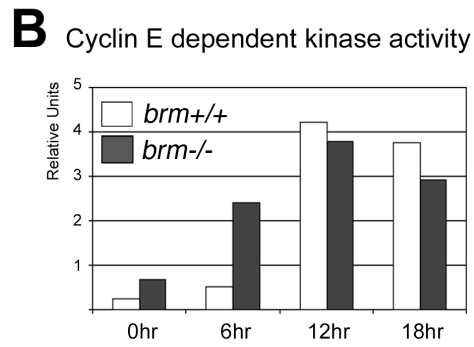
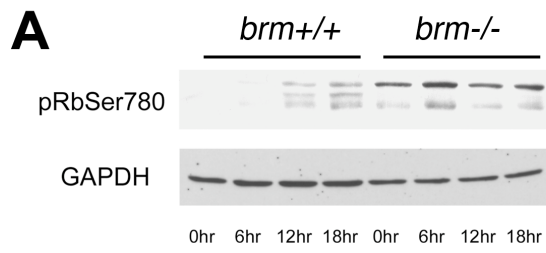
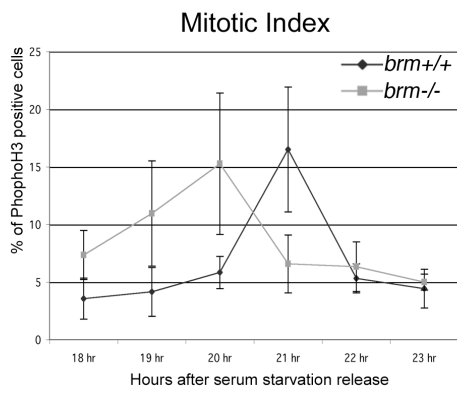
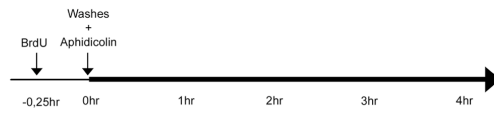


Figure 4

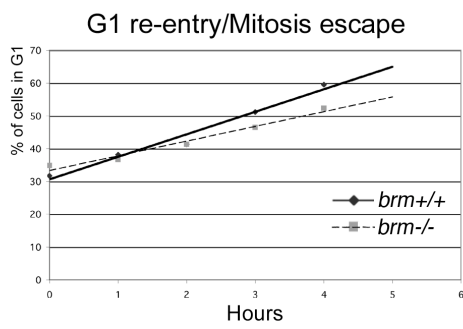
A



B



C



D

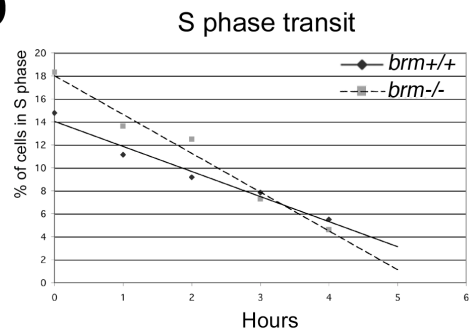


Figure 5

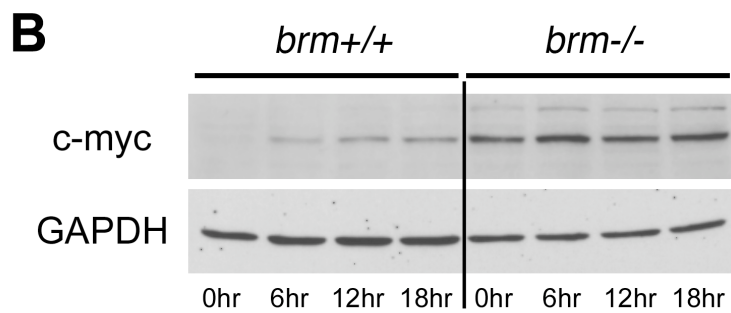
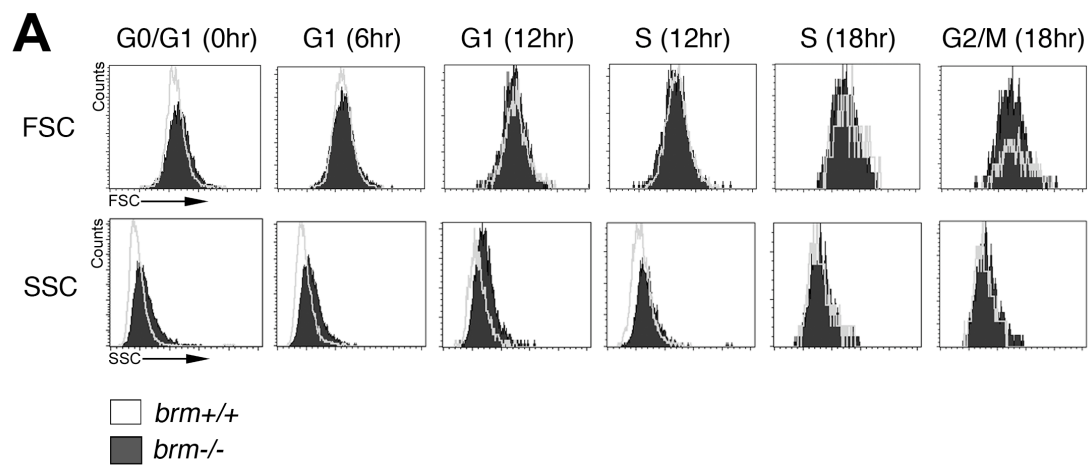


Figure 6

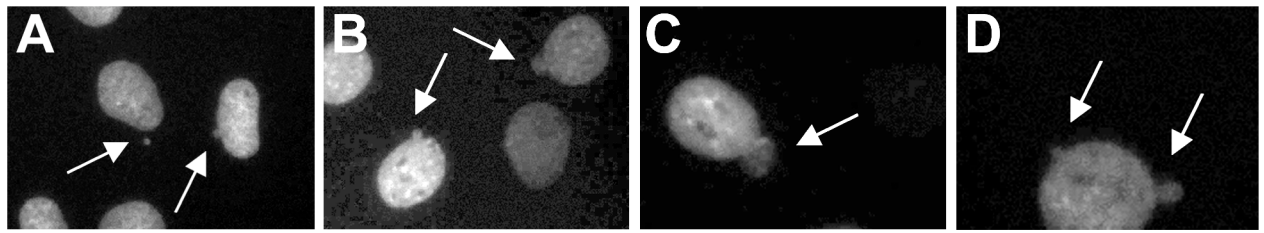
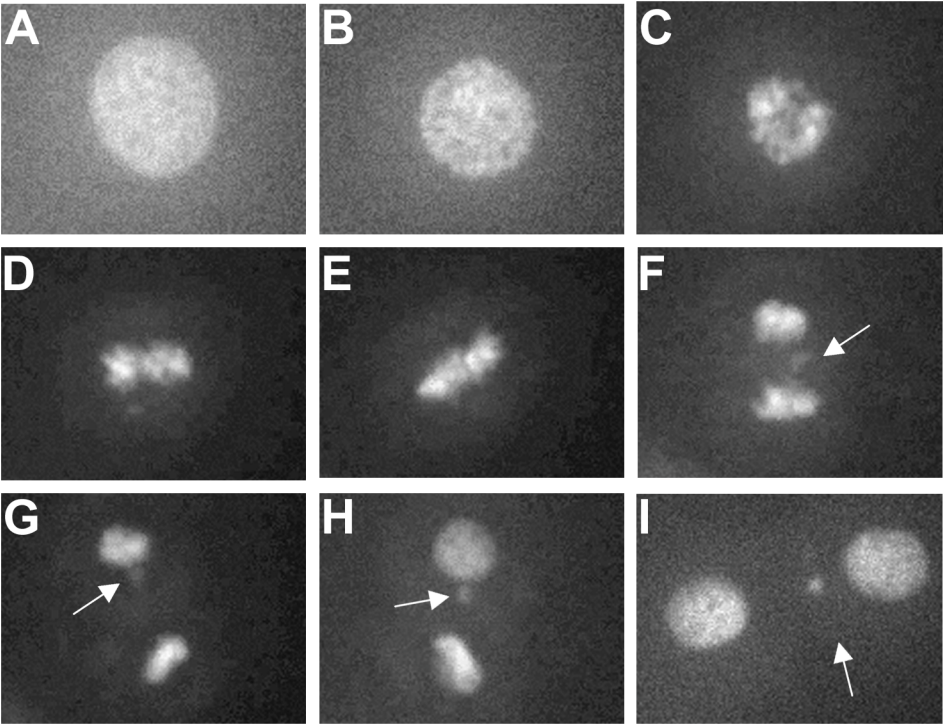


Figure 7



2.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES : C-MYC ET CYCLINE A DEUX MECANISMES DE REPRESSION DIFFERENTS

Nous avons montré que contrairement aux cellules sauvages, dans les cellules *brm* ^{-/-} arrêtées en absence de sérum, les protéines c-Myc et Cycline A sont exprimées. Nous avons également démontré que le gène de la cycline A n'est plus réprimé dans les cellules *brm* ^{-/-} rendues quiescentes. Nous pouvons donc suggérer que comme dans le cas de la cycline A, la dérégulation de l'expression de c-Myc est due à une dérèpression du gène. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cotransfctés les cellules *brm* ^{-/-} avec des quantités croissantes de vecteurs codant pour la protéine Brm ou un mutant de Brm dans le site de liaison à l'ATP (noté Brm-NTP) avec les vecteurs portant le promoteur du gène cycline A (sauvage ou muté sur les sites CCRE et CHR) ou de c-myc en amont d'une cassette d'expression luciférase. Douze heures après transfection, les cellules sont arrêtées 48 heures par privation de sérum.

Nous pouvons remarquer que les activités luciférase sous le contrôle des promoteurs sauvages de c-myc et cycline A diminuent en présence de quantité croissante de Brm (figure 41a et b). Par conséquent, Brm peut restaurer la répression des gènes c-myc et cycline A dans les cellules *brm* ^{-/-} arrêtées par privation de sérum. Par contre, l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur muté de la cycline A n'est pas diminuée en présence de quantité croissante de Brm (figure 41c). Ce résultat est en accord avec les données préalablement obtenues puisque Brm est incapable de se fixer sur le promoteur de la cycline A muté au niveau des sites CCRE/CHR. Cependant, de façon surprenante, le mutant Brm-NTP peut restaurer la répression de c-myc, mais pas celle de la cycline A (figure 41a et b). Ceci suggère que les mécanismes de répression de ces deux gènes sont différents. Bien que la répression de la cycline A et de c-myc fasse intervenir la protéine Brm, seule la répression de la cycline A semble nécessiter l'activité de remodelage de la chromatine de Brm. Pour conclure, on peut envisager que dans le cas de c-myc, Brm permette de recruter d'autres protéines nécessaires à la répression du gène ou bien que d'autres fonctions de Brm soient importantes.

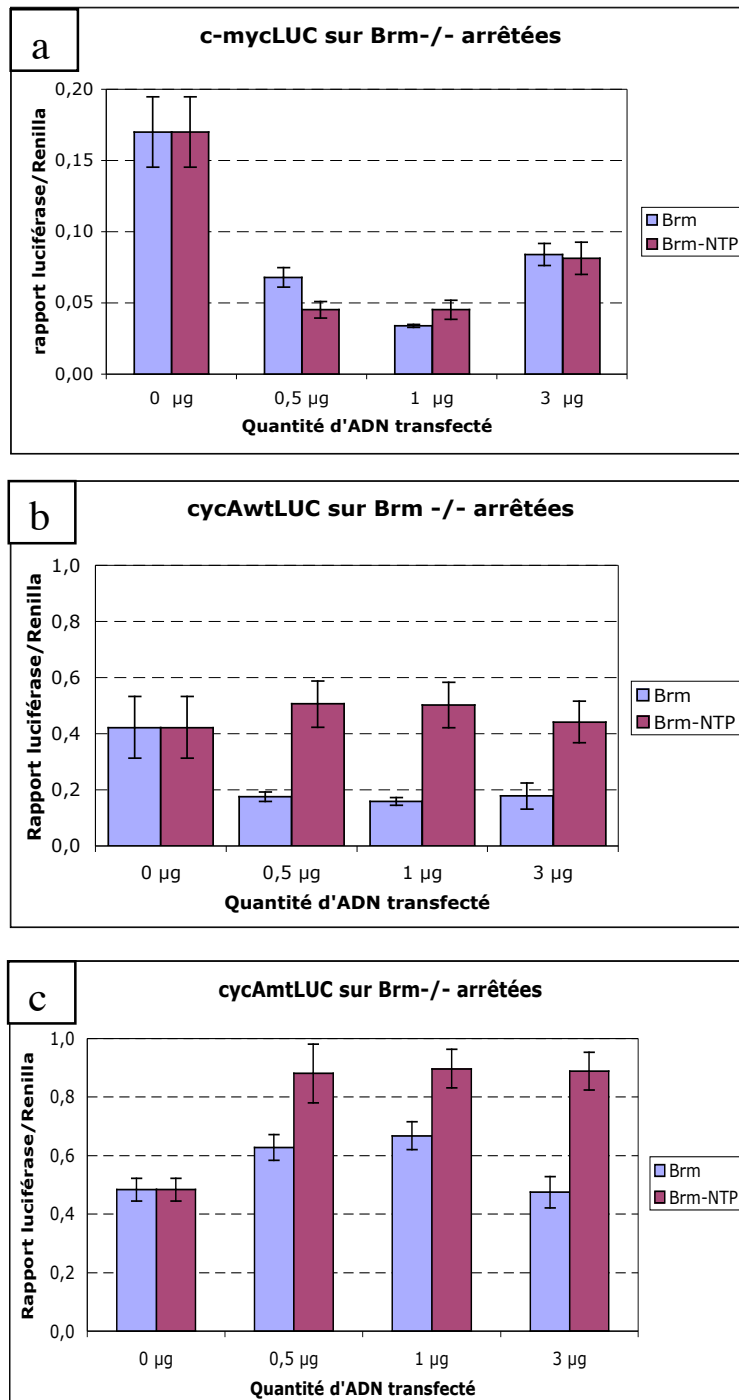


Figure 41: Répression des gènes c-myc et cycline A par Brm
a- La cotransfection de la protéine Brm ou du mutant Brm-NTP restaure la répression de c-myc dans les cellules brm -/- arrêtées par privation de sérum
b- La cotransfection de la protéine Brm et non pas du mutant Brm-NTP restaure la répression de cycline A dans les cellules brm -/- arrêtées par privation de sérum
c- Le promoteur de la cycline A muté sur le CCRE et le CHR n'est plus réprimé par Brm

2.4 PUBLICATION 3 : CYCLE CELLULAIRE ET DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES

2.4.1 Introduction

L'épiderme humain, couche la plus externe de la peau, est un épithélium stratifié, composé principalement de kératinocytes. La couche basale de l'épithélium renferme: (i) les cellules souches qui sont généralement quiescentes mais qui ont la capacité de se diviser un nombre illimité de fois, afin d'assurer le renouvellement constant de la peau, (ii) les cellules TAC qui sont les cellules filles des cellules souches, elles se divisent un nombre limité de fois mais très rapidement. Après trois ou quatre cycle de division, les cellules TAC vont perdre leur capacité à proliférer et vont se différencier terminalement en migrant vers les couches supérieures de la peau (Watt, 1989). Les cellules des couches supérieures sont plus larges et plus spécialisées, elles s'assemblent pour former une couche insoluble et continue, une véritable barrière protectrice entre le corps et l'environnement, l'enveloppe cornée (Fuchs and Byrne, 1994). Les cellules de la couche cornée desquament continuellement de la surface de la peau et par conséquent de nouvelles cellules différenciées doivent être produites tout au long de la vie. Bien que les cellules de la couche basale soient en constante prolifération, l'épiderme normal garde toujours la même épaisseur et la peau reste lisse. L'équilibre prolifération/différenciation est donc précisément contrôlé, de telle sorte qu'il apporte le nombre de cellules nécessaires pour remplacer les kératinocytes qui se décrochent chaque jour de la peau. Ce phénomène est appelé l'homéostasie. Cependant, l'épiderme est continuellement exposé à des facteurs environnementaux mutagènes comme les rayons UV qui peuvent conduire à des altérations génétiques responsables de la perte de l'homéostasie. Dans le développement de cancers, l'équilibre prolifération /différenciation est perturbé et l'homéostasie est perdue.

Le contrôle de la transition prolifération/différenciation reste encore peu connu. Il a été démontré que l'entrée en différenciation des kératinocytes, *in vivo* et *in vitro*, est précédée de la sortie des cellules du cycle cellulaire (Fuchs, 1990). Cependant le mécanisme impliqué reste mal connu. Le modèle le plus utilisé pour étudier la différenciation des kératinocytes *in vitro* est la mise en suspension des cellules, la perte d'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire induisant la différenciation des kératinocytes sous 24h. Les études ont montré que la perte de contact induit l'expression de CKI et un arrêt du cycle cellulaire (Hauser *et al.*,

1997). Les auteurs ont alors suggéré que cet arrêt du cycle provoque l'entrée en différenciation des kératinocytes. Cependant, l'expression constitutive de p27 ou p21 dans les kératinocytes est suffisante pour induire l'arrêt du cycle cellulaire mais non pas la différenciation terminale (Di Cunto *et al.*, 1998; Harvat *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que les kératinocytes peuvent entrer en différenciation dans toutes les phases du cycle (Dazard *et al.*, 2000; Gandarillas *et al.*, 2000). Enfin, c-Myc identifié comme un facteur d'activation du cycle cellulaire, stimule la différenciation épidermique (Arnold and Watt, 2001; Gandarillas and Watt, 1997; Waikel *et al.*, 2001). Pour élucider les mécanismes qui contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation des kératinocytes, j'ai analysé l'expression des différents marqueurs du cycle cellulaire ainsi que l'activité des complexes Cdk/Cycline en fonction de l'état prolifération/différenciation des kératinocytes déterminé par des analyses en cytométrie en flux.

2.4.2 Résultats

Après induction de la différenciation des kératinocytes par mise en suspension, on observe un pic d'expression de p21 qui inhibe majoritairement les complexes Cycline A/Cdk et entraîne un arrêt des kératinocytes en G2/M. La différenciation terminale qui suit cet engagement est caractérisée par l'accumulation de la Cycline E et le maintien d'une activité kinase associée à la Cycline E non négligeable alors que les kératinocytes ont toujours un contenu en ADN de 4N. De plus, l'expression des Cyclines de G2/M, A et B, ainsi que de leurs activités kinases respectives chutent.

D'autre part, j'ai montré que l'expression de c-Myc dans les kératinocytes conduit à une augmentation de l'expression des Cyclines E, A et B ainsi que des activités kinases qui leur sont associées. Par conséquent, c-Myc active dans un premier temps la progression des kératinocytes dans le cycle cellulaire, ce qui contribue à l'augmentation de la population de kératinocytes en prolifération. Cependant, après quelques jours d'activation de c-Myc, on remarque une accumulation de p21 qui marque l'engagement irréversible en différenciation terminale et l'accumulation des kératinocytes en G2/M. De la même façon qu'après la mise en suspension des kératinocytes, on constate une diminution de l'expression et des activités kinases associées aux cyclines de G2/M tandis que l'expression et l'activité kinase associée à la cycline E sont maintenues.

Par ailleurs, j'ai confirmé par immunofluorescence que les kératinocytes différenciés expriment toujours la Cycline E et n'expriment plus les Cyclines de G2/M, A et B. Enfin,

l'inhibition de Cdc2, et non de Cdk2, par des composés chimiques est suffisante pour bloquer les kératinocytes en G2/M et induire la différenciation terminale des kératinocytes.

2.4.3 Conclusion

Nos résultats permettent d'affiner le modèle de différenciation et réconcilient les effets prolifératifs de c-Myc avec la différenciation. Nous montrons que la différenciation s'accompagne d'une augmentation de p21, d'un arrêt du cycle cellulaire et d'une chute des activités kinases mais avec le maintien de l'activité kinase associée à la cycline E. Par conséquent, la différenciation s'effectue dans un état G1, même si les cellules ont un contenu en ADN de 4N. Ce phénomène semble jouer un rôle important dans la voie de différenciation puisqu'un blocage de la mitose par le nocodazole (Gandarillas *et al.*, 2000) ou une inhibition de Cdc2 induit la différenciation des kératinocytes. Il est d'ailleurs probable que la mise en suspension des kératinocytes induit également la différenciation en empêchant les cellules de réaliser la mitose (Ben-Ze'ev and Raz, 1981; Orly and Sato, 1979). Quant au rôle de c-Myc, il semble induire la différenciation en activant d'abord la prolifération des cellules souches qui deviennent des cellules TAC ou en augmentant le nombre de cycle effectué par les cellules TAC. Ces résultats confirment que la différenciation des kératinocytes est un phénomène en deux étapes, prolifération puis différenciation proprement dite.

Keratinocytes differentiate in G1 phase after a mitosis bypass

Marjorie Coisy-Quivy¹, Alberto Gandarillas^{1, 2} and Jean-Marie Blanchard¹

1. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR5535, CNRS 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 3, France.

2. IURC, 75 rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

Background: The epidermis contains two types of proliferative keratinocytes: stem cells, with unlimited self-renewal capacity, and transit amplifying cells (TAC), daughters of stem cells that are destined to withdraw from cell cycle and terminally differentiate after a few rounds of division. Experiments with cultured human keratinocytes and transgenic mice suggest that c-Myc promotes epidermal stem cell differentiation. However, the factors involved in the regulation of this transition remain unclear. To elucidate the events that establish arrest of cell division and keratinocyte differentiation initiation, we analyzed cyclin/cdk protein expression and their corresponding kinase activities during loss of anchorage or c-Myc-induced human primary keratinocyte differentiation.

Results: Engagement of keratinocyte differentiation is marked by a peak of p21 expression, which inhibits G2/M cyclins, primarily the cyclin A associated kinase. In contrast, terminal differentiation is characterized by a decrease in G2/M cyclin expression and activity while cyclin E expression and activity are sustained. Moreover, the inhibition of G2/M cdk resulted in a significant induction of keratinocyte differentiation. c-Myc activation first enhanced cell cycle in small, undifferentiated cells that subsequently led to an increased number of differentiated keratinocytes.

Conclusions: We propose that c-Myc promotes cell cycle activation of stem cells and TAC. Subsequently, TAC stop their cell cycle in G2/M by induction of p21 and engage in differentiation. Differentiated keratinocytes do not sustain G2/M arrest and progress into a G1-like state with 4N DNA content. Down regulation of p21 would lead to a significant increase in the number of polyploid cells.

Introduction

Skin epidermis is a stratified epithelium composed principally of keratinocytes. In order to maintain skin homeostasis and effective response to injury, keratinocyte proliferation and differentiation are tightly regulated [1]. Failures in such regulation cause skin disorders such as psoriasis and skin cancer [1]. Proliferation takes place in the basal layer cells, attached to an underlying basement membrane [2, 3]. Keratinocytes that leave this layer stop dividing and undergo terminal differentiation as they move through the suprabasal layer. Cells in the outmost layers, larger and specialized, assemble to form an insoluble layer, and a protective barrier between the body and the environment, the cornified envelope [4]. Cornified cells are continually shed from the surface of the epidermis, and therefore new differentiated cells must be produced throughout adult life. Replenishment of the differentiation compartment depends on proliferation of a subpopulation of cells in the basal layer, known as stem cells. Stem cells have an unlimited ability of self-renewal, but are thought to proliferate infrequently and to be generally quiescent [5]. Stem cell daughters, named the transit amplifying cells (TAC), undergo several rounds of division and then terminal differentiation [6]. Only a few regulators of this transition are known, including integrins and the proto-oncogene c-Myc. Cell adhesion molecules are clearly involved in the control of proliferation and differentiation by mediating cell-matrix interactions [7]. As for c-Myc, constitutive expression in the suprabasal epidermal layer, leads to proliferation and reduced expression of terminal differentiation markers in transgenic mice [8, 9]. However, activation of c-Myc in keratinocyte stem cells leads to an increase in TAC cell number and terminal differentiation [10-12]. c-Myc is the first factor involved in cell cycle activation that has been shown to be able to induce terminal differentiation. However, relevant c-Myc target genes remain to be identified. Together, these results clearly reveal that cell cycle and differentiation are closely linked into keratinocyte differentiation.

The principal regulators of cell cycle progression are the cyclins, whose expression oscillates considerably throughout the cell cycle. These proteins associate with protein kinases (cyclin dependent kinase: cdk) to drive specific phosphorylation throughout the cell cycle. The complex cyclin D/Cdk4 and cyclin D/Cdk6 control G0/G1 transition and G1 advance whereas cyclin E/Cdk2 and cyclin A/Cdk2, respectively, regulate G1/S transition and S phase progression. G2 phase progression involves cyclin A associated to cdc2 (cdk1) and cyclin B1/cdc2 permits G2/M transition and M phase [13]. Cdk activities are controlled at several levels, including protein expression, phosphorylation and inhibition by small protein (Cdk

inhibitor: CKI). Two of them, p21 (Cip1/Waf1) and p27 (Kip1), have been associated to growth arrest and differentiation in a number of cell systems [14].

Little is known about the control of keratinocyte cell cycle. It has been demonstrated that appearance of the differentiated keratinocyte phenotype, both *in vitro* and *in vivo*, follows withdrawal from the cell cycle [1]. However, the mechanisms involved remain unclear. The principle model of keratinocyte terminal differentiation used to understand mechanisms of growth arrest is the disruption of cell attachment to the substratum [15]. Thus, it has been proposed that loss of attachment correlates to CKI-dependent growth arrest in G0/G1 phase in fibroblasts [16]. Constitutive expression of CKI in keratinocytes is sufficient to induce cell cycle arrest but not terminal differentiation [17, 18]. Moreover, populations of terminal differentiated keratinocytes were found to be in all phases of cell cycle [19, 20]. To elucidate the events that establish the arrest of cell division and keratinocyte differentiation initiation, we analyzed cyclin/cdk protein expressions and their corresponding kinase activities during loss of anchorage or c-Myc-induced human primary keratinocyte differentiation.

Here, we show that keratinocyte differentiation is accomplished without a strong cell cycle arrest signal. In both suspension or c-Myc-induced differentiation, keratinocytes enter differentiation preferentially in G2/M phase. Inhibition of G2/M cyclins is essential to engage differentiation, as revealed cdc2 inhibitors. *In vivo*, p21 inhibits G2/M cyclins at engagement point and thus plays a key role in initiation of keratinocyte differentiation. Finally, terminally differentiated keratinocytes have characteristic G1 cyclin activity and a 4N DNA content, suggesting that they have re-entered cell cycle without completing mitosis. This event may explain cell enlargement observed during this process.

Results

Keratinocyte differentiation occurs in G1 after a mitosis bypass

To assess whether keratinocytes continue their cell cycle during differentiation, we followed DNA synthesis by BrdU labeling at various time points during the differentiation process (figure 1A). Our results showed that a significant proportion of keratinocytes continued to incorporate BrdU (figure 1A) at 6 hours, time of irreversible engagement to differentiation, and further when the majority of keratinocytes are differentiated (figure 1A). Moreover, the increase of polyploid cells suggested that DNA synthesis could occur when cells re-entered G1 phase after avoided mitosis (figure 1A and lower table). After 24 hours, polyploid and BrdU positive cell number decreased as a possible consequence of DNA degradation that takes place at a late stage of differentiation. To further confirm this result, we observed the fate of keratinocytes entering differentiation in S or G2 phases, after a BrdU labeling step prior to the induction of differentiation (figure 1B, upper diagram). Interestingly, BrdU labeled cells continued their cell cycle during differentiation, but the increase of polyploid cells indicated that cell cycle progression might take place after a mitosis bypass (figure 1B). Moreover, non-BrdU labeled cells entering differentiation in G2, might also bypass mitosis and continue their cell cycle (figure 1B, BrdU negative cells).

