



**HAL**  
open science

# ASPECTS EPIGENETIQUES DES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES & IMPLICATION DE L'HISTONE ACETYLTRANSFERASE Tip60

Arnaud van den Broeck

► **To cite this version:**

Arnaud van den Broeck. ASPECTS EPIGENETIQUES DES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES & IMPLICATION DE L'HISTONE ACETYLTRANSFERASE Tip60. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00419895

**HAL Id: tel-00419895**

**<https://theses.hal.science/tel-00419895>**

Submitted on 25 Sep 2009

**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.

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE I**  
Spécialité : **Biologie Cellulaire et Intégrative**

Soutenue publiquement par

**Arnaud VAN DEN BROECK**

le 3 Septembre 2009

**ASPECTS ÉPIGÉNÉTIQUES  
DES  
CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES  
&  
IMPLICATION DE L'HISTONE ACÉTYLTRANSFÉRASE  
Tip60**

**Membres du jury :**

Rapporteur : **Pr Jean-Yves SCOAZEC**, Lyon  
Rapporteur : **Dr Didier TROUCHE**, Toulouse  
Examineur : **Pr Elizabeth BRAMBILLA**, Grenoble  
Examineur : **Dr Saadi KHOCHBIN**, Grenoble  
Examineur : **Dr Zdenko HERCEG**, Lyon

Directeur de thèse : **Dr Sylvie GAZZERI**, Grenoble

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE I**  
Spécialité : **Biologie Cellulaire et Intégrative**

Soutenue publiquement par

**Arnaud VAN DEN BROECK**

le 3 Septembre 2009

**ASPECTS ÉPIGÉNÉTIQUES  
DES  
CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES  
&  
IMPLICATION DE L'HISTONE ACÉTYLTRANSFÉRASE  
Tip60**

**Membres du jury :**

Rapporteur : **Pr Jean-Yves SCOAZEC**, Lyon  
Rapporteur : **Dr Didier TROUCHE**, Toulouse  
Examineur : **Pr Elizabeth BRAMBILLA**, Grenoble  
Examineur : **Dr Saadi KHOCHBIN**, Grenoble  
Examineur : **Dr Zdenko HERCEG**, Lyon

Directeur de thèse : **Dr Sylvie GAZZERI**, Grenoble

# **REMERCIEMENTS**

Je remercie le **Professeur Christian BRAMBILLA** de m'avoir accueilli dans son unité INSERM ainsi que le **Professeur Elisabeth BRAMBILLA** de m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son groupe de recherche.

Je remercie les membres du jury, le **Professeur Jean-Yves SCOAZEC** et le **Docteur Didier TROUCHE** qui m'ont fait l'honneur de juger et de critiquer ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que les **Docteurs Zdenko HERCEG** et **Saadi KHOCHBIN** pour leur participation à ce jury de thèse.

Je remercie la **Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF)** pour son soutien financier durant ma 4<sup>ème</sup> année de Doctorat.

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Docteur Sylvie GAZZERI** de m'avoir accueilli dans son équipe dès ma première année de Master et de m'avoir permis d'y effectuer également ma thèse. Merci aussi pour toute sa confiance, sa disponibilité, ses conseils et son soutien lorsque les résultats se faisaient attendre.

Je désire également remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux de thèse :

Merci **Béatrice** pour toutes tes critiques scientifiques constructives et pour ta bonne humeur de tous les jours.

Merci **Pascal** pour tout le temps passé sous la hôte de culture. Merci pour ta patience, ton aide précieuse et ta sympathie.

Merci **Céline** pour tous ces services techniques rendus, ta bonne humeur de tous les jours, et ta joie de vivre pétillante, bref pour ton immense contribution au bon fonctionnement et à la bonne ambiance du labo.

Merci **Damien** pour ton étroite collaboration durant cette dernière année de thèse. Merci également pour tous ces bons moments passés ensemble.

Merci **Laure** pour ton aide technique à mes débuts et pour ton amitié.

Merci à toutes mes collègues de bureau **Valérie**, **Peggy**, **Galia**, et plus récemment **Elodie**, pour avoir contribué à cette excellente ambiance de travail (enfin, ponctuée de rires mémorables !!!). Merci pour tout.

Merci **Patricia** pour ta bonne humeur et tes taquineries quotidiennes.

Merci **Coco** pour ton aide et ta joie de vivre.

Merci également à tout le reste de l'**ex-U578** pour leur amitié.

Un grand Merci à **ma famille**, notamment à ma petite sœur **Audrey** et à mon petit frère **Mathieu**, et surtout à **mes parents** qui m'ont toujours encouragé. Mille merci pour votre soutien, ainsi que votre aide dans les moments difficiles. Je vous aime tant. Merci également à **mes grands-parents** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi depuis tout petit. Sans eux, je n'en serais pas là aujourd'hui.

Merci à ma belle famille et notamment mes beaux-parents **Alain** et **Marinette** pour leurs encouragements, et **Véro** et **Mousse** pour leur gentillesse.

Merci également à tous mes amis qui ont su tirer profit de mon temps libre pour me changer l'esprit et plus particulièrement à **Damien** et **Claire**, et à **David** et **Elodie**.

Un dernier merci, et non pas des moindres à **Julie**, ma femme, qui a toujours été présente, notamment dans les moments difficiles. Elle a su quitter sa famille, son travail, et ses amis pour me suivre dans cette aventure. Merci d'avoir toujours été à mon écoute, de m'avoir continuellement encouragé et supporté, même lorsque mon travail affectait mon humeur, particulièrement ces derniers temps. Merci pour ta patience. Merci infiniment pour cet amour sans conditions.

# **AVANT-PROPOS**

Ces travaux ont été réalisés dans le Centre de Recherche INSERM/UJF U823, dans l'Equipe 2 « Bases Moléculaires de la Progression de Cancers du Poumon », à l'institut Albert Bonniot, à Grenoble.

Ils ont donné lieu aux publications/communications suivantes :

### **Articles dans des revues internationales à comité de lecture**

**A. Van Den Broeck**, E. Brambilla, D. Moro-Sibilot, S. Lantuejoul, C. Brambilla, B. Eymin, S. Khochbin, and S. Gazzeri.

Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.

**Clinical Cancer Research**, Volume 14 (22), 2008, Pages 7237-7245.

### **Articles annexes:**

A. Eymery, B. Horard, M. El Atifi-Borel, G. Fourel, F. Berger, A. L. Vitte, **A. Van den Broeck**, E. Brambilla, A. Fournier, M. Callanan, S. Gazzeri, S. Khochbin, S. Rousseaux, E. Gilson and C. Vourc'h.

A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells.

**Nucleic Acids Research**, *en revue*.

G. Merdzhanova, V. Edmond, S. De Seranno, **A. Van Den Broeck**, L. Corcos, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and E. Eymin.

E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35.

**Cell Death Differ**, Volume 15 (12), Dec. 2008, Pages 1815-23.



## Communications orales

**Conférencier invité dans l'équipe de Peter D. Adams, Beatson Institute For Cancer Research**, Décembre 2008, Glasgow, Ecosse : Epigenetic Aspects of Lung Cancer.

**Lungstorming - 7<sup>ème</sup> Réunion d'Hiver**, Février 2008, Lille, France : Aspects épigénétiques des cancers broncho-pulmonaires : Rôle de l'Histone Acétyltransférase Tip60.

**Seconde Journée Epipro**, Octobre 2007, Lyon, France : Modification de l'acétylation et de la méthylation de l'histone H4 dans les cancers du poumon.

**Journée de l'Ecole Doctorale**, Juin 2007, Grenoble, France : Aspects épigénétiques des cancers pulmonaires - Rôle de la protéine suppressive de tumeur p14<sup>ARF</sup>.

**2<sup>ème</sup> Journée Scientifiques du CLARA**, Mars 2007, Grenoble, France : Le facteur de transcription E2F1 est négativement régulé par acétylation via la protéine Tip60.

## Communications affichées

**Journées de la Recherche Médicale de Grenoble (JRM)**, Avril 2009, Grenoble, France : Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.

**4<sup>ème</sup> Journées de Recherche Respiratoire (J2R)**, Octobre 2008, Grenoble, France : The Tip60 acetyltransferase modulates the E2F1 transcription factor.

**3<sup>ème</sup> Journée Scientifiques du CLARA**, Mars 2008, Lyon, France: Aberrant pattern of histone H4 modification in human lung carcinoma.

**3<sup>ème</sup> Journées de Recherche Respiratoire (J2R)**, Octobre 2007, Paris, France : Altération globale des modifications épigénétiques de l'histone H4 dans les tumeurs bronchiques humaines.

**Gordon Research Conferences on CANCER GENETICS & EPIGENETICS**, Mai 2007, Barga, Italia: Aberrant pattern of histone H4 modification in human lung carcinoma.

**2<sup>ème</sup> Journée Scientifiques du CLARA**, Mars 2007, Grenoble, France: Le facteur de transcription E2F1 est négativement régulé par acétylation via la protéine Tip60.

**2<sup>ème</sup> Journées de Recherche Respiratoire (J2R)**, Octobre 2006, Tours, France : Tip60 régule négativement l'activité biologique du facteur de transcription E2F1.

**Prix et récompenses**

**2<sup>ème</sup> Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), Octobre 2006, Tours, France:**

***PRIX DU MEILLEUR POSTER***

# **TABLE DES MATIERES**

<b>REMERCIEMENTS</b> -----	1
<b>AVANT-PROPOS</b> -----	3
<b>TABLE DES MATIERES</b> -----	6
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> -----	11
<b>ABREVIATIONS</b> -----	14
<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>18</b>
<b>I. LE CANCER DU POU MON</b> -----	<b>18</b>
1. Données épidémiologiques-----	18
2. Etiologie-----	19
3. Classification histologique des cancers du poumon selon l’OMS (2004)-----	19
3.1 Les carcinomes malpighiens-----	20
3.2 Les adénocarcinomes-----	20
3.3 Les carcinomes à petites cellules (CPC)-----	21
3.4 Les carcinomes à grandes cellules-----	21
3.5 Les tumeurs carcinoïdes-----	22
4. Classification pathologique pTNM selon l’UICC (2002)-----	22
5. Caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire-----	24
5.1 La susceptibilité face au cancer pulmonaire-----	24
5.2 La carcinogénèse broncho-pulmonaire, un processus multi-étapes-----	25
5.3 Instabilité chromosomique, oncogènes et suppresseurs de tumeur-----	27
5.3.1 Instabilité chromosomique-----	28
5.3.2 Les oncogènes et signaux de prolifération-----	28
5.3.3 Les gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance-----	30
5.3.3.1 L’inactivation de la voie p16 <sup>INK4a</sup> /Rb-----	32
a) L’inactivation du gène Rb (Retinoblastome)-----	32
b) L’inactivation de p16 <sup>INK4a</sup> -----	32
5.3.3.2 L’inactivation de la voie p14 <sup>ARF</sup> /p53-----	34
a) L’inactivation de p53-----	34
b) L’inactivation de p14 <sup>ARF</sup> -----	35
<b>II. NOTIONS D’EPIGENETIQUE</b> -----	<b>36</b>
1. La structure de la chromatine-----	36
1.1 Le nucléosome : élément de base de la chromatine-----	38
1.2 L’euchromatine et l’hétérochromatine-----	38
2. Les modifications de la chromatine et leurs fonctions-----	39
2.1 Les fonctions globales des modifications de la chromatine-----	41
2.2 Les fonctions localisées des modifications de la chromatine-----	41
2.2.1 L’acétylation...-----	42

2.2.1.1 ... dans la transcription	42
2.2.1.2 ... dans la réparation	44
2.2.1.3 ... dans la réplication	44
2.2.1.4 ... dans la relaxation chromatinienne	44
2.2.2 La méthylation...	45
2.2.2.1 ... dans la transcription	45
2.2.2.2 ... dans la réponse aux dommages de l'ADN	47
2.2.2.3 ... dans le développement	48
3. Le code histone	48
4. Une mission : décrypter le code !	49
5. Les variants d'histones	50
6. Et l'épigénétique dans le cancer ?	51
6.1 Le statut épigénétique des cellules normales	51
6.2 Le statut épigénétique des cellules tumorales	52
6.3 Les altérations épigénétiques et leur impact sur le pronostic	53
6.4 Une nouvelle génération de thérapies cliniques	54

### **III. L'HISTONE ACETYLTRANSFERASE TIP60 : STRUCTURE ET FONCTIONS**-----55

1. Le gène HTATIP	55
2. Localisation subcellulaire et expression de Tip60	57
2.1 Localisation subcellulaire de Tip60	57
2.2 Expression de la protéine Tip60	57
2.2.1 Modifications post-traductionnelles	57
2.2.1.1 Ubiquitinylation	57
2.2.1.2 Phosphorylation	58
2.2.1.3 Acétylation	58
2.2.2 Autres modes de régulation	58
3. Tip60 possède une activité histone acétyltransférase	59
4. Le complexe Tip60	60
5. Les fonctions biologiques de Tip60	62
5.1. Implication dans la régulation de la transcription	62
5.1.1 Co-activateur	62
5.1.1.1 Le facteur de transcription c-Myc	62
5.1.1.2 Le facteur de transcription E2F1	62
5.1.1.3 Autres facteurs de transcription	64
5.1.2 Co-répresseur	64
5.2 Tip60 : protéine clé de la réponse aux cassures double-brins de l'ADN	65
5.2.1 Mise en place de la réponse aux dommages de l'ADN	66
5.2.2 Relaxation de la chromatine	67
5.2.3 Echange d'histones	69
5.2.4 Co-activation de p53	69

5.3 L'apoptose selon Tip60	70
6. Tip60, un nouveau paradoxe dans le cancer	71
6.1 Tip60, oncogène	71
6.2 Tip60, suppresseur de tumeur	72
6.3 Qu'en est-il des sous-unités de son complexe ?	73
<b>IV. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1, UNE PROTEINE MULTI-FACETTES</b>	<b>75</b>
1. Organisation de la famille E2F	75
1.1 Structure	75
1.2 Les différents sous-groupes de la famille E2F	77
1.2.1 Les facteurs activateurs	77
1.2.2 Les facteurs répresseurs	77
2. E2F1, un facteur de transcription étroitement régulé	79
2.1 Expression	79
2.1.1 L'ubiquitinylation	79
2.1.2 La phosphorylation	80
2.1.3 L'acétylation	82
2.2 Localisation	82
3. Les fonctions biologiques du facteur de transcription E2F1	83
3.1 Vue traditionnelle de E2F1 : contrôler l'entrée en phase S	83
3.1.1 La rupture du frein Rb : un réseau complexe de phosphorylations	84
3.1.2 Activation du programme transcriptionnel E2F1 : un surprenant switch moléculaire !	84
3.2 E2F1 un facteur de la prolifération doté d'une fonction pro-apoptotique	85
3.2.1 La mort cellulaire dépendante de p53	86
3.2.2 La mort cellulaire indépendante de p53	86
3.2.3 La voie TRAIL	86
3.2.4 La voie AKT ou le contrôle de l'apoptose	87
3.3 E2F1, une clé pour la réparation des dommages de l'ADN	89
3.3.1 Phosphorylation et stabilisation de E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN	89
3.3.2 Un rôle privilégié pour la protéine p73	89
3.3.3 Acétylation de E2F1 : une étape critique de la réponse aux dommages de l'ADN	90
3.3.4 E2F1, senseur de dommages de l'ADN ?	93
3.4 E2F1 et Sénescence : une alliance obscure	93
3.4.1 La sénescence répllicative	93
3.4.2 La sénescence de stress	94
4. E2F1, un paradoxe dans la tumorigénèse	95
4.1 E2F1, oncogène	95
4.2 E2F1, suppresseur de tumeur	96
4.3 Une influence tissulaire et environnementale majeure	97

<b>OJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>99</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>100</b>
<b>I. Altération globale des modifications épigénétiques de l’histone H4 dans les cancers du poumon</b> .....	<b>100</b>
1. Introduction.....	100
2. Résultats .....	101
2.1 Altération globale de l’acétylation de l’histone H4 .....	101
2.2 Eradication de la triméthylation de l’histone H4 .....	101
2.3 Un suspect : matricule N° Suv4-20H2 .....	102
3. Conclusion.....	103
4. Article 1 .....	103
<b>II. Le facteur de transcription E2F1 est régulé par Tip60 en réponse aux stress génotoxiques</b> .....	<b>104</b>
1. Introduction.....	104
2. Résultats .....	105
2.1 La HAT Tip60 interagit avec le facteur de transcription E2F1 et l’acétyle sur ses lysines 120 et 125 .....	105
2.2 L’acétylation de E2F1 par Tip60 conduit à sa stabilisation .....	105
2.3 E2F1 s’accumule sous une forme acétylée dépendante de Tip60 en réponse au cis-platine.....	106
3. Conclusion.....	106
4. Article 2 .....	106
<b>RESULTATS NON PUBLIES</b> .....	<b>130</b>
<b>Statut de l’histone acétyltransférase Tip60 dans les cancers broncho-pulmonaires</b> .....	<b>130</b>
1. Introduction.....	130
2. Résultats .....	130
2.1 Production et validation d’un anticorps dirigé contre la protéine Tip60.....	130
2.2 Analyse ”in situ” de l’expression de la protéine Tip60 dans les tumeurs bronchiques	131
2.3 Perte de l’expression de l’ARNm de Tip60 .....	133
2.4 Le promoteur du gène HTATIP codant pour Tip60 n’est pas méthylé .....	134
2.5 Rôle des microARNs ?.....	138
3. Conclusion/Discussion.....	140

<b>DISCUSSION</b> .....	<b>142</b>
<b>I. Une signature épigénétique pour les cancers du poumon</b> .....	<b>142</b>
1. L'altération globale des marques épigénétiques de l'histone H4 .....	142
1.1 Les lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4 .....	143
1.2 La lysine 16 de l'histone H4, une lysine à part .....	143
1.3 H4K20me3, une marque de l'hétérochromatine .....	144
2. Mise en évidence d'un « dialogue épigénétique » .....	146
3. Mécanismes moléculaires à l'origine des altérations... ..	146
3.1 ...de l'acétylation de l'histone H4 ? .....	146
3.2 ...de la triméthylation de H4K20 ? .....	148
4. H4K20me3, un outil potentiel pour une meilleure prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes de stade I ? .....	149
<b>II. E2F1 s'accumule sous une forme acétylée dépendante de la HAT Tip60 en réponse au stress génotoxiques</b> .....	<b>150</b>
1. Une nouvelle implication de E2F1 dans la réponse aux dommages de l'ADN .....	150
2. Tip60 vs P/CAF : Deux HATs pour une même cible ! .....	152
3. E2F1, senseur de dommages de l'ADN ? .....	154
4. Vers une meilleure compréhension de la résistance des cellules tumorales aux sels de platine .....	154
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>156</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>186</b>



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>FIGURE 1 : ESTIMATION DE L'INCIDENCE ET DE LA MORTALITE DES CANCERS EN EUROPE EN 2006. TABLEAU 1 : CLASSIFICATION PTNM SELON L'UICC 2002 (6<sup>EME</sup> EDITION)</b> -----	18
<b>FIGURE 2 : MODELE DE LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE: UN PROCESSUS MULTI-ETAPES</b> -----	26
<b>FIGURE 3 : ALTERATION DES VOIES SUPPRESSIVES DE TUMEUR DANS LES CANCERS DU POUMON</b> -----	31
<b>FIGURE 4 : ALTERATIONS DE LA VOIE RB DANS LES CANCERS HUMAINS</b> -----	33
<b>FIGURE 5 : LES DIFFERENTS NIVEAUX D'ORGANISATION DE LA CHROMATINE</b> -	37
<b>FIGURE 6 : LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES DE CŒUR NUCLEOSOMALES</b> -----	43
<b>FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DOMAINES PROTEIQUES DES PROTEINES TIP60</b> -----	56
<b>FIGURE 8 : MODELE SIMPLIFIE DE L'IMPLICATION DE TIP60 DANS LA TRANSCRIPTION DES GENES</b> -----	65
<b>FIGURE 9 : MODELE DE L'IMPLICATION DU COMPLEXE TIP60 DANS LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN ET LEUR REPARATION CHEZ LES MAMMIFERES</b> -----	68
<b>FIGURE 10 : MODELE DECRIVANT LE ROLE CRITIQUE DU NIVEAU DE L'ACTIVITE DE TIP60</b> -----	74
<b>FIGURE 11 : PORTRAITS DES FAMILLES E2F ET DP</b> -----	76
<b>FIGURE 12 : ORGANISATION DU RESEAU E2F/RB CHEZ LES MAMMIFERES</b> -----	78
<b>FIGURE 13 : LA PHOSPHORYLATION DE E2F1 REGULE SON ACTIVITE TRANSACTIVATRICE EN FIN DE PHASE S</b> -----	81

<b>FIGURE 14 :</b> E2F1 EST PHOSPHORYLE PAR LES KINASES ATM/ATR ET CHK2 EN REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN -----	81
<b>FIGURE 15 :</b> SUPPRESSION DU POTENTIEL APOPTOTIQUE DE E2F1 DURANT LE PROCESSUS DE PROLIFERATION CELLULAIRE NORMALE-----	88
<b>FIGURE 16 :</b> MODELE DE LA MISE EN PLACE DE L'APOPTOSE MEDIEE PAR E2F1 EN REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN-----	91
<b>FIGURE 17 :</b> MODELE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE P73 EN REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN -----	92
<b>FIGURE 18:</b> CARACTERISATION D'UN ANTICORPS ANTI-TIP60 -----	132
<b>FIGURE 19:</b> EXPRESSION DE LA PROTEINE TIP60 DANS LES CANCERS BRONCHIQUES-----	133
<b>FIGURE 20:</b> EXPRESSION DES ARNm DE TIP60 DANS LES POUMONS NORMAUX--	135
<b>FIGURE 21:</b> PERTE D'EXPRESSION DES ARNm DE TIP60 DANS LES CANCERS BRONCHIQUES-----	136
<b>FIGURE 22:</b> LE PROMOTEUR DU GENE HTATIP N'EST PAS HYPERMETHYLE DANS LES CANCERS BRONCHIQUES -----	137
<b>FIGURE 23:</b> LA HAT TIP60 EST POTENTIELLEMENT REGULEE PAR DES MICROARNs-----	139
<b>FIGURE 24:</b> EXPRESSION DES ARNm DE TIP60 ET SUV4-20H1 DANS LES CANCERS BRONCHIQUES -----	141
<b>FIGURE 25 :</b> ALTERATION GLOBALE DU « PAYSAGE EPIGENETIQUE » DE L'HISTONE H4 DANS LES CANCERS BRONCHIQUES -----	142
<b>FIGURE 26:</b> MODELE DU MODE DE REGULATION DU GENE ERCC1 EN REPOSE AU CISPLATINE-----	151

---

**FIGURE 27:** MODELE DE LA REGULATION DE L'ACETYLATION DE E2F1 EN  
 REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN ----- 153

**TABLEAU 1 :** CLASSIFICATION PTNM SELON L'UICC 2002 (6<sup>EME</sup> EDITION) ----- 23

**TABLE 1:** LES ALTERATIONS CYTOGENETIQUES FREQUENTES DANS LES  
 CANCERS DU POU MON ----- 27

**TABLE 2 :** LES ALTERATIONS GENETIQUES FREQUENTES DANS LES CANCERS  
 DU POU MON ----- 29

**TABLE 3 :** LES DIFFERENTS CLASSES DE MODIFICATIONS DES HISTONES ----- 40

**TABLE 4 :** LES ENZYMES DE MODIFICATION DE LA CHROMATINE ----- 46

**TABLE 5 :** COMPOSITION DU COMPLEXE TIP60 CHEZ *H. SAPIENS* (*H.S.*) ET DES  
 COMPLEXES HOMOLOGUES CHEZ *D. MELANOGASTER* (*D.M.*) ET *S. CEREVISIAE*  
 (*S.C.*) NUA4 ----- 60

**TABLE 6 :** TIP60 DANS LE CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL ----- 63

# **ABBREVIATIONS**

5-AZA : 5-AZA déoxycytidine  
 ADN : Acide Désoxyribonucléique  
 AMPK $\alpha$ 2 : AMP-activated Protein Kinase  $\alpha$ 2  
 Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor 1  
 AR : Androgen Receptor  
 ARN : Acide Ribonucléique  
 ARNm : ARN messenger  
 ATF2 : Activating Transcription Factor 2  
 ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated  
 ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated  
 ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3 related  
 BAF53: 53kDa BRG-1/human BRM Associated Factor  
 Bcl-2: B-cell lymphoma 2  
 Brd8/TRCP120 : Bromo-protein bromodomain containing protein 8/Thyroid Receptor Coactivator Protein 120 kDa  
 CBnPC : Carcinomes Bronchiques non à Petites Cellules  
 CBP : CREB Binding Protein  
 CDK : Cycline Dependent Kinase  
 Chk2 : Checkpoint 2  
 c-Myc : MYeloCytomatosis oncogene c  
 CPC : Carcinomes à Petites Cellules  
 cPLA<sub>2</sub> : cytosolic PhosphoLipase A<sub>2</sub>)  
 Crb2 : Crumbs-like protein 2  
 CREB : cAMP Responsive Element Binding protein  
 CRM-1 : Chromosome maintenance region 1  
 CYP1A1 : Cytochrome p450 1A1  
 DDB2 : DNA Damage Binding protein 2  
 DISC: Death Inducing Signaling Complex  
 DMAP1 : DNA Methyltransferase Associated Protein 1  
 DMBA : 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene  
 DNAPKcs: DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit  
 DNMT : DNA MethylTransferase  
 DP : DRFT1-polypeptide-1

E2F1: E2F factor 1

EGFR (ERBB1) : Epidermal Growth Factor Receptor

ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementation group 1

FHIT: Fragile Histidine Triad

FLIP<sub>short</sub> : FLICE-Inhibitory Protein short

Gas41 : Glioma Amplified Sequence 41

GNAT : General control non depressible 5 related N-AcetylTransferase

GSTM1: Glutathione-S-Transferase M1

HAT : Histone AcétylTransférase

HCF-1 : herpes simplex virus (HSV) Host Cell Factor-1

HDAC : Histone DéACétylase

HDM : Histone DéMéthylase

HDM2 : Human Double Minute

HER2 (ERBB2): Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus-1

HMT : Histone MéthylTransférase

HOX: Homeobox

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HTATIP : HIV-1 TAT Interactive Protein, 60kDa

hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase

IHC : ImmunoHistoChimie

IL-9 : InterLeukine-9

ING : INhibitor of Growth

INO80: INOsitol requiring family

ISWI : Imitation of SWItch

K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LOH : Loss Of Heterozogotie

MBP: Methyl-CpG-Binding Protein

MBT : Malignant Brain Tumor

MCM : MiniChromosome Maintenance

Mdm2 : Mouse Double Minute 2

MGMT : DNA-repair enzyme O<sup>6</sup>-Methyl Guanine-DNAMethylTransferase

Mrg15: Mortality factor 4 Related Gene 15

MrgBP : Mrg Binding Protein  
MrgX: Motality factor 4 Related Gene X  
MRN : MRE11/RAD50/NBS1  
MYST : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60  
NBS1 : Nijmegen breakage syndrome  
NER : Nucleotide Excision Repair  
NES : Nuclear Export Signal  
NFκB : Nuclear Factor kappa light chain gene enhancer in B cells  
NLS : Nuclear Localisation Signal  
NURD/MI-2/CHD: NUCleosome Remodeling and Deacetylation  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
P/CAF: p300/CBP Associated Factor  
p107 : pocket protein p107  
p53BP1 : p53 Binding Protein 1  
PcG : Polycomb Group  
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen  
PCR MSP : Methylation Specific PCR  
PHD : Plant HomeoDomain  
PIKK : Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase  
PIRH2 : p53-inducible protein with RING-H2 domain  
PKA : Protéine Kinase A  
PKMT : Protein Lysine MethylTransferase  
PLIP : PLA2 Interacting Protein  
PRMT : Protein Arginine MethylTransferase  
RB : Rétinoblastome  
RT/qPCR : Reverse Transcription/quantitative PCR  
SAHF : Senescence Associated Heterochromatin Foci  
SNP : Single Nucleotide Polymorphism  
Sp1 : transcription factor Specificity Protein 1  
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
SV40 : Simian Virus 40  
SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable  
SWR1 : SWI2/SNF2-Related ATPase



Tip60 : Tat Interacting Protein 60 KDa

TK : Thymidine Kinase

TNF: Tumor Necrosis Factor

TopBP1 : DNA Topoisomerase II- $\beta$  Binding Protein1

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRRAP : TRansformation/tRanscription domain Associated Protein