These particular cell cycle features led us to investigate the fate of cell cycle markers during the keratinocyte differentiation process. The G1 cyclin, cyclin E, continuously accumulated throughout the differentiation process, whereas cyclin A and B, both present at the differentiation engagement point (6 hours), disappeared as cells entered terminal differentiation (figure 1C, 12 hours). Interestingly, cdc2 underwent a significant down-regulation, like its cyclins partners, cyclin A and cyclin B (figure 1C). Unlike cdc2, the amount of cdk2, partner of cyclin E for the G1/S transition control and centrosome duplication, remained constant (figure 1C). Moreover, we showed that the CKI, p21 and p27, were expressed at low levels in adherent cell culture and were clearly induced during the differentiation process. While p27 levels increased constantly as keratinocytes differentiated, p21 expression peaked around 6 hours at the time of differentiation engagement and decreased thereafter (figure 1C). Finally, the retinoblastoma sensitivity protein pRb, a major cell cycle indicator, remained constantly expressed upon a drastic drop at terminal differentiation (figure 1C). Interestingly, the phosphorylated form of pRb, a G2/M phase marker, dramatically decreased as cells differentiated and did not show a detectable level thereafter (figure 1C).

Because cell cycle progression directly results from the kinase activity of cyclin/cdk, we evaluated this activity for three different cyclin/cdk complexes during the differentiation process. Cyclin A associated kinase activity dramatically declined immediately after the start of differentiation (figure 1D). After 6 hours, while the protein was still present at high level, kinase activity was only 20% of that observed in undifferentiated keratinocytes (figure 1C and 1D, cyclin A panel). As cells progressed further into differentiation, very low levels of cyclin A associated kinase activity was observed (figure 1D, cyclin A). In contrast, the decrease of cyclin B activity more closely followed the decrease in protein levels and dropped to barely undetectable levels after 6 hours (figure 1D, cyclin B panel). Cdk2 and cyclin E associated kinase activity reached a peak as cells entered differentiation but remained at 30% to 50% of the undifferentiated activity level during the differentiation process (figure 1D, cyclin E and cdk2 panels).

These results suggested that keratinocyte differentiation was accomplished without a strong signal of cell cycle arrest. Furthermore, cyclin activity profile revealed that G2/M cyclins marked the differentiation engagement point, whereas terminal differentiation was characterized by G1 cyclin E activity. Moreover, terminal differentiation was completed without mitosis. However, as the loss of cell-matrix anchorage could inhibit cell division, we decided to confirm these results in the c-Myc induced differentiation system that also allowed us to analyze the TAC compartment [11].

c-Myc promotes keratinocyte differentiation by activating transitory amplifying cells

It has been previously shown that c-Myc overexpression in stem cells induces terminal differentiation [11]. Here, we investigated the rate of DNA synthesis during this process (figure 2A). BrdU incorporation slightly and transiently increased after 12 hours of c-Myc activation and then decreased back to values measured prior to induction (figure 2A). Interestingly, DNA synthesis observed 12 hours after c-Myc induction was principally due to BrdU incorporation in small cells, corresponding mainly to transit amplifying cells and to a lesser extent to stem cells (figure 1B). These data suggested that c-Myc activated entry into cell cycle of stem cells or TAC or both. Furthermore, c-Myc-induced differentiating keratinocytes also presented a significant increase in the number of polyploid cells (figure 2A), indicating that polyploidy observed in suspension was a specific feature of keratinocyte differentiation and was not due to the loss of anchorage (figure 1A). Next we performed an analysis of cell cycle machinery expression and cyclin/cdk activities as described in the previous section. Cyclin protein levels increased between 12 hours and 2 days consistent with

the augmentation of cell synthesizing DNA (figure 2C). Interestingly, the cyclin expressions and the activities of their cognate kinases were sustained during the following days, corresponding to several rounds of TAC division (figure 2C and 2D). After 5 days, there was a significant reduction in the levels of cyclin A and cyclin B proteins whereas the amount of cyclin E protein remained constant. At this time, modifications in cyclin associated kinase activities correlated with protein expression. These results are consistent with what was observed in suspension experiments. The difference in kinase activities between the two systems at the beginning of differentiation was due to the fact that suspension-induced differentiation was a terminal process: cells do not undergo a proliferative state, and keratinocytes were directly committed to terminal differentiation. In contrast, during c-Myc induced differentiation, cells continue to proliferate (for few days) before undergoing terminal differentiation. p21 expression peaked at 3 days and declined to near basal levels by day 7. It appeared that p21 expression corresponded to the increase of cyclin levels. We noticed that, as observed for suspension-induced differentiation, the decline of G2/M cyclins and p21 occurred at the same time as the rise of the differentiation marker, involucrin (data not shown). cyclin E peaked concomitantly with changes in cell size and morphology (figure 2C). cdc2 protein level did not significantly vary while the two forms of cdk2 decreased, especially the phosphorylated active form [21]. This result is consistent with the reduction in cdk2 kinase activity, which is observed after 3 days, together with the decrease in the level of the faster migrating form (figure 2D). Finally, increased pRb phosphorylation was associated to an increase of cyclin associated kinase activities between 12 hours and 2 days, and this level was sustained during TAC proliferation. We found a down regulation of pRb protein after 7 days when terminal differentiation was reached. It is worth noting that in suspension-induced differentiation, there was also a disappearance of pRb in terminally differentiated keratinocytes. In c-Myc-induced differentiation, we showed that all cyclin expression and associated kinase activities increased, consistent with the increase in BrdU incorporating cells. This result suggested that activation of c-Myc immediately activated cell cycle of stem cells or TAC or both. Furthermore, continuous c-Myc activation drove keratinocytes into terminal differentiation, which was characterized by a decrease of G2/M cyclin expression and associated kinase activity while the cyclin E expression and associated kinase activity were sustained. Both differentiating systems showed the same variation in cyclin expression and associated kinase activity during terminal differentiation, suggesting that these results could be a significant trait of keratinocyte terminal differentiation *in vivo*.

Differentiated keratinocytes expressed cyclin E but not cyclin A and B

To further compare cyclin patterns, we performed immunofluorescence experiments to determine the presence of cyclins and the differentiation marker involucrin. Cyclin A, the S and G2/M phase cyclin, was preferentially expressed in small, undifferentiated cells, as shown by the lack of involucrin staining (figure 3A, arrows). Moreover, the other G2/M cyclin, cyclin B, was also solely visible in little, undifferentiated cells or that started differentiation as illustrated by a slight involucrin staining surrounding the cells (figure 3B, arrows). Like cyclin A and B, cyclin E not only stained undifferentiated cells as well, but more surprisingly, involucrin positive cells presented a strong cyclin E staining in all of our experiments (figure 3C, arrows). These results showed that keratinocytes did not necessary need to reside in the G1 phase to start to differentiate but, the lack of G2/M cyclin staining and the presence of cyclin E suggested that terminally differentiated keratinocytes were likely to be in G1. Interestingly, DNA quantification during the differentiation process indicated that a significant number of cells were in tetraploid as well as in polyploid stages (figure 1A). All together these results imply that keratinocyte differentiation took place without mitosis, contributing to the cell enlargement observed during this process.

p21 controls cyclin activity during keratinocytes entry to differentiation

We have shown that p21 protein peaked in the two systems of differentiation and its expression was reduced at the same time when cells began to express the differentiation marker involucrin. Interestingly, p21 was induced before a decrease in cdk activity and DNA replication. Therefore, to characterize more precisely the contribution of p21 in the terminal keratinocyte differentiation, we analyzed the effects of this CKI on the G1 and G2 cyclin/Cdk during suspension-induced differentiation. To this end, we first immunoprecipitated p21 and looked at its associated proteins (figure 4A). We found that cyclin A and cyclin B were especially associated with p21 after 6 hours of suspension, whereas cyclin E was co-immunoprecipitated principally after 12 hours (figure 4B). Similarly, cdc2 and cdk2 were associated with p21 after respectively 6 hours and 12 hours (figure 4B, p21 IP panel). Almost all cyclin A and cyclin A-bound cdks were removed by p21 depletion after 6 hours, suggesting that they were quantitatively associated with p21 upon terminal differentiation entry (figure 4B, see supernatant vs p21 IP panel). This result suggested that the drop of cyclin A associated kinase activity observed at engagement time was due to p21 inhibition (figure 1D, cyclin A panel). In contrast, a slight amount of cyclin B was associated with p21 at the engagement time (6 hours) compared to the total amount of this cyclin (figure 4B,

supernatant and p21 IP panel). However, it was interesting to note that despite the association of p21 with cyclin B and the active form of cdc2 (figure 4D, PSTAIR panel), the remaining kinase activity was not significantly affected (figure 1D, cyclin B panel). With respect to cyclin E, p21 was significantly associated with cyclin E/Cdk2 complex, even though a large amount of the complex remained free of CKI (figure 4E). As the cyclin E associated kinase activity decreased after 6 hours (figure 1D, cyclin E panel), whereas the amount of cyclin E present after p21 depletion was higher than in adherent keratinocytes (figure 4E), we could presume that p27 was responsible for this inhibition. Moreover, sustained cyclin E dependent kinase activity during the differentiation process, was certainly due to the increase of cyclin E expression that overcome increased p27 levels (figure 1C). This experiment demonstrated that while p21 bound and fully inhibited the G2/M cyclin at the engagement point, cyclin E dependent kinase activity was maintained strongly suggesting that terminally differentiated keratinocytes were in G1 phase.

Cdc2 inhibition induces terminal differentiation of keratinocytes

The particular pattern of cyclin expression, described above, led us to look at the effect of various known inhibitors of cell cycle progression on keratinocyte differentiation. Upon treatment with cdc2 inhibitors (NG97 and roscovitin), keratinocytes accumulated in G2/M phase with a 4N DNA content, consistent with an inhibition of cdc2 activity (figure 5B). Nevertheless, DNA synthesis continued in the presence of these inhibitors and 2 days of treatment led to an increase in polyploidy (figure 5B and 5D). Interestingly, we observed a considerable increase in cell size (figure 5A, 5B and 5D; morphology), and an induction of terminal differentiation (figure 5B; involucrin expression). Cells treated with cdc2 inhibitors were often larger than the controls and cells with a granular cytoplasm and two nuclei cells were frequently observed (figure 5A). In contrast, DNA synthesis was significantly reduced upon treatment with the cdk2 inhibitor AG555, and keratinocytes accumulated in G1 phase with a 2N DNA content (figure 5C and 5D), consistent with an inhibition of cdk2 kinase activity. Under these conditions, polyploidy, cell size and terminal differentiation were reduced (figure 5 A, C and D). Treatment with AG555 produced a specific morphology with a significant decrease of differentiated larger cells, almost all keratinocytes were smaller (figure 5A), and culture was weakly stratified. Thus, cdk2 inhibition reduced terminal differentiation whereas cdc2 inhibition induced keratinocyte differentiation. These results confirmed that G2/M cyclin inhibition is a key control in terminal differentiation, and emphasized the idea that loss of the ability to proceed through mitosis is a marker of keratinocyte differentiation.

Discussion

Here we have shown that keratinocyte differentiation is tightly linked to the cell cycle. Analysis of cyclin expressions and associated kinase activities, leads us to think that terminally differentiating cells are in G1 phase. This result is not consistent with DNA quantification indicating that a minority of cell have a 2N DNA content. Based on this observation, we propose that keratinocyte differentiation occurs without mitosis. The presence of G2/M cyclins at the engagement point strongly suggests that differentiation starts preferentially in G2 phase. Subsequently, keratinocytes progress to G1 phase, bypassing mitosis. This process would explain the effects of G2/M cdk and mitosis inhibitors, and could explain keratinocyte enlargement during terminal differentiation (figure 6).

Keratinocyte differentiation, cell cycle and mitosis.

Our study shows that keratinocytes enter terminal differentiation preferentially in G2/M phase but their cell division is impeded. Differentiated keratinocytes fail to maintain this arrest and they continue their cell cycle by undergoing a G1 like state with a 4N DNA content and, occasionally, reduplicate their genome to reach a polyploid state. This "mitotic slippage" is likely to be sufficient to induce terminal differentiation and seems to play a key role in keratinocyte differentiation. Interestingly, when keratinocytes are blocked in mitosis with nocodazol they also undergo terminal differentiation and *de novo* replication [20]. Similarly, various cell types blocked in mitosis for a long periods with inhibitors of mitotic spindle formation undergo "mitotic slippage", which is a failure to maintain their arrested state [22, 23]. During this mitotic slippage, cells degrade cyclin B and cyclin A, down regulate cdc2 kinase activity and resume interphase without completing chromosome segregation or cell division [23, 24]. One hypothesis that could explain the lack of cytokinesis, observed in keratinocyte differentiation, would be that changes in cytoskeleton structure may create a physical constraint, thus impeding cell division. This mechanism may explain why the engagement is irreversible and why in wound healing and in many pathologic conditions, keratinocytes that become hyperproliferative, produce a specific keratin protein. One good candidate could be keratin K10 which ectopic expression inhibits proliferation of human keratinocytes [25]. Furthermore, K10-induced inhibition is reversed by the coexpression of K16 but not K14. These results are consistent with the expression pattern of these proteins observed in the epidermis, where, basal, proliferative keratinocytes express K14. When they terminally differentiate, keratinocytes switch off K14 and start K10 expression, whereas in

response to hyperproliferative stimuli, K16 replaces K10. Furthermore, *in vivo*, transgenic mice that ectopically express K10 have hypoplastic and hyperkeratotic epidermis due to a dramatic decrease in skin keratinocyte proliferation [26]. Finally, keratin K10^{-/-} mice display basal keratinocyte hyperproliferation attended by an induction of c-Myc and wound healing keratins K6 and K16 [27]. In line with the down regulation of K10 in squamous cell carcinomas and its absence in proliferating cells, these data suggest that tissue restricted expression of some members of the keratins gene family not only serves structural functions and could be directly involved in cell cycle arrest and cytokinesis bypass.

Function of c-Myc during keratinocyte differentiation

We show that cyclin expression and activity increase between 12 hours and 2 days after activation of c-Myc, and during the same period, we observed increased DNA synthesis. Our experiments reveal that in primary human keratinocytes, constitutive activation of c-Myc stimulates proliferation in small cells corresponding in majority to transit amplifying cells and in a lesser extent to stem cells. This is consistent with the function attributed to the proto-oncogene c-Myc in other cell types, and namely its role in the stimulation of cell cycle progression. Some authors have suggested that c-Myc induces differentiation in keratinocytes by activating and repressing a subset of genes encoding cell adhesion and cytoskeleton proteins [28]. Here, we propose that activation of c-Myc represents a strong cell cycle induction signal. First, this signal may lead to increase cell cycle activity in stem cells, and thus to produce more TAC. Second, c-Myc could activate proliferation of TAC, leading to an increased of TAC and thus of differentiated keratinocytes. c-Myc acts on the cell cycle through at least three distinct pathways which can enhance CDK function: (i) functional inactivation of the CDK inhibitor p27, (ii) induction of the CDK-activating phosphatase CDC25A, (iii) deregulation of cyclin expressions [29, 30]. Nevertheless, overexpression of c-Myc might also cause a G2 arrest and a withdrawal from mitosis, as it has been reported for fibroblasts [31, 32], and this effect could reinforce, here, keratinocyte terminal differentiation. However, it is not clear whether c-Myc could block cells in G2 and/or help to bypass mitosis. Beyond this complex effect, expression of c-Myc is down regulated in late steps of differentiation [33], and under the involucrin promoter, c-Myc leads to formation of precancerous features [9], indicating that c-Myc activity need to be tightly repressed for successful completion of the differentiation process. Surprisingly, despite the fact that c-Myc expression is driven by a CMV promoter in our system, c-Myc mRNA disappears as cells enter terminal differentiation [11], mimicking what is observed in suspension conditions. This

result emphasizes the idea that an active c-myc repression mechanism exists and plays a crucial role in keratinocyte differentiation.

p21 and G2/M arrest

We observed here that differentiation engagement is characterized by an induction of p21. Such an induction has been identified as a strong cell cycle stop signal and it is not clear whether it leads to a G1 or a G2 phase arrest. Interestingly, at the time of differentiation engagement, a slight amount of cyclin B is associated with p21, but the whole kinase activity is almost not affected. Our study suggests that p21 principally inhibits cyclin A associated kinase activity. This event could clearly lead to a G2/M phase arrest as it has been recently proposed [34]. Moreover, p21^{-/-} keratinocytes present a substantial down modulation of selective terminal differentiation markers and a reversible commitment to differentiation [35, 36]. However, primary keratinocytes constitutively expressing p21, also show decreased expression of terminal differentiation markers [18]. These data clearly suggest that p21 is necessary for a G2/M arrest and differentiation engagement but that its down-regulation is further needed for terminal differentiation.

Polyploid cells: casualty of war?

Interestingly, several studies have shown that p21 is required for the G2/M checkpoint in human cells, and prevents endoreplication through direct inhibition of cyclin E/cdk2 [37, 38]. In keratinocytes, p21 is down-regulated after differentiation engagement and cyclin E dependent kinase activity remains constant, these may lead to inefficient control of genome stability and thus to polyploid differentiated keratinocytes. Furthermore, pRb and p53 that help to maintain normal cell ploidy by preventing DNA re-replication prior to mitotic division [39], are down-regulated in differentiated keratinocytes [19].

Conclusive model

Keratinocyte stem cells have an unlimited capacity for self-renewal but divide infrequently. We have displayed that the proto-oncogene c-Myc activates cell cycle in stem cells and/or in TAC, leading to an increase of TAC number and thus in differentiated keratinocytes. Differentiation engagement is characterized by an up-regulation of p21 expression that inhibits activities of G2/M cyclins. Differentiated keratinocytes do not sustain a G2/M arrest and thus progress in a G1 like state with a 4N DNA content marked by a high expression of cyclin E. Finally, the down-regulation of p21 and pRb could lead to the possible reduplication

of DNA. Interestingly, polyploidy might be a possible mean to obtain an significant increase of cell size during keratinocyte differentiation, as observed in plants and animals [40, 41]. Aneuploidy is common among tumor cells and frequently follows an intermediate tetraploid state [42, 43]. However, keratinocytes protect themselves by the expression of a new cytoskeleton that renders cell division mechanically impossible. Moreover, keratinocytes commit to an irreversible differentiation program culminating in enucleation, internal degradation and transformation in dead scales that are continuously shed from the surface of the skin. Consistently, the lesions that c-Myc induces are completely benign and spatially delimited because they arise within an epithelium in which the outward migration and shedding of keratinocytes is dominant over their accumulation [9]. This dominant loss of potentially neoplastic keratinocytes through shedding may account for the remarkable rarity of malignant progression and the high frequency with which such lesions spontaneously regress in human skin.

Materials and methods

Cell culture strains and conditions

Primary keratinocytes were isolated from neonatal human foreskin and cultured as described previously [11]. Early passages of keratinocytes from three different individuals were used (strains KA, KMB, and KQ). Terminal differentiation was induced by suspending disaggregated keratinocytes (2×10^5 cells/ml) in culture medium supplemented with 1,75% methyl cellulose (SIGMA, M-0512). The cell suspension was transferred to bacterial culture grade plastic dishes coated with 0,4% polyHEMA (SIGMA, P-3932) for 24 h and recovered from suspension by diluting 10 times the methyl cellulose with cold PBS as described previously [44]. Primary keratinocytes expressing c-MycERTM has been previously described [11] and are cultured as normal keratinocytes. Activation of conditional c-Myc was achieved by adding 100 nM 4-hydroxytamoxifen (variant Z, research Biochemicals International) to the culture medium every 48 h for the lengths of time indicated. Keratinocytes were treated for 48 hours with Cdk inhibitors, with respectively 50 μ M of AG555 (Tryphostin B46 ICN Biochemicals), 30 μ M of Roscovitin (ICN Biochemicals) and 1 μ M of NG97 (kind gift of J Meijer) dissolved in DMSO.

Flow cytometry

Trypsinized keratinocytes were washed once with PBS and fixed in 1% formaldehyde for 10 min for involucrin staining as previously described [11]. Monoclonal anti-involucrin antibody SY5 was a kind gift of F Watt. For DNA content, keratinocytes were fixed in cold 70% ethanol over night at 4°C, washed twice in PBS and resuspended in staining solution (PBS, 20 μ g/ml DNase free-RNase, 25 μ g/ml propidium iodide). For DNA synthesis analysis, keratinocytes that had been cultured in the presence of 10 μ M BrdU for 2 h treated and fixed in ethanol as above. BrdU staining was then performed as described [11] followed by RNase treatment and propidium iodide staining. After staining, all cells were firmly resuspended and filtered through a 70 μ M mesh to minimize the presences of aggregates, and then analysed by flow cytometry on a Becton Dickinson FACScan. 10 000 events were gated and acquired for every sample.

Immunofluorescence

Cells were trypsinized, washed once with PBS, laid on polylysined coverslips, washed twice with PBS, fixed with PBS containing 3,8% formaldehyde for 10 min and permeabilized with cold methanol 5 min. After washing with PBS, cells were incubated for 1 h at 37°C in a wet chamber with rabbit polyclonal anti-involucrin antibody DH1 (a kind gift of F Watt) and anti-cyclin A antibody (C 4710, Sigma) or anti-cyclin B (sc-245, Santa Cruz) or anti-cyclin E (sc-247, Santa Cruz). They were then washed in PBS and incubated 1 h at 37°C with FITC-conjugated goat anti-rabbit Ig G antibody (Jackson ImmunoResearch) and Cy3-conjugated sheep anti-mouse Ig G antibody (Sigma). After washing with PBS, coverslips were mounted with 90% glycerol - 10% PBS 10X - 1mg/ml p-phenylenediamine –100 µg/ml DAPI. Images were acquired on a DMRA microscope using 40X lens. Digital images were recorded with a 12-bit C4795-NR CCD camera (Hamamatsu).

Whole cell extract and Immunoblots

Cells were washed once with PBS and then incubated for 30 min on ice in lysis buffer (100mM NaCl, 50mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 1% NP40, 2.5mM NaPPi, 5mM NaF, 2.5mM β-glycerophosphate, 1mM DTT supplemented with protease inhibitors Boehringer) and centrifuged at 15000g 15 min. Supernatants concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce). For western blot analysis, 80 µg of cell extract were separated by SDS-PAGE (7% or 12%) and transferred to nitro-cellulose membranes. After blocking and incubating with antibodies, blots were finally subjected to enhanced chemiluminescence substrate (Lumi-Light, Roche or SuperSignal West Femto, Pierce) following supplier's protocol. The following primary antibodies were used anti-cyclin A (C 4710, Sigma), anti-cyclin B (sc-245, Santa Cruz), anti-cyclin E (sc-247, Santa Cruz), anti-cyclin D1 (556470, BD Biosciences), anti-cdc2 (C3085, Sigma), anti-cdk2 (sc-163, Santa Cruz), anti-PSTAIR (P-7962, Sigma), anti-p21 (sc-397, Santa Cruz), anti-p27 (sc-528, Santa Cruz), anti-Rb (554136, BD Biosciences), anti-p107 (sc-318, Santa Cruz), anti-p130 (sc-317, Santa Cruz), anti-phosphoRb (ser795, ser807/811, ser780, Cell Signaling).

Immunoprecipitation and *in vitro* kinase assays

Cell lysate (200µg) was incubated for 2 h at 4°C with anti-cyclin E antibody (sc-248, Santa Cruz) or anti-cyclin A antibody (sc-751, Santa Cruz) or anti-cyclin B antibody (sc-245, Santa Cruz) and then incubated for 1 h at 4°C with 30µl beads (protein A Sepharose for cyclin A, protein G Sepharose for cyclin B and anti-mouse Ig G Agarose for cyclin E). The

immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and twice with kinase buffer (25mM HEPES pH 7,5, 15mM MgCl₂). The final pellet was resuspended in 25µl of kinase buffer supplemented with 50µM ATP, 500µM DTT, 4µg histone H1, and 2.5µCi of γ -³²P ATP. After incubation for 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition Laemmli sample buffer, heated 10 min at 37°C and separated on SDS-11% PAGE gels. After partial transfer, proteins were analysed by western blot, and histone H1 kinase activity by phosphoimager (Typhoon 9200, Amersham Biosciences) and Cerenkov counting on Beckman LS6000sc counter. For p21 depletion, 250µg of whole cell extract were incubating with saturating amounts of p21 specific antibody (sc-397, Santa Cruz) for 2 h at 4°C, whereas mock sample with incubating with protein A Sepharose beads only. 1/5 of the resulting supernatants is analysed by immunoblots and the rest is used for further immunoprecipitation with cyclin specific antibodies. Histone H1 amount was verified after transfer by coomassie staining of the remaining gel to confirm absence of proteolytic activity.

References

1. Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 1028-1035.
2. Watt, F.M., and Green, H. (1981). Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J Cell Biol* 90, 738-742.
3. Adams, J.C., and Watt, F.M. (1989). Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature* 340, 307-309.
4. Fuchs, E., and Byrne, C. (1994). The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 4, 725-736.
5. Hall, P.A., and Watt, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
6. Potten, C.S., and Morris, R.J. (1988). Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10, 45-62.
7. Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21, 3919-3926.
8. Waikel, R.L., Wang, X.J., and Roop, D.R. (1999). Targeted expression of c-Myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UV-B induced apoptosis. *Oncogene* 18, 4870-4878.
9. Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.
10. Waikel, R.L., Kawachi, Y., Waikel, P.A., Wang, X.J., and Roop, D.R. (2001). Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 28, 165-168.
11. Gandarillas, A., and Watt, F.M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11, 2869-2882.
12. Arnold, I., and Watt, F.M. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol* 11, 558-568.
13. Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
14. Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.
15. Watt, F.M. (1988). Proliferation and terminal differentiation of human epidermal keratinocytes in culture. *Biochem Soc Trans* 16, 666-668.
16. Hauser, P.J., Agrawal, D., Flanagan, M., and Pledger, W.J. (1997). The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell Growth Differ* 8, 203-211.
17. Harvat, B.L., Wang, A., Seth, P., and Jetten, A.M. (1998). Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci* 111 (Pt 9), 1185-1196.
18. Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P.K., and Dotto, G.P. (1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280, 1069-1072.
19. Dazard, J.E., Piette, J., Basset-Seguain, N., Blanchard, J.M., and Gandarillas, A. (2000). Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene* 19, 3693-3705.

20. Gandarillas, A., Davies, D., and Blanchard, J.M. (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* *19*, 3278-3289.
21. Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* *257*, 1958-1961.
22. Rieder, C.L., and Palazzo, R.E. (1992). Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci* *102* (Pt 3), 387-392.
23. Kung, A.L., Sherwood, S.W., and Schimke, R.T. (1990). Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 9553-9557.
24. Andreassen, P.R., and Margolis, R.L. (1994). Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J Cell Biol* *127*, 789-802.
25. Paramio, J.M., Casanova, M.L., Segrelles, C., Mitnacht, S., Lane, E.B., and Jorcano, J.L. (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* *19*, 3086-3094.
26. Santos, M., Bravo, A., Lopez, C., Paramio, J.M., and Jorcano, J.L. (2002). Severe abnormalities in the oral mucosa induced by suprabasal expression of epidermal keratin K10 in transgenic mice. *J Biol Chem* *277*, 35371-35377.
27. Reichelt, J., and Magin, T.M. (2002). Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci* *115*, 2639-2650.
28. Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I., and Watt, F.M. (2003). Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* *130*, 2793-2808.
29. Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J., and Soucek, L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Lett* *490*, 153-162.
30. Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6274-6279.
31. Li, Q., and Dang, C.V. (1999). c-Myc overexpression uncouples DNA replication from mitosis. *Mol Cell Biol* *19*, 5339-5351.
32. Felsher, D.W., Zetterberg, A., Zhu, J., Tlsty, T., and Bishop, J.M. (2000). Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10544-10548.
33. Gandarillas, A., and Watt, F.M. (1995). Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* *11*, 1403-1407.
34. Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J., and Dulic, V.V. (2003). Permanent cell cycle exit in G(2) phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *Embo J* *22*, 3992-4002.
35. Topley, G.I., Okuyama, R., Gonzales, J.G., Conti, C., and Dotto, G.P. (1999). p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9089-9094.
36. Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., and Dotto, G.P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* *10*, 3065-3075.
37. Stewart, Z.A., Leach, S.D., and Pietenpol, J.A. (1999). p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol Cell Biol* *19*, 205-215.