UBF : Upstream Binding Transcription Factor

UTR : UnTRanslated

UV : Ultra Violet

WD40: Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every 40 residues

XPC : Xeroderma Pigmentosum groups C

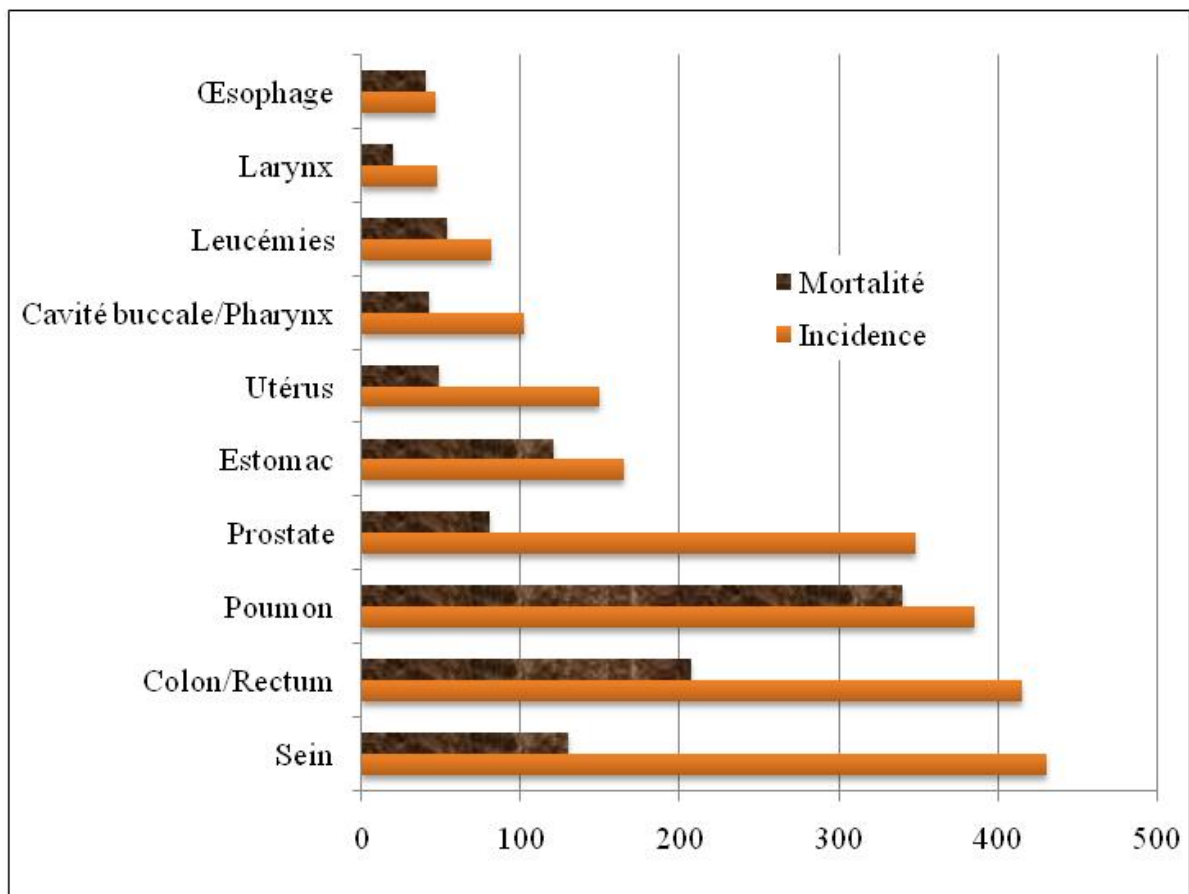
ZEB : Zinc finger E box Binding protein

# **INTRODUCTION**

# I. LE CANCER DU POUMON

## 1. Données épidémiologiques

Avec une estimation de 3,2 millions de nouveaux cas et 1,7 million de décès en 2006, le cancer reste un important problème de santé publique en Europe. Les formes de cancer les plus communes sont le cancer du sein (429 900 cas, soit 13,5% des cas de cancers), suivi des cancers colorectaux (412 900, soit 12,9%) et le cancer du poumon (386 300, soit 12,1%). Le cancer broncho-pulmonaire, avec un nombre de décès estimé de 334 800 (soit 19,7% de l'ensemble des décès liés au cancer) est la cause la plus commune de décès par cancer (Ferlay, J. et al, 2007) (**Figure 1**).



**Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006.** Le cancer du poumon est la troisième forme de cancers diagnostiquée, cependant elle se distingue comme étant la forme de cancer la plus meurtrière, en Europe, en 2006.

*Adapté d'après Ferlay et al (2007)*

Le cancer du poumon reste une maladie de très mauvais pronostic. Son taux de survie à 5 ans est inférieur à 15% aux Etats-Unis et à 10% en Europe, à peine plus que les 8,9% observés dans les pays en développement (Parkin, D.M. et al, 2005). Ce mauvais pronostic est principalement dû à un diagnostic trop tardif expliquant le fait que seulement 20 à 30% des patients sont éligibles pour une résection chirurgicale de la tumeur (Fry, W. et al, 1999). En dépit de cette chirurgie, près des deux tiers des patients rechutent. La survie globale est en effet très fortement corrélée au stade, les patients de stade IA présentant une survie à 5 ans de 70%, qui chute à 40% pour un stade II, contre 5% pour les stades métastatiques (stade IV).

## **2. Etiologie**

La localisation géographique de l'incidence et de la mortalité des cancers du poumon est hautement influencée par l'exposition passée au tabac. Parmi les facteurs de risque, le tabac joue un rôle prépondérant. Pour l'année 2000, le tabac a été estimé comme étant responsable de 85 % des cas mondiaux de cancer du poumon chez l'homme et de 49 % chez la femme. En Europe, ce pourcentage atteint les 95 % chez l'homme (Fry, W. et al, 1999). Le risque relatif dépend de la quantité consommée. Pour un risque de 1 chez le non-fumeur, il passe à 15 pour un demi-paquet fumé par jour et à 64 pour deux paquets. Ce risque décroît avec un arrêt de la consommation pour se stabiliser à une valeur inférieure à 2, 20 ans après le sevrage tabagique. Concernant le tabagisme passif, le risque relatif a été évalué à 1,4% (William, M.D. & Sandler, A.B., 2001).

D'autres facteurs environnementaux sont liés au développement du cancer du poumon, notamment l'exposition à des substances telles que l'amiante, l'arsenic, le radon, le nickel, le cadmium, etc... (Brüske-Hohlfeld, I., 2009).

## **3. Classification histologique des cancers du poumon selon l'OMS (2004)**

L'intérêt d'une telle classification repose sur la nécessité de délivrer un diagnostic qui permette l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques et serve de base aux

études épidémiologiques et biologiques. Le diagnostic doit reposer sur des critères histologiques simples, reproductibles et donc utilisables pour tous les pathologistes.

La classification de l'OMS de 1999 (Travis, W.D. et al, 1999) et sa mise à jour en 2004 (Travis, W.D. et al, 2004) ont intégré de nouvelles entités depuis celle de 1981 et redéfinissent les critères diagnostiques des lésions préneoplasiques bronchiques. A ce jour, ces dernières comprennent les dysplasies survenant sur métaplasie malpighienne, lésion précurseur des carcinomes malpighiens, les hyperplasies alvéolaires atypiques (précurseurs des adénocarcinomes), et l'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique, précurseur des tumeurs carcinoïdes.

Parmi les carcinomes, les sous-types histologiques les plus fréquemment rencontrés, et qui seront brièvement discutés dans ce paragraphe sont les adénocarcinomes, les carcinomes malpighiens, les carcinomes à petites cellules, les carcinomes à grandes cellules et les carcinoïdes. Les entités les plus rares regroupent entre autres les carcinomes sarcomatoïdes et les carcinomes adénosquameux.

Les cancers du poumon sont subdivisés en deux différentes sous-classes : **(i)** les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBnPC) incluant les carcinomes malpighiens, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules ; **(ii)** les tumeurs pulmonaires neuroendocrines comprenant les carcinoïdes typiques et atypiques, les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et les carcinomes à petites cellules, ce dernier étant le plus agressif.

### **3.1 Les carcinomes malpighiens**

Ce sont des tumeurs malignes dont la synthèse de kératine par les cellules tumorales est une principale caractéristique. La différenciation malpighienne se manifeste également par la présence de grandes cellules quadrangulaires à limites nettes étroitement unies par des ponts d'union. En fonction du degré de kératinisation et de la présence ou non de ponts d'union, les carcinomes malpighiens sont qualifiés de bien, moyennement ou peu différenciés. Ce type histologique représente approximativement 30% des carcinomes bronchiques.

### **3.2 Les adénocarcinomes**

Il s'agit du type histologique le plus fréquemment diagnostiqué dans de nombreux pays et notamment aux Etats-Unis où ils représentent 60 % des cancers pulmonaires. Ils se

sont accrus d'au moins 10 % depuis les 20 dernières années en Europe. Cette incidence croissante des adénocarcinomes est constatée chez l'homme et surtout chez la femme : c'est la forme prédominante de cancer chez les hommes jeunes de moins de 50 ans, chez les femmes de tous âges, chez les non-fumeurs et chez les ex-fumeurs. En effet, l'adénocarcinome reste un cancer statistiquement et puissamment lié au tabagisme puisque 80 % des adénocarcinomes s'observent chez les fumeurs.

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales présentant une différenciation glandulaire ou une sécrétion de mucines par les cellules tumorales, dont plusieurs variantes histologiques ont été décrites. La forme bronchioloalvéolaire correspond à un adénocarcinome présentant une forme non invasive pure, dont les cellules colonisent les parois alvéolaires sans envahir l'interstitium alvéolaire, ni les vaisseaux, ni la plèvre. Cette définition a une grande valeur pronostic avec une survie de 100% des patients à 5 ans.

### 3.3 Les carcinomes à petites cellules (CPC)

Cette catégorie représente des tumeurs neuroendocrine de haut grade constituées de cellules de petites tailles, au rapport noyau/cytoplasme très élevé, et dont la chromatine apparaît finement ponctuée dissimulant le nucléole. Ce sont des tumeurs de haut grade de malignité avec un index mitotique très élevée et une nécrose tumorale souvent présente et extensive. Les carcinomes à petites cellules expriment tous au moins l'un des trois facteurs de différenciation neuroendocrine suivant : synaptophysine, chromogranine, N-CAM. Ils représentent 20% des carcinomes pulmonaires. Ils sont en général diagnostiqués à un stade avancé, le plus souvent traités par chimiothérapie et leur pronostic reste très lourd. La survie de ces patients n'excède pas 2,5 ans.

### 3.4 Les carcinomes à grandes cellules

Ce sont des tumeurs malignes qui ne présentent pas les critères de différenciation des carcinomes épidermoïdes, glandulaires, ou à petites cellules. Parmi ces carcinomes, deux variantes se distinguent par leur impact pronostic : le **carcinome neuroendocrine à grandes cellules** et le **carcinome basaloïde**. Le premier présente une architecture endocrine et l'expression d'au moins l'un des trois marqueurs neuroendocrines. La présence d'un index mitotique élevé et/ou la présence de nécrose tumorale le distingue du carcinoïde atypique qui est de bien meilleur pronostic. Quant au second, il consiste en une prolifération de cellules

souches basales à haut index prolifératif, et est également corrélé à un pronostic plus péjoratif que les autres carcinomes à grandes cellules.

Les **carcinomes adénosquameux** et **sarcomatoïdes** sont deux entités rarement diagnostiquées.

### **3.5 Les tumeurs carcinoïdes**

Ces tumeurs sont caractérisées par une différenciation neuroendocrine du poumon et sont considérées comme des tumeurs de bas grade de malignité ou de grade intermédiaire. Elles se distinguent des carcinomes à petites cellules et des carcinomes neuroendocrine à grandes cellules par leur bon pronostic et leur prévalence élevée chez le non-fumeur.

Pour les tumeurs à différenciation neuroendocrine, il existe un spectre lésionnel d'agressivité croissante comprenant le carcinoïde typique, puis le carcinoïde atypique, le carcinome neuroendocrine à grandes cellules et le carcinome à petites cellules, ce dernier étant le plus agressif.

## **4. Classification pathologique pTNM selon l'UICC (2002)**

Le système pTNM est la classification de référence pour les cliniciens et les pathologistes pour classer l'ampleur de la propagation d'un cancer. Elle permet de définir le stade histopathologique d'extension d'une tumeur après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection (**Tableau 1**).

### Classification TNM

#### **pT: tumeur primitive**

**pT0:** pas de tumeur

**pTis:** carcinome in situ

**pT1:** Tumeur de 3 cm maximum sans invasion bronchoscopique d'une bronche souche

**pT2:** Tumeur de plus de 3 cm, ou envahissant une bronche souche à plus de 2 cm de la carène, ou envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive

**pT3:** Tumeur envahissant la paroi thoracique, le diaphragme, la plèvre médiastinale, pariétale, le péricarde pariétal ou située à moins de 2 cm de la carène ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive de tout un poumon

**pT4:** Tumeur envahissant le médiastin, le cœur, les gros vaisseaux, la trachée, l'œsophage, le corps vertébral, la carène, associée à une pleurésie maligne, ou avec des nodules satellites dans le même lobe

#### **pN: ganglions régionaux**

**pN0:** absence (après examen macroscopique)

**pN1:** métastase ganglionnaire péribronchique ou périhilaire ipsilatérale ou intraparenchymateuse, incluant l'atteinte ganglionnaire par extension directe

**pN2:** métastase ganglionnaire médiastinale ou sous carénaire ipsilatérale

**pN3:** métastase ganglionnaire médiastinale ou hilare controlatérale ou susclaviculaire ipsi ou controlatérale

#### **pM: métastase à distance**

**pM0:** absence de métastase à distance

**pM1:** métastase à distance incluant des nodules satellites de 2 lobes différents.

**Tableau 1 : Classification pTNM selon l'UICC 2002 (6<sup>ème</sup> édition).**



De même que la classification histologique, le système pTNM est une base indispensable pour la mise en place de protocoles thérapeutiques adéquats, mais aussi à toute étude épidémiologique.

Cette classification est basée sur trois notions :

- T : Taille et/ou extension de la tumeur primitive ;
- N : Présence ou absence de métastase ganglionnaire (ganglions locorégionaux) ;
- M : Présence ou absence de métastase à distance.