38. Minella, A.C., Swanger, J., Bryant, E., Welcker, M., Hwang, H., and Clurman, B.E. (2002). p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol* *12*, 1817-1827.
39. Di Leonardo, A., Khan, S.H., Linke, S.P., Greco, V., Seidita, G., and Wahl, G.M. (1997). DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res* *57*, 1013-1019.
40. Royzman, I., and Orr-Weaver, T.L. (1998). S phase and differential DNA replication during *Drosophila* oogenesis. *Genes Cells* *3*, 767-776.
41. Traas, J., Hulskamp, M., Gendreau, E., and Hofte, H. (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol* *1*, 498-503.
42. Galipeau, P.C., Cowan, D.S., Sanchez, C.A., Barrett, M.T., Emond, M.J., Levine, D.S., Rabinovitch, P.S., and Reid, B.J. (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7081-7084.
43. Shackney, S.E., Smith, C.A., Miller, B.W., Burholt, D.R., Murtha, K., Giles, H.R., Ketterer, D.M., and Pollice, A.A. (1989). Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* *49*, 3344-3354.
44. Watt, F.M., Kubler, M.D., Hotchin, N.A., Nicholson, L.J., and Adams, J.C. (1993). Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *J Cell Sci* *106 (Pt 1)*, 175-182.

Acknowledgments

We are grateful to F. M. Watt for involucrin antibodies; C. Sardet's lab, C. Bonne-Andrea and M.L. Vignais for helpful discussions; J.C. Dantoni, B. Bell and Felix J. Kim for critical reading of this manuscript; and V. Dulic. for sharing technical knowledge in Cyclin immunoprecipitations and *in vitro* kinase assays. This work was supported by grants from the CNRS and La Ligue contre le Cancer. M. C-Q. was funded by a fellowship from La Ligue contre le Cancer.

Figure legends

Figure 1: Suspension induced keratinocyte differentiation alters cell cycle markers profile.

(A – B) Flow-cytometry analysis of DNA synthesis in primary human keratinocytes during suspension-induced differentiation. Dot plots representing BrdU incorporation (FL1 H) versus DNA content (FL2 A). Aggregates were excluded on the basis of the ratio propidium iodide Area/Width (data not shown). (A) Keratinocytes placed in suspension for respectively 6 hours, 12 hours and 24 hours are incubated with BrdU for the last 2 hours. Table: percentage of BrdU positive and polyploid cells. Data were obtained from three independent experiments done in duplicate. (B) Adherent keratinocytes were first incubated with BrdU for 2 hours and then placed in suspension without BrdU for respectively 6 hours, 12 hours and 24 hours. Table shows the percentage of polyploid cells either BrdU labelled (BrdU+, > 4N) or unlabelled (BrdU-, > 4N). Data were obtained from three independent experiments done in duplicate. (C) Western blot analysis of cell cycle markers during suspension-induced keratinocyte differentiation. (D) Cyclin associated kinase activities measured with Histone H1 as a substrate (autoradiography and phosphoimager quantification). Data in histograms are the average of three independent experiments, error bars are the s.e.m.

Figure 2: Cell cycle analysis in primary human keratinocytes during c-Myc-promoted differentiation. (A – B) Flow-cytometry analysis of DNA synthesis. Adherent keratinocytes were incubated with BrdU for 2 hours after activation of c-Myc for respectively 12 hours, 2, 3, 5 and 7 days. (A) Dot plots representing BrdU incorporation (FL1 H) versus DNA content (FL2 A). Aggregates were excluded on the basis of the ratio propidium iodide Area/Width (data not shown) (B) Dot plots representing Side Scatter (SSC), as a size marker, versus BrdU incorporation. Aggregates were excluded on the basis of the ratio propidium iodide Area/Width (data not shown). Table: percentage of BrdU labelled cells. Data were obtained from two independent experiments done in duplicate. (C) Western blot analysis of cell cycle markers. (D) Cyclin associated kinase activities measured on Histone H1: autoradiography and phosphoimager quantification. Data in histograms are the average of three independent experiments, error bars are the s.e.m.

Figure 3: Differentiated keratinocytes express mostly cyclin E. Stratified cells were trypsinized and labelled with cyclin A, cyclin B or cyclin E antibodies (panel A, B and C

respectively), together with the differentiation marker involucrin (green), while DNA was stained with DAPI (blue). Each panel contains three images of three independent experiments.

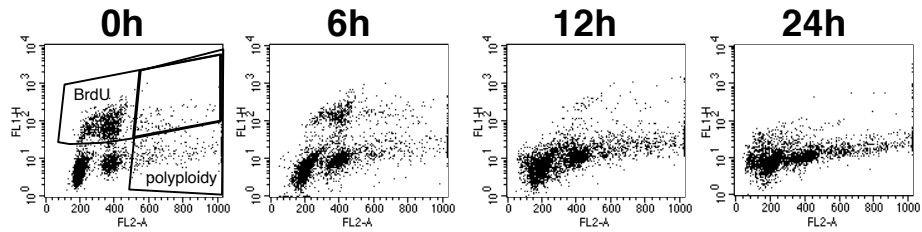
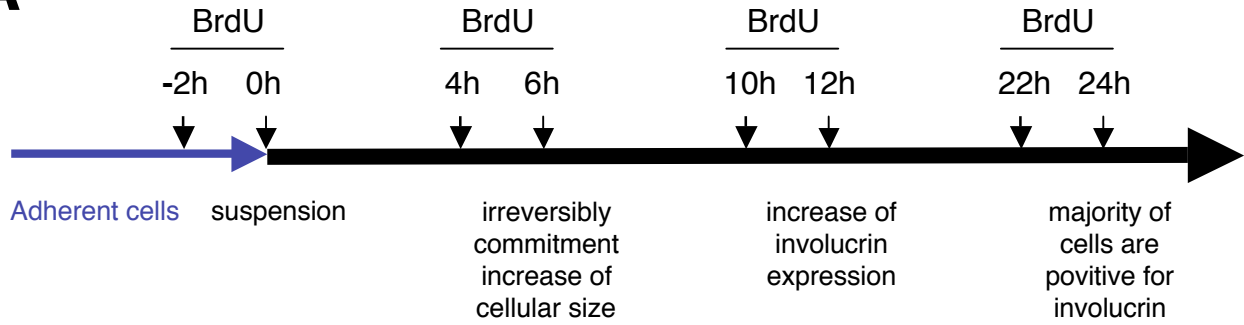
Figure 4: The p21 cdk inhibitor marks differentiation engagement and blocks cyclin A and cyclin B dependent kinase activities. (A) Cyclin E, cyclin A and cyclin B were immunoprecipitated from either mock or p21-depleted extracts, and the kinase activities of immunoprecipitated cyclin complexes were tested on Histone H1. (B) western blot analysis of p21 immunoprecipitation and of p21-depleted supernatant. (C-D-E) western blot analysis of cyclin A, cyclin B and cyclin E co-immunoprecipitated proteins from either mock or p21-depleted extracts.

Figure 5: The inhibition of G2/M cyclin dependent kinase activities enhances keratinocyte differentiation. (A) Microscopic aspect of keratinocyte colonies treated with the G1 cdk inhibitor AG555, the G2/M Cdk inhibitors Roscovitin and NG97, or with DMSO as a control. The scale bar represents 10 μ m. (B-C) Cytometry analysis of treated keratinocytes, for the morphology, the DNA content, DNA synthesis and involucrin expression. (D) Quantification of large cells (morphology), BrdU positive cells and polyploid cells as deduced from cytometry analysis, and normalized to DMSO control. Numbers are means of three independent experiments in duplicate and bars are the s.e.m.

Figure 6: Proposed model of keratinocyte differentiation linking cell cycle control, size increase and differentiation or how to grow easily. Keratinocytes enter differentiation in a G2/M phase by p21-mediated inactivation of G2/M cyclin dependent activities, followed with cytokinesis bypass, leading to accumulation of differentiated keratinocytes in G1 phase carrying 4N chromosomes.

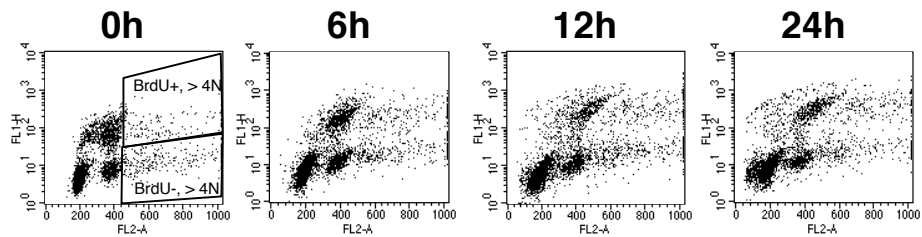
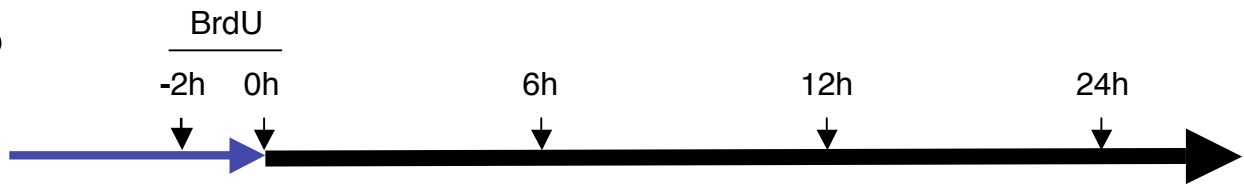
FIG 1 A - B

A



BrdU (%)	23	14	5	5
Polyploidy (%)	7	9	14	11

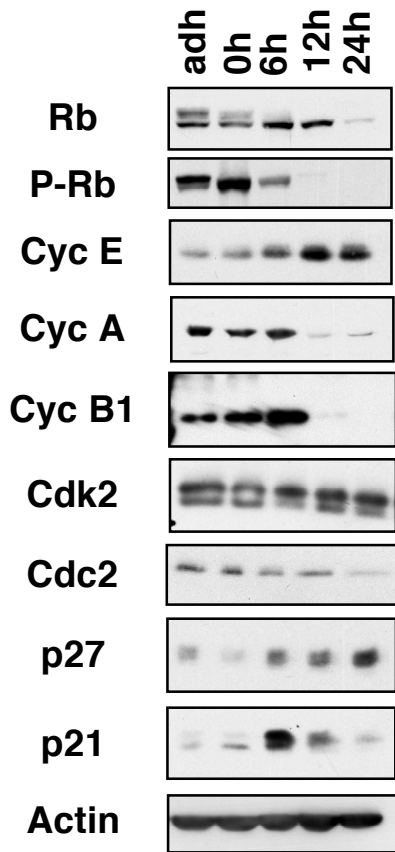
B



BrdU+, >4N (%)	2	5	9	7
BrdU-, >4N (%)	5	6	9	5

FIG 1 C - D

C



D

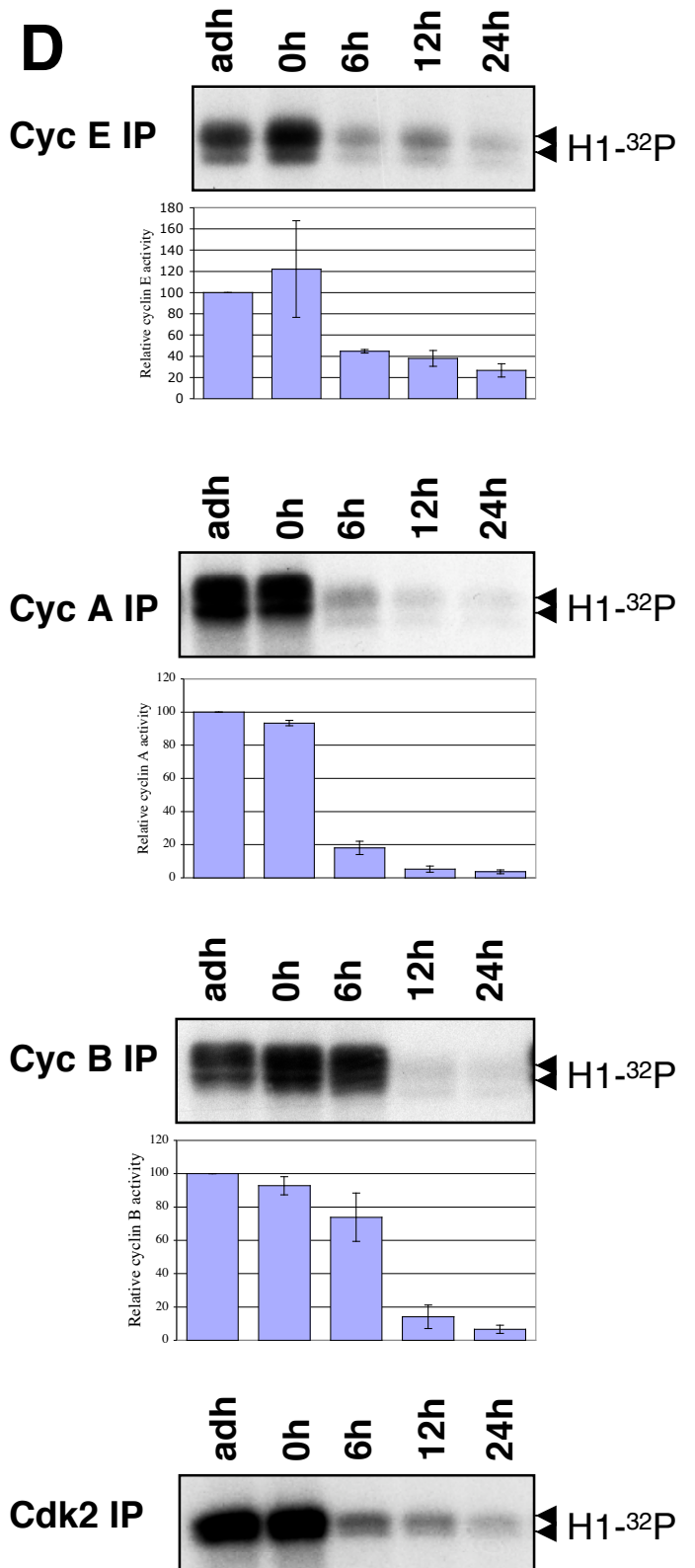
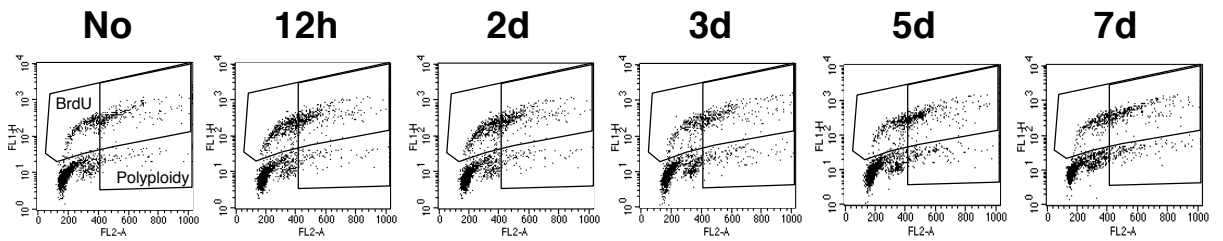
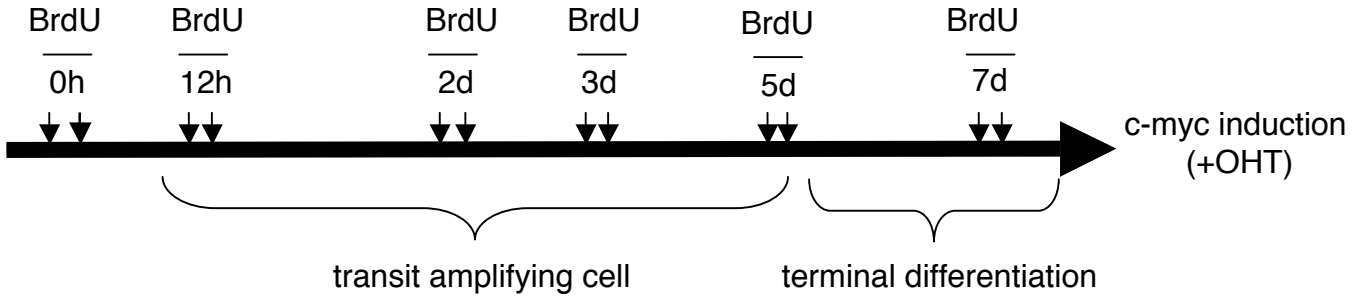


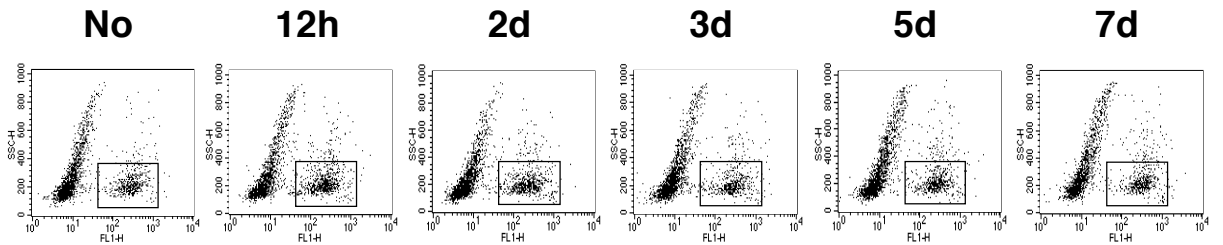
FIG 2 A - B

A



	No	12h	2d	3d	5d	7d
BrdU (%)	27	35	29	25	25	30
Polyploidy (%)	18	20	20	20	20	23

B



	No	12h	2d	3d	5d	7d
BrdU (%)	24	29	26	21	21	24

FIG 2 C - D

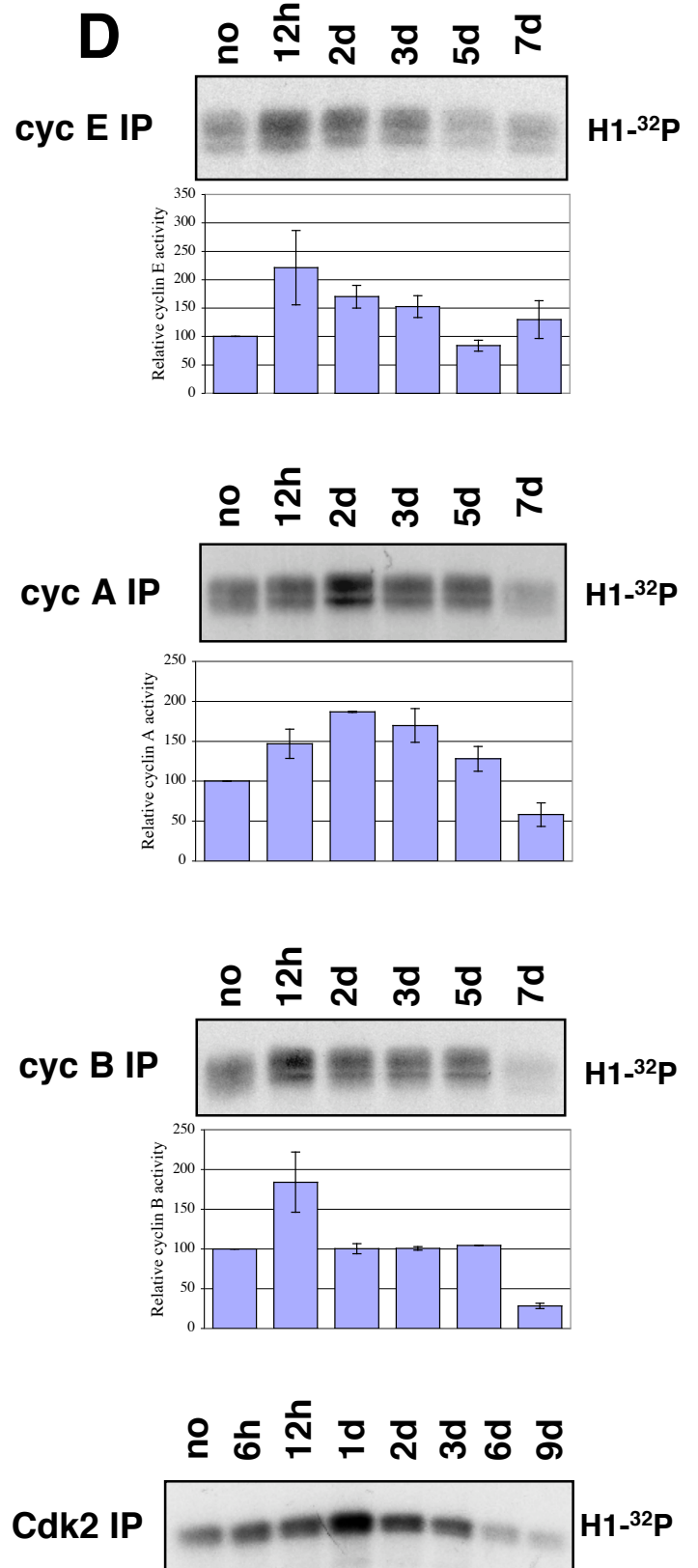
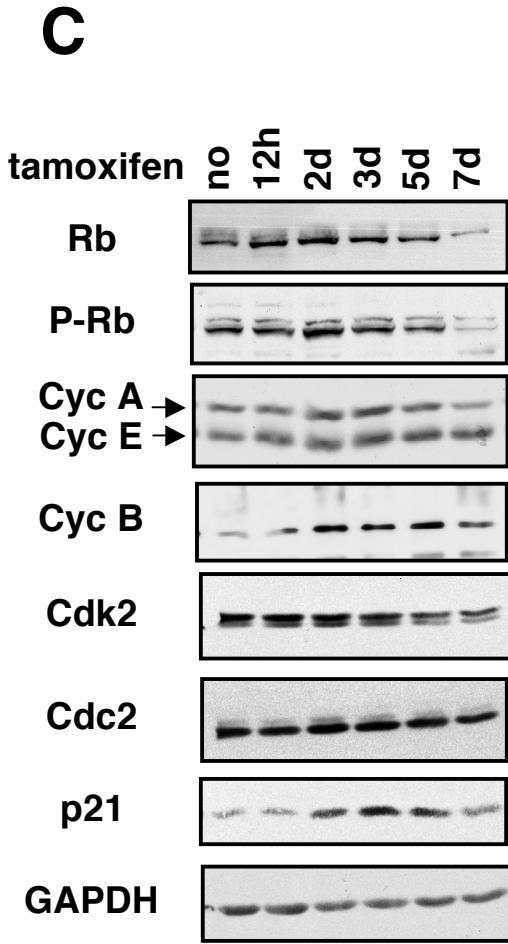


FIG 3 A - B

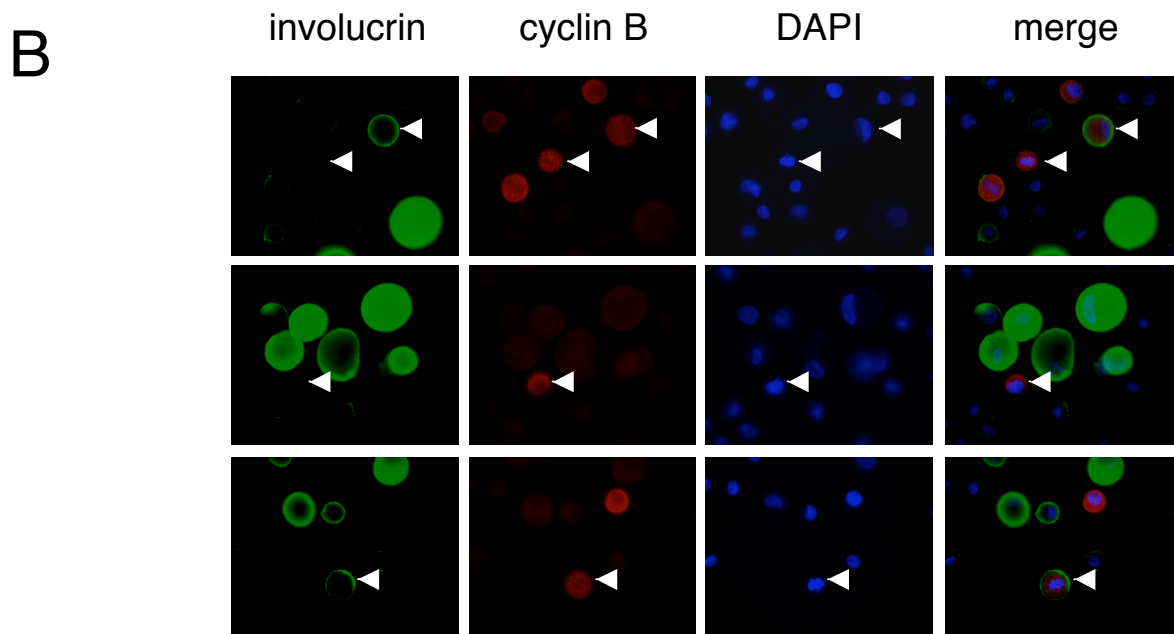
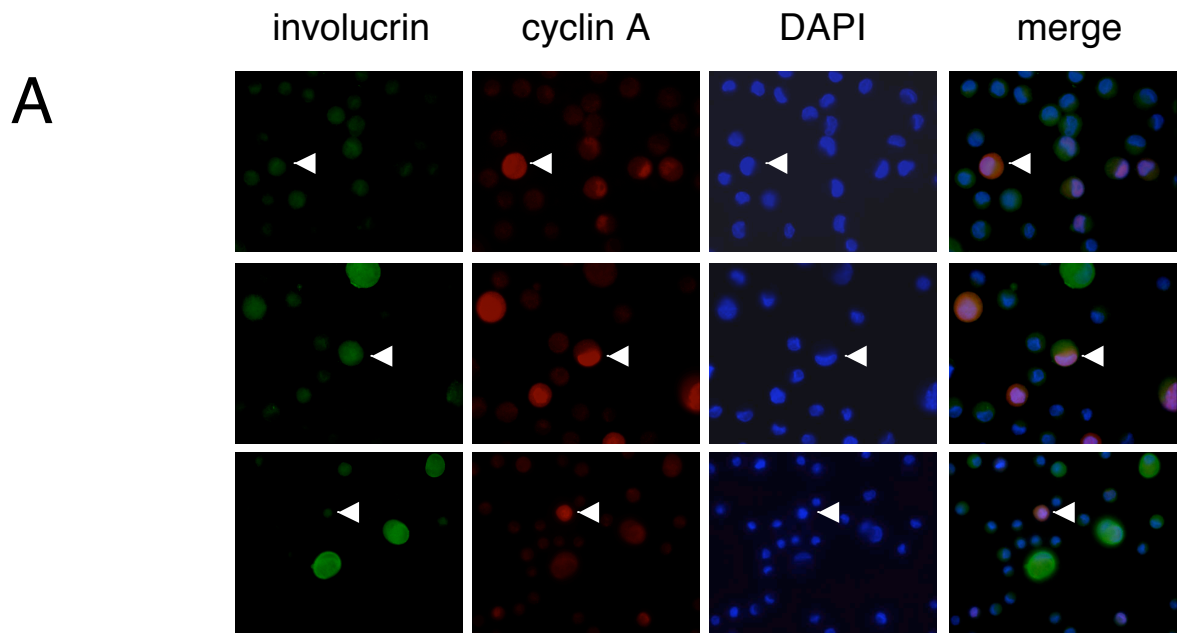