Le stade TNM peut être regroupé en cinq grandes catégories :

<b>Stade</b>	<b>Statut pTNM</b>	<b>Stade</b>	<b>Statut pTNM</b>
<b>0</b>	Tis N0M0	<b>IIIA</b>	T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, ou T3N2M0
<b>IA</b>	T1N0M0	<b>IIIB</b>	T4 ou N3M0
<b>IB</b>	T2N0M0	<b>IV</b>	M1
<b>IIA</b>	T1N1M0		
<b>IIB</b>	T2N0M0 ou T3N0M0		

## 5. Caractéristiques moléculaires de la carcinogénèse pulmonaire

### 5.1 La susceptibilité face au cancer pulmonaire

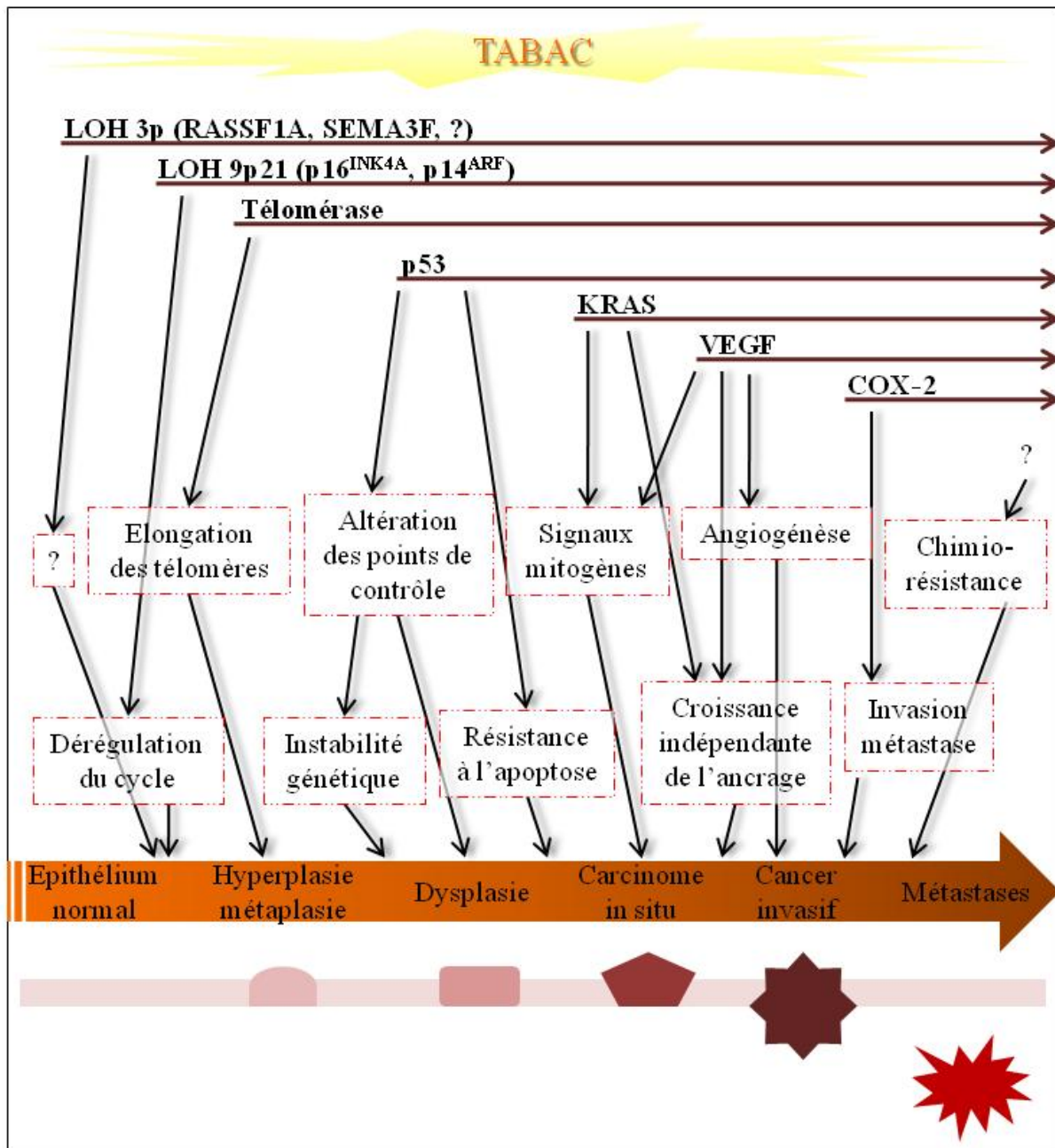
Nous venons de voir que le cancer du poumon est l'un des cancers les plus communs et le plus meurtrier au monde et que sa pathologie est étroitement associée à la consommation de tabac. Il est actuellement admis que l'exposition chronique aux carcinogènes de la fumée de cigarette induit l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques au niveau de gènes clés de la tumorigénèse, conduisant à l'émergence de lésions bronchiques néoplasiques. Cependant, si le tabac est responsable de la survenue de 80 à 90% des cancers du poumon, seul un faible pourcentage des fumeurs à long terme (10 à 15%) développe ces cancers (Lippman, S.M. & Spitz, M.R., 2001 ; Spivack, S.D. et al, 1997). Il apparaît en effet que

certaines facteurs génétiques confèrent à une population de fumeurs une plus grande susceptibilité au développement d'un cancer pulmonaire.

A côté du rôle bien établi de la consommation de tabac, d'autres expositions environnementales aussi bien que des facteurs génétiques contribuent aussi au développement des cancers du poumon. Il existe en effet des gènes de prédisposition à la transformation maligne incluant des gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes comme CYP1A1 (Cytochrome p450 1A1) et/ou dans leur détoxification comme GSTM1 (Glutathione-S-Transferase M1) (Shields, P.G. et al, 2002). Les modifications de ces gènes peuvent être héritées et/ou acquises et ainsi contribuer au risque de développer un cancer.

## **5.2 La carcinogénèse broncho-pulmonaire, un processus multi-étapes**

Il est maintenant bien établi que le cancer du poumon a pour origine les cellules épithéliales bronchiques et que la transformation d'une cellule normale en carcinome invasif est un processus multi-étapes précédé par des lésions pré-malignes. Cependant, seul un petit nombre de ces lésions progressent vers un cancer invasif et la majorité d'entre elles restent latentes et même régressent. Il y a peu de données informatives concernant la séquence des altérations génétiques conduisant au cancer du poumon. Cependant, ces anomalies sont la conséquence d'une forte instabilité génétique qui se traduit par des mutations ponctuelles, des réarrangements, des délétions, des amplifications géniques ou encore des aneuploïdies. L'analyse histologique systématique des résections chirurgicales de cancers bronchiques a permis de confirmer l'existence d'un vrai continuum lésionnel au niveau de l'épithélium de l'arbre bronchique, allant de l'hyperplasie basale au carcinome invasif en passant par des stades de métaplasie malpighienne, dysplasie légère, modérée et sévère, puis de carcinome in situ. Une corrélation entre l'existence de ce continuum lésionnel et la carcinogénèse multi-étapes a été mise en évidence par l'analyse moléculaire systématique des lésions précancéreuses chez les fumeurs : l'acquisition séquentielle d'altérations génétiques s'accompagne d'une augmentation du pouvoir prolifératif et invasif de ces lésions et détermine la transition vers des lésions au potentiel évolutif important (**Figure 2**).



**Figure 2 : Modèle de la carcinogénèse bronchique: un processus multi-étapes.** En réponse à une exposition à des agents carcinogènes comme ceux du tabac, s'accumulent un certain nombre d'altérations génétiques et épigénétiques qui peuvent conduire à la transformation d'un épithélium bronchique normal en épithélium hyperplasique, métaplasique et dysplasique, puis en carcinome in situ et enfin en carcinome invasif.

*Adapté d'après Osada & Takahashi (2002)*

Ainsi, le modèle de la carcinogénèse bronchique suit le modèle général élaboré par Hanahan et ses collaborateurs selon lequel les altérations génétiques sont responsables de l'acquisition, par une cellule d'un épithélium bronchique normal, des six propriétés élémentaires qui vont faire d'elle une cellule maligne (Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000) : **(i)** indépendance face aux facteurs de croissances autorisant la cellule à une prolifération active et soutenue, **(ii)** insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire, **(iii)** capacité d'échapper à l'apoptose, **(iv)** acquisition d'un pouvoir répliatif illimité (échappement à la sénescence répliatif), **(v)** capacité à induire une néoangiogénèse (pour les besoins en oxygène et en nutriments), **(vi)** acquisition du pouvoir métastasant donnant à la cellule tumorale la capacité de s'implanter à distance de son tissu originel et ainsi de coloniser de nouveau tissus et/ou organes.

### 5.3 Instabilité chromosomique, oncogènes et suppresseurs de tumeur

La littérature suggère ainsi qu'un nombre varié et séquentiel d'altérations génétiques sont nécessaires à la conversion de cellules épithéliales bronchiques normales en cellules cancéreuses malignes. Parmi ces altérations, beaucoup sont communes aux deux groupes histologiques principaux : les cancers bronchiques non à petite cellules (CBnPC) et les cancers du poumon à petites cellules (**Tables 1**).

	Chromosome	
	Perte	Gain
CBnPCs	3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q, 22q	1p, 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12q
CBPCs	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p	3q, 5p, 8q, 19q, Xq

**Table 1: Les altérations cytogénétiques fréquentes dans les cancers du poumon.**

*Adapté d'après Panani & Roussos (2006)*

### 5.3.1 Instabilité chromosomique

En contraste avec les désordres hématologiques souvent caractérisés par des aberrations chromosomiques simples et équilibrées, les tumeurs épithéliales ont toujours des anomalies chromosomiques complexes et non équilibrées, notamment dans le cancer du poumon (Testa, J.R. et al, 1997).

La première aberration récurrente à avoir été décrite dans les carcinomes pulmonaires à petites cellules est la délétion en 3p (Whang-Peng, J. et al, 1982). Cette délétion est fréquemment retrouvée dans tous les sous types de cancer du poumon. En effet, la perte d'hétérozygotie et/ou des délétions homozygotes en 3p ont été détectées dans quasiment 100% des CBPCs et des CBnPCs. Cette région génomique semble donc jouer un rôle important dans les étapes précoces de la carcinogénèse pulmonaire. Le gène FHIT (Fragile Histidine Triad) situé en 3p14.2 est fréquemment délété ou muté dans les cancers du poumon où il représente la délétion la plus précoce dans les lésions bronchiques préneoplasiques. D'autres anomalies caryotypiques récurrentes ont été rapportées dans les CBPCs : del(5q), del(13q) et del(17p) et bien d'autres encore. Quant aux CBnPCs, ces altérations cytogénétiques sont encore plus complexes et ne seront pas discutées ici (pour revue Panani, A.D. & Roussos, C., 2006). Quoiqu'il en soit, peu de choses sont connues au sujet des mécanismes à l'origine de ces aberrations chromosomiques.

### 5.3.2 Les oncogènes et signaux de prolifération

L'homéostasie d'un tissu ou d'un organe, au sein d'une population cellulaire normale, nécessite un strict équilibre de la balance entre les gènes de prolifération, favorisant la division et/ou la survie cellulaire (proto-oncogènes) et les gènes anti-prolifératifs (gènes suppresseurs de tumeurs) ralentissant la progression du cycle cellulaire et/ou induisant l'apoptose. La rupture de cet équilibre, par apparition de mutations au sein des cellules épithéliales de l'arbre bronchique en réponse à une exposition aux carcinogènes du tabac, peut transformer cet épithélium bronchique normal en lésion potentiellement cancéreuse.

Les proto-oncogènes codent pour des protéines qui interviennent dans la transmission de signaux de prolifération. Ce sont des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines membranaires transductrices de signaux, des facteurs de transcription ou des

protéines régulant le cycle cellulaire. Dans la cellule tumorale, la dérégulation de l'expression de ces gènes suite à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques, ou encore suite à des altérations épigénétiques conduit à leur activation constitutive et à leur fonction oncogénique proprement dite. Ces modifications donnent la capacité aux oncogènes d'induire la transformation tumorale seul ou en coopération, certains étant capables d'immortaliser une cellule (c-Myc) ou d'induire l'émergence du phénotype tumoral (Ras).

De nombreux oncogènes ont été identifiés à ce jour (Osada, H. et al, 2002 ; Sekido, Y. et al, 2003 ; Shigematsu, H. et al, 2006). Vous trouverez ci-après une liste des oncogènes les

Gene	Altérations	Fréquence %	
		CBnPCs	CBPCs
<b>FHIT</b>	Délétion/mutation	~ 40	~ 80
<b>K-RAS</b>	Mutation	~ 20	Rare
<b>ERBB1/EGFR</b>	Surexpression	~ 60	-
<b>ERBB2/HER2</b>	Surexpression	~ 20	-
<b>Famille Myc</b>	Surexpression	5-10	15-30
<b>BCL-2</b>	Surexpression	10-35	75-95
<b>Cyclines</b>	Surexpression	?	?
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	Délétion/mutation/hyperméthylation	~ 70	Rare
<b>Rb</b>	Délétion/mutation	15-30	~ 90
<b>p53</b>	Mutation/délétion	~ 50	~ 50

**Table 2 : Les altérations génétiques fréquentes dans les cancers du poumon.**

*Adapté d'après Panani & Roussos (2006)*

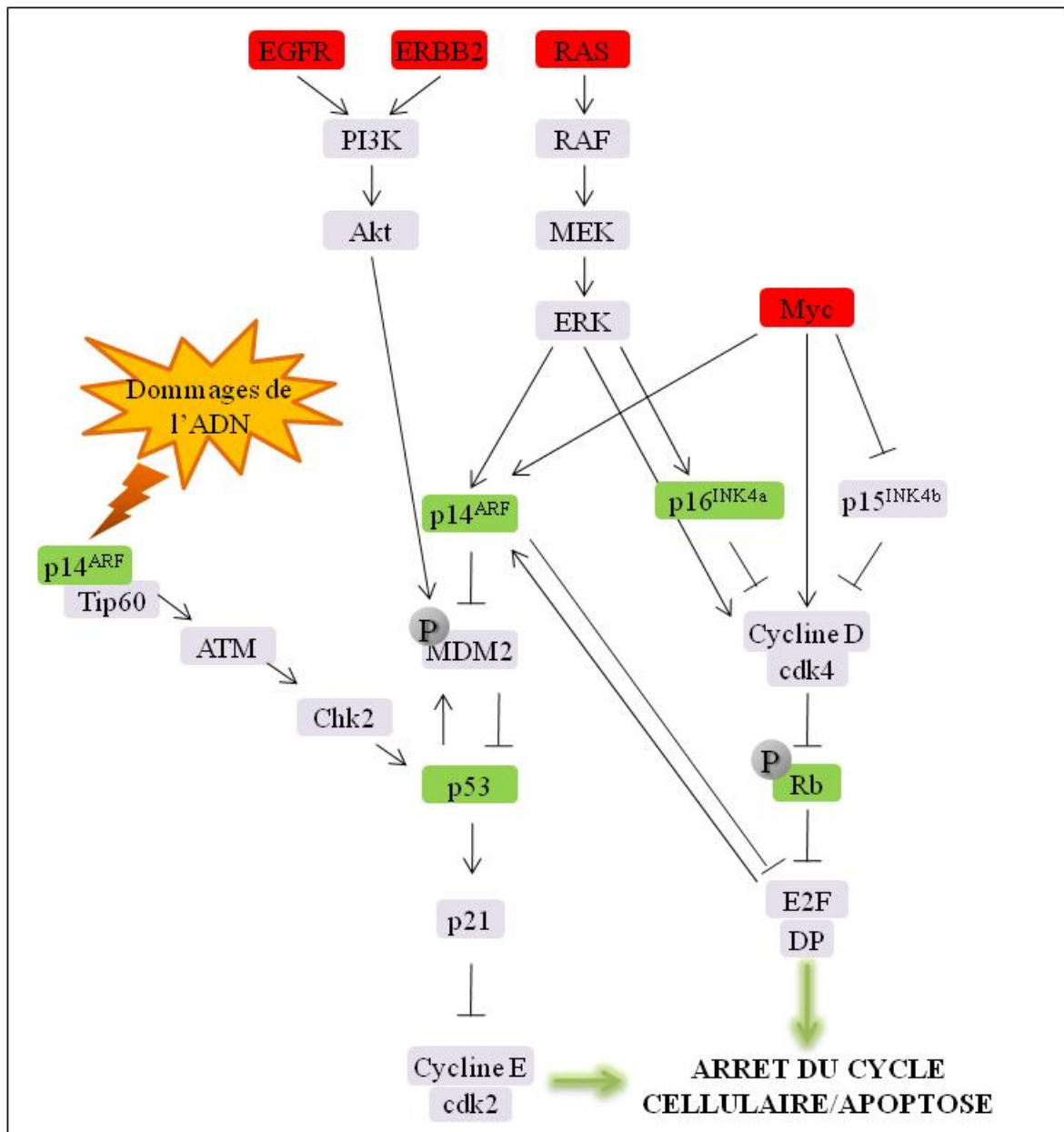
plus fréquemment activés au cours de la carcinogénèse bronchique (**Table 2**).