FIG 3 - C

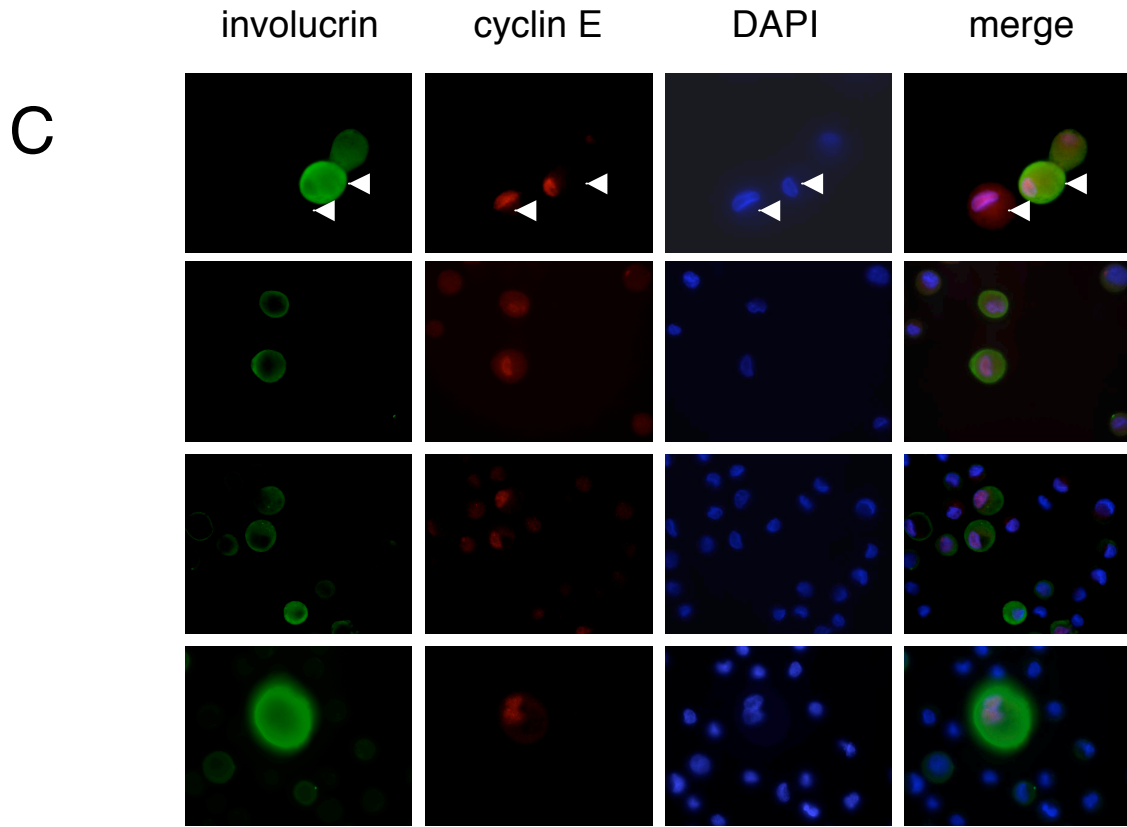
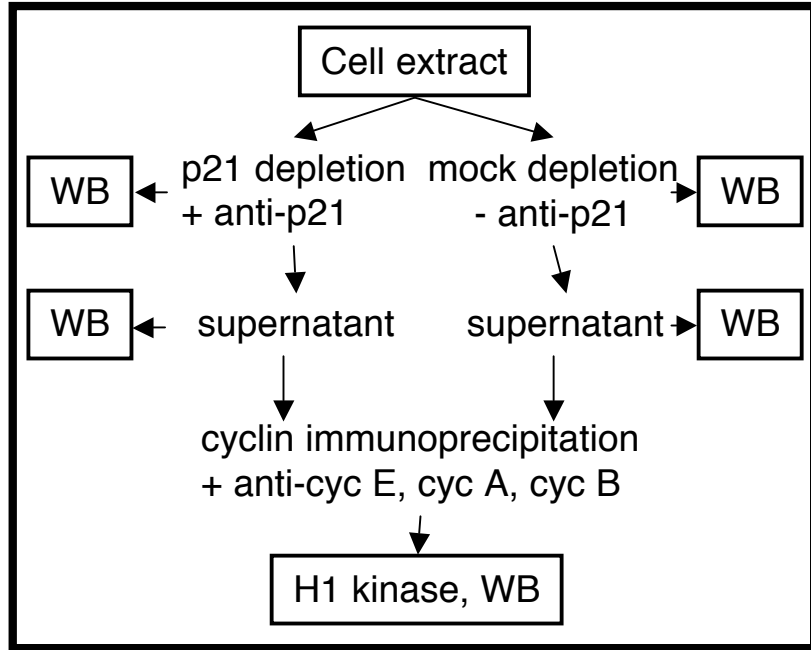


FIG 4 A - B

A p21 immunodepletion



B p21 immunodepletion and p21 immunoprecipitation

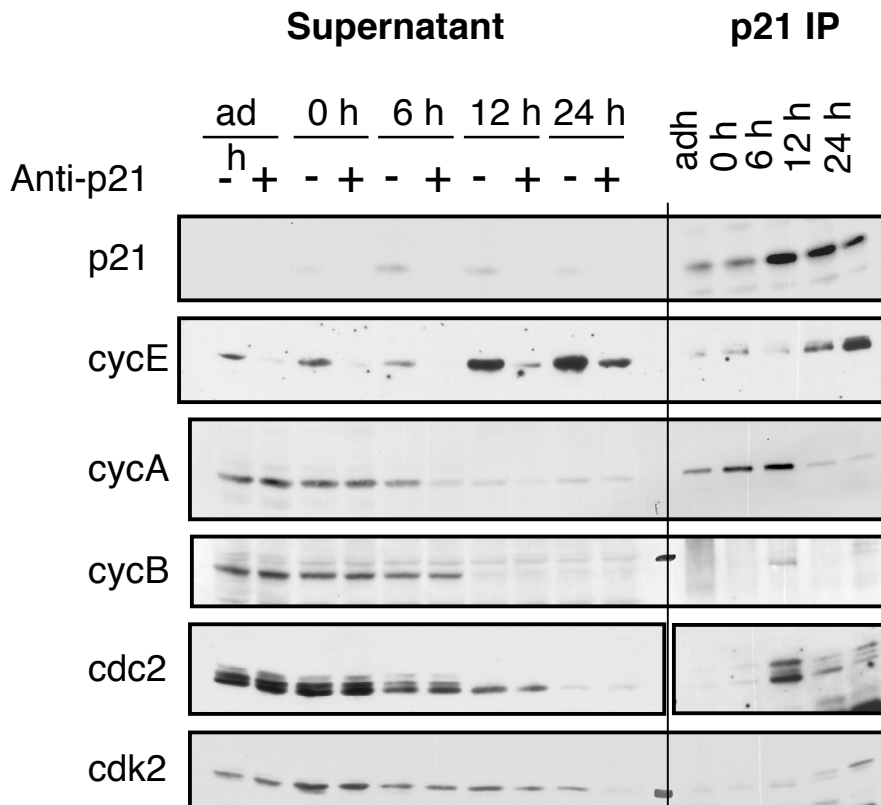
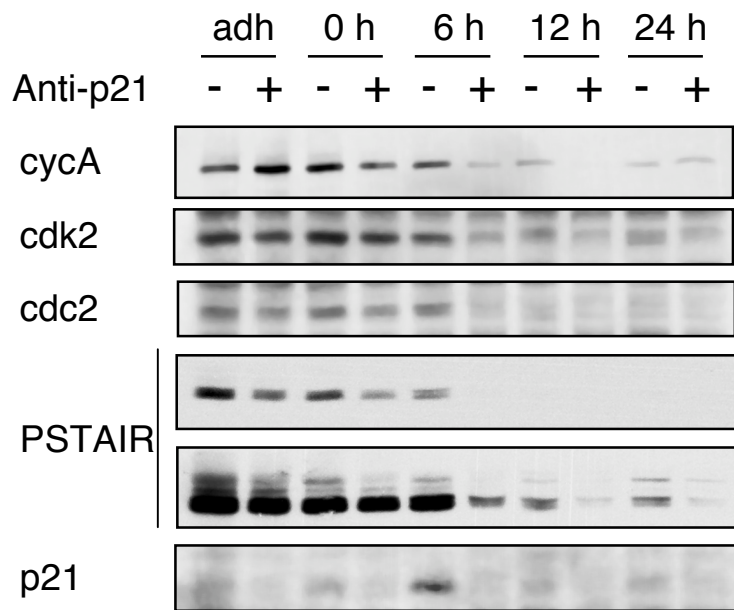


FIG 4 C - D

C cyclin A immunoprecipitation after p21 immunodepletion



D cyclin B immunoprecipitation after p21 immunodepletion

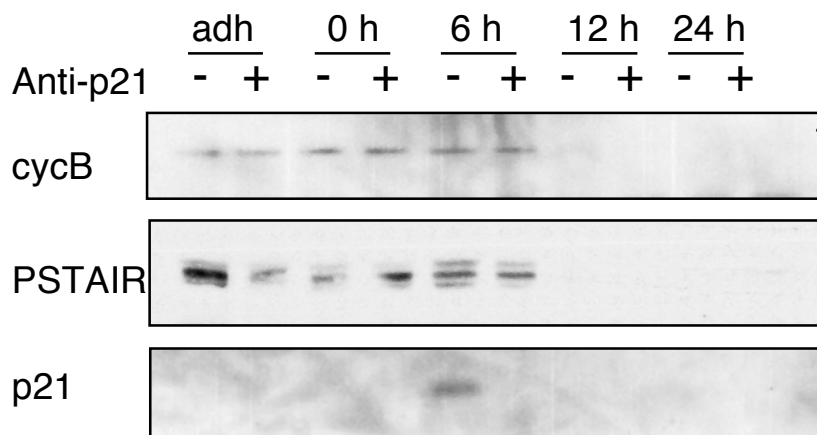


FIG 4 - E

E Cyclin E immunoprecipitation after p21 depletion

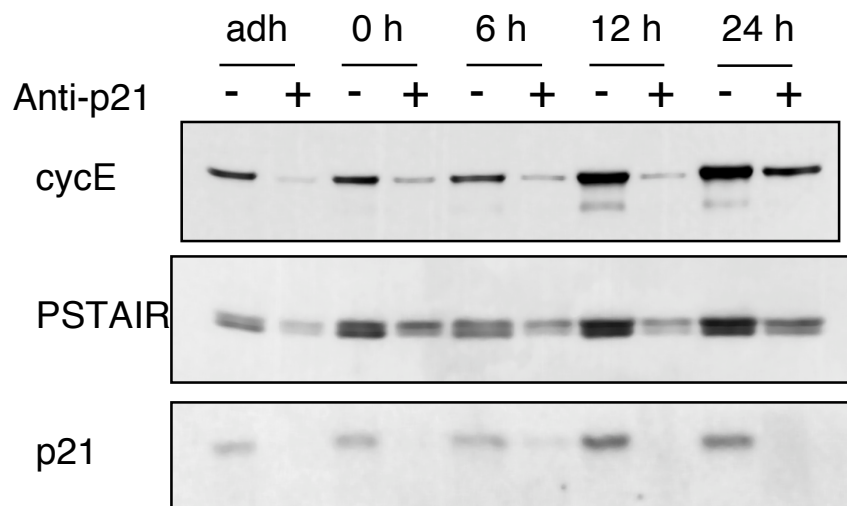
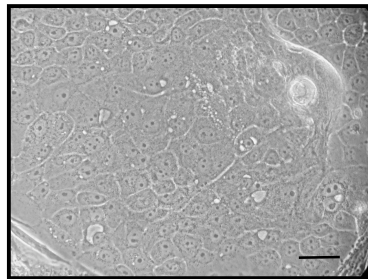
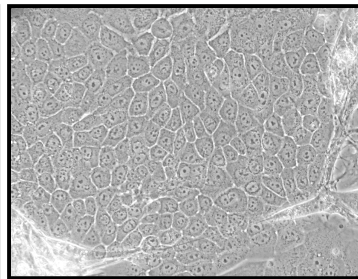


FIG 5 A

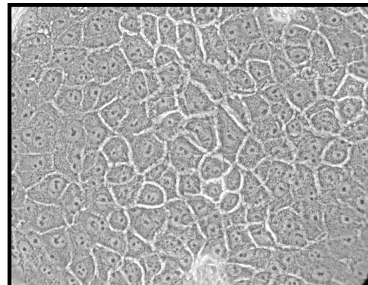
DMSO
(control)



AG555
(Cdk2 inhibitor)



Roscovitin
(Cdc2 inhibitor)



NG97
(Cdc2 inhibitor)

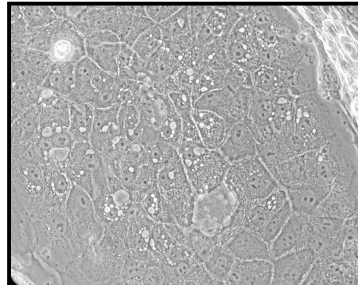
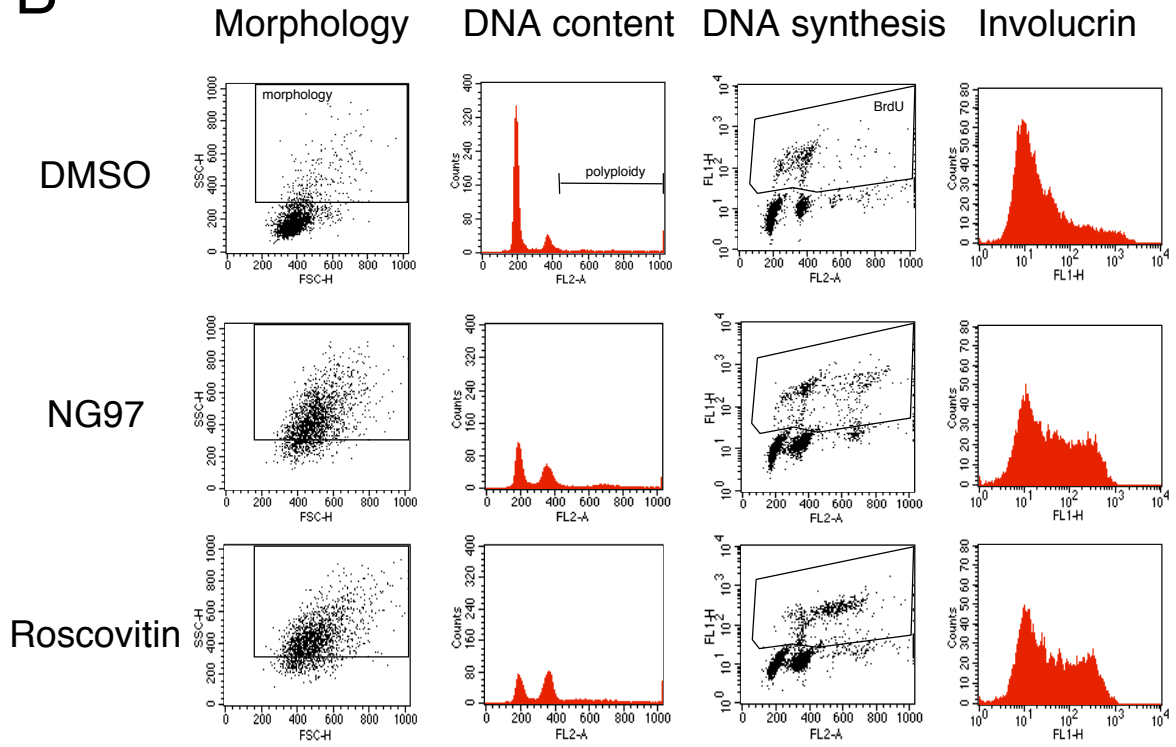


FIG 5 B - C

B



C

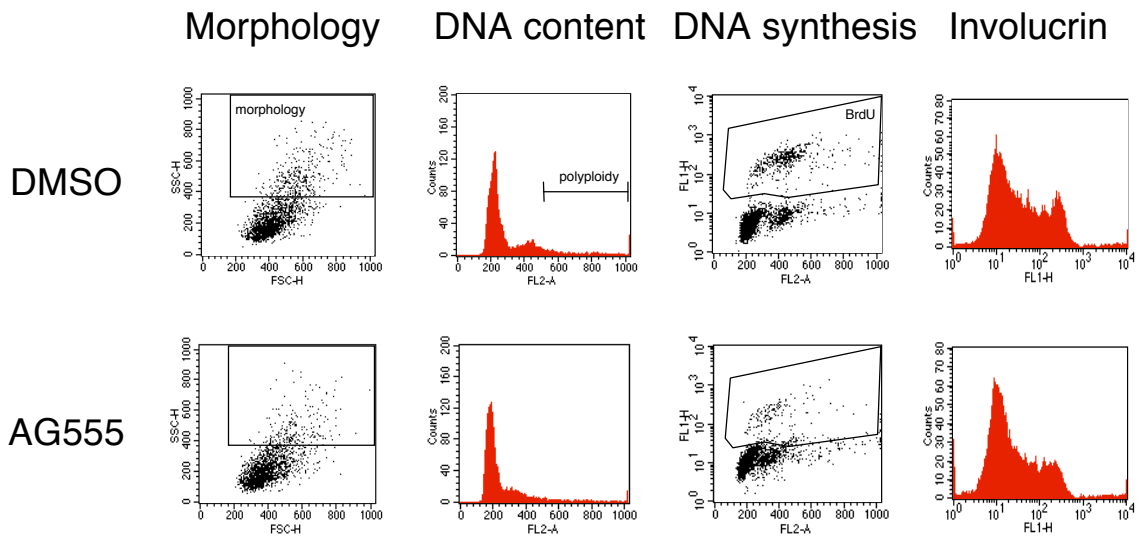
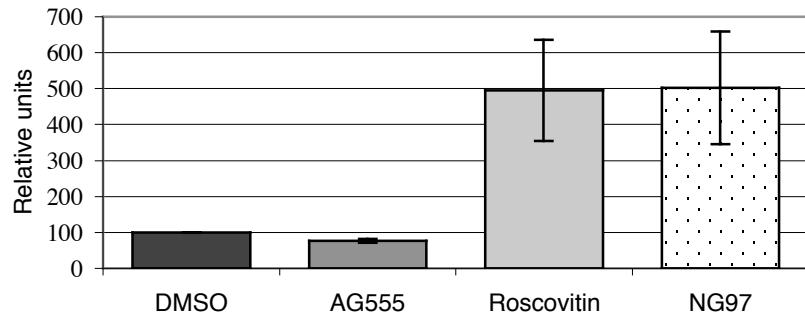
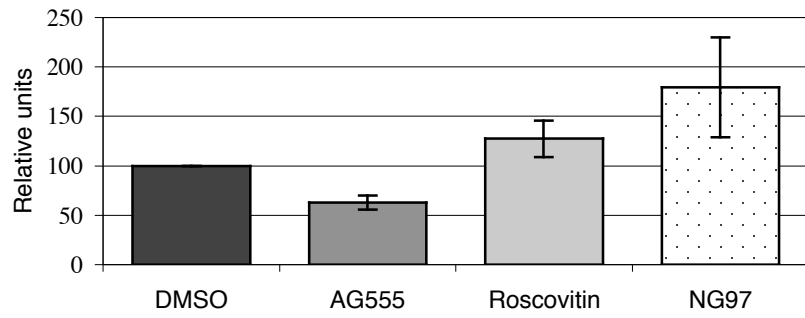


FIG 5 D

Morphology



BrdU



Polyploidy

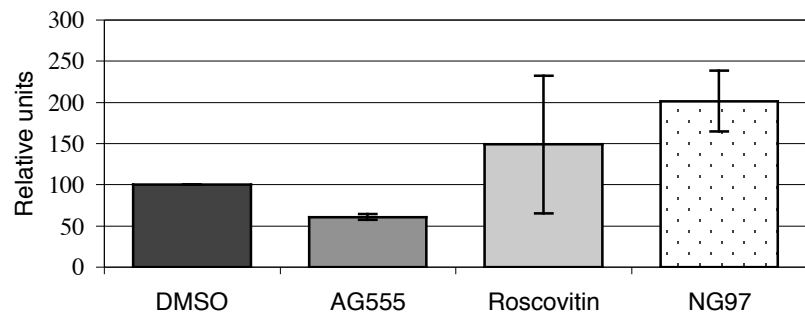
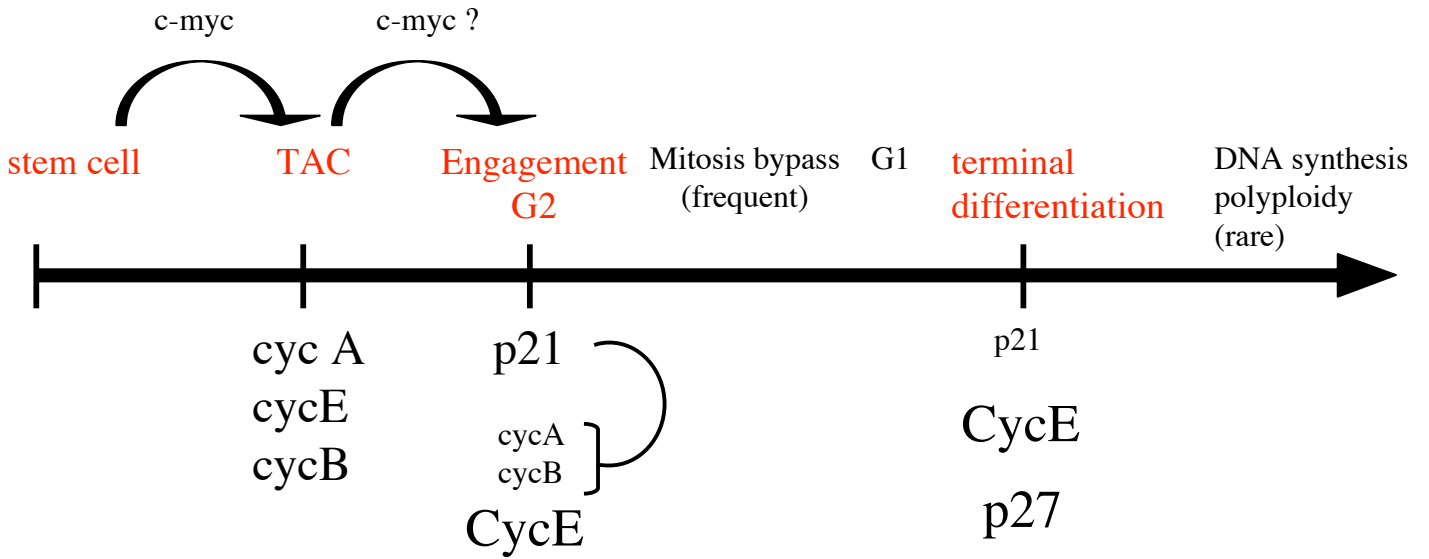


FIG 6



2.5 RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ROLE DE p21 DANS LA DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES INDUITE PAR EXPRESSION DE C-MYC

Nous avons montré qu'après induction de la différenciation des kératinocytes par mise en suspension, p21 est fortement exprimée au moment précis de l'engagement en différenciation, et inhibe alors complètement les complexes Cdk associées à la Cycline A mais aussi partiellement les complexes Cycline B/Cdc2 et Cycline E/Cdk2. Nous avons proposé que l'inhibition par p21 des complexes Cdk associées aux Cyclines A et B est suffisante pour conduire à un arrêt des kératinocytes en G2/M avec un contenu en ADN de 4N. Pour confirmer ces résultats dans un autre système, nous avons réalisé la même expérience d'immunodéplétion de p21 mais après induction de la différenciation par expression de c-Myc.

Nous pouvons constater que de la même façon qu'après mise en suspension des kératinocytes, l'expression de p21 augmente pour atteindre un pic après 3 à 5 jours d'induction de c-Myc, c'est-à-dire au moment de l'engagement en différenciation. Cet inhibiteur semble s'associer aux différentes Cyclines et Cdk présentes (figure 42A). Cependant, si l'on compare les quantités de protéines totales ou restantes après déplétion de p21, on remarque que p21 inhibe surtout les Cycline A et E (figure 42B). Néanmoins, la quantité de Cycline E non associée à p21 augmente lors du processus de différenciation alors que la quantité de Cycline A libre disparaît complètement (figure 42C et D). Ces données suggèrent que de la même façon qu'après mise en suspension, p21 inhibe majoritairement les complexes Cdk/Cycline A.

Pour conclure, l'activation de c-Myc entraîne dans un premier temps (entre 12h et 2 jours) une accumulation des Cyclines, ce qui conduit à une augmentation des activités kinases associées. Dans un deuxième temps (entre 3 et 5 jours), p21 augmente et inhibe principalement les complexes Cdk associées aux Cycline A et E, vraisemblablement pendant les derniers cycles d'amplification transitoires des cellules TAC précédant l'engagement en différenciation terminale. Finalement, l'entrée en différenciation terminale (entre 5 et 7 jours) se caractérise par l'effondrement des activités kinases associées aux Cycline A et B, dû à la diminution des expressions de ces deux Cyclines et la présence de p21 sur les complexes Cycline A/Cdk.

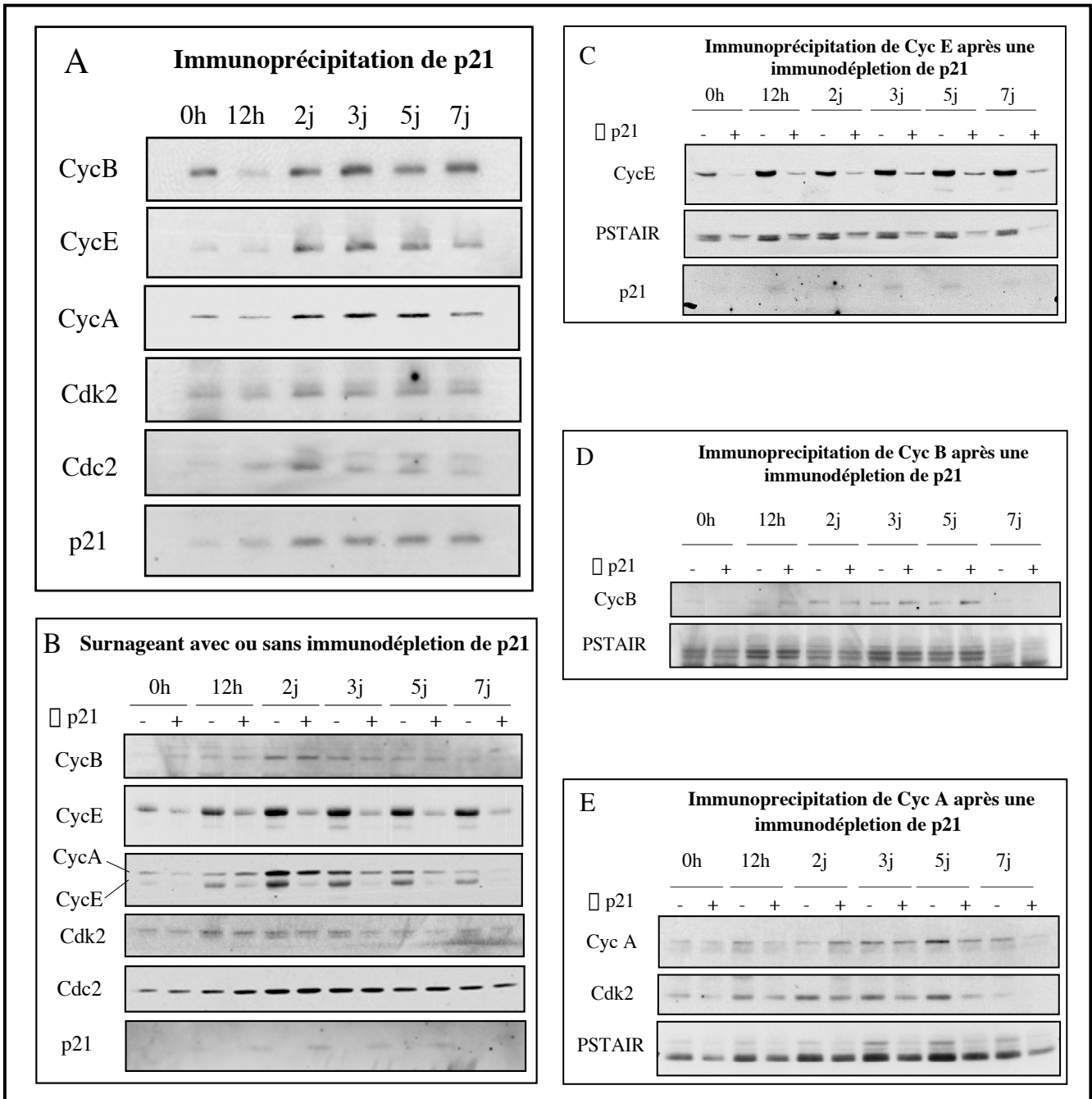


Figure 42: Rôle de p21 dans l'inhibition des complexes Cdk/Cycline au cours de la différenciation des kératinocytes induite par expression de c-Myc
 A Analyse des protéines, Cyclines et Cdk, associées à p21 au cours de la différenciation
 B Analyse des protéines, Cyclines et Cdk, présentes dans les surnageants après immunodépletion ou non de p21
 C, D, E Analyse des protéines co-immunoprécipités avec les Cyclines B, E et A après immunodépletion ou non de p21

De la même façon que pour l'induction de la différenciation après mise en suspension, ces résultats suggèrent que l'inhibition des complexes Cdk/Cyclines de G2/M permette l'accumulation des cellules en G2/M et l'entrée en différenciation terminale. Toutefois, le maintien de l'activité kinase Cycline E/Cdk2 dans les cellules différenciées suppose que ces cellules ne sont pas restées en G2/M, mais sont entrées dans un état G1 avec un contenu en ADN de 4N. Enfin, ce phénomène pourrait se prolonger par une endoréplication comme en témoigne l'apparition de kératinocytes terminalement différenciés et polyploïdes.