### 5.3.3 Les gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur est l'une des étapes les plus précoces de la carcinogénèse bronchique. Ces gènes exercent à l'état normal une fonction régulatrice négative sur la prolifération cellulaire (Weinberg, R.A. et al, 1991). Ils codent pour des protéines qui ont la capacité de prévenir l'effet des oncogènes et d'inhiber le phénotype tumoral d'où le nom qui leur a été donné de gènes suppresseurs de tumeur. Leur perte confère à la cellule un avantage prolifératif. Les gènes suppresseurs de tumeur sont qualifiés de récessifs car les deux allèles du gène doivent être inactivés (mutation ou dérégulation épigénétique) ou éliminés (délétion ou perte d'hétérozygotie) pour libérer la cellule de leur « surveillance ». Cependant, il existe de rares cas de gènes suppresseurs de tumeur haplo-insuffisants (ex : p27, Tip60 (Fero, M.L. et al, 1998 ; Gorrini, C. et al, 2007)).

Au cours du processus de la carcinogénèse pulmonaire, les gènes suppresseurs de tumeur préférentiellement inactivés codent pour des protéines appartenant aux deux grandes voies de signalisation des protéines p16<sup>INK4a</sup>/Rb et p14<sup>ARF</sup>/p53 (Osada, H. et al, 2002 ; Sekido, Y. et al, 2003) (**Figure 3**). Ce sont deux voies de régulation clés car elles contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome via leur implication dans les points de contrôle des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. En réponse à un stress (ex : dommages de l'ADN), elles vont induire un arrêt du cycle (afin de réparer l'ADN endommagé) et/ou l'apoptose (si la cellule est incapable de prendre en charge ces lésions).





**Figure 3 : Altération des voies suppressives de tumeur dans les cancers du poumon.** Les deux voies de signalisation majeures (p14<sup>ARF</sup>-p53 et p16<sup>INK4a</sup>-Rb) dont l'inactivation est impliquée au cours de la carcinogénèse pulmonaire sont fonctionnellement liées, et jouent des rôles critiques dans les points de contrôle, l'inhibition de la croissance cellulaire et/ou l'apoptose. Ces deux voies sont interconnectées via les protéines p14<sup>ARF</sup> et E2F1. De plus, des signaux émanant de divers oncogènes et facteurs de croissance leurs sont aussi connectés. De nombreux éléments de ces deux voies sont inactivés dans les cancers du poumon (Rouge: oncogènes fréquemment activés, Vert: inactivation fréquente)

*Adapté d'après Osada & Takahashi (2002)*



### 5.3.3.1 L'inactivation de la voie p16<sup>INK4a</sup>/Rb

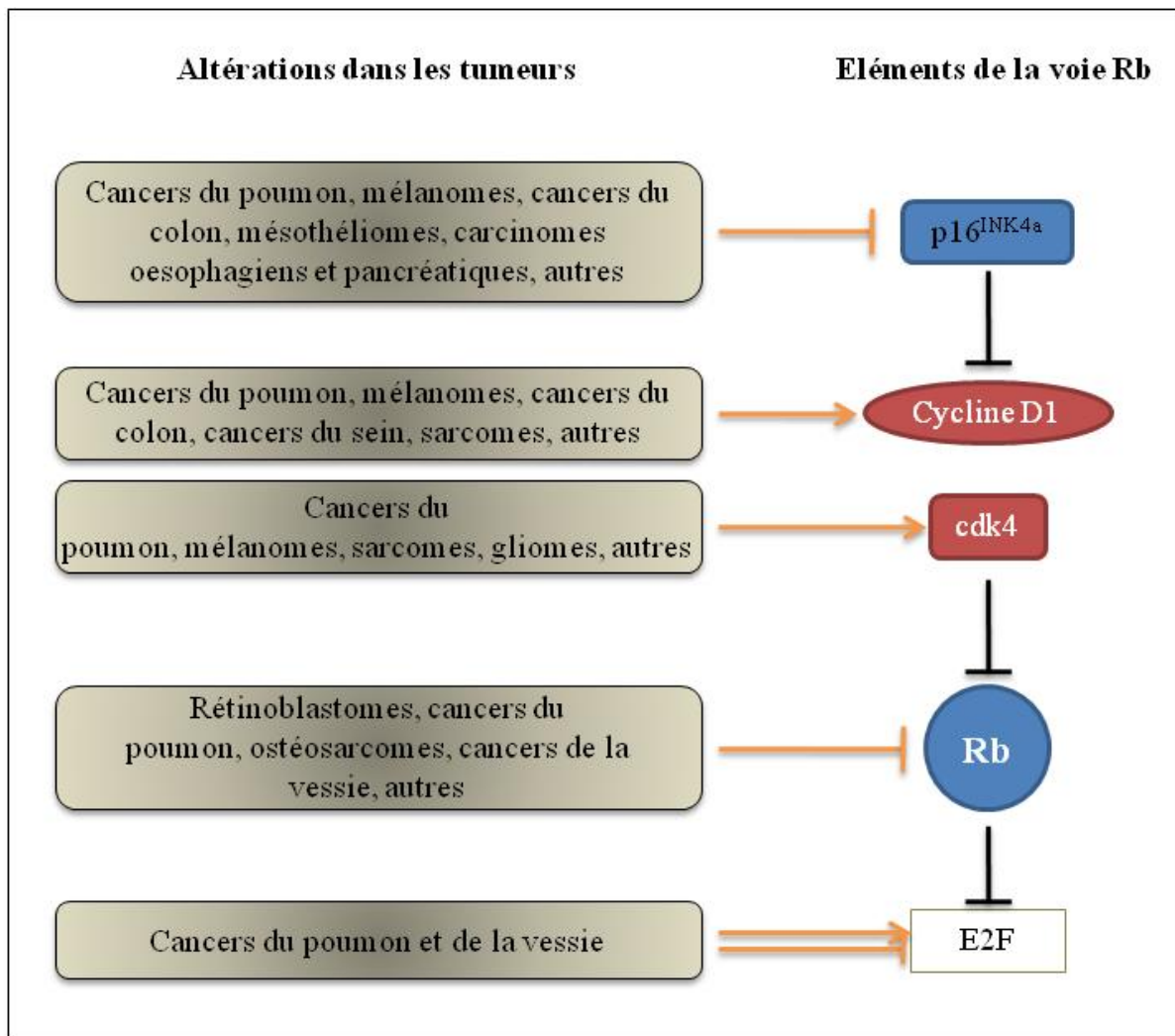
La voie de signalisation p16<sup>INK4a</sup>/Rb est altérée dans la quasi-totalité des carcinomes bronchiques, mais aussi dans de nombreux autres types de cancer (**Figure 4**).

#### *a) L'inactivation du gène Rb (Retinoblastome)*

Le produit du gène Rb, situé en 13q14.1, est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et est fréquemment inactivé dans les cancers du poumon. L'inactivation de Rb est rapportée dans plus de 90% des carcinomes pulmonaires à petites cellules (Beasley, M.B. et al, 2003 ; Harbour, J.W. et al, 1988) et dans 15-30% des CBnPCs (Mitsuuchi, Y. & Testa, J.R., 2002). Cette perte d'expression est expliquée par une perte d'hétérozygotie pour un allèle, le second étant inactivé par des mutations non-sens ou un épissage anormal (Gouyer, V. et al, 1998). A la différence des carcinomes bronchiques à petites cellules, les CBnPCs conservent majoritairement l'expression de Rb, cependant Rb est maintenue sous sa forme inactive phosphorylée par perte d'expression de la protéine p16<sup>INK4a</sup> dans 50% des cas (Brambilla, E. et al, 1999). Enfin, Rb peut également être maintenue dans un statut hyperphosphorylé inactif en réponse à une surexpression des complexes cycline-CDK, notamment la cycline D1.

#### *b) L'inactivation de p16<sup>INK4a</sup>*

Le gène suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup> est situé sur le chromosome 9 en position p21 et est fréquemment altéré dans de nombreux types de cancers. p16<sup>INK4a</sup> est un inhibiteur des complexes cycline D1-cdk4/6 qui inactivent Rb par phosphorylation. Par conséquent, il existe une interaction étroite entre les fonctions de p16<sup>INK4a</sup> et celles de Rb. Des études montrent que p16<sup>INK4a</sup> est inactivé dans 70% des CBnPCs (qui maintiennent l'expression de Rb) mais rarement dans les SCLCs (qui ont inactivé Rb). L'inactivation de p16<sup>INK4a</sup> s'effectue en grande majorité par délétion homozygote, mais aussi par perte d'hétérozygotie associée à une hyperméthylation du promoteur de l'allèle restant, ou plus rarement, associée à des mutations ponctuelles de cette copie restante (Gazzeri, S. et al, 1998). De façon remarquable, les délétions homozygotes et les mutations sont retrouvées chez les fumeurs alors que la méthylation du promoteur touche les non-fumeurs (Mitsuuchi, Y. & Testa, J.R., 2002 ;



**Figure 4: Altérations de la voie Rb dans les cancers humains.** Les tumeurs humaines contiennent fréquemment des altérations telles que des mutations ponctuelles, des délétions, des amplifications, ou encore une hyperméthylation des promoteurs concernant les éléments qui composent la voie Rb. Ces altérations peuvent être activatrices ou inhibitrices. Dans la majorité des cas, elles se produisent au niveau des régulateurs situés en amont de la protéine Rb. Une liste non exhaustive des types de cancers humains dans lesquels ces altérations sont observées est indiquée pour chacun des composant de cette voie de signalisation.

*Adapté d'après Dimova & Dyson (2005)*

Kishimoto, Y. et al, 1995 ; Shapiro, G.I. et al, 1995 ; Otterson, G.A. et al, 1994). Il a été montré que la méthylation de p16<sup>INK4a</sup> est un événement précoce et un biomarqueur potentiel pour le diagnostic précoce. De manière intéressante, cette méthylation peut être détectée dans 100% des crachats de patients porteurs d'un carcinome malpighien jusqu'à 3 ans avant son diagnostic clinique (Belinsky, S.A. et al, 1998 ; Palmisano, W.A. et al, 2000).

### 5.3.3.2 L'inactivation de la voie p14<sup>ARF</sup>/p53

La voie de signalisation p14<sup>ARF</sup>/p53 est la seconde voie anti-proliférative majeure à être fréquemment dérégulée au cours de la carcinogénèse bronchique.

#### *a) L'inactivation de p53*

Le gène p53 (17p13.1) code pour une protéine nucléaire qui est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire, la mort par apoptose et la sénescence. La protéine suppressive de tumeur p53 est considérée comme « le gardien du génome » ; cette protéine détermine si une cellule doit survivre ou mourir suite à un dommage de l'ADN, une hypoxie, et à une exposition à des radiations et aux traitements chimiothérapeutiques (Dlamini, Z. et al, 2004 ; Giaccia, A.J. & Kastan, M.B., 1998). Le gène p53 est inactivé dans environ 50% des CBPCs et des CBnPCs (Zochbauer-Muller, S. et al, 2002). Dans 80% des cas, l'inactivation a lieu par perte d'hétérozygotie et mutation ponctuelle de l'allèle restant, mutation ciblant le domaine d'interaction à l'ADN de p53 conduisant à une protéine p53 non fonctionnelle. Ces résultats suggèrent ainsi l'implication critique des fonctions transcriptionnelles de p53 au cours de la carcinogénèse bronchique. A l'heure actuelle, de très nombreuses publications ont fait état de mutations du gène p53 dans divers types de cancers humains (Soussi, T. et al, 2000). Ainsi, dans le cancer du poumon, il y a un nombre important de mutations concentrées dans la région 151-159 avec un point chaud sur les codons 157 et 158. Ces variations peuvent être dues à l'implication de divers carcinogènes (Soussi, T. et al, 2000). Des mutations de p53 ont aussi été trouvées dans des lésions pulmonaires précoces, suggérant que la fonction de p53 est inactivée très tôt dans le processus de la tumorigénèse (Mitsuuchi, Y. & Testa, J.R., 2002). Enfin, bien que l'expression de p53 soit perdue dans 50% des CBnPCs de stade précoce et que la fréquence de mutation de son gène soit de 48%, aucune influence n'a été retrouvée sur le pronostic. Cependant, la mutation de p53 associée à la surexpression de la cycline D1 conduit à un très mauvais pronostic (Burke, L. et al, 2005). De façon intéressante, l'accumulation de p53 dans les lésions pré-invasives bronchiques est hautement prédictive d'une progression vers l'invasion tumorale (Brambilla, E. et al, 1998). Ainsi, la présence d'anomalies concomitantes des voies p14<sup>ARF</sup>/p53 et p16<sup>INK4a</sup>/RB influe significativement pour prédire un mauvais pronostic.

***b) L'inactivation de p14<sup>ARF</sup>***

Le gène suppresseur de tumeur p14<sup>ARF</sup> est un gène dont la découverte a été très surprenante car ses séquences codantes chevauchent partiellement celles du gène INK4a, d'où son nom ARF pour Alternative Reading Frame. En effet, le locus INK4a/ARF présente la particularité de coder pour deux transcrits alternatifs (Duro, D. et al, 1995 ; Mao, L. et al, 1995 ; Quelle, D.E. et al, 1995 ; Sharpless, N.E. & DePinho, R.A., 1999 ; Stone, S. et al, 1995) donnant lieu à l'expression des protéines p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup> contrôlant respectivement les voies Rb et p53. Situé sur le chromosome 9 en position p21, ce locus est fréquemment altéré dans de nombreux types de cancers. Les mutations inactivant spécifiquement la protéine p14<sup>ARF</sup> sont très rares car dans la grande majorité des cas, c'est la délétion ou la mutation du gène INK4a qui entraîne la perte de p14<sup>ARF</sup>, les deux gènes se chevauchant. Pour cette raison, il est difficile de déterminer quel gène est préférentiellement ciblé. Quoi qu'il en soit, l'inactivation du gène codant pour la protéine p14<sup>ARF</sup>, par délétion homozygote ou mutation génique, a été observé dans un certain nombre de tumeurs humaines (pour revue Sharpless, N.E. & DePinho, R.A., 1999). De façon intéressante, l'expression de p14<sup>ARF</sup> est indétectable dans 65% des tumeurs neuroendocrines de haut grade (carcinomes à grandes et petites cellules) alors que les messagers sont toujours présents (Gazzeri, S. et al, 1998). Dans cette même étude, la perte de p14<sup>ARF</sup> a également été observée dans 25% des CBnPCs. Ces travaux ont été confirmés par la suite (Sanchez-Cespedes, M. et al, 1999 ; Vonlanthen, S. et al, 1998). Enfin, plusieurs équipes ont observé une hyperméthylation du promoteur de p14<sup>ARF</sup> (Esteller, M. et al, 2001 ; Furonaka, O. et al, 2004 ; Zochbauer-Muller, S. et al, 2001) qui peut atteindre 25 à 30% des cancers broncho-pulmonaires de type malpighien (Furonaka, O. et al, 2004).

---

## II. NOTIONS D'ÉPIGÉNÉTIQUE

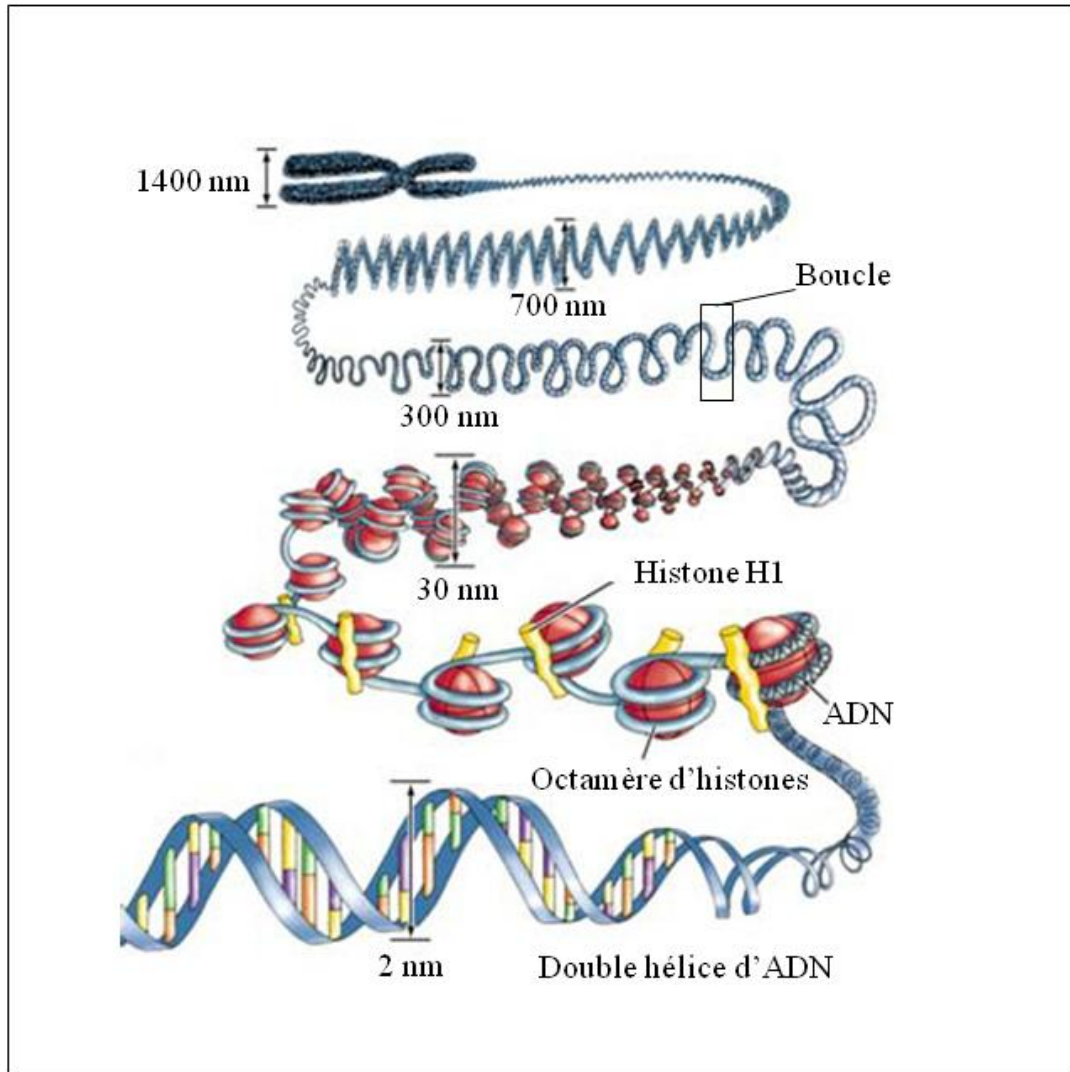
**« L'épigénétique a toujours été l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer. » Denise Barlow (Vienne, Autriche)**

Cette citation illustre assez bien ce qu'est l'épigénétique. En effet, l'épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes qui ne s'accompagnent pas de changement de la séquence nucléotidique. Ce terme comprend la modification de l'ADN par méthylation des cytosines, la modification de protéines histones par fixation covalente de différents groupements chimiques (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation, etc.), l'incorporation de variants d'histone (H2A-X, H2A.Z, H3.3, etc.) et les régulations médiées par les petits ARNs non-codant dont nous ne parlerons pas au cours de ce manuscrit. Tous ces changements sont finement régulés et soumis à de nombreuses régulations et ce, en réponse à un environnement donné et impliquent toutes les voies de signalisation décrites à ce jour. L'épigénétique constitue l'un des fondements de la diversité biologique.

### 1. La structure de la chromatine

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau. C'est la substance de base des chromosomes eucaryotes. Elle correspond à l'association de l'ADN et de protéines structurales appelées histones. On peut attribuer deux fonctions à la chromatine : une fonction de compaction de l'ADN et une fonction dynamique qui permet la régulation de l'expression des gènes. Dans la cellule, les acides nucléiques ne sont jamais nus : ils sont toujours associés à des protéines. D'une longueur de 2 mètres pour quelques 3 milliards de paires de bases, l'ADN contenu dans le noyau doit donc être fortement compacté. Cette compaction de l'ADN résulte de plusieurs niveaux d'organisation. Le premier niveau de repliement est fourni par la double hélice d'ADN elle-même. Puis, l'enroulement de l'ADN autour d'un cœur protéique va constituer ce que l'on appelle un nucléosome. La répétition de cette structure en nucléosome tout au long de l'ADN va donner à la chromatine un aspect de « collier de perles » d'une épaisseur de 10 nm. Dans un second temps, cette fibre de 10 nm se replie pour adopter une structure en hélice de 30 nm de diamètre. Enfin, elle est à son tour

repliée en une fibre de 300 nm pour constituer des domaines en boucles de 15 000 à 100 000 paires de bases (**Figure 5**). Il est vraisemblable que des régions spécifiques de l'ADN puissent médier l'interaction de ces domaines particuliers en boucle aux protéines de la charpente des chromosomes.



**Figure 5 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.** Les différents niveaux de compaction de l'ADN sont représentés de la forme la moins condensée qu'est la double hélice d'ADN libre, en bas, à sa forme la plus condensée qu'est le chromosome métaphasique, en haut. Le diamètre de la fibre chromatinienne est indiqué pour chaque niveau de repliement. Pour des raisons de simplicité, les queues N-terminales des histones ne sont pas représentées ici.

*Adapté d'après Hansen (2002)*

## 1.1 Le nucléosome : élément de base de la chromatine

Le nucléosome, qui est l'élément de base de la chromatine, est constitué de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère composé de deux copies de chacune des protéines histones de cœur : H2A, H2B, H3 et H4 (Kornberg, R.D. et al, 1974, 1999). L'histone de liaison H1 ainsi que des protéines non histones peuvent interagir avec les nucléosomes pour former des structures de plus haut degré d'enroulement (Woodcock, C.L., 2006a, Woodcock, C.L. et al, 2006b). Les histones sont les protéines liées à l'ADN les plus abondantes dans les cellules eucaryotes et parmi les protéines connues les plus conservées dans l'évolution. Ce sont de petites protéines basiques avec un poids moléculaire compris entre 11 et 20 kDa qui contiennent un fort pourcentage d'acides aminés chargés positivement (20%) tels que les lysines et les arginines. Les cellules eucaryotes contiennent principalement 5 types d'histones : L'histone de liaison H1 et les histones de cœur H2A, H2B, H3, et H4. Toutes les histones de cœur possèdent une queue N-terminale flexible et partagent une structure globulaire caractéristique, le domaine central « Histone Fold », dont les études structurales indiquent qu'il participe à l'interaction entre les protéines histones pour la formation de l'octamère d'histones (le nucléosome) (Luger, K. et al, 1997). Ces études structurales ont également confirmé que les queues N-terminales des histones sont situées à l'extérieur du nucléosome et ainsi, peuvent moduler les interactions avec d'autres nucléosomes aussi bien qu'avec des facteurs régulateurs (Luger, K. et al, 1997).

## 1.2 L'euchromatine et l'hétérochromatine

On distingue classiquement deux types de chromatine dans les cellules eucaryotes en fonction de critères structuraux et fonctionnels. L'euchromatine, qui consiste en un ADN actif, de structure globalement décondensée permet l'expression génique. Elle correspond à des zones riches en gènes, où ceux-ci sont actifs et transcrits. L'hétérochromatine, quant à elle, correspond à des régions d'ADN condensées pauvres en gènes et consiste en un ADN principalement inactif. En règle générale, les protéines histones contenues dans ce type de chromatine apparaissent hypoacétylées et hyperméthylées, en comparaison avec l'euchromatine (pour revue Huisinga, K.L. et al, 2006). L'hétérochromatine peut à son tour se subdiviser en deux catégories : l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine

constitutive. Cette dernière est située autour du centromère et des télomères et consiste, en général, en des séquences répétitives. L'hétérochromatine constitutive est un domaine dont la structure est cruciale pour le maintien de l'intégrité chromosomique (pour revue Huisinga, K.L. et al, 2006). En dépit du fait qu'elle a longtemps été considérée comme une région inerte, l'hétérochromatine constitutive n'est plus considérée comme telle, et peut être le siège de gènes activement transcrits qui seraient impliqués dans le maintien de cette structure hétérochromatinienne (pour revue Dimitri, P. et al, 2005). L'hétérochromatine facultative, quant à elle, contient généralement des gènes éteints. Le transcriptome de la cellule est régulé par cette structure. Ainsi, les cellules en stade final de différenciation qui doivent donc exprimer un nombre de gènes restreints, assurant juste leur métabolisme et leur fonction, présentent de nombreuses régions de cette hétérochromatine facultative.

## 2. Les modifications de la chromatine et leurs fonctions

Il est actuellement admis que l'enroulement de l'ADN autour des histones interfère avec les transactions de l'ADN. Le masquage d'un promoteur d'un gène par un nucléosome est réfractaire à la transcription. En effet, et comme nous venons de le voir, les histones ont des queues N-terminales qui flottent à l'extérieur de la structure nucléosomale. On y retrouve des charges positives au niveau de certains constituants. L'ADN étant globalement chargé négativement, il y a donc une interaction forte entre le nucléosome et l'ADN. Les histones peuvent ainsi être considérées comme des répresseurs généraux de la transcription. De ce fait, pour qu'un gène puisse être exprimé, il faut qu'il y ait un remodelage de la chromatine au niveau de sa séquence promotrice. Il y a nécessité d'un signal, d'un code, afin d'indiquer à la cellule de décompacter la fibre de chromatine à un locus donné. Ce code est porté par les protéines histones. On parle de modifications post-traductionnelles des histones.

Les extrémités N-terminales des histones, aussi bien que certains acides aminés du domaine globulaire, peuvent être ciblées par des modifications post-traductionnelles covalentes, telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, l'ADP-ribosylation et l'isomérisation de proline (Cosgrove, M.S. & Wolberger, C., 2005 ; Groth, A. et al, 2007 ; Kouzarides T., 2007 ; Kusch, T. & Workman, J.L., 2007 ; Shilatifard A., 2006) (**Table 3**). En effet, de telles modifications des queues N-terminales des histones peuvent altérer les interactions histone-ADN, aussi bien au sein qu'entre les



nucléosomes, et par conséquent, peuvent affecter la structure chromatinienne. Dans ce cadre, ces modifications covalentes des histones peuvent collaborer pour moduler une multitude de processus cellulaires, incluant la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

<b>Modifications</b>	<b>Résidus modifiés</b>	<b>Fonctions régulées</b>
<b>Acétylation</b>	K-ac	Transcription, Réparation, Réplication, Condensation
<b>Méthylation (Lysines)</b>	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Réparation
<b>Méthylation (Arginines)</b>	R-me1 R-me2	Transcription
<b>Phosphorylation</b>	S-ph T-ph	Transcription, Réparation, Condensation
<b>Ubiquitinylation</b>	K-ub	Transcription, Réparation
<b>Sumoylation</b>	K-su	Transcription
<b>ADP-ribosylation</b>	E-ar	Transcription
<b>Déimination</b>	R > Cit	Transcription
<b>Isomérisation de Prolines</b>	P-cis > P-trans	Transcription

**Table 3 : Les différents classes de modifications des histones.** Tableau récapitulatif des différentes modifications que l'on peut retrouver sur les protéines histones. Les fonctions associées avec chacune de ces modifications sont indiquées.

*Adapté d'après Kouzarides T., (2007)*

De façon simpliste, les fonctions de ces modifications des histones peuvent être subdivisées en deux catégories : **(i)** d'une part, les fonctions que l'on peut qualifier de « globales » (structuration des grands domaines chromatinien) **(ii)** et d'autre part, les fonctions plus localisées (régulation spécifique d'un locus donné). En effet, il est actuellement admis que les modifications épigénétiques jouent un rôle crucial dans l'établissement et le maintien de la structure et des fonctions des grandes régions chromatinien. Ainsi, elles rendent possible le partitionnement du génome en des domaines distincts que sont l'euchromatine, où l'ADN est accessible à la transcription, et l'hétérochromatine, où il est inaccessible. Cependant, à une petite échelle, ces modifications vont modifier les

caractéristiques de la chromatine pour l'exécution d'une fonction donnée, qui peut être très localisée (transcription d'un gène, réparation de l'ADN) et/ou à l'échelle du génome (réplication de l'ADN, condensation des chromosomes mitotiques).

## **2.1 Les fonctions globales des modifications de la chromatine**

Il existe deux grands types de chromatine au sein du génome, l'hétérochromatine qui est « silencieuse » et l'euchromatine qui est « active ». Chacune est associée à un groupe distinct de modifications.

L'hétérochromatine est une structure déterminante dans le maintien de l'intégrité du génome, et notamment des télomères. Chez les mammifères, le statut hétérochromatique est associé à de faibles niveaux d'acétylation et un fort niveau de méthylation sur des sites spécifiques : la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) et la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20).

L'euchromatine représente une large proportion du génome. Dans cet environnement chromatinien, l'ADN est très « flexible » : les gènes peuvent être activés ou réprimés, l'ADN peut également être modulé pour sa réparation ou sa réplication. De ce fait, les types de modifications que l'on y retrouve reflètent cette « flexibilité ». En effet, dans le contexte d'un statut transcriptionnellement inactif, de faibles niveaux d'acétylation, de méthylation et de phosphorylation peuvent être détectés sur les gènes, niveaux qui ne sont pas suffisants pour induire la transcription. Il y a donc nécessité d'activités enzymatiques supplémentaires pour que la transcription puisse prendre place. Typiquement, l'euchromatine activement transcrite se caractérise par de forts niveaux d'acétylation et une triméthylation des lysines 4, 36 et 79 de l'histone H3 (pour revue Kouzarides T., 2007).

## **2.2 Les fonctions localisées des modifications de la chromatine**

La régulation de l'expression des gènes au sein de l'euchromatine nécessite le recrutement d'enzymes de modification de la chromatine par des facteurs de transcription spécifiques. En réponse à un stimulus donné, les facteurs de transcription interagissent avec les promoteurs de leurs gènes cibles et initient une cascade d'évènements qui conduira à l'expression ou la répression de certains gènes.

En ce qui concerne le processus de la transcription, les modifications peuvent être divisées en deux groupes : celles qui corrént avec une activation et celles qui corrént avec une répression de la transcription. L'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, et l'ubiquitinylation ont été impliquées dans l'activation alors que la méthylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la déimination et l'isomérisation des prolines ont été impliquées dans la répression (pour revue Kouzarides T., 2007). Cependant, les travaux actuels semblent plutôt indiquer qu'une modification donnée a le potentiel d'activer ou de réprimer selon le contexte cellulaire. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons uniquement sur les modifications par acétylation et méthylation.

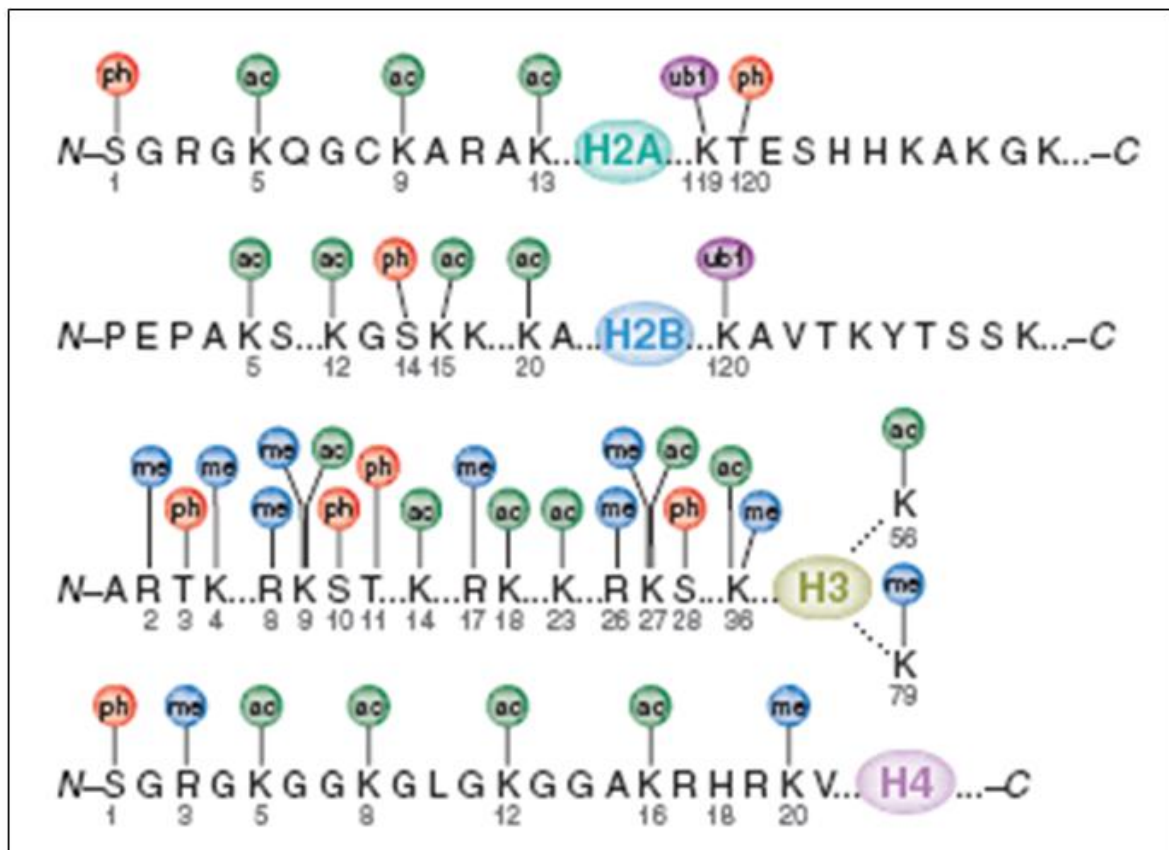
### 2.2.1 L'acétylation...

L'acétylation est une modification épigénétique réversible des lysines qui est régulée par deux types d'enzymes à activité antagoniste, les histones acétyltransférases (HATs) qui acétylent et les déacétylases (HDACs) qui déacétylent. Il existe trois familles majeures de HATs : les familles **MYST**, **GNAT** (Gcn5 related N-acetyltransferase) et **p300/CBP**. A l'heure actuelle, le génome mammalien code pour 11 HDACs qui peuvent être classifiées en quatre groupes distincts: les HDACs de **classe I, IIa/b, IV** et les **Sirtuines** qui sont souvent référées comme HDACs de classe III (pour revue, Haberland, M. et al, 2009).

#### 2.2.1.1 ... dans la transcription

Il a été proposé que l'acétylation des histones neutralise la charge positive des lysines ciblées, altérant ainsi les interactions histone-ADN pour créer une architecture chromatiniennne plus permissive à la transcription (Shahbazian, M.D. & Grunstein, M., 2007). A ce titre, cette modification est presque invariablement associée à l'activation de la transcription. La plupart des sites d'acétylation caractérisés à ce jour sont situés au sein des queues N-terminales des histones qui sont très accessibles pour la mise en place de cette modification (**Figure 6**). Cependant, une lysine présente au niveau du domaine cœur de l'histone H3, la lysine 56, a récemment été démontré comme étant acétylée chez la levure (Xu, F. et al, 2005). Etant donné la localisation particulière de cette lysine, il est raisonnable de spéculer que sa modification par acétylation altère l'interaction histone-ADN. A l'inverse, la déacétylation corréle avec une répression de la transcription, et à ce titre, les HDACs sont présentes dans de nombreux

complexes répresseurs de la chromatine, et ne semblent pas montrer de spécificité particulière. Cependant, il semble que cela ne soit pas toujours le cas notamment chez la levure avec Hda1 pour H3 et H2B et Hos2 pour H3 et H4. La HDAC de classe III, Sir2, est plus sélective pour H4K16ac, et récemment, SirT2 chez l'Homme a été montré comme ayant une spécificité similaire (Vaquero, A. et al, 2006).



**Figure 6 : Les modifications post-traductionnelles des histones de cœur nucléosomales.** Ces modifications incluent l'acétylation (ac), la méthylation (me), la phosphorylation (ph) et l'ubiquitinylation (ub). La grande majorité des modifications connues des histones se produisent sur leur extrémité N-terminale, avec quelques exceptions incluant l'ubiquitinylation des queues C-terminales des histones H2A et H2B et l'acétylation et la méthylation du domaine globulaire d'H3 sur les lysine 56 et 79, respectivement. Les domaines globulaires de chacune des histones sont représentés par les ovales de couleur.

*Adapté d'après Bhaumik, Smith & Shilatifard (2007)*

### 2.2.1.2 ... dans la réparation

L'acétylation joue également un rôle critique dans le processus de réparation des dommages de l'ADN. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, l'acétylation de H3K56 est présente sur les histones H3 nouvellement synthétisées durant la phase S. En l'absence de dommage, cette acétylation disparaît en G2. Cependant, en présence de dommages, l'expression des HDACs Hst3 et Hst4 (deux homologues de Sir2), qui en conditions normales déacétylent cette lysine, est inhibée et la modification persiste (Celic, I. et al, 2006 ; Maas, N.L. et al, 2006). De plus, la HAT Rtt109 qui acétyle cette lysine 56 a récemment été impliquée dans la stabilité du génome et dans la réplication de l'ADN (Driscoll, R. et al, 2007 ; Han, J. et al, 2007 ; Schneider, J. et al, 2006). Toujours chez la levure, la HAT Hat1 est également impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN. Cette enzyme est recrutée aux sites de cassures et acétyle la lysine 12 de l'histone H4 (Qin, S. & Parthun, M.R., 2006).

### 2.2.1.3 ... dans la réplication

Un premier rôle de l'acétylation dans la réplication de l'ADN a été suspecté lorsque qu'une HAT, HBO1, a été isolée en tant que partenaire d'interaction des complexes de reconnaissance des origines de réplication. Cela a permis de démontrer le rôle critique de HBO1 dans le processus de la réplication. La déplétion de HBO1, ou de son partenaire ING5, induit une réduction de la synthèse de l'ADN et affecte la progression en phase S (Doyon, Y. et al, 2006). De plus, l'acétylation de H4K8 intervient dans l'initiation de la phase S du cycle cellulaire et donc la réplication de l'ADN (Doyon, Y. et al, 2006). Dans une autre étude, il a été montré que HBO1 stimule l'assemblage des complexes pré-répliatifs ainsi que le recrutement des protéines MCMs (Mini Chromosome Maintenance) à la chromatine (Iizuka, M. et al, 2006). Ces résultats suggèrent que HBO1, de part sa capacité à acétyler l'histone H4, est nécessaire à l'initiation de la phase S et la mise en place des origines de réplication.

### 2.2.1.4 ... dans la relaxation chromatiniennne

Des expérimentations *in vitro* ont mis en évidence un rôle de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 dans la relaxation de la chromatine (Shogren-Knaak, M. et al, 2006). De plus, la HDAC de classe III SirT2, qui montre une spécificité pour cette lysine 16 acétylée,

aurait la capacité d'induire la condensation de la chromatine *in vivo* (Vaquero, A. et al, 2006). En accord avec cela, SirT2 se localise au niveau de la chromatine durant la transition G2/M, lorsque celle-ci a besoin d'être condensée.

### 2.2.2 La méthylation...

Les histones sont méthylées sur les résidus lysines, arginines ou les deux (Kouzarides T., 2007 ; Shilatifard A., 2006). Les arginines peuvent être mono- ou diméthylées alors que les lysines peuvent être mono-, di-, ou triméthylées. Les enzymes impliquées sont les Histones MéthylTransférases (HMTs). Il en existe 2 familles : les PRMTs (Protein Arginine MethylTransferase) et les PKMTs (Protein Lysine MethylTransferase). Les PKMTs ont une très grande spécificité de substrat par rapport aux HATs (**Table 4**). La déméthylation, quant à elle, est effectuée par des histones déméthylases (HDMs) dont certaines ne sont pas encore décrites à ce jour.

#### 2.2.2.1 ... dans la transcription

En contraste avec l'acétylation, la méthylation ne semble pas altérer la charge globale de l'acide aminé modifié. Elle peut cependant ajouter du volume ainsi que de l'hydrophobicité qui peuvent réduire la stabilité du nucléosome et/ou servir de plateforme pour la fixation d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Lee, D.Y. et al, 2005). Les HMTs et les HDMs ne modifient qu'une seule lysine sur une seule histone et leurs effets peuvent être soit activateurs soit répresseurs de la transcription (Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2005). La méthylation, contrairement à l'acétylation qui est une marque purement activatrice, montre des effets paradoxaux (Kouzarides T., 2007). Trois sites spécifiques de méthylation sont impliqués dans l'activation de la transcription : H3K4, H3K36, et H3K79. H3K4 et H3K36 sont impliqués dans l'élongation de la transcription (Carrozza, M.J. et al, 2005 ; Cuthbert, G.L. et al, 2004 ; Joshi, A.A. & Struhl, K., 2005 ; Keogh, M.C. et al, 2005). Quant à H3K79, peu de choses sont connues à son sujet, cependant cette marque serait impliquée dans l'inhibition de la propagation des protéines hétérochromatiques Sir2 et Sir3 dans les régions d'euchromatine (Kouzarides T., 2007). A

l'opposé, trois sites spécifiques de méthylation sont impliqués dans la répression de la transcription : H3K9, H3K27, et H4K20.

<b>Les enzymes de modification de la chromatine</b>	<b>Résidus modifiés</b>
<b>Acétyltransférases</b>	
HAT1	H4 (K5, K12)
P300/CBP	H3 (K14, K18) H4 (K5, K8) H2A K5 H2B (K12, K15)
PCAF/GCN5	H3 (K9, K14, K18)
Tip60	H4 (K5, K8, K12, K16) H3 K14
HBO1 (ScEsa1, SpMST1)	H4 (K5, K8, K12)
ScSAS3	H3 (K14, K23)
ScSAS2 (SpMST2)	H4 K16
ScRTT109	H3 K56
<b>Déacétylases</b>	
SirT2 (ScSir2)	H4 K16
<b>Lysine Méthyltransférases</b>	
SUV39H1	H3K9
SUV39H2	H3K9
G9a	H3K9
MLL 1-5	H3K4
SET1A	H3K4
SET1B	H3K4
ASH1	H3K4
SET2	H3K36
DOT1	H3K79
Pr-SET 7/8	H4K20
SUV420H1	H4K20
SUV420H2	H4K20
SpSet9	H4K20
EZH2	H4K27
<b>Lysine Déméthylases</b>	
LSD1	H3K4
JHDM1a/b	H3K36
JHDM2a/b	H3K9
JMJD2A/JHDM3A	H3K9, H3K36

**Table 4 : Les enzymes de modification de la chromatine.** Liste non exhaustive: seules les enzymes spécifiques de certains résidus et impliquées dans l'acétylation et la méthylation des lysines sont mentionnées. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sp* *Schizosaccharomyces pombe*.