III. DISCUSSION

3.1 CARACTERISATION DU MECANISME DE REPRESSION DE LA CYCLINE A AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

Nos résultats nous ont permis de mieux caractériser les mécanismes de répression de la cycline A. Nous avons montré que la régulation de la transcription de la cycline A est associée à la structure nucléosomale de son promoteur proximal. Nous avons également mis en évidence le rôle essentiel joué par la protéine Brm, appartenant au complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, dans le mécanisme de répression de la cycline A.

Nous proposons que le mécanisme de répression du gène de la cycline A dépende de la présence de deux nucléosomes positionnés au niveau des sites d'initiation de la transcription. Le modèle le plus couramment utilisé pour expliquer ce phénomène est que les nucléosomes limitent l'accès de facteurs d'initiation de la transcription à l'ADN par le simple fait d'un encombrement stérique. Ce mécanisme a été proposé pour la répression transcriptionnelle dans d'anciens travaux d'Imbalzano (Imbalzano *et al.*, 1994). Nous avons également démontré que Brm, une sous unité catalytique des complexes SWI/SNF, est recrutée sur les sites répresseurs CHR-CCRE du promoteur de la cycline A lorsqu'il est inactif. De plus, l'absence de Brm lève la répression du gène de la cycline A dans les cellules quiescentes. Il est intéressant à noter que les complexes SWI/SNF ont d'abord été caractérisés comme des activateurs transcriptionnels (Sudarsanam *et al.*, 2000). Depuis, les complexes SWI/SNF ont été impliqués dans la répression de plusieurs gènes : c-fos (Murphy *et al.*, 1999), les gènes cibles des E2F (Trouche *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000), la cycline D1 (Zhang *et al.*, 2002). Plusieurs mécanismes ont alors été envisagés. Tout d'abord, les complexes SWI/SNF ont la capacité de remodeler les nucléosomes en deux états, un état dit normal inactif et un état dit remodelé actif, avec une même efficacité (Schnitzler *et al.*, 1998). Par conséquent, les complexes SWI/SNF pourrait conférer la répression *in vivo* en créant un état nucléosomal inactif au niveau du promoteur. Toutefois, les complexes SWI/SNF pourraient également faciliter le recrutement de répresseurs via leur activité de remodelage en rendant l'ADN accessible. Enfin, les complexes SWI/SNF pourraient permettre la répression par un mécanisme indépendant de leur activité connue de remodelage de la chromatine, par exemple en favorisant des modifications covalentes des histones. Dans le cas de la répression

de la cycline A, il semble peu probable que Brm permette le recrutement de répresseurs car le promoteur réprimé est dans un état nucléosomal inactif, fermé. Nous proposons donc que Brm permette de positionner et de maintenir la structure nucléosomale répressive du promoteur en quiescence. De plus, nous avons montré que l'activité de remodelage de la chromatine de Brm est nécessaire pour restaurer la répression de la cycline A dans les cellules *brm*^{-/-}. Par conséquent, le premier modèle semble correspondre le mieux à la situation du promoteur de la cycline A. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs de remodelage de la chromatine soient impliqués dans la répression de la cycline A et que des modifications covalentes particulières des histones soient requises pour l'établissement de cette structure répressive. Par ailleurs, les complexes SWI/SNF ont été purifiés avec des protéines à activité histone déacétylases comme les HDAC1 et 2 (Sif *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que la répression de la cycline E fait intervenir les complexes SWI/SNF-HDAC (Zhang *et al.*, 2000). Cependant, il a été observé que la répression de la cycline A était indépendante de l'activité HDAC bien que le promoteur inactif soit déacétylé, car en présence d'inhibiteurs d'HDAC le gène est toujours réprimé (Siddiqui *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). La répression de la cycline A ne dépend également, ni de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, ni de la méthylation de l'ADN puisque les lysines 9 des histones H3 du promoteur de la cycline A ne sont pas méthylées et que le 5-Aza-2-déoxycytidine qui bloque la méthylation de l'ADN ne lève pas la répression de la cycline A (Siddiqui *et al.*, 2003). Pourtant, ces deux modifications sont impliquées dans la répression d'autres gènes et certaines protéines qui s'associent à ces modifications peuvent interagir avec les complexes SWI/SNF. Par exemple, les méthylations des lysines 9 de certaines histones H3 du promoteur de la cycline E, catalysées par la méthyltransférase SuvarH1, sont essentielles pour la répression du gène de la cycline E en G0/G1 (Nielsen *et al.*, 2001). Ces modifications sont reconnues par la protéine HP1 qui interagit avec les complexes SWI/SNF (Nielsen *et al.*, 2002) ou des histones déacétylases (Nielsen *et al.*, 1999) pour réprimer la transcription. D'autres part, il a été mis en évidence que la méthylation de l'ADN pouvait être corrélée à une inactivation transcriptionnelle (Razin and Riggs, 1980), par exemple le "silencing" du gène p16 dans les cellules cancéreuses humaines (Merlo *et al.*, 1995). Récemment, il a montré que certaines protéines qui se liaient à l'ADN méthylé (MeCP2 et MBD2) recrutait des complexes à activité déacétylase comme Sin3/HDAC (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998) et NuRD/Mi2/NRD (Zhang *et al.*, 1999) qui étaient nécessaires à la répression de la transcription. Or, ces deux complexes sont également capables d'interagir avec les complexes SWI/SNF (Pal *et al.*, 2003; Shimono *et al.*, 2003). Pour conclure, de nombreuses modifications des histones sont impliquées dans la répression

transcriptionnelle et peuvent recruter des complexes associés aux SWI/SNF. Néanmoins, dans le cas de la répression de la cycline A ni la déacétylation des histones H3 et H4, ni la méthylation de la lysine 9 des histones H3, ni la méthylation de l'ADN ne semblent requises. Cependant, il se pourrait que d'autres modifications des histones soient impliquées notamment la méthylation des arginines des histones par PRMT5 qui est nécessaire pour la répression de la cycline E et de *cad*, un gène cible de *c-Myc* (Fabrizio *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2003). De plus, le mécanisme de répression de *cad* met en jeu un complexe contenant les SWI/SNF (Pal *et al.*, 2003). Mais de nombreuses autres modifications impliquées dans la répression des gènes pourront également être testé par immunoprécipitation de la chromatine sur des cellules quiescentes. Ainsi, nous pourrions en déduire si la structure nucléosomale répressive de la cycline A dans les cellules quiescentes est uniquement le fruit de Brm.

Lorsque les cellules ré-entrent dans le cycle cellulaire, le promoteur de la cycline A devient beaucoup plus sensible à la digestion à la micrococcal suggérant que les nucléosomes ont été retirés ou bien que l'ADN est partiellement relaxés autour des nucléosomes. Il semble que la première hypothèse soit la plus probable car après une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti histone H4, on observe une diminution de signal du promoteur proximal en fin de G1 quand le gène est activé par rapport à la fraction de cellules quiescentes correspondant au gène inactif. Par ailleurs, nous n'avons pas remarqué de déplacement de ces deux nucléosomes sur la région du promoteur étudiée. De façon intéressante, ces trois mécanismes, enlèvement/déplacement/relaxation, ont été décrits *in vitro* (Aalfs and Kingston, 2000; Flaus and Owen-Hughes, 2001; Narlikar *et al.*, 2002). De plus, ces mécanismes permettent d'expliquer comment la transcription est activée puisqu'ils rendent l'ADN, au niveau de certaines régions, plus accessible pour le recrutement d'activateurs de la transcription ou de facteurs du complexe de préinitiation de la transcription (Imbalzano *et al.*, 1994).

On peut se demander, d'autre part, si des complexes de remodelage de la chromatine sont nécessaires pour activer la transcription de la cycline A et donc retirer/déplacer/relâcher ces deux nucléosomes positionnés. En effet, plusieurs travaux ont montré que les complexes de remodelage de la chromatine avaient la propriété de retirer/déplacer/relâcher des nucléosomes (Aalfs and Kingston, 2000; Narlikar *et al.*, 2002) rendant les sites d'initiation de la transcription accessible aux activateurs ou aux facteurs d'initiation de la transcription (Burns and Peterson, 1997; Cote *et al.*, 1994; Imbalzano *et al.*, 1994). En particulier, Brg1 qui s'associe au promoteur de la cycline A dans des cellules en croissance exponentielle pourrait

être impliqué dans l'activation de la transcription de la cycline A (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003). De la même façon, l'activation de nombreux promoteurs a été corrélée avec des méthylations, des acétylations ou des phosphorylations des histones (Introduction 1.2.3). Il paraît donc intéressant d'étudier si les histones des deux nucléosomes subissent des modifications avant d'être retirés. Après synchronisations des cellules (privation de sérum/relâchement), il sera possible de déterminer par immunoprécipitation de la chromatine s'il existe des modifications des deux nucléosomes présents sur le promoteur de la cycline A, précédant leur enlèvement. Notamment, il a été mis en évidence que les complexes SWI/SNF et les histones acétyltransférases (HAT) interviennent dans l'activation de plusieurs gènes dont PHO5, PHO8 et HO chez la levure (Cosma *et al.*, 1999; Reinke and Horz, 2003). Cependant, plusieurs mécanismes semblent possibles. Pour le promoteur PHO8, l'absence de l'un ou l'autre des complexes conduit à l'absence de remodelage (Gregory *et al.*, 1999). À l'inverse, le promoteur de PHO5 est dans un état ouvert lorsque les HAT ou SWI/SNF sont absents bien que le remodelage soit plus lent (Gaudreau *et al.*, 1997; Gregory *et al.*, 1998). Pourtant, dans les deux cas, il a été montré que l'acétylation des histones précède l'enlèvement des nucléosomes. D'autre part, alors que pour l'activation de PHO5 et dans d'autres cas, l'hyperacétylation a lieu en absence de l'activité de remodelage des SWI/SNF (Reinke *et al.*, 2001; Syntichaki *et al.*, 2000), l'hyperacétylation du promoteur HO requière le recrutement préalable des complexe SWI/SNF (Cosma *et al.*, 1999). Ces données suggèrent qu'au moins deux types de mécanismes existent (Narlikar *et al.*, 2002). Les histones acétyltransférases pourraient stabiliser les interactions des SWI/SNF avec leur cible et directement affectées l'activité de remodelage des complexes SWI/SNF (Hassan *et al.*, 2001) ou bien le remodelage de la chromatine induit par les complexes SWI/SNF pourrait augmenter l'accessibilité des extrémités amino-terminales des histones aux histones acétyltransférases.

Nous trouvons que Brm est recrutée sur le promoteur de la cycline A aux niveaux des sites répresseurs CCRE et CHR dans des cellules quiescentes. Nos résultats confirment d'autres travaux qui montrent que Brm est associée au promoteur de la cycline A dans des cellules en différenciation ou arrêtées par surexpression de l'inhibiteur de Cdk, p16 (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003). Cependant, nous n'avons pas pu détecter Brm sur le promoteur de la cycline A dans des cellules en croissance exponentielle. On peut alors se demander si les mécanismes de répression mis en jeu en G0, sur des cellules quiescentes et en début G1 sur des cellules en prolifération sont identiques. Le mécanisme de répression de la cycline A en début de G1 pourrait impliquer Brg1 qui peut être recruté sur le promoteur de la cycline A

dans des cellules en croissance exponentielle (Dahiya *et al.*, 2001; Kadam and Emerson, 2003). De plus, le niveau d'expression de Brm est élevé dans des cellules arrêtées en G0 ou en différenciation mais relativement faible dans des cellules en croissance exponentielle alors que Brg1 est abondant tout au long du cycle cellulaire (Muchardt *et al.*, 1998). Il serait donc intéressant d'analyser si Brm ou Brg1 est présent sur le promoteur de la cycline A sur une population homogène de cellules en G1 obtenue par élutriation, par exemple.

Il semble maintenant établi que les complexes SWI/SNF sont dirigés sur certains promoteurs via leurs interactions avec des activateurs ou des répresseurs de la transcription. Par exemple, dans le cas du promoteur HO, les complexes SWI/SNF sont recrutés par l'activateur swi5 (Cosma *et al.*, 1999). Il a été démontré que plusieurs activateurs interagissent directement avec les complexes SWI/SNF et que ces interactions sont nécessaires pour le recrutement du complexe SWI/SNF sur les promoteurs (Yudkovsky *et al.*, 1999). De la même manière, il a été observé que les répresseurs Hir1/Hir2 interagissent avec les complexes SWI/SNF et que cette association est nécessaire à la répression de la transcription du gène des histones de la levure HTA1-HTB1 (Dimova *et al.*, 1999). D'autres connexions entre les complexes SWI/SNF et des répresseurs transcriptionnels ont été mises en évidence. Notamment, les protéines Brm et Brg1 peuvent interagir avec les protéines de la famille de pRb qui répriment les gènes cibles des E2F (Dunaief *et al.*, 1994; Trouche *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a également été publié que la répression de la cycline A impliquait pRb et les complexes SWI/SNF (Siddiqui *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). De plus, les MEF Rb *-/-* mais pas p107 *-/-* et p130 *-/-* ne sont plus capables de réprimer la cycline A dans des cellules quiescentes, indiquant que pRb est bien essentiel dans la régulation du gène de la cycline A (Philips *et al.*, 1998). Enfin, notre équipe a mis en évidence qu'un site CCRE fonctionnel est nécessaire à la répression de la cycline A par pRb. Or, nous avons également démontré que les deux sites répresseurs CCRE et CHR du promoteur de la cycline A sont nécessaires pour le recrutement de Brm et pour maintenir la structure nucléosomale inactive dans les cellules quiescentes. Toutes ces données suggèrent fortement que Brm est recrutée sur les sites CCRE et CHR via son interaction avec la protéine pRb pour réprimer la cycline A dans les cellules quiescentes. Cependant, pRb n'a pas la propriété de se fixer à l'ADN et il n'a jamais été clairement établi que le promoteur de la cycline A renferme un site E2F. Certains auteurs ont proposé que E2F4 pourrait y être recruté mais d'autres équipes n'ont jamais été capables de confirmer ces résultats (Rayman *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2000; Weinmann *et al.*, 2002). Par conséquent, il serait intéressant de déterminer clairement la nature du complexe

régulateur de la cycline A. Toutes les approches effectuées jusqu'à maintenant pour tenter de déterminer les facteurs se liant au CCRE et au CHR ont échoué. Les tentatives d'isolation par fractionnement protéique, et liaison sur un oligonucléotide portant les séquences CCRE et CHR ont conduit à une impasse. La découverte de nucléosomes situés sur ces sites en phase G0/G1, nous a permis d'envisager d'autres approches. Sachant que ces sites ne sont occupés *in vivo* qu'en G0/G1, nous avons émis l'hypothèse qu'une conformation topologique de type nucléosome était nécessaire à la reconnaissance et à la liaison des sites CCRE et CHR par les facteurs protéiques. C'est en reconstituant un nucléosome, immobilisé sur des billes magnétiques, incubées avec un extrait protéique de cellules quiescentes que nous avons pu détecter par western blot le recrutement de Brm et non Brg 1 sur le promoteur inactif de la cycline A. Il convient maintenant de poursuivre ce travail en déterminant par spectrométrie de masse les autres protéines retenues sur cette séquence d'ADN portant les sites CCRE et CHR. Ceci permettrait d'identifier le complexe répresseur liant la séquence CHR-CCRE. Nous pourrions alors envisager de déterminer le rôle exact de pRb et des E2F dans ce mécanisme de répression. Enfin, la même approche pourra être utilisée mais avec des extraits de cellules synchronisées en G1 afin de déterminer si Brm ou Brg1 ou encore d'autres protéines sont nécessaires pour la répression de la cycline A en début de G1. Ainsi, il sera possible de savoir si le même complexe de répression intervient en G0 et en G1 ou si les deux mécanismes sont différents. Pour valider l'hypothèse que ces facteurs sont bien présents *in vivo* sur le promoteur de la cycline A, il sera important de réaliser le même type d'expérience que pour la protéine Brm. On pourra par exemple envisager d'inactiver le gène intéressant par la technique de RNAi et d'analyser la structure du promoteur de la cycline A ainsi que son activité transcriptionnelle en fonction du cycle cellulaire.

3.2 LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LA CROISSANCE CELLULAIRE

Les complexes SWI/SNF sont impliqués dans le remodelage de la chromatine lors de l'activation ou la répression de la transcription de certains gènes. À l'intérieur de ces complexes, Brm et Brg1 sont mutuellement exclusifs ; ce sont eux qui affectent la structure nucléosomale en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (Martens and Winston, 2003). Pour caractériser les fonctions spécifiques de Brm et de Brg1 et plus généralement des complexes SWI/SNF chez les mammifères, les gènes *brm* ou *brg1* ont été inactivés par recombinaison homologe chez la souris. Contrairement aux souris *brg1* *-/-* qui présentent une

létalité embryonnaire (Bultman *et al.*, 2000; Sumi-Ichinose *et al.*, 1997), les souris *brm*^{-/-} se développent normalement (Reyes *et al.*, 1998). Il a donc été proposé que Brg1, dont l'expression est augmentée dans les souris *brm*^{-/-}, pouvait remplacer Brm dans les complexes SWI/SNF (Reyes *et al.*, 1998). Cependant, leurs profils d'expression sont très différents. Tandis que le niveau d'expression de Brm est élevé dans des cellules arrêtées en G0 ou en différenciation et relativement faible dans des cellules en croissance exponentielle, Brg1 est abondant tout au long du cycle cellulaire (Muchardt *et al.*, 1998). De plus, les fibroblastes issus des souris *brm*^{-/-} paraissent proliférer plus vite que les sauvages (Reyes *et al.*, 1998). Ces derniers résultats suggéraient qu'effectivement des fonctions de Brm ne peuvent pas être compensées par Brg1. En particulier, au niveau du contrôle du cycle cellulaire, la répression du gène cycline A en quiescence ne peut pas être palliée par l'expression de Brg1. D'autres part, les souris adultes *brm*^{-/-} sont 15% plus grosses que leurs homologues sauvages (Reyes *et al.*, 1998). Il a été suggéré que cette augmentation en masse était due à une augmentation de la capacité à proliférer, mais la taille des fibroblastes issus des souris *brm*^{-/-} n'avait pas été étudiée. Nous avons montré les cellules *brm*^{-/-} sont plus volumineuses que les cellules *brm*^{+/+} en phase G0 et G1 du cycle cellulaire. Cependant, cette différence de taille est perdue lorsque les cellules atteignent les phases S et G2/M. Ces résultats suggèrent que la taille accrue des souris dépourvues de *brm* soit due à la conjonction d'une vitesse de réplication plus élevée des cellules et d'une augmentation de taille des cellules en quiescences. Nous montrons, de plus, que le proto-oncogène *c-Myc* n'est plus réprimé en absence de sérum dans les fibroblastes dépourvus de *brm*, or *c-Myc* est un important régulateur de la croissance cellulaire. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif de *c-Myc* chez la drosophile ou l'inactivation mono-allélique de *c-myc* chez la souris aboutit à l'obtention d'individus plus petits (Gallant *et al.*, 1996; Schreiber-Agus *et al.*, 1997; Trumpp *et al.*, 2001). De plus, la transcription de *c-myc* est réprimée dans des cellules quiescentes alors qu'elle est activée dès l'ajout de facteurs de croissance. Il est intéressant ici de mettre en parallèle la dérégulation de *c-myc* et de la cycline A dans les cellules *brm*^{-/-} privées de sérum. Il serait en effet tentant de penser que la répression des deux gènes en quiescence passe par les mêmes mécanismes et les mêmes complexes SWI/SNF contenant Brm. Pourtant, les expériences de transfections transitoires de vecteurs codant pour Brm ou un mutant de Brm dans le site de liaison de l'ATP avec les constructions *cycALuc* et *mycLuc* dans les cellules *brm*^{-/-} semblent démontrer que les mécanismes seraient plutôt différents. Alors que le mutant Brm-NTP n'est plus capable de réprimer le gène de la cycline A, il peut toujours restaurer la répression du gène *c-myc*. Ces résultats suggèrent que l'activité de remodelage de la chromatine de la protéine Brm n'est pas

nécessaire pour la répression du gène *c-myc* à l'inverse du gène de la cycline A. Il serait intéressant dans une deuxième étape de vérifier si cette présence est nécessaire à la répression du gène. Une première expérience préliminaire, nous a déjà permis de vérifier que Brm est recrutée au niveau du promoteur de *c-myc* dans des cellules quiescentes. De plus, il faudra identifier les séquences requises au recrutement de Brm et regarder l'effet de leur mutation sur l'expression du gène. Si la présence de Brm s'avère indispensable, on peut supposer que, dans ce cas, Brm pourrait recruter ou activer d'autres complexes impliqués dans le remodelage de la chromatine. En particulier, il a été démontré que les complexes SWI/SNF interagissent avec des enzymes modifiant covalentement les histones comme les HDAC (Zhang *et al.*, 2000), des méthyltransférases (SuvarH1 et PRMT5) (Pal *et al.*, 2003; Shimono *et al.*, 2003) qui peuvent inhiber la transcription de certains gènes. Ensuite, il serait intéressant d'analyser la structure nucléosomale du gène *c-myc* au cours du cycle cellulaire et en particulier après un arrêt du cycle par privation de sérum et relâchement, dans des cellules sauvages et des cellules *brm* *-/-*. Ainsi, on pourra déterminer si la répression de *c-myc* requière un remodelage de la chromatine du promoteur comme dans le cas de la cycline A. Par ailleurs, il a déjà été publié que les structures nucléosomales des promoteurs *c-myc* actif et inactif sont différentes. La position des différents nucléosomes a aussi été déterminée (Albert *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 2001; Pullner *et al.*, 1996). Il semble que quatre nucléosomes de *c-myc* peuvent être retirés/déplacés/relaxés : le premier est très en amont du promoteur P0, le deuxième juste en amont du P0 et les deux derniers sont sur le promoteur P1. Ces données suggèrent qu'il existe différents modes de répression pour les différents promoteurs. Par conséquent, il paraît très probable que la répression de *c-myc* en G0/G1 fasse intervenir le même mécanisme de répression de la transcription que la cycline A à la différence que la modification de la structure nucléosomale du promoteur *c-myc* requière une autre activité enzymatique de remodelage que Brm.

D'autre part, il a été montré que le promoteur de *c-myc* possède un site E2F qui, en recrutant pRb, réprime la transcription de *c-myc* (Albert *et al.*, 2001). Enfin, les HDAC semble jouer un rôle important dans le mécanisme de répression de *c-myc* (Albert *et al.*, 2001) car les inhibiteurs de HDAC lèvent la répression du gène. Il est donc possible que la répression de *c-myc* fasse intervenir les complexes SWI/SNF-pRb-HDAC, comme il a été proposé pour le mécanisme de répression de la cycline E, Plk1 (Gunawardena *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2000). Par contre, les HDAC ne sont pas impliqués dans le mécanisme de répression de la cycline A. On peut alors suggérer que dans le cas de *c-myc*, le mécanisme de répression est associé à un remodelage de la chromatine dépendant de modifications covalentes des histones

et particulièrement de déacétylations et non pas directement des complexes SWI/SNF. Ces derniers seraient nécessaires pour l'activité des HDAC, par exemple, comme il a été proposé dans la dernière publication de l'équipe de Knudsen (Gunawardena *et al.*, 2004). Pour déterminer si les complexes SWI/SNF influencent l'activité des déacétylases (HDAC), nous pourrions analyser le niveau d'acétylation des histones H4 sur le promoteur de c-myc. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-H4 acétylés réalisées sur des cellules *brm*^{-/-} et *brm*^{+/+} arrêtées en absence de sérum, en parallèle, permettraient de comparer le niveau d'acétylation du promoteur. Enfin, pour caractériser le rôle de l'activité des HDAC sur la répression de c-myc par les complexes SWI/SNF, nous pourrions transfecter des cellules *brm*^{-/-} avec la construction mycLuc et un vecteur d'expression codant pour Brm en présence ou non d'inhibiteurs des HDAC. Toutes ces données pourront permettre de mieux comprendre les mécanismes de répression de c-myc conduits par Brm.

3.3 LE FACTEUR DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE BRM ET LE CYCLE CELLULAIRE

Des travaux effectués dans des cellules de mammifères ont conduit à placer les complexes SWI/SNF au centre des mécanismes de régulation du cycle cellulaire. En effet, Brm et Brg1 interagissent avec les protéines du Rétinoblastome qui assurent la répression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (Muchardt and Yaniv, 2001). De plus, Brm et Brg1 présentent des mutations ou des dérégulations dans certaines lignées cellulaires issues de tumeurs humaines (Cho *et al.*, 2004; Klochendler-Yeivin *et al.*, 2002; Muchardt and Yaniv, 2001). En outre, il a été démontré que des cellules transformées par ras n'expriment plus la protéine Brm (Muchardt *et al.*, 1998). L'expression de Brm dans ces cellules est d'ailleurs suffisante pour conduire à la réversion du phénotype. Enfin, la surexpression de Brm ou Brg1 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, les cellules présentent un phénotype particulier, elles deviennent volumineuses et aplaties comme des cellules sénescents (Strober *et al.*, 1996).

Pour mieux comprendre les fonctions de Brm au sein des complexes SWI/SNF dans le contrôle de la prolifération, nous avons comparé la progression dans le cycle cellulaire des cellules *brm*^{-/-} et *+/+*. Nous avons observé que les cellules *brm*^{-/-} présentent de nombreuses dérégulations au niveau de l'expression de protéines du cycle cellulaire comme les Cyclines E et A et les protéines de la famille de pRb. Ces dérégulations conduisent à un cycle cellulaire légèrement plus rapide et à l'apparition d'instabilité génomique qui pourraient être à l'origine

des cancers. De façon intéressante, les cellules *brm* $-/-$ ne semblent pas ré-entrer plus rapidement dans le cycle cellulaire et en particulier en phase S. Pourtant, il avait été publié que la surexpression de la Cycline A suffit à accélérer la phase G1 (Resnitzky *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1995). Nous suggérons que les inhibiteurs de Cdk, p27 et p21, associés à la cycline A évitent une activation prématurée des complexes Cycline A/Cdk et donc une entrée trop précoce dans le cycle cellulaire. En effet, les pics d'activités des complexes Cycline A/Cdk dans les cellules *brm* $-/-$ et $+/+$ ont lieu en même temps. Néanmoins, on peut noter une activité kinase associée à la Cycline A non négligeable 6 heures après le relâchement dans les cellules *brm* $-/-$. Cependant, cette activité kinase ne semble pas suffisante pour induire l'entrée des cellules *brm* $-/-$ en phase S. Le niveau d'expression des CKI suffit donc pour contrecarrer la surexpression modérée de la Cycline A dans les cellules dépourvues de *brm*. La sortie de quiescence dépend également de l'activité kinase de la Cycline E. On peut donc penser que les cellules *brm* $-/-$ ne rentrent pas plus vite dans le cycle car l'activité kinase de la Cycline E n'est pas dérégulée. Mais, au contraire, les cellules *brm* $-/-$ présentent aussi une expression précoce de la Cycline E. Pourtant, comme pour la Cycline A, l'activité kinase associée à la Cycline E est maximale en même temps dans les cellules *brm* $-/-$ et *brm* $+/+$, bien qu'une activité kinase non négligeable soit aussi observable 6 heures après le relâchement. En conclusion, alors que les expressions des Cycline E et A sont dérégulées dans les cellules *brm* $-/-$, la régulation des activités kinases semble correcte grâce à l'intervention des CKI, p21 et p27. Ces CKI semblent donc jouer un rôle important pour éviter une entrée en phase S prématurée.