*Adapté d'après Kouzarides T., (2007)*

La méthylation de H3K9 est impliquée dans la répression des gènes de l'euchromatine, aussi bien que dans la mise en place de l'hétérochromatine. Cette répression implique le recrutement de HP1 au niveau des promoteurs des gènes réprimés. Ces modifications sont médiées par des co-répresseurs tels que la protéine Rb. La méthylation de H3K27 est impliquée dans la répression de l'expression des gènes HOX et dans l'inactivation du chromosome X. Peu de choses sont connues en ce qui concerne les fonctions répressives de la méthylation de H4K20, si ce n'est qu'elle est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine.

A la différence de l'acétylation, la méthylation cible également l'ADN (pour revue, Esteller M., 2008). En effet, les cytosines de l'ADN peuvent être méthylées, méthylation qui prend place au niveau des îlots CpG présents dans tout le génome et notamment dans les régions promotrices d'environ 60% des gènes. La méthylation de l'ADN est catalysée par des DNMTs (DNA MethylTransferase). Cette modification corrèle avec un statut répresseur de la chromatine et par conséquent entraîne une inactivation des gènes ciblés. Il existe deux modèles expliquant cette répression : **(i)** la méthylation de la cytosine peut altérer l'interaction de facteurs de transcription tels que Sp1 sur leur séquence de reconnaissance ; **(ii)** la méthylation de l'ADN peut entraîner un changement du statut de la chromatine via le recrutement de protéines capable de reconnaître les CpG méthylés, les MBPs (Methyl-CpG-Binding Proteins) (pour revue Klose, R.J. and Bird, A.P., 2006). Suite à la méthylation d'îlots CpG, les MBPs ont le potentiel de recruter, au niveau de ces CpG méthylés, des complexes à activités de modification de la chromatine, notamment des HDACs et/ou des HMTs, pour induire l'inactivation transcriptionnelle du gène en question.

#### **2.2.2.2 ... dans la réponse aux dommages de l'ADN**

Les deux premiers degrés de méthylation de H4K20 sont impliqués dans l'établissement de la réponse aux dommages de l'ADN chez *S. pombe*. Les dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes génèrent des foyers nucléaires au niveau des sites de cassure qui contiennent H4K20 méthylée et la protéine CRB2 (Sanders, S.L. et al, 2004). Ces deux marques épigénétiques, qui sont en temps normal masquées au sein du nucléosome, sont exposées à l'environnement de la cellule suite à une lésion de l'ADN et reconnues par



CRB2 pour induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Botuyan, M.V. et al, 2006). De façon similaire, il semblerait que ce mécanisme soit conservé chez les mammifères puisque l'homologue humain de CRB2, la protéine p53BP1, reconnaît aussi la méthylation de H4K20, même si elle interagit également avec H3K79 méthylée (Huyen, Y. et al, 2004). De plus, une étude structurale et fonctionnelle récente indique que cette protéine reconnaît avec grande affinité la méthylation de H4K20 et est recrutée aux sites de dommages via cette méthylation (Botuyan, M.V. et al, 2006). De façon intéressante, CRB2 et p53BP1 reconnaissent uniquement la mono- et la diméthylation de H4K20, ce qui laisse la possibilité que la forme triméthylée puisse jouer un rôle dans une autre étape de la réparation de l'ADN, ou qu'elle puisse être impliquée dans une fonction totalement différente, en l'absence d'une signalisation de dommages de l'ADN.

### 2.2.2.3 ... dans le développement

De façon très intéressante, il a récemment été mis en évidence que le niveau de méthylation de l'arginine 26 de l'histone H3 diffère entre les blastomères d'un même embryon au stade 4 cellules. Les cellules dont le niveau de méthylation est élevé donneront les cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne, alors que celles dont le niveau de méthylation est plus faible, seront à l'origine du trophoctoderme mural (Torres-Padilla, M.E. et al, 2007).

## 3. Le code histone

Les modifications post-traductionnelles des histones sont des acteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle. Comme nous venons de le voir, il existe de nombreux types de modifications des histones. Les différentes combinaisons de ces modifications formeraient un code épigénétique qui, une fois lu par des domaines protéiques spécifiques, induirait un état chromatinien particulier: actif ou inactif. Les histones peuvent donc subir de nombreuses modifications, et selon le code histone, une modification aurait la capacité d'influencer les autres. En effet, chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation de H3S10 entraîne l'acétylation de H3K14. Cette double modification sur la même histone H3 est interprétée comme reflétant l'activation transcriptionnelle (Walter, W. et al, 2008). L'acétylation de H3K18 et H3K23

induit la méthylation de l'arginine 17, résultant en une activation des gènes de réponse aux estrogènes (Daujat, S. et al, 2002). Ce « dialogue » entre ces modifications des histones peut également conduire à la perte de modifications particulières. A ce titre, chez *S. cerevisiae*, la méthylation de H3K36 crée une marque qui cible les nucléosomes pour la déacétylation des histones H3 et H4 par la HDAC Rpd3S, suite au passage de l'ARN polymérase (Lee J.S. & Shilatifard, A., 2007).

Il apparaît également que ces modifications ont une influence les unes sur les autres, non seulement lorsqu'elles sont présentes sur une même queue d'histone, mais également en *trans*, puisqu'il existe un lien entre l'ubiquitinylation de H2BK123 et la méthylation de H3K4 (Weake, V.M. & Workman, J.L., 2008).

## 4. Une mission : décrypter le code !

Le signal épigénétique porté par le locus chromatinien doit être traduit pour induire une réponse cellulaire, bien que certaines modifications post-traductionnelles puissent remplir leur fonction par leur seule présence sur les histones. La plupart de ces modifications constituent des sites d'interaction reconnus par des protéines spécialisées. Les protéines responsables de cette traduction sont dotées de domaines structuraux particuliers capables de s'associer avec un type de modification précis. De nombreux domaines ont été décrits à ce jour et ces domaines structuraux ont été mis en évidence pour la plupart des modifications post-traductionnelles des histones, incluant l'ubiquitination (de Napoles, M. et al, 2004), la sumoylation (Shiio, Y. & Eisenman, R.N., 2003) ou encore l'ADP-ribosylation (Karras, G.I. et al, 2005). Cependant, comme précédemment, seules les interactions impliquant l'acétylation et la méthylation seront discutées ici (pour revue Taverna, S.D. et al, 2007). Le plus souvent, ces protéines font parties de complexes multi-protéiques.

L'acétylation d'un résidu lysine crée un site d'ancrage pour un domaine protéique appelé **bromodomaine** (Jeanmougin, F. et al, 1997; Yang, X.J., 2004). Les bromodomains reconnaissent ainsi spécifiquement les lysines acétylées des queues N-terminales des histones et permettent la rétention de complexes protéiques sur des régions de chromatine hyperacétylée. Ce domaine spécialisé est retrouvé dans plusieurs protéines associées à la chromatine et la plupart des HATs (pour revue De la Cruz, X. et al, 2005).

Contrairement au bromodomaine, qui est le seul domaine protéique capable de reconnaître les lysines acétylées, plusieurs types de domaines différents ont été impliqués dans l'interaction avec des lysines méthylées (pour revue Volkel, P. & Angrand, P.O., 2007). Parmi ces domaines, on distingue alors le **chromodomaine** (pour CHROMatin Organisation MOdifier), **la répétition WD40** (pour Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every 40 residues), **le domaine Tudor**, **le domaine MBT** (pour Malignant Brain Tumor), et **le doigt de zinc de type PHD**.

Tous ces différents domaines structuraux se retrouvent dans les complexes de remodelage de la chromatine. Le packaging de l'ADN via les nucléosomes masque l'ADN et ralentit ou prévient la reconnaissance de séquences ADN par les facteurs de transcription. Afin de permettre un accès rapide et hautement régulé à l'ADN, les cellules ont développé ces complexes de remodelage de la chromatine qui sont des appareillages très sophistiqués afin d'altérer la position, la présence, et la structure des nucléosomes. Dans chaque complexe se trouve au moins une protéine à activité ATPasique.

Ces complexes de remodelage peuvent être subdivisés en plusieurs familles sur la base de leur composition et de leurs activités : SWI/SNF, ISWI, NURD/MI-2/CHD, et les ATPases INO80 et SWR1. Les complexes de remodelage de la chromatine peuvent affecter les nucléosomes selon au moins 4 mécanismes différents : **(i)** le déplacement de l'octamère d'histones à une nouvelle position ce qui permet d'exposer une séquence d'ADN masquée, **(ii)** l'éjection du nucléosome pour exposer l'ADN, **(iii)** le retrait des dimères H2A/H2B laissant uniquement le tétramère H3/H4 en position centrale ce qui expose l'ADN et déstabilise le nucléosome, et **(iv)** l'échange de dimère, par exemple, échange de dimères H2A/H2B par des dimères contenant H2B et le variant d'histone H2A, H2AZ (Chez la levure *S. cerevisiae*, les nucléosomes sont enrichis en H2AZ au niveau du promoteur des gènes afin de stimuler leur transcription) (pour revue Cairns, B.R., 2007).

## 5. Les variants d'histones

Les variants protéiques des histones constituent un autre mode de régulation épigénétique qui joue un rôle majeur dans le dynamisme de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes. En effet, chaque histone de cœur, à l'exception de l'histone H4,

possède plusieurs isoformes protéiques, dont l'homologie est variable. Elles sont regroupées sous le terme de variants d'histones (pour revue Pusarla, R.H. & Bhargava, P., 2005).

De façon intéressante, alors que les histones de cœur voient leur expression augmenter au cours de la phase S du cycle cellulaire, afin de répondre au besoin de la réplication de l'ADN, les variants d'histone, quant à eux, sont également exprimés en dehors de la phase S et peuvent être incorporés dans la chromatine indépendamment de la synthèse d'ADN (Wu, R.S. et al, 1982). De plus, de part leurs variations de séquence, en comparaison avec les histones de cœur, ces variants d'histones peuvent altérer l'organisation du nucléosome par des changements structuraux mais aussi par des différences de charges globales provenant de la séquence des variants elle-même et/ou de l'effet des modifications post-traductionnelles qu'ils peuvent subir (pour revue Bernstein, E. & Hake, S.B., 2006). L'un des variants d'histone probablement le mieux caractérisé à ce jour est le variant H2A.X dont la forme phosphorylée (phosphorylation sur sa sérine 139), aussi appelé  $\gamma$ -H2A.X, joue un rôle majeur dans l'initiation de la réponse aux dommages de l'ADN et leur réparation (pour revue, Downs, J.A., 2007).

## **6. Et l'épigénétique dans le cancer ?**

Les altérations de la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones, et du remodelage de la chromatine sont les dérégulations épigénétiques majeures associées à la tumorigénèse. En fait, toutes les voies de signalisation cellulaire contribuant à la mise en place d'un phénotype néoplasique sont affectées par les « gènes épigénétiques » dans la pathologie cancéreuse. Au cours de ce chapitre, nous allons discuter de l'importance des processus épigénétiques dans le développement des cancers et notamment leurs implications pronostics.

### **6.1 Le statut épigénétique des cellules normales**

Le développement des récentes technologies d'épigénomique a permis d'établir des différences entre les statuts épigénétiques des cellules normales et tumorales (Fraga, M.F. & Esteller, M., 2002). La méthylation des cytosines de l'ADN est la modification épigénétique qui a été la plus étudiée. Ces cytosines sont situées au sein de dinucléotides CpG. 3 à 6 % des

cytosines du génome des cellules normales sont méthylées. Ces CpGs sont pour certains regroupés en îlots (îlots CpG), notamment au niveau des régions promotrices de certains gènes (Bird A.P., 1986). La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité génomique. A ce titre, dans les cellules normales, les séquences répétées sont fortement méthylées, méthylation qui prévient la réactivation d'éléments transposables.

Dans la cellule normale, une balance hautement régulée maintient la chromatine soit dans un statut actif/acétylé soit inactif/déacétylé. Cette balance est étroitement régulée par les HATs et les HDACs. Une autre balance concerne la méthylation des lysines et arginines des histones. Cette modification post-traductionnelle est finement régulée par les HMTs et HDMs, et ce processus est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes et de la structure de la chromatine.

Etant données les vastes fonctions cellulaires régulées par ces différentes modifications épigénétiques, il n'est pas surprenant que des études récentes aient pu mettre en évidence des changements globaux de la méthylation de l'ADN et des modifications des histones dans les cellules cancéreuses (Fraga, M.F. et al, 2005 ; Harikrishnan, K.N. et al, 2005).

## **6.2 Le statut épigénétique des cellules tumorales**

La coexistence de l'hyperméthylation des promoteurs de gènes spécifiques et l'hypométhylation globale de l'ADN génomique est une caractéristique épigénétique des cellules tumorales (Weber, M. et al, 2005). La plupart des gènes inactivés par ce processus sont des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, l'angiogénèse, l'invasion ou encore l'adhésion cellulaire (pour revue Mulero-Navarro, S. & Esteller, M., 2008). A ce titre, un profil différent d'hyperméthylation des promoteurs de ces gènes est observé dans divers types tumoraux (Costello, J.F. et al, 2000 ; Esteller, M. et al, 2001).

Les modifications post-traductionnelles des histones émergent également comme un autre processus épigénétique critique qui peut expliquer le comportement des cellules tumorales. La comparaison avec des tissus normaux a permis de révéler que ces modifications sont dérégulées dans les tumeurs. A ce titre, la perte d'acétylation de H4K16 et la perte de la triméthylation de H4K20 sont une caractéristique des cellules cancéreuses (Fraga, M.F. et al,

2005). Ces dérégulations peuvent être ou non associées avec l'hyperméthylation des promoteurs (Cameron, E.E. et al, 1999).

### **6.3 Les altérations épigénétiques et leur impact sur le pronostic**

Jusqu'à très récemment, les altérations des modifications post-traductionnelles des histones qui ont été observées dans les cellules cancéreuses ne l'étaient qu'au niveau de promoteurs précis. Cependant, une étude récente a démontré que les altérations globales des modifications des histones peuvent prédire la survie des patients porteurs du cancer de la prostate (Seligson, D.B. et al, 2005). Cette analyse par immunohistochimie a mis en évidence le pouvoir pronostic de deux modifications post-traductionnelles des histones, H3K4me2 et H3K18ac. Dans une étude similaire, il a été observé que le niveau d'acétylation de H3K9 est prédictif de la survie des patients porteurs d'un adénocarcinome de stade I (Barlési, F. et al, 2007). Enfin, une autre étude indique que la perte de la méthylation de l'ADN de même que l'hypoacétylation de H3K9 s'accroissent avec la progression tumorale dans les cancers de la prostate (Mohamed, M.A. et al, 2007). Ces résultats sont en accord avec