D'autre part, nous avons montré que les cellules *brm* $-/-$ traversent plus rapidement la phase S. Les complexes SWI/SNF sont connus pour pouvoir interagir avec les "pocket" protéines et il a déjà été démontré que ces complexes peuvent réguler l'expression de plusieurs gènes cibles des E2F comme la cycline A, la cycline E et *cdc2* (Zhang *et al.*, 2000). Comme de nombreux gènes cibles des E2F sont des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN, notamment des protéines du complexe pré-RC (*Orc*, *Mcm*, *Cdc6*) et la polymérase α (Ren *et al.*, 2002; Stevaux and Dyson, 2002), on peut tout à fait envisager que la surexpression de plusieurs de ces protéines contribue à accélérer la phase S. Il est possible que ceci conduise en augmentant le nombre de complexes pré-RC sur l'ADN et donc le nombre d'origines de réplication allumées. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en comparant par immunofluorescence ou par western blot la quantité de protéines des pré-RC fixée sur la chromatine dans des cellules *brm* $-/-$ et $+/+$ synchronisées en phase S (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Cependant, des effets plus

globaux sur la structure de la chromatine pourraient également avoir des conséquences sur la vitesse de progression en phase S. Par ailleurs, de nombreuses observations indiquent que l'activité des origines chez la levure est régulée par un effet de positionnement dans le noyau qui ressemble aux effets de positionnement médiés par la chromatine, sur la régulation de la transcription. Des expériences de relocalisation d'origines ont montré que certaines régions chromosomiques imposent un retard ou un avancement dans l'activation des origines, c'est-à-dire des origines tardives peuvent être activées en même temps que des origines précoces ou inversement (Fangman and Brewer, 1992; Ferguson *et al.*, 1991; Ferguson and Fangman, 1992). Mais, la relocalisation des origines peut également avoir un effet sur l'efficacité d'activation des origines; par exemple une origine active peut devenir inactive (Fangman and Brewer, 1992; Sharma *et al.*, 2001). Certaines régions chromosomiques contiennent des séquences, agissant en cis, qui recrutent les protéines chromatiniennes SIR, incluant l'histone déacétylase SIR2 et la protéine SIR3 (Rusche *et al.*, 2003). Cette protéine établie une structure chromatinienne complexe qui réprime la transcription de gènes à l'intérieur de certaines régions. De la même façon, cette structure hétérodimérique peut retarder ou bloquer l'activation des origines de réplication. Par exemple, la délétion de SIR3 entraîne une initiation de la réplication précoce à l'intérieur d'éléments subtélomériques, mais n'affecte pas l'initiation de la réplication d'origines tardives placées plus à l'intérieure (Stevenson and Gottschling, 1999). Quant à la mutation de SIR2, elle augmente l'efficacité d'origines placées à l'intérieur de l'ADN ribosomal ce qui renforce l'idée suggérant l'existence d'un lien entre la modification des histones et le fonctionnement des origines de réplication. En effet, depuis ces dernières années, il a été établi que les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle dans la régulation de la transcription, et récemment des travaux indiquent que ces modifications pourraient aussi avoir un rôle dans l'activation des origines. Notamment, l'état d'acétylation des histones entourant les origines de réplication semble affecter le moment de leur activation pendant la phase S, une augmentation du niveau d'acétylation avancerait temporellement l'activation de l'origine. Les données qui ont conduit à émettre cette hypothèse proviennent de l'étude du rôle de l'histone déacétylase Rpd3 chez la levure. La délétion de Rpd3 entraîne un changement global dans le niveau d'acétylation des histones et d'ARNm, confirmant l'importance de ces modifications dans la régulation de la transcription. En particulier, l'état d'acétylation de nombreuses régions chromatiniennes intergéniques augmente (Robyr *et al.*, 2002), et par conséquent le niveau d'acétylation autour de nombreuses origines de réplication augmente également (Vogelauer *et al.*, 2002). De façon surprenante, le moment d'activation de chacune de ces origines devient plus précoce dans les cellules

dépourvues de Rpd3 et le temps d'avancement corrèle à l'augmentation du niveau d'acétylation. Récemment, il a été montré que la délétion de Rpd3 conduit uniquement à une activation précoce des origines tardives au niveau de loci chromosomiques internes, mais elle n'altère pas l'initiation des origines précoces ou très tardives, des origines proximales des télomères (Aparicio *et al.*, 2004). En plus des modifications des histones, le positionnement et le déplacement des nucléosomes, ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP, qui ont la propriété de déplacer et altérer la structure des nucléosomes, jouent un rôle important dans la régulation de la transcription. Actuellement, plusieurs études suggèrent que le positionnement des nucléosomes pourrait aussi réguler l'activité des origines (Lipford and Bell, 2001; Simpson, 1990; Thoma *et al.*, 1984). Des études sur l'origine de réplication ARS1 indiquent que les sites de fixation d'Abf1p et d'Orc (élément A) de ces origines positionnent des nucléosomes ou des limites de nucléosomes, les nucléosomes étant alors déposés et maintenus en dehors et de chaque côté de ces régions. Des mutations dans le site de fixation d'Abf1p augmente la probabilité qu'un nucléosome se fixe sur l'élément A et réduit l'activité de l'origine ARS1 (Venditti *et al.*, 1994). De la même façon, la construction de site de fixation spécifique en dehors de ARS1, qui conduit au positionnement d'un nucléosome sur l'autre élément A fonctionnel, réduit l'activité de l'origine ARS1 (Simpson, 1990). D'autres expériences ont mis en évidence que la fixation de Orc joue un rôle positif dans le positionnement de nucléosomes à proximité mais en dehors de l'élément A d'ARS1 (Lipford and Bell, 2001). Si le positionnement des nucléosomes peut réguler l'activité des origines, il est fort possible que les complexes remodelant la chromatine dépendants de l'ATP, qui déplacent des nucléosomes, peuvent moduler l'activité de certaines origines et particulièrement celles à qui, il pourrait manquer la séquence permettant le positionnement correct des nucléosomes présent dans ARS1. Par conséquent, la capacité de ces complexes à placer un nucléosome sur ou autour des origines pourrait permettre d'inhiber ou d'améliorer l'activité des origines. Seules des études sur la réplication virale *in vitro* et *in vivo* indiquent que ces complexes de remodelage peuvent effectivement améliorer l'activité des origines (Fyodorov and Kadonaga, 2001). Une autre étude démontre que les complexes SWI/SNF pourraient améliorer l'activité de certaines origines (Flanagan and Peterson, 1999). Dans ce travail, l'activité des origines est testée par des essais de stabilité de plasmides et plusieurs ARS sont examinés. Dans des souches mutantes pour SWI/SNF, le plasmide ARS121 est perdu alors que la stabilité des plasmides ARS1 et ARS307 est in affectée. De plus, un plasmide mutant pour ARS1 contenant un défaut dans le site de fixation d'Abf1p au niveau de son origine, requiert les complexes SWI/SNF pour sa stabilité. De même, une mutation dans

l'élément B1, qui réduit l'affinité d'Orc pour ARS1, montre également une dépendance vis-à-vis des complexes SWI/SNF (Lee and Bell, 1997; Rao and Stillman, 1995). Ces résultats suggèrent l'existence d'une séquence spécifique activatrice de la réplication qui permet le positionnement correct de nucléosomes de part et d'autres de l'origine via les protéines Orc et Abf1p. Lorsque cette séquence est absente, l'activité de l'origine dépend de la présence des complexes SWI/SNF. En conclusion, il est possible que les conséquences de la perte de *brm* sur l'absence de répression de plusieurs gènes, et en particulier sur la structure chromatinienne, permettent de favoriser l'initiation de la réplication de certaines origines tardives en même temps que les origines précoces. On peut également penser que l'absence de nucléosomes sur certaines séquences permettrait l'activation d'origines qui sont normalement inactives ou bien l'augmentation de la vitesse de progression de la fourche de réplication. Tout ceci pourrait participer à l'accélération de la phase S. Cependant, il est difficile avec le peu de techniques dont nous disposons aujourd'hui sur les cellules de mammifères de déterminer quelles sont les véritables conséquences de l'absence de *brm* sur la réplication. En effet, de nombreuses techniques sont applicables uniquement chez la levure dans laquelle les origines de réplication tardives et précoces sont connues. La technique de peignage moléculaire couramment utilisé chez la levure semble aujourd'hui possible dans les cellules de mammifères (Merrick *et al.*, 2004; Versini *et al.*, 2003). On pourrait alors envisager grâce à cette technique de déduire la distance moyenne entre les origines "allumées" afin de déterminer si dans les cellules *brm* *-/-*, il y a plus d'origine active. En synchronisant les cellules *brm* *-/-* et *brm* *+/+*, on pourrait élucider si certaines origines tardives sont activées précocement. Enfin, en réalisant des cinétiques de marquage BrdU, il sera possible de mesurer des vitesses moyennes d'avancement de la fourche afin de vérifier si dans les cellules *brm* *-/-* la fourche progresse plus vite. Cependant, si l'absence de *brm* n'a de conséquences que pour un nombre limité d'origine, il sera très difficile d'observer des variations.

Enfin, nous avons mis en évidence que les cellules *brm* *-/-* ont une phase G2/M plus longue. De plus, les cellules dépourvues de *brm* présentent des problèmes de ségrégation des chromosomes lors de la mitose ce qui semble conduire à la formation de micronucléi ou de noyau avec des lobulations. De telles observations ont également été faites dans des cellules surexprimant la Cycline A ou une forme non dégradable de la Cycline A (den Elzen and Pines, 2001; Furuno *et al.*, 1999; Geley *et al.*, 2001). Il a été démontré que la surexpression de la cycline A entraîne un retard du début d'alignement des chromosomes et d'anaphase (den Elzen and Pines, 2001; Geley *et al.*, 2001). De plus, l'équipe de Pines a montré que le retard

est proportionnel à la quantité de Cycline A, et que celle-ci doit être en grande partie dégradée pour l'alignement correct des chromosomes et l'anaphase (den Elzen and Pines, 2001; Geley *et al.*, 2001). Les auteurs ont proposé que le retard dans l'alignement des chromosomes et l'anaphase soit dû à une compétition directe entre la Cycline A et les autres substrats de l'APC, notamment la Cycline B et la sécurine (den Elzen and Pines, 2001; Geley *et al.*, 2001). En effet, des observations préliminaires semblent indiquer que la destruction de la Cycline B et de la sécurine pouvait être plus lente dans les cellules surexprimant la Cycline A (den Elzen and Pines, 2001). Par contre, l'équipe de Pines ne s'est pas intéressée à la ségrégation des chromosomes (den Elzen and Pines, 2001). Quant à l'équipe de Hunt, elle a suivi la séparation des chromosomes sur des cellules vivantes exprimant la construction H2B-GFP, mais il ne rapporte pas de problème de séparation des chromatides soeurs dans les cellules surexprimant une forme non dégradable de la Cycline A (Geley *et al.*, 2001). Cependant, dans la vidéo jointe à son article, on peut observer une cellule qui présente des anomalies de ségrégation des chromosomes comme celles que nous avons observées. Il est probable dans les cellules *brm* ^{-/-}, la Cycline A est suffisamment dégradée pour induire qu'un retard en mitose, mais elle monopolise une grande quantité des constituants de l'APC et par conséquent elle peut perturber la dégradation de la sécurine ou d'autres protéines impliquées dans la séparation des chromatides soeurs. Pour conclure, les problèmes de mitose et de ségrégation des chromosomes engendrés par la surexpression de la Cycline A pourraient expliquer comment la Cycline A peut conduire à la formation de tumeurs (Brecht, 1993; Wang *et al.*, 1992). Cependant, dans les cellules *brm* ^{-/-} on peut également constater une dérégulation de la Cycline E et de c-Myc qui sont deux oncogènes importants, fortement exprimés dans les cellules cancéreuses (Keyomarsi *et al.*, 1995; Keyomarsi *et al.*, 1994; Nesbit *et al.*, 1999; Spencer and Groudine, 1991). De plus, il a été rapporté que ces deux protéines peuvent conduire à de l'instabilité génomique (Li and Dang, 1999; Mai *et al.*, 1996a; Mai *et al.*, 1996b; Spruck *et al.*, 1999). Il a été montré que la dérégulation de l'expression de c-Myc ou de la Cycline E accélère l'entrée en phase S (Resnitzky *et al.*, 1994; Santoni-Rugiu *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1995). De plus, la surexpression de la Cycline E entraîne un ralentissement de la phase S, dû principalement à une diminution du nombre d'origine de réplication active, ce qui pourrait augmenter la fréquence des cellules à entrer en mitose avec un génome incomplètement répliquer (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Il a été suggéré que ceci mène à d'inévitables accidents de régulation dont des problèmes de non disjonction des chromatides soeurs et par conséquent à de l'aneuploïdie. Par ailleurs, les cellules dépourvues de la protéine Cdc4, impliquée dans la dégradation de la Cycline E, présentent des problèmes

de ségrégation des chromosomes et des noyaux anormaux (Rajagopalan *et al.*, 2004). Néanmoins, les différents mécanismes engendrant de l'instabilité génomique et des anomalies de ségrégation des chromosomes sont loin d'être tous identifiés. Il semble donc difficile aujourd'hui de déterminer qu'elle est la, ou les, véritable(s) origine(s) de l'instabilité génomique dans les cellules *brm* *-/-*, d'autant plus que de nombreux gènes cibles de la protéine Brm restent inconnus. Par ailleurs, il se pourrait que Brm contrôle l'expression de protéines importantes dans la progression de la mitose et notamment la protéine Plk1 qui est régulée par les E2F. Il serait donc très intéressant de réaliser des expériences de microarrays pour déterminer les gènes cibles de Brm. Ces données permettraient de mieux comprendre les effets de Brm sur le cycle cellulaire et pourquoi elle est mutée ou absente dans de nombreuses lignées cancéreuses.

3.4 CYCLE CELLULAIRE ET DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES

Le mécanisme de différenciation des kératinocytes est un mécanisme en deux étapes. Les cellules souches généralement quiescentes ne se divisent que très rarement pour donner des cellules TAC qui entrent dans un cycle de 3 à 4 divisions très rapide. Ces cellules vont alors sortir du cycle cellulaire, quitter la couche basale, et se différencier terminalement en migrant vers les couches supérieures de la peau (Watt, 1989). Selon le modèle traditionnel, les kératinocytes sortiraient du cycle cellulaire en G0/G1 avant d'entamer le processus de différenciation (Fuchs, 1993; Gandarillas and Watt, 1995; Harvat *et al.*, 1998; Hauser *et al.*, 1997; Hurlin *et al.*, 1995). Cependant, il a été démontré que les kératinocytes pouvaient entrer en différenciation dans toutes les phases du cycle (Gandarillas *et al.*, 2000). De plus, un facteur d'activation du cycle cellulaire comme c-Myc stimule la différenciation épidermique (Arnold and Watt, 2001; Gandarillas and Watt, 1997; Waikel *et al.*, 2001). Nous avons donc essayé d'élucider les mécanismes qui contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation des kératinocytes en utilisant deux modèles d'induction de la différenciation : la mise en suspension et l'activation de l'expression de c-Myc.

D'après l'analyse de l'expression des Cyclines, les kératinocytes en différenciation seraient effectivement en G1. Cependant, si l'on regarde la quantification de l'ADN, on remarque que beaucoup de kératinocytes ont un contenu en ADN supérieur à 2N. La présence des Cyclines de G2/M au moment de l'engagement suggère que la différenciation des kératinocytes commence préférentiellement en G2/M. D'ailleurs, l'inhibition de l'activité kinase Cdc2 par des agents chimiques entraîne une forte induction de la différenciation des kératinocytes. *In vivo*, nous avons mis en évidence que p21 s'accumule au moment de l'engagement en

différenciation et inhibe majoritairement les complexes Cycline A/Cdk2 et Cycline A/Cdc2. Nous proposons donc que p21 est responsable de l'arrêt des kératinocytes en G2/M au moment de l'engagement. Ce mécanisme d'arrêt en G2 induit par p21 a été caractérisé très récemment (Baus *et al.*, 2003). Dans le travail de Baus, p21, induit en réponse à l'altération de l'ADN par des agents génotoxiques, permet l'inactivation des complexes Cdk/Cycline requis dans l'entrée en mitose c'est-à-dire les complexes Cycline A/Cdk2, Cycline A/Cdc2 et Cycline B/Cdc2. Ces complexes perdent alors la capacité à phosphoryler les protéines de la famille pRb et empêchent l'expression des gènes requis pour le passage en mitose tels que les gènes codant pour plk, cdc2, cdk2, cycline A et cdc25A (Ishida *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002). Par conséquent, ce processus entraîne les cellules à arrêter leur cycle en phase G2. De façon intéressante, nous avons également observé une faible association de p21 avec les complexes Cycline B/Cdc2, prouvant que p21 pourrait également inactiver ces complexes comme dans le travail de Baus. Cependant, la quantité de Cycline B non associée à p21 est largement supérieure à la quantité de Cycline B associée à p21, suggérant que l'inhibition des complexes Cycline B/Cdc2 passe, dans notre cas, par un autre mécanisme. Certains travaux suggèrent que l'activité kinase des complexes Cycline A/Cdk2 est nécessaire à l'activation des complexes Cycline B/Cdc2 (Furuno *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1992). Cependant, le rôle exact de l'activité des complexes Cycline A/Cdk2 sur l'activité Cycline B/Cdc2 reste à élucider. Toutefois, on peut penser que la participation des complexes Cycline A/Cdk2 en G2 serait de phosphoryler et inactiver pRb pour libérer les E2F, capables d'activer la transcription des gènes plk (Gunawardena *et al.*, 2004), requis dans l'activation des complexes Cycline B/Cdc2. Néanmoins, dans notre cas, l'inhibition des complexes Cycline B/Cdc2 semble surtout le résultat d'une diminution de l'expression de la Cycline B, qui suit par ailleurs, la diminution du niveau de phosphorylation de pRb et la diminution de l'activité Cycline A/Cdk2. Des travaux ont montré que l'inhibition de l'activité Cycline A/Cdk2 ou la répression des E2F conduit à la dégradation de la Cycline B via l'APC Cdh1 (Lukas *et al.*, 1999). Ils proposent d'une part que les E2F en régulant l'expression de la cycline A, contrôle l'activité kinase Cycline A/Cdk2 et d'autre part que l'activité Cycline A/Cdk2 contrôle l'accumulation de la Cycline B en phosphorylant et inhibant Cdh1 qui est impliquée dans la dégradation de la Cycline B via l'APC (Lukas *et al.*, 1999). Par conséquent, nous pouvons imaginer que l'inhibition de l'activité Cycline A/Cdk2 par p21 diminue la quantité de Cdh1 phosphorylée et donc entraîne la dégradation de la Cycline B. De plus, l'inhibition des E2F par pRb hypophosphorylée entraînerait la chute de l'expression des cyclines A et B. Enfin, l'arrêt en G2/M induit par p21 semble important dans l'engagement en différenciation terminale

puisque les kératinocytes p21 $-/-$ présentent une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation terminale et un engagement réversible en différenciation (Missero *et al.*, 1996; Topley *et al.*, 1999). p21 pourrait donc représenter le signal déclencheur de la différenciation des kératinocytes. En induisant l'arrêt des kératinocytes en G2/M, il pourrait rendre irréversible la sortie du cycle et la différenciation des kératinocytes. Cependant, les kératinocytes qui surexpriment p21 montrent également une diminution des marqueurs de différenciation terminale (Di Cunto *et al.*, 1998). Ces données suggèrent qu'une régulation précise de la quantité de p21 est requise pour la différenciation des kératinocytes. Dans un premier temps, p21 semble nécessaire pour l'arrêt G2/M et donc l'engagement en différenciation terminale. Mais ensuite, l'expression de p21 doit chuter afin de permettre le programme de différenciation terminale.

Néanmoins, les kératinocytes ne semblent pas pouvoir maintenir cet arrêt en G2/M puisque l'expression des Cyclines de G2/M diminue alors que la Cycline E, Cycline de phase G1, s'accumule. Les kératinocytes en différenciation terminale seraient donc dans un état G1 avec un contenu en ADN de 4N, et occasionnellement les kératinocytes pourraient redupliquer leur génome pour devenir polyploïdes. Ce phénomène a déjà été rapporté et est appelé le "mitotic slippage". Les cellules sont incapables de maintenir l'arrêt en mitose trop longtemps et finissent par retourner en interphase (Kung *et al.*, 1990; Rieder and Palazzo, 1992). De nombreuses lignées cellulaires bloquées en mitose pendant une longue période par des inhibiteurs d'assemblage du fuseau mitotique, comme le nocodazole, la colcémide et le taxol, vont présenter un "mitotic slippage". Durant ce processus, les cellules dégradent les Cyclines de G2/M, la Cycline A et la Cycline B, et reviennent en interphase sans finir la mitose (Andreassen and Margolis, 1994; Kung *et al.*, 1990). Ce mécanisme pourrait être induit par p21, car il a été montré que l'injection de p21, dans des cellules en mitose, permet aux cellules de retourner en interphase sans réaliser de division cellulaire (Furuno *et al.*, 1999). Des travaux récents ont démontré que l'arrêt des cellules en interphase avec un contenu de 4N correspond à un arrêt G1 et dépend de la voie p53/p21 (Andreassen *et al.*, 2001). En effet, des cellules dépourvues de p53/p21 continuent à cycliser et deviennent aneuploïdes (Andreassen *et al.*, 2001). p21 inhiberait les complexes Cycline E/Cdk 2 pour empêcher la reréplication et la formation de cellules polyploïdes (Andreassen *et al.*, 2001; Minella *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 1999). Comme l'expression de p21 diminue après l'engagement des kératinocytes en différenciation, et que l'activité kinase associée à la Cycline E se maintient à 40%, on peut tout à fait envisager que le maintien d'une activité Cycline E/Cdk2 ne permette plus de

garantir une stabilité génomique, et entraîne, en conséquence, l'apparition de cellules polyploïdes dans des kératinocytes. Dans ce cas, l'activité kinase résiduelle associée à la Cycline A, que nous avons observée après l'engagement en différenciation, pourrait correspondre à la faible proportion de kératinocytes qui endorépliquent leur génome. De plus, l'expression de pRb et p53, qui sont nécessaires pour éviter la reréplication après un blocage de la mitose (Di Leonardo *et al.*, 1997), est fortement réduite dans les kératinocytes en différenciation terminale (Dazard *et al.*, 2000).

Ce mécanisme de "mitotic slippage" semble suffisant pour induire la différenciation terminale des kératinocytes puisque l'exposition prolongée des kératinocytes au nocodazole induit également la différenciation terminale (Gandarillas *et al.*, 2000). De même, nous avons montré que l'inhibition de l'activité kinase Cdc2 est suffisante pour induire la différenciation terminale. Par conséquent, l'inhibition de la mitose ou de la cytokinèse pourrait représenter un signal d'entrée en différenciation des kératinocytes. Il est possible que cette absence de cytokinèse dans les kératinocytes en différenciation soit la conséquence d'un changement de la nature du cytosquelette de la cellule et notamment des kératines exprimées. On peut en effet penser que les kératines spécifiques des kératinocytes en différenciation imposent des contraintes spécifiques réduisant leur capacité de division. Ce mécanisme permettrait également d'expliquer pourquoi les kératinocytes qui deviennent hyperprolifératifs pendant de la cicatrisation ou dans des anomalies pathologiques, produisent des kératines spécifiques. Par ailleurs, il a été montré que la kératine 10, qui est spécifique des kératinocytes différenciés inhibe la prolifération des kératinocytes (Paramio *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002). De plus, cette inhibition de la prolifération peut être reversé par la coexpression de la kératine 16. Or, la kératine 16 est spécifique des kératinocytes hyperprolifératif, elle remplace la K10 lors du processus de cicatrisation. Finalement, les souris K10 *-/-* présentent des kératinocytes basaux hyperprolifératifs, qui expriment les kératines spécifiques du processus de cicatrisation, K6 et K16 (Reichelt and Magin, 2002). Ces résultats suggèrent que les kératines pourraient non seulement avoir des fonctions structurales, mais qu'elles pourraient également être directement impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire des kératinocytes différenciés, et dans le "mitotic slippage" des kératinocytes. Les kératines pourraient induire l'arrêt du cycle, le "mitotic slippage" et la différenciation en exerçant des contraintes physiques et/ou via des signaux intracellulaires. Toutefois, les données actuelles restent encore insuffisantes et ne permettent pas de conclure avec certitude.

Enfin, il est également possible que la dégradation des Cyclines de G2/M, A et B, soit importante pour ce mécanisme de "mitotic slippage", et l'induction de la différenciation des kératinocytes. Leur dégradation inhibe définitivement la mitose et pourrait induire le retour en interphase des cellules. Il est probable que le système protéolytique qui permette la dégradation de ces Cyclines mitotiques soit le complexe l'APC^{Cdh1} qui, phosphorylé par les Cdk, est inactif durant les phases S, G2 et une partie de la mitose (Peters, 2002). Ce complexe est donc actif de la fin de la mitose à la fin de la phase G1. Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation des complexes Cycline A/Cdk2 pouvaient induire l'activation de l'APC^{Cdh1} et la dégradation de la Cycline B (Lukas *et al.*, 1999). Par conséquent, on peut penser que l'inactivation des complexes Cycline A/Cdk2 est suffisante pour induire la dégradation des Cyclines mitotiques. Pour tester si l'activation de la dégradation des Cyclines mitotiques permet d'induire le "mitotic slippage" et la différenciation des kératinocytes, on pourrait faire exprimer dans les kératinocytes un mutant de Cdh1 non phosphorylable (Lukas *et al.*, 1999), et donc constitutivement actif, et analyser l'état de différenciation des kératinocytes. À l'inverse, on pourrait bloquer les kératinocytes en mitose et inhiber la fonction de Cdh1, en présence d'inhibiteur de l'APC, ou en exprimant dans les kératinocytes l'inhibiteur physiologique de Cdh1, Emi1 (Hsu *et al.*, 2002), ou encore plus spécifiquement en micro-injectant des anticorps bloquant contre Cdh1, puis analyser l'état de différenciation des kératinocytes. Il serait aussi intéressant d'exprimer dans les kératinocytes des Cyclines mitotiques non dégradables, et analyser, si dans ces conditions, les kératinocytes peuvent toujours induire le "mitotic slippage" et l'activation de la différenciation.

Au contraire de la dégradation des Cyclines de G2/M, il se pourrait que ce soit l'expression de la Cycline E qui induisent l'entrée en différenciation. Par ailleurs, il a été démontré que la cycline E est nécessaire au mécanisme d'endoréplication (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). Dans les mégakaryocytes, il a été montré que l'expression de la Cycline E permet de réactiver l'expression de la Cycline A et d'induire l'endoréplication qui est un mécanisme crucial dans la différenciation des mégakaryocytes (Garcia *et al.*, 2000). Les auteurs de cette étude proposent que l'expression de la Cycline E est suffisante pour induire une différenciation efficace des mégakaryocytes (Garcia *et al.*, 2000). Par conséquent, il pourrait être intéressant d'exprimer dans les kératinocytes, d'une part la Cycline E sauvage, et d'autre part, un mutant non dégradable de la cycline E, afin de palier à la dégradation active de la protéine. Ces expériences devraient permettre de mieux comprendre le rôle de la Cycline E dans l'induction de la différenciation et le phénomène d'endoréplication.

Quelques heures après l'activation de l'expression de c-Myc dans les kératinocytes, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité des Cyclines, en même temps qu'une augmentation de la synthèse d'ADN. Cette activation de la réplication touche principalement les petites cellules, suggérant que c-Myc stimule la prolifération des cellules souches et/ou des TAC. Ces résultats sont en accord avec le rôle de c-Myc dans la stimulation de la prolifération cellulaire. Nous proposons que c-Myc stimule la différenciation des kératinocytes en activant la prolifération des cellules souches et des cellules TAC, et donc, en augmentant la population de cellules TAC capables de se différencier terminalement. Néanmoins, c-Myc pourrait également activer la différenciation des kératinocytes en induisant le mécanisme de "mitotic slippage". En effet, il a été montré que c-Myc pouvait arrêter les cellules en G2 et même permettre la reréplication des cellules après un arrêt en mitose (Felsher *et al.*, 2000; Li and Dang, 1999). D'autre part, certains auteurs ont suggéré que c-Myc pourrait induire la différenciation en régulant négativement des gènes codant pour des protéines du cytosquelette et de l'adhésion, mais ils ont remarqué des variations après 4 jours d'induction de c-Myc alors que les cellules sont déjà engagées dans la différenciation. Il se pourrait donc qu'ils observent les conséquences de l'engagement en différenciation, qui est effectivement caractérisée par une diminution de l'expression des molécules d'adhésion. Cependant, l'expression de c-myc est régulée négativement dans les dernières étapes de la différenciation (Gandarillas and Watt, 1995). L'expression de c-myc sous le promoteur de l'involucrine (exprimée tardivement lors de la différenciation) n'induit pas la différenciation et mène à la formation de lésions précancéreuses (Pelengaris *et al.*, 1999), suggérant que c-myc doit être réprimé pour que le processus de différenciation ait lieu correctement. D'ailleurs, de façon surprenante dans notre système, la quantité d'ARNm de c-myc diminue lorsque les kératinocytes entrent en différenciation terminale alors que sa transcription est sous le contrôle d'un promoteur CMV (Gandarillas and Watt, 1997). Ces résultats supportent l'idée que les mécanismes de régulation de l'expression de c-myc dans les kératinocytes sont cruciaux pour la différenciation des kératinocytes. De plus, d'après ces données, on peut penser que la répression de c-myc dans les kératinocytes en différenciation pourrait faire intervenir un mécanisme de remodelage de la chromatine, phénomène qui peut avoir lieu dans les cellules en différenciation.

3.5 DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES, CYCLE CELLULAIRE ET CHROMATINE

Il a été montré que ces complexes de remodelage de la famille SWI/SNF sont impliqués dans le mécanisme de différenciation de plusieurs types cellulaires. En particulier, ils pourraient activer des gènes de différenciation. La différenciation des cellules myéloïdes, des érythrocytes, des entérocytes, des cellules musculaires, et des adipocytes a été liée à la présence des complexes SWI/SNF fonctionnels (de la Serna *et al.*, 2001; Kowenz-Leutz and Leutz, 1999; Pedersen *et al.*, 2001; Salma *et al.*, 2004; Soutoglou and Talianidis, 2002), et dans un nombre limité de cas, à la capacité des complexes SWI/SNF à remodeler la chromatine au niveau du promoteur induit. De plus, nous avons montré que la perte de brm dans des fibroblastes conduit à une dérépression de c-myc et des cyclines E et A, qui semblent jouer un rôle essentiel dans l'équilibre prolifération/différenciation, et dans l'engagement en différenciation des kératinocytes. Et enfin, il a été observé que la régulation de la transcription par c-Myc implique les complexes SWI/SNF (Cheng *et al.*, 1999b; Pal *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant d'étudier des complexes SWI/SNF dans la différenciation des kératinocytes. Nous pourrions dans un premier temps analyser les profils d'expression de Brm et Brg1 sur des coupes de peau humaines par immunofluorescence. D'autres part, nous pourrions analyser des coupes de peau de souris brm *-/-*, afin de déterminer si elles ont des propriétés particulières. Par exemple, comme il semble que c-Myc, la Cycline E et la Cycline A soient impliquées dans la prolifération des kératinocytes et dans l'entrée en différenciation terminale, il est possible que la surexpression de ces protéines dans les kératinocytes brm *-/-* induisent la formation d'une peau plus épaisse; elle pourrait conduire à augmenter le nombre de cellules TAC et de cellules différenciées. De plus, dans ces kératinocytes brm *-/-*, on pourrait peut-être observer une augmentation du phénomène d'endoréplication, dû à la surexpression de c-Myc, de la Cycline E et de la Cycline A. Il serait alors possible de déterminer les conséquences de l'endoréplication sur la différenciation des kératinocytes. Enfin, l'inactivation spécifique de brg1 dans des kératinocytes murins (*in vitro* et *in vivo*) devrait mettre en lumière le rôle de Brg1 dans l'équilibre prolifération/différenciation des kératinocytes.

IV. PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en lumière le rôle essentiel joué par la protéine Brm, appartenant au complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, dans le déroulement du cycle cellulaire. J'envisagerai de continuer ces travaux en essayant de déterminer quelles sont les origines des problèmes de ségrégation des chromosomes lors de la mitose et finalement pourquoi la perte de Brm conduit à de l'instabilité génomique. Il me semble important de répondre à cette question car des travaux récents proposent que l'aneuploïdie dans les cellules somatiques joue un rôle dans la tumorigénèse (Sen, 2000). En particulier, il a été suggéré que l'instabilité chromosomique est intimement associée à la transformation (Lengauer *et al.*, 1998) ou du moins à des événements précédents la transformation (Li *et al.*, 1997b).

Pour répondre à cette question, je souhaiterais dans un premier temps réaliser des expériences de microarrays sur des cellules *-/-* et *brm +/+*, en parallèle, afin de déterminer les cibles potentielles de Brm au cours de la mitose. Ces résultats permettront de savoir si la seule protéine importante pour le déroulement de la mitose dérégulée dans les cellules *brm -/-* est la cycline A. Les gènes cibles obtenus dans ce microarrays pourront fournir d'autres pistes quant aux causes de l'instabilité génétique dans les cellules dépourvues de Brm.

En parallèle, il serait intéressant de faire des caryotypes des cellules *brm -/-* pour vérifier que l'on retrouve un nombre aberrant de chromosomes dans les cellules *brm -/-*. Nous pourrions également regarder plus en détail la structure et en particulier le degré de condensation générale des chromosomes car la perte de protéines du complexe condensine conduit au même type de phénotype en mitose que celui des cellules *brm -/-* (Watrin and Legagneux, 2005). Cependant, j'envisage également de construire des vecteurs rétroviraux permettant la production de RNAi pour Brm, dans le but d'obtenir des lignées stables humaines dépourvues de Brm. En effet, il est plus facile de faire des études de caryotype dans les cellules humaines où les chromosomes peuvent être identifiés et où l'on pourra éventuellement déterminer s'il existe dans les cellules dépourvues de Brm des points de cassure au niveau de certains chromosomes. De plus, on pourra confirmer le phénotype des cellules *brm -/-* dans ces cellules humaines et éventuellement exclure la possibilité que le phénotype des cellules *brm -/-* soit dû à un phénomène de compensation de la perte de la protéine.

Enfin, j'aimerais suivre en vidéomicroscopie la mitose de cellules *brm -/-*, co-exprimant l'histone H2B-GFP avec des protéines centromériques (par exemple CENP-A) ou

télomériques (comme TRF1), ou présentes le long des bras des chromosomes (par exemple les condensines comme SMC2 ou SMC4), rendues fluorescentes par fusion avec la protéine RFP. En parallèle, je pourrai regarder par immunofluorescence ces protéines dans des cellules dépourvues de Brm obtenues dans les différents stades de la mitose. Ainsi, je pourrai déterminer s'il existe véritablement des problèmes de séparation des chromatides soeurs à ces différentes régions. De plus, je serai en mesure de déterminer si la formation de micronucléi a pour origine la perte d'un chromosome (2 spots lumineux) et/ou d'une chromatide (1 spot lumineux) et donc si ces problèmes de ségrégation n'ont pas plutôt comme origine des défauts d'attachement des chromosomes via les kinétochores aux pôles du fuseau mitotique. Dans ce dernier cas, il pourrait être nécessaire de faire des marquages du fuseau mitotique avec un anticorps anti α tubuline.

V. BIBLIOGRAPHIE

A

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P. B., et al. (1999). 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* 18, 1923-1938.
- Aalfs, J. D., et Kingston, R. E. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* 25, 548-555.
- Aasland, R., Stewart, A. F., et Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem Sci* 21, 87-88.
- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., et Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 111 (Pt 12), 1751-1757.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., et Brinster, R. L. (1985). The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Adams, M. R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., et Nevins, J. R. (2000). Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol* 20, 3633-3639.
- Agarwal, R., et Cohen-Fix, O. (2002). Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes Dev* 16, 1371-1382.
- Albert, T., Mautner, J., Funk, J. O., Hortnagel, K., Pullner, A., et Eick, D. (1997). Nucleosomal structures of *c-myc* promoters with transcriptionally engaged RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 17, 4363-4371.
- Albert, T., Wells, J., Funk, J. O., Pullner, A., Raschke, E. E., Stelzer, G., Meisterernst, M., Farnham, P. J., et Eick, D. (2001). The chromatin structure of the dual *c-myc* promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J Biol Chem* 276, 20482-20490.
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupard, M. A., et Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105, 459-472.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., et DePinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., et Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., et Land, H. (1993). Oncogenic activity of the *c-Myc* protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.
- Amati, B., Dalton, S., Brooks, M. W., Littlewood, T. D., Evan, G. I., et Land, H. (1992). Transcriptional activation by the human *c-Myc* oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359, 423-426.

An, W., Leuba, S. H., van Holde, K., et Zlatanova, J. (1998). Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3396-3401.

Andreassen, P. R., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., et Margolis, R. L. (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell* *12*, 1315-1328.

Andreassen, P. R., et Margolis, R. L. (1994). Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J Cell Biol* *127*, 789-802.

Angus-Hill, M. L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Cairns, B. R. (2001). A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* *7*, 741-751.

Annunziato, A. T., Frado, L. L., Seale, R. L., et Woodcock, C. L. (1988). Treatment with sodium butyrate inhibits the complete condensation of interphase chromatin. *Chromosoma* *96*, 132-138.

Aparicio, J. G., Viggiani, C. J., Gibson, D. G., et Aparicio, O. M. (2004). The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *24*, 4769-4780.

Aplin, A. E., Howe, A. K., et Juliano, R. L. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 737-744.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., et Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10148-10152.

Arnold, I., et Watt, F. M. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol* *11*, 558-568.

Assoian, R. K., et Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 93-98.

Atherton-Fessler, S., Parker, L. L., Geahlen, R. L., et Piwnicka-Worms, H. (1993). Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol* *13*, 1675-1685.

Ayad, N. G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S., et Kirschner, M. W. (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* *113*, 101-113.

Ayer, D. E., et Eisenman, R. N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* *7*, 2110-2119.



Bailly, E., Pines, J., Hunter, T., et Bornens, M. (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J Cell Sci* *101* (Pt 3), 529-545.

Ball, A. R., Jr., Schmiesing, J. A., Zhou, C., Gregson, H. C., Okada, Y., Doi, T., et Yokomori, K. (2002). Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol* *22*, 5769-5781.

Bannister, A. J., et Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* *384*, 641-643.

Bannister, A. J., Schneider, R., et Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801-806.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., et Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Barratt, M. J., Hazzalin, C. A., Cano, E., et Mahadevan, L. C. (1994). Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4781-4785.

Baudino, T. A., et Cleveland, J. L. (2001). The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21, 691-702.

Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., et Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* 3, 39-44.

Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J., et Dulic, V. V. (2003). Permanent cell cycle exit in G(2) phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *Embo J* 22, 3992-4002.

Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., et Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14173-14178.

Bell, S. P., et Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.

Ben-Ze'ev, A., et Raz, A. (1981). Multinucleation and inhibition of cytokinesis in suspended cells: reversal upon reattachment to a substrate. *Cell* 26, 107-115.

Berdnik, D., et Knoblich, J. A. (2002). Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 12, 640-647.

Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T., et Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8695-8700.

Blanchard, J. M., Piechaczyk, M., Dani, C., Chambard, J. C., Franchi, A., Pouyssegur, J., et Jeanteur, P. (1985). c-myc gene is transcribed at high rate in G0-arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature* 317, 443-445.

Blangy, A., Arnaud, L., et Nigg, E. A. (1997). Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. *J Biol Chem* 272, 19418-19424.

Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., et Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.

Bohmer, R. M., Scharf, E., et Assoian, R. K. (1996). Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol Biol Cell* 7, 101-111.

Bonnieu, A., Piechaczyk, M., Marty, L., Cuny, M., Blanchard, J. M., Fort, P., et Jeanteur, P. (1988). Sequence determinants of c-myc mRNA turn-over: influence of 3' and 5' non-coding regions. *Oncogene Res* 3, 155-166.

Booher, R. N., Holman, P. S., et Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* 272, 22300-22306.

Borgne, A., Ostvold, A. C., Flament, S., et Meijer, L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* 274, 11977-11986.

Borradori, L., et Sonnenberg, A. (1996). Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 647-656.

Bosch, M., Gil, J., Bachs, O., et Agell, N. (1998). Calmodulin inhibitor W13 induces sustained activation of ERK2 and expression of p21(cip1). *J Biol Chem* 273, 22145-22150.

Bottazzi, M. E., Zhu, X., Bohmer, R. M., et Assoian, R. K. (1999). Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *J Cell Biol* 146, 1255-1264.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., et Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-5333.

Boxer, L. M., et Dang, C. V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.

Bradbury, E. M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14, 9-16.

Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R., et Sarner, N. (1973). Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *Eur J Biochem* 33, 131-139.

Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J., et Hunt, T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4344-4349.

Brechot, C. (1993). Oncogenic activation of cyclin A. *Curr Opin Genet Dev* 3, 11-18.

Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., et Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.

Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y., Winston, F., et Allis, C. D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 15, 3286-3295.

Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merckenschlager, M., et Fisher, A. G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-854.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., et Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.

Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G., et Magnuson, T. (2000). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell* 6, 1287-1295.

Burgeson, R. E., et Christiano, A. M. (1997). The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 651-658.

Burns, L. G., et Peterson, C. L. (1997). The yeast SWI-SNF complex facilitates binding of a transcriptional activator to nucleosomal sites in vivo. *Mol Cell Biol* 17, 4811-4819.



Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., et Kornberg, R. D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249-1260.

Carruthers, L. M., Bednar, J., Woodcock, C. L., et Hansen, J. C. (1998). Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* *37*, 14776-14787.

Chadee, D. N., Hendzel, M. J., Tylipski, C. P., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., Wright, J. A., et Davie, J. R. (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* *274*, 24914-24920.

Chai, B., Hsu, J. M., Du, J., et Laurent, B. C. (2002). Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. *Genetics* *161*, 575-584.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., et Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* *284*, 2174-2177.

Chen, Z., Indjeian, V. B., McManus, M., Wang, L., et Dynlacht, B. D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev Cell* *3*, 339-350.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., et Sherr, C. J. (1999a). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* *18*, 1571-1583.

Cheng, S. W., Davies, K. P., Yung, E., Beltran, R. J., Yu, J., et Kalpana, G. V. (1999b). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* *22*, 102-105.

Cheung, P., Allis, C. D., et Sassone-Corsi, P. (2000a). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* *103*, 263-271.

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., et Allis, C. D. (2000b). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* *5*, 905-915.

Cho, K. S., Elizondo, L. I., et Boerkoel, C. F. (2004). Advances in chromatin remodeling and human disease. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 308-315.

Classon, M., et Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* *2*, 910-917.

Claudio, P. P., Howard, C. M., Baldi, A., De Luca, A., Fu, Y., Condorelli, G., Sun, Y., Colburn, N., Calabretta, B., et Giordano, A. (1994). p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res* *54*, 5556-5560.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., et Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3260-3265.

Collins, N., Poot, R. A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Dellaire, G., et Varga-Weisz, P. D. (2002). An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* *32*, 627-632.

Cooper, M. P., Balajee, A. S., et Bohr, V. A. (1999). The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell* *10*, 2119-2129.

Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* *299*, 35-55.

Cosma, M. P., Tanaka, T., et Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* *97*, 299-311.

Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., et Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* *265*, 53-60.



- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M., et Dean, D. C. (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* 8, 557-569.
- Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R., et Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-682.
- Dazard, J. E., Piette, J., Basset-Seguin, N., Blanchard, J. M., et Gandarillas, A. (2000). Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene* 19, 3693-3705.
- de la Barre, A. E., Angelov, D., Molla, A., et Dimitrov, S. (2001). The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J* 20, 6383-6393.
- de la Serna, I. L., Carlson, K. A., et Imbalzano, A. N. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* 27, 187-190.
- De Souza, C. P., Osmani, A. H., Wu, L. P., Spotts, J. L., et Osmani, S. A. (2000). Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 102, 293-302.
- den Elzen, N., et Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153, 121-136.
- Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P. K., et Dotto, G. P. (1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280, 1069-1072.
- Di Leonardo, A., Khan, S. H., Linke, S. P., Greco, V., Seidita, G., et Wahl, G. M. (1997). DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res* 57, 1013-1019.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., et Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Diffley, J. F., et Labib, K. (2002). The chromosome replication cycle. *J Cell Sci* 115, 869-872.
- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S., et Osley, M. A. (1999). A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell* 4, 75-83.
- Dong, F., Hansen, J. C., et van Holde, K. E. (1990). DNA and protein determinants of nucleosome positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5724-5728.
- Doree, M. (2003). [Triggering cell mitosis in higher eukaryotes]. *Med Sci (Paris)* 19, 299-307.
- Draviam, V. M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R., et Pines, J. (2001). The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 152, 945-958.
- Duguet, M. (1997). When helicase and topoisomerase meet! *J Cell Sci* 110 (Pt 12), 1345-1350.
- Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., et Goff, S. P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79, 119-130.
- Dundr, M., et Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356, 297-310.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* *117*, 2523-2531.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* *12*, 2245-2262.



Eady, R. A., McGrath, J. A., et McMillan, J. R. (1994). Ultrastructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol* *103*, 13S-18S.

Eberharter, A., Ferrari, S., Langst, G., Straub, T., Imhof, A., Varga-Weisz, P., Wilm, M., et Becker, P. B. (2001). Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *Embo J* *20*, 3781-3788.

Eisenman, R. N. (2001). Deconstructing myc. *Genes Dev* *15*, 2023-2030.

Ekholm-Reed, S., Mendez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., et Reed, S. I. (2004). Dereglulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* *165*, 789-800.

Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P., et Campbell, J. L. (1999). Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. *Mol Biol Cell* *10*, 3263-3277.

Escargueil, A. E., Plisov, S. Y., Filhol, O., Cochet, C., et Larsen, A. K. (2000). Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem* *275*, 34710-34718.

Escargueil, A. E., Plisov, S. Y., Skladanowski, A., Borgne, A., Meijer, L., Gorbsky, G. J., et Larsen, A. K. (2001). Recruitment of cdc2 kinase by DNA topoisomerase II is coupled to chromatin remodeling. *Faseb J* *15*, 2288-2290.



Fabrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J. R., Lee, J. H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A., et Sardet, C. (2002). Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* *3*, 641-645.

Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U., et Gumbiner, B. M. (1996). Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* *132*, 1105-1114.

Fangman, W. L., et Brewer, B. J. (1992). A question of time: replication origins of eukaryotic chromosomes. *Cell* *71*, 363-366.

Faragher, A. J., et Fry, A. M. (2003). Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol Biol Cell* *14*, 2876-2889.

Felsher, D. W., Zetterberg, A., Zhu, J., Tlsty, T., et Bishop, J. M. (2000). Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10544-10548.

Ferguson, B. M., Brewer, B. J., Reynolds, A. E., et Fangman, W. L. (1991). A yeast origin of replication is activated late in S phase. *Cell* 65, 507-515.

Ferguson, B. M., et Fangman, W. L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* 68, 333-339.

Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., et Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.

Findeisen, M., El-Denary, M., Kapitza, T., Graf, R., et Strausfeld, U. (1999). Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 264, 415-426.

Fisk, H. A., Mattison, C. P., et Winey, M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14875-14880.

Fisk, H. A., et Winey, M. (2001). The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell* 106, 95-104.

Flanagan, J. F., et Peterson, C. L. (1999). A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Res* 27, 2022-2028.

Flaus, A., et Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* 11, 148-154.

Fry, A. M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., et Nigg, E. A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 141, 1563-1574.

Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 1028-1035.

Fuchs, E. (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* 17, 197-208.

Fuchs, E., et Byrne, C. (1994). The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 4, 725-736.

Fuchs, E., Dowling, J., Segre, J., Lo, S. H., et Yu, Q. C. (1997). Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins. *Curr Opin Genet Dev* 7, 672-682.

Fujita, M., Yamada, C., Tsurumi, T., Hanaoka, F., Matsuzawa, K., et Inagaki, M. (1998). Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. *J Biol Chem* 273, 17095-17101.

Furuno, N., den Elzen, N., et Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147, 295-306.

Fyodorov, D. V., et Kadonaga, J. T. (2001). The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* 106, 523-525.



Galaktionov, K., Chen, X., et Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-517.

Gallant, P., Shio, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M., et Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523-1527.

Gandarillas, A. (2000). Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol* 35, 53-62.

Gandarillas, A., Davies, D., et Blanchard, J. M. (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* *19*, 3278-3289.

Gandarillas, A., et Watt, F. M. (1995). Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* *11*, 1403-1407.

Gandarillas, A., et Watt, F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* *11*, 2869-2882.

Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., et Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* *3*, 321-324.

Garcia, P., Frampton, J., Ballester, A., et Cales, C. (2000). Ectopic expression of cyclin E allows non-endomitotic megakaryoblastic K562 cells to establish re-replication cycles. *Oncogene* *19*, 1820-1833.

Garcia-Ramirez, M., Dong, F., et Ausio, J. (1992). Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J Biol Chem* *267*, 19587-19595.

Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., et Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* *270*, 17923-17928.

Garrod, D. R., Merritt, A. J., et Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 537-545.

Gartel, A. L., et Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* *1*, 639-649.

Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., et Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4510-4515.

Gaudreau, L., Schmid, A., Blaschke, D., Ptashne, M., et Horz, W. (1997). RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast PHO5 promoter. *Cell* *89*, 55-62.

Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M., et Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* *153*, 137-148.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H., et Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* *114*, 431-443.

Geraghty, D. S., Ding, M., Heintz, N. H., et Pederson, D. S. (2000). Premature structural changes at replication origins in a yeast minichromosome maintenance (MCM) mutant. *J Biol Chem* *275*, 18011-18021.

Getsios, S., Huen, A. C., et Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 271-281.

Giet, R., et Glover, D. M. (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* *152*, 669-682.

Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Le Guellec, K., et Prigent, C. (1999). The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XI_{Eg}5. *J Biol Chem* *274*, 15005-15013.

Gilbert, D. M. (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* *294*, 96-100.

Gille, H., et Downward, J. (1999). Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* *274*, 22033-22040.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., et Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., et al. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11, 1640-1650.

Green, K. J., et Gaudry, C. A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 208-216.

Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Lui, L., Berger, S. L., et Horz, W. (1998). Absence of Gcn5 HAT activity defines a novel state in the opening of chromatin at the PHO5 promoter in yeast. *Mol Cell* 1, 495-505.

Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., Munsterkotter, M., et Horz, W. (1999). Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *Embo J* 18, 6407-6414.

Gregory, P. D., Wagner, K., et Horz, W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* 265, 195-202.

Gunawardena, R. W., Siddiqui, H., Solomon, D. A., Mayhew, C. N., Held, J., Angus, S. P., et Knudsen, E. S. (2004). Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J Biol Chem* 279, 29278-29285.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., et Liu, E. T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 60, 5922-5928.

Guo, X. W., Th'ng, J. P., Swank, R. A., Anderson, H. J., Tudan, C., Bradbury, E. M., et Roberge, M. (1995). Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *Embo J* 14, 976-985.

Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L., et Tobey, R. A. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 84, 1-15.

Gurley, L. R., Walters, R. A., et Tobey, R. A. (1973). Histone phosphorylation in late interphase and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 50, 744-750.

H

Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., et Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9, 680-689.

Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., et Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J* 17, 4127-4138.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A., et Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 155, 1109-1116.

Harbour, J. W., et Dean, D. C. (2000a). Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol* 12, 685-689.

Harbour, J. W., et Dean, D. C. (2000b). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-67.

Harbour, J. W., et Dean, D. C. (2000c). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409.

Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A., et Dean, D. C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869.

Harvat, B. L., Wang, A., Seth, P., et Jetten, A. M. (1998). Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci* 111 (Pt 9), 1185-1196.

Hassan, A. H., Neely, K. E., et Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104, 817-827.

Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., et Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89, 341-347.

Hatsell, S., et Cowin, P. (2001). Deconstructing desmoplakin. *Nat Cell Biol* 3, E270-272.

Hauser, P. J., Agrawal, D., Flanagan, M., et Pledger, W. J. (1997). The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell Growth Differ* 8, 203-211.

Hayes, J. J., Clark, D. J., et Wolffe, A. P. (1991). Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6829-6833.

Hebbes, T. R., Thorne, A. W., et Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* 7, 1395-1402.

Helps, N. R., Brewis, N. D., Lineruth, K., Davis, T., Kaiser, K., et Cohen, P. T. (1998). Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 111 (Pt 10), 1331-1340.

Helps, N. R., Luo, X., Barker, H. M., et Cohen, P. T. (2000). NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J* 349, 509-518.

Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., et Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., et al. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.

Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D., et Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., et Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.

Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T., et Tye, B. K. (2000). Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev* 14, 913-926.

Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P., et Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 268, 305-314.

Hornig, N. C., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., et Uhlmann, F. (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* 12, 973-982.

Hornig, N. C., et Uhlmann, F. (2004). Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *Embo J* 23, 3144-3153.

Hsu, J. M., Huang, J., Meluh, P. B., et Laurent, B. C. (2003). The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 23, 3202-3215.

Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C. S., Lukas, J., et Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4, 358-366.

Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., et al. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-291.

Huang, J., Hsu, J. M., et Laurent, B. C. (2004). The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell* 13, 739-750.

Huet, X., Rech, J., Plet, A., Vie, A., et Blanchard, J. M. (1996). Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 16, 3789-3798.

Huletsky, A., Niedergang, C., Frechette, A., Aubin, R., Gaudreau, A., et Poirier, G. G. (1985). Sequential ADP-ribosylation pattern of nucleosomal histones. ADP-ribosylation of nucleosomal histones. *Eur J Biochem* 146, 277-285.

Hurlin, P. J., Foley, K. P., Ayer, D. E., Eisenman, R. N., Hanahan, D., et Arbeit, J. M. (1995). Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* 11, 2487-2501.

9

Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., et Kingston, R. E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.

Iritani, B. M., et Eisenman, R. N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13180-13185.

Irniger, S. (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett* 532, 7-11.

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., et Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699.

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A., et Kitagawa, M. (2000). Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* 275, 16235-16241.

Ito, T., Levenstein, M. E., Fyodorov, D. V., Kutach, A. K., Kobayashi, R., et Kadonaga, J. T. (1999). ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev* 13, 1529-1539.

9

- Jackman, M., Kubota, Y., den Elzen, N., Hagting, A., et Pines, J. (2002). Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* *13*, 1030-1045.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A., et Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* *5*, 143-148.
- Jacob, F., et Brenner, S. (1963). [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]. *C R Hebd Seances Acad Sci* *256*, 298-300.
- Jallepalli, P. V., Waizenegger, I. C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M. R., Peters, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., et Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* *105*, 445-457.
- Jares, P., Donaldson, A., et Blow, J. J. (2000). The Cdc7/Dbf4 protein kinase: target of the S phase checkpoint? *EMBO Rep* *1*, 319-322.
- Johnson, C. A., O'Neill, L. P., Mitchell, A., et Turner, B. M. (1998). Distinctive patterns of histone H4 acetylation are associated with defined sequence elements within both heterochromatic and euchromatic regions of the human genome. *Nucleic Acids Res* *26*, 994-1001.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N., et Gallant, P. (1999). *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell* *98*, 779-790.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., et Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* *19*, 187-191.

2

- Kadam, S., et Emerson, B. M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* *11*, 377-389.
- Kalinin, A. E., Kajava, A. V., et Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* *24*, 789-800.
- Kaszas, E., et Cande, W. Z. (2000). Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci* *113 (Pt 18)*, 3217-3226.
- Kato, G. J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., et Dang, C. V. (1990). An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* *10*, 5914-5920.
- Keyomarsi, K., Conte, D., Jr., Toyofuku, W., et Fox, M. P. (1995). Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* *11*, 941-950.
- Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H. J., et Pardee, A. B. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* *54*, 380-385.

- Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., et Seigneurin-Berny, D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 162-166.
- Kikuchi, A. (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* *268*, 243-248.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., et Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* *282*, 487-490.
- Kimura, K., et Hirano, T. (2000). Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11972-11977.
- Kingston, R. E., et Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* *13*, 2339-2352.
- Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C., et Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 73-79.
- Knudson, A. G., Jr. (1978). Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol* *5*, 57-60.
- Koepp, D. M., Harper, J. W., et Elledge, S. J. (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* *97*, 431-434.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868-871.
- Kornberg, R. D., et Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* *184*, 865-868.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 198-209.
- Kowenz-Leutz, E., et Leutz, A. (1999). A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell* *4*, 735-743.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., et Peters, J. M. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *Embo J* *22*, 6598-6609.
- Kramer, E. R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., et Peters, J. M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* *8*, 1207-1210.
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., et Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* *11*, 1555-1569.
- Kumagai, A., et Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* *273*, 1377-1380.
- Kung, A. L., Sherwood, S. W., et Schimke, R. T. (1990). Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 9553-9557.
- Kuo, M. H., et Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* *20*, 615-626.
- Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., et Allis, C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* *383*, 269-272.
- Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E., et Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* *12*, 627-639.



- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., et Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* *11*, 847-862.
- Labib, K., Diffley, J. F., et Kearsey, S. E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* *1*, 415-422.
- Lacey, K. R., Jackson, P. K., et Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2817-2822.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., et Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116-120.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., et Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* *89*, 349-356.
- Laman, H., Peters, G., et Jones, N. (2001). Cyclin-mediated export of human Orc1. *Exp Cell Res* *271*, 230-237.
- Land, H., Parada, L. F., et Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* *304*, 596-602.
- Lane, H. A., et Nigg, E. A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* *135*, 1701-1713.
- Langan, T. A., Gautier, J., Lohka, M., Hollingsworth, R., Moreno, S., Nurse, P., Maller, J., et Sclafani, R. A. (1989). Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol* *9*, 3860-3868.
- Langst, G., et Becker, P. B. (2001). ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell* *8*, 1085-1092.
- Langst, G., Bonte, E. J., Corona, D. F., et Becker, P. B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* *97*, 843-852.
- Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y., et Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* *407*, 592-598.
- Lavoie, J. N., Rivard, N., L'Allemain, G., et Pouyssegur, J. (1996). A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* *2*, 49-58.
- Lee, D. G., et Bell, S. P. (1997). Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* *17*, 7159-7168.
- Lee, J., Kumagai, A., et Dunphy, W. G. (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell* *12*, 551-563.
- Lee, J. K., Seo, Y. S., et Hurwitz, J. (2003). The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2334-2339.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M. R., Kihara, M., Sugino, A., et Tye, B. K. (1997). Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev* *11*, 3365-3374.

- Lengauer, C., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lenox, J. M., Koch, P. J., Mahoney, M. G., Lieberman, M., Stanley, J. R., et Radice, G. L. (2000). Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia. *J Invest Dermatol* 114, 948-952.
- Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z., et Geiger, B. (1999). p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 18, 869-876.
- Li, J., Meyer, A. N., et Donoghue, D. J. (1997a). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 502-507.
- Li, Q., et Dang, C. V. (1999). c-Myc overexpression uncouples DNA replication from mitosis. *Mol Cell Biol* 19, 5339-5351.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., et Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
- Li, R., Yerganian, G., Duesberg, P., Kraemer, A., Willer, A., Rausch, C., et Hehlmann, R. (1997b). Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14506-14511.
- Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W. K., Zhang, M. Q., et Ren, B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-8169.
- Lipford, J. R., et Bell, S. P. (2001). Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell* 7, 21-30.
- Liu, N., Lucibello, F. C., Engeland, K., et Muller, R. (1998). A new model of cell cycle-regulated transcription: repression of the cyclin A promoter by CDF-1 and anti-repression by E2F. *Oncogene* 16, 2957-2963.
- Liu, N., Lucibello, F. C., Korner, K., Wolfrain, L. A., Zwicker, J., et Muller, R. (1997). CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res* 25, 4915-4920.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., et Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 5, 917-926.
- Losada, A., Hirano, M., et Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* 16, 3004-3016.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., et Hirano, T. (2000). Identification and characterization of SA/Scp3 subunits in the Xenopus and human cohesin complexes. *J Cell Biol* 150, 405-416.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., et Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luger, K., et Richmond, T. J. (1998). DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* 8, 33-40.
- Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J., et Lukas, J. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401, 815-818.
- Luo, R. X., Postigo, A. A., et Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-473.



- Ma, H., Baumann, C. T., Li, H., Strahl, B. D., Rice, R., Jelinek, M. A., Aswad, D. W., Allis, C. D., Hager, G. L., et Stallcup, M. R. (2001). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol* 11, 1981-1985.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., et Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391, 601-605.
- Mahadevan, L. C., Willis, A. C., et Barratt, M. J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65, 775-783.
- Mai, S., Fluri, M., Siwarski, D., et Huppi, K. (1996a). Genomic instability in MycER-activated Rat1A-MycER cells. *Chromosome Res* 4, 365-371.
- Mai, S., Hanley-Hyde, J., et Fluri, M. (1996b). c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene* 12, 277-288.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A. V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., et Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *Embo J* 21, 5911-5920.
- Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H., et Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13, 882-886.
- Marahrens, Y., et Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 255, 817-823.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J. Y., Loktev, A., Hsieh, H. M., Reimann, J. D., et Jackson, P. K. (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 4, 813-826.
- Martens, J. A., et Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 136-142.
- Martinez, E., Kundu, T. K., Fu, J., et Roeder, R. G. (1998). A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* 273, 23781-23785.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K., et Arai, K. (2000). Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 by Cdks. *J Biol Chem* 275, 29042-29052.
- Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S., et Sedivy, J. M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* 8, 1039-1048.
- Matsumoto, Y., Hayashi, K., et Nishida, E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 9, 429-432.
- Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y. D., et Nigg, E. A. (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *J Cell Sci* 115, 3275-3284.

Mayor, T., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., Fry, A. M., et Nigg, E. A. (2000). The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol* *151*, 837-846.

McGhee, J. D., Nickol, J. M., Felsenfeld, G., et Rau, D. C. (1983). Histone hyperacetylation has little effect on the higher order folding of chromatin. *Nucleic Acids Res* *11*, 4065-4075.

McGowan, C. H., et Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *Embo J* *12*, 75-85.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., et Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* *404*, 782-787.

Mello, J. A., et Almouzni, G. (2001). The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 136-141.

Menssen, A., et Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6274-6279.

Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J., et Nigg, E. A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* *1*, 88-93.

Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B., et Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* *1*, 686-692.

Merrick, C. J., Jackson, D., et Diffley, J. F. (2004). Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J Biol Chem* *279*, 20067-20075.

Mihaylov, I. S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L. A., Minamino, N., Cooley, L., et Zhang, H. (2002). Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Mol Cell Biol* *22*, 1868-1880.

Mimura, S., et Takisawa, H. (1998). Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J* *17*, 5699-5707.

Minella, A. C., Swanger, J., Bryant, E., Welcker, M., Hwang, H., et Clurman, B. E. (2002). p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol* *12*, 1817-1827.

Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., et Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* *10*, 3065-3075.

Moreira, J. M., et Holmberg, S. (1999). Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *Embo J* *18*, 2836-2844.

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* *374*, 131-134.

Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 767-772.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 261-291.

Muchardt, C., Bourachot, B., Reyes, J. C., et Yaniv, M. (1998). ras transformation is associated with decreased expression of the brm/SNF2alpha ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* *17*, 223-231.

Muchardt, C., et Yaniv, M. (1999a). ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol* *293*, 187-198.

Muchardt, C., et Yaniv, M. (1999b). The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol* *10*, 189-195.

Muchardt, C., et Yaniv, M. (2001). When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene* *20*, 3067-3075.

Mulligan, G., et Jacks, T. (1998). The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet* *14*, 223-229.

Munger, K., et Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* *89*, 213-228.

Murgia, C., Blaikie, P., Kim, N., Dans, M., Petrie, H. T., et Giancotti, F. G. (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *Embo J* *17*, 3940-3951.

Murphy, D. J., Hardy, S., et Engel, D. A. (1999). Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol Cell Biol* *19*, 2724-2733.

Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C., et Sobczak-Thepot, J. (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* *15*, 83-86.

Musacchio, A., et Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 731-741.



Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., et Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386-389.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., et Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* *108*, 475-487.

Nasmyth, K., Peters, J. M., et Uhlmann, F. (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* *288*, 1379-1385.

Neish, A. S., Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Wei, W., et Parvin, J. D. (1998). Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* *26*, 847-853.

Nesbit, C. E., Tersak, J. M., et Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* *18*, 3004-3016.

Nevins, J. R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* *9*, 585-593.

Nguyen, V. Q., Co, C., et Li, J. J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* *411*, 1068-1073.

Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P., et Losson, R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *Embo J* *18*, 6385-6395.

Nielsen, A. L., Sanchez, C., Ichinose, H., Cervino, M., Lerouge, T., Chambon, P., et Losson, R. (2002). Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *Embo J* *21*, 5797-5806.

Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., et Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* *412*, 561-565.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* *17*, 471-480.

Nilsson, I., et Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4, 107-114.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., et Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16, 479-489.



O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G., Jr., et DePinho, R. A. (2000a). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* 14, 2185-2191.

O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C., et al. (2000b). Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet* 24, 113-119.

Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M., et Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136.

Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X. J., Howard, B. H., Qin, J., et Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., et Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.

Ohsumi, K., Katagiri, C., et Kishimoto, T. (1993). Chromosome condensation in Xenopus mitotic extracts without histone H1. *Science* 262, 2033-2035.

Okuda, M. (2002). The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6170-6174.

Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E., et Fukasawa, K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.

Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarle, S. A., et Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131, 3907-3920.

Orly, J., et Sato, G. (1979). Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell* 17, 295-305.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., et Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.



- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., et Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., et Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-685.
- Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., et Sif, S. (2003). mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol* 23, 7475-7487.
- Palazzo, R. E., Vogel, J. M., Schnackenberg, B. J., Hull, D. R., et Wu, X. (2000). Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol* 49, 449-470.
- Paramio, J. M., Casanova, M. L., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, E. B., et Jorcano, J. L. (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19, 3086-3094.
- Parisi, T., Beck, A. R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., et Amati, B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *Embo J* 22, 4794-4803.
- Patra, D., et Dunphy, W. G. (1998). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev* 12, 2549-2559.
- Patra, D., Wang, S. X., Kumagai, A., et Dunphy, W. G. (1999). The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* 274, 36839-36842.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- Pedersen, T. A., Kowenz-Leutz, E., Leutz, A., et Nerlov, C. (2001). Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev* 15, 3208-3216.
- Pelengaris, S., Khan, M., et Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., et Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A., et Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-5320.
- Persson, H., Gray, H. E., et Godeau, F. (1985). Growth-dependent synthesis of c-myc-encoded proteins: early stimulation by serum factors in synchronized mouse 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 5, 2903-2912.
- Peter, M., Le Peuch, C., Labbe, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J., et Doree, M. (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* 3, 551-556.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.

Peters, J. M., King, R. W., Hoog, C., et Kirschner, M. W. (1996). Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 274, 1199-1201.

Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., et Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* 18, 396-410.

Peterson, C. L., et Workman, J. L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10, 187-192.

Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J., et Kingston, R. E. (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* 3, 247-253.

Philips, A., Huet, X., Plet, A., Le Cam, L., Vie, A., et Blanchard, J. M. (1998). The retinoblastoma protein is essential for cyclin A repression in quiescent cells. *Oncogene* 16, 1373-1381.

Philips, A., Huet, X., Plet, A., Rech, J., Vie, A., et Blanchard, J. M. (1999). Anchorage-dependent expression of cyclin A in primary cells requires a negative DNA regulatory element and a functional Rb. *Oncogene* 18, 1819-1825.

Pierce, S. B., Yost, C., Britton, J. S., Loo, L. W., Flynn, E. M., Edgar, B. A., et Eisenman, R. N. (2004). dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development* 131, 2317-2327.

Pines, J. (1996). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* 6, 1399-1402.

Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1, E73-79.

Pines, J., et Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115, 1-17.

Pines, J., et Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* 13, 3772-3781.

Potten, C. S., et Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.

Pullner, A., Mautner, J., Albert, T., et Eick, D. (1996). Nucleosomal structure of active and inactive c-myc genes. *J Biol Chem* 271, 31452-31457.

Pusch, O., Bernaschek, G., Eilers, M., et Hengstschlager, M. (1997). Activation of c-Myc uncouples DNA replication from activation of G1-cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 15, 649-656.

2

Qian, Y. W., Erikson, E., Li, C., et Maller, J. L. (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 18, 4262-4271.



- Rabbits, P. H., Watson, J. V., Lamond, A., Forster, A., Stinson, M. A., Evan, G., Fischer, W., Atherton, E., Sheppard, R., et Rabbits, T. H. (1985). Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *Embo J* 4, 2009-2015.
- Rajagopalan, H., Jallepalli, P. V., Rago, C., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., et Lengauer, C. (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 428, 77-81.
- Rao, H., et Stillman, B. (1995). The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2224-2228.
- Rayman, J. B., Takahashi, Y., Indjeian, V. B., Dannenberg, J. H., Catchpole, S., Watson, R. J., te Riele, H., et Dynlacht, B. D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16, 933-947.
- Razin, A., et Riggs, A. D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., et Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Reichelt, J., et Magin, T. M. (2002). Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci* 115, 2639-2650.
- Reinke, H., Gregory, P. D., et Horz, W. (2001). A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the PHO8 promoter in vivo. *Mol Cell* 7, 529-538.
- Reinke, H., et Horz, W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* 11, 1599-1607.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A., et Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., et Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14, 1669-1679.
- Resnitzky, D., Hengst, L., et Reed, S. I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15, 4347-4352.
- Reyes, J. C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C., et Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J* 17, 6979-6991.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., et Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9, 1831-1845.
- Rieder, C. L., et Palazzo, R. E. (1992). Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci* 102 (Pt 3), 387-392.
- Roberts, C. W., Galusha, S. A., McMenamin, M. E., Fletcher, C. D., et Orkin, S. H. (2000). Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13796-13800.

- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N., et Grunstein, M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* *109*, 437-446.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E., et Assoian, R. K. (1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell* *10*, 3197-3204.
- Rosenberg, A. R., Zindy, F., Le Deist, F., Mouly, H., Metezeau, P., Brechot, C., et Lamas, E. (1995). Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* *10*, 1501-1509.
- Roth, S. Y., et Allis, C. D. (1992). Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci* *17*, 93-98.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., et Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* *70*, 81-120.
- Rothblum-Oviatt, C. J., Ryan, C. E., et Piwnica-Worms, H. (2001). 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell Growth Differ* *12*, 581-589.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* *18*, 5311-5317.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M., et Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* *392*, 831-835.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L., et Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* *72*, 481-516.

S

- Salma, N., Xiao, H., Mueller, E., et Imbalzano, A. N. (2004). Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* *24*, 4651-4663.
- Santoni-Rugiu, E., Falck, J., Mailand, N., Bartek, J., et Lukas, J. (2000). Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* *20*, 3497-3509.
- Santos, M., Bravo, A., Lopez, C., Paramio, J. M., et Jorcano, J. L. (2002). Severe abnormalities in the oral mucosa induced by suprabasal expression of epidermal keratin K10 in transgenic mice. *J Biol Chem* *277*, 35371-35377.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., et Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Sawin, K. E., et Mitchison, T. J. (1995). Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4289-4293.
- Schmid, P., Schulz, W. A., et Hameister, H. (1989). Dynamic expression pattern of the myc protooncogene in midgestation mouse embryos. *Science* *243*, 226-229.
- Schmidt, E. V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* *18*, 2988-2996.
- Schmiesing, J. A., Gregson, H. C., Zhou, S., et Yokomori, K. (2000). A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of *Xenopus* XCAP-D2,

colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation. *Mol Cell Biol* 20, 6996-7006.

Schnitzler, G., Sif, S., et Kingston, R. E. (1998). Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* 94, 17-27.

Schorl, C., et Sedivy, J. M. (2003). Loss of protooncogene c-Myc function impedes G1 phase progression both before and after the restriction point. *Mol Biol Cell* 14, 823-835.

Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R., Rao, G., Guida, P., Skoultchi, A. I., et DePinho, R. A. (1995). An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* 80, 777-786.

Schreiber-Agus, N., Stein, D., Chen, K., Goltz, J. S., Stevens, L., et DePinho, R. A. (1997). Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1235-1240.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., et Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., et Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.

Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P., et Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11264-11268.

Sealy, L., et Chalkley, R. (1978). DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I. *Nucleic Acids Res* 5, 1863-1876.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., et Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.

Sen, S. (2000). Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 12, 82-88.

Shanahan, F., Seghezzi, W., Parry, D., Mahony, D., et Lees, E. (1999). Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol* 19, 1460-1469.

Sharma, K., Weinberger, M., et Huberman, J. A. (2001). Roles for internal and flanking sequences in regulating the activity of mating-type-silencer-associated replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 35-45.

Sharpless, N. E., et DePinho, R. A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9, 22-30.

Shen, X., Yu, L., Weir, J. W., et Gorovsky, M. A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell* 82, 47-56.

Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Sherr, C. J., et Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163.

Sherr, C. J., et Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Sherr, C. J., et Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-99.

Shiio, Y., et Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13225-13230.

Shimono, Y., Murakami, H., Kawai, K., Wade, P. A., Shimokata, K., et Takahashi, M. (2003). Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J Biol Chem* 278, 51638-51645.

Siddiqui, H., Solomon, D. A., Gunawardena, R. W., Wang, Y., et Knudsen, E. S. (2003). Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol Cell Biol* 23, 7719-7731.

Sif, S., Saurin, A. J., Imbalzano, A. N., et Kingston, R. E. (2001). Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev* 15, 603-618.

Simpson, R. T. (1990). Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature* 343, 387-389.

Soutoglou, E., et Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901-1904.

Spencer, C. A., et Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 56, 1-48.

Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W., et Reed, S. I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7, 639-650.

Spruck, C. H., Won, K. A., et Reed, S. I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401, 297-300.

St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J. W., Florenes, V. A., Slingerland, J. M., et Kerbel, R. S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* 142, 557-571.

Staehling-Hampton, K., Ciampa, P. J., Brook, A., et Dyson, N. (1999). A genetic screen for modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153, 275-287.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., et Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.

Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., et Eilers, M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* 14, 4814-4826.

Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., et Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107, 715-726.

Stevaux, O., et Dyson, N. J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 684-691.

Stevenson, J. B., et Gottschling, D. E. (1999). Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev* 13, 146-151.

Stewart, Z. A., Leach, S. D., et Pietenpol, J. A. (1999). p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol Cell Biol* 19, 205-215.

Stopka, T., et Skoultchi, A. I. (2003). The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14097-14102.

Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G., et Allis, C. D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14967-14972.

Strobeck, M. W., Knudsen, K. E., Fribourg, A. F., DeCristofaro, M. F., Weissman, B. E., Imbalzano, A. N., et Knudsen, E. S. (2000). BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7748-7753.

Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, et Goff, S. P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol* 16, 1576-1583.

Stucke, V. M., Sillje, H. H., Arnaud, L., et Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *Embo J* *21*, 1723-1732.

Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., et Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3364-3369.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H., et Peters, J. M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* *151*, 749-762.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., et Peters, J. M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* *9*, 515-525.

Sumi-Ichinose, C., Ichinose, H., Metzger, D., et Chambon, P. (1997). SNF2beta-BRG1 is essential for the viability of F9 murine embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* *17*, 5976-5986.

Sumiyoshi, E., Sugimoto, A., et Yamamoto, M. (2002). Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci* *115*, 1403-1410.

Sun, Z. W., et Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* *418*, 104-108.

Sunkel, C. E., et Glover, D. M. (1988). *polo*, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* *89 (Pt 1)*, 25-38.

Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., et Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev* *13*, 2271-2283.

Syntichaki, P., Topalidou, I., et Thireos, G. (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* *404*, 414-417.

7

Takahashi, Y., Rayman, J. B., et Dynlacht, B. D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* *14*, 804-816.

Takuwa, N., Fukui, Y., et Takuwa, Y. (1999). Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* *19*, 1346-1358.

Taunton, J., Hassig, C. A., et Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* *272*, 408-411.

Taylor, W. R., et Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* *20*, 1803-1815.

Tedesco, D., Lukas, J., et Reed, S. I. (2002). The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* *16*, 2946-2957.

Thoma, F., Bergman, L. W., et Simpson, R. T. (1984). Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J Mol Biol* *177*, 715-733.

- Thullberg, M., Bartkova, J., Khan, S., Hansen, K., Ronnstrand, L., Lukas, J., Strauss, M., et Bartek, J. (2000). Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett* 470, 161-166.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180, 487-502.
- Toh, Y., Oki, E., Oda, S., Tokunaga, E., Ohno, S., Maehara, Y., Nicolson, G. L., et Sugimachi, K. (1997). Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis. *Int J Cancer* 74, 459-463.
- Toh, Y., Pencil, S. D., et Nicolson, G. L. (1994). A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* 269, 22958-22963.
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., et Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917-921.
- Topley, G. I., Okuyama, R., Gonzales, J. G., Conti, C., et Dotto, G. P. (1999). p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9089-9094.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., et Nishida, E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410, 215-220.
- Traas, J., Hulskamp, M., Gendreau, E., et Hofte, H. (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol* 1, 498-503.
- Trimarchi, J. M., et Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 11-20.
- Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M., et Kouzarides, T. (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11268-11273.
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G. R., et Bishop, J. M. (2001). c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* 414, 768-773.
- Tse, C., et Hansen, J. C. (1997). Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction. *Biochemistry* 36, 11381-11388.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., et Hansen, J. C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18, 4629-4638.
- Tsuchiya, E., Hosotani, T., et Miyakawa, T. (1998). A mutation in NPS1/STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin-remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres. *Nucleic Acids Res* 26, 3286-3292.
- Tsukiyama, T., et Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Genet Dev* 7, 182-191.



Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., et Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.

Umar, A., Buermeyer, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M., et Kunkel, T. A. (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87, 65-73.



van Holde, K., et Zlatanova, J. (1999). The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance? *Bioessays* 21, 776-780.

Van Hooser, A., Goodrich, D. W., Allis, C. D., Brinkley, B. R., et Mancini, M. A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* 111 (Pt 23), 3497-3506.

Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., et Becker, P. B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388, 598-602.

Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., et Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3, 1076-1085.

Venditti, P., Costanzo, G., Negri, R., et Camilloni, G. (1994). ABFI contributes to the chromatin organization of *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 B-domain. *Biochim Biophys Acta* 1219, 677-689.

Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., et Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773-779.

Versini, G., Comet, I., Wu, M., Hoopes, L., Schwob, E., et Pasero, P. (2003). The yeast Sgs1 helicase is differentially required for genomic and ribosomal DNA replication. *Embo J* 22, 1939-1949.

Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M. F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., et Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203-206.

Veyrune, J. L., Hesketh, J., et Blanchard, J. M. (1997). 3' untranslated regions of c-myc and c-fos mRNAs: multifunctional elements regulating mRNA translation, degradation and subcellular localization. *Prog Mol Subcell Biol* 18, 35-63.

Vidal, A., et Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.

Vidal, M., et Gaber, R. F. (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 6317-6327.

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., et Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20, 1899-1910.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., et Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709-718.

Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D., et Amati, B. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* 15, 6595-6604.

Vlach, J., Hennecke, S., et Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-5344.

Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B. J., et Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* 10, 1223-1233.



Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F., et Wolffe, A. P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 62-66.

Wade, P. A., Jones, P. L., Vermaak, D., et Wolffe, A. P. (1998). A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol* 8, 843-846.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., et Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.

Waikel, R. L., Kawachi, Y., Waikel, P. A., Wang, X. J., et Roop, D. R. (2001). Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 28, 165-168.

Waizenegger, I., Gimenez-Abian, J. F., Wernic, D., et Peters, J. M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* 12, 1368-1378.

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., et Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.

Walsh, S., Margolis, S. S., et Kornbluth, S. (2003). Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol Cancer Res* 1, 280-289.

Wang, H. B., et Zhang, Y. (2001). Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res* 29, 2517-2521.

Wang, J., Zindy, F., Chenivesse, X., Lamas, E., Henglein, B., et Brechot, C. (1992). Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 7, 1653-1656.

Wang, S., Zhang, B., et Faller, D. V. (2002). Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J* 21, 3019-3028.

Wang, W., Cote, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., et al. (1996a). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J* 15, 5370-5382.

Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B. R., et Crabtree, G. R. (1996b). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev* 10, 2117-2130.

Wanzel, M., Herold, S., et Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 13, 146-150.

Watanabe, N., Broome, M., et Hunter, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *Embo J* 14, 1878-1891.

Watrln, E., et Legagneux, V. (2005). Contribution of hCAP-D2, a Non-SMC Subunit of Condensin I, to Chromosome and Chromosomal Protein Dynamics during Mitosis. *Mol Cell Biol* 25, 740-750.

Watt, F. M. (1989). Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol* 1, 1107-1115.

Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 831-837.

Watt, F. M. (2001). Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 410-417.

Watt, F. M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21, 3919-3926.

Watt, F. M., et Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430.

Weber, J. D., Raben, D. M., Phillips, P. J., et Baldassare, J. J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1), 61-68.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

Weinmann, A. S., Yan, P. S., Oberley, M. J., Huang, T. H., et Farnham, P. J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* 16, 235-244.

Wells, J., Boyd, K. E., Fry, C. J., Bartley, S. M., et Farnham, P. J. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* 20, 5797-5807.

Widom, J. (1997). Getting around the nucleosomes. *Science* 278, 1899-1901.

Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., et Tora, L. (1998). Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 393, 187-191.

Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., et Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.

Winey, M., et O'Toole, E. T. (2001). The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol* 3, E23-27.

Winston, F., et Carlson, M. (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* 8, 387-391.

Wolffe, A. P., et Hayes, J. J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27, 711-720.

Wong, A. K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., Ghaffari, S., Iliev, D., Penn, B., Woodland, A. M., et al. (2000). BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* 60, 6171-6177.

Woo, R. A., et Poon, R. Y. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2, 316-324.

Wu, L., et Winston, F. (1997). Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the SUC2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 25, 4230-4234.

Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., et Larsson, L. G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.

X

Xue, Y., Canman, J. C., Lee, C. S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G. T., Young, M. K., Salmon, E. D., et Wang, W. (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13015-13020.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J., et Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2, 851-861.

Y

Yanagida, M. (2000). Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* 5, 1-8.

Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., et Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-2143.

Yang, J., Song, H., Walsh, S., Bardes, E. S., et Kornbluth, S. (2001a). Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J Biol Chem* 276, 3604-3609.

Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., et al. (2001b). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20, 1688-1702.

Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M., et Strebhardt, K. (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 21, 8282-8292.

Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., et Peterson, C. L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev* 13, 2369-2374.

Yukawa, M., Katoh, S., Miyakawa, T., et Tsuchiya, E. (1999). Nps1/Sth1p, a component of an essential chromatin-remodeling complex of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for the maximal expression of early meiotic genes. *Genes Cells* 4, 99-110.

Z

Zeller, K. I., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A., et Dang, C. V. (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 4, R69.

Zerfass-Thome, K., Schulze, A., Zwerschke, W., Vogt, B., Helin, K., Bartek, J., Henglein, B., et Jansen-Durr, P. (1997). p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol Cell Biol* 17, 407-415.

Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., et Dean, D. C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.

Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., Turner, B. M., et Roth, S. Y. (1998a). Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *Embo J* 17, 3155-3167.

Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S., et Reinberg, D. (1998b). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 95, 279-289.

Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., et Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935.

Zhang, Z. K., Davies, K. P., Allen, J., Zhu, L., Pestell, R. G., Zagzag, D., et Kalpana, G. V. (2002). Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol Cell Biol* 22, 5975-5988.

Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R. M., Roberts, J. M., et Assoian, R. K. (1996). Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 133, 391-403.

Zou, H., Stemman, O., Anderson, J. S., Mann, M., et Kirschner, M. W. (2002). Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett* 528, 246-250.

Zou, L., et Stillman, B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280, 593-596.

Zou, L., et Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* 20, 3086-3096.

Zwicker, J., Lucibello, F. C., Wolfrain, L. A., Gross, C., Truss, M., Engeland, K., et Muller, R. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *Embo J* 14, 4514-4522.

RESUME en français

Les principaux régulateurs de la prolifération cellulaire sont les Cdk (cyclin dependent kinase), dont l'activité dépend de leur association avec leurs partenaires, les cyclines. Le contrôle du niveau d'expression des cyclines représente le premier mécanisme par lequel l'activité des Cdk est régulée. Cette régulation est essentielle pour maintenir l'équilibre prolifération/différenciation de la peau. Cependant, les mécanismes mis en jeu restent peu connus.

Nous avons montré que Brm, protéine des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF, est responsable de la répression de la cycline A par la mise en place ou le maintien de deux nucléosomes situés sur les sites d'initiation de la transcription. De plus, nous avons mis en évidence que l'absence de brm conduit à accélérer la progression des cellules dans le cycle cellulaire en jouant sur le déroulement de la phase S. Cependant, les cellules dépourvues de brm présentent également une mitose rallongée et des aberrations chromosomiques. Ceci pourrait être la conséquence de la dérégulation de trois oncogènes : c-myc, cycline A et cycline E et pourrait expliquer pourquoi brm est mutée dans de nombreux cancers.

Enfin, nous avons montré que l'entrée en différenciation des kératinocytes s'accompagne d'une forte expression de p21 qui entraîne un arrêt en G2/M en inhibant les complexes Cycline A/Cdk. Cependant, les kératinocytes en différenciation ne peuvent maintenir cet arrêt et entre dans un état G1 à 4N, caractérisé par une forte expression de la Cycline E et l'absence de Cyclines de G2/M.

DISCIPLINE: Biologie Cellulaire et Biochimie

MOTS-CLES

cycle cellulaire, cycline, Cdk, p21, Brm, chromatine, kératinocytes, différenciation

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

IGMM, UMR 5535
équipe du Dr Jean-Marie Blanchard
1919, route de Mende
34293 Montpellier Cedex 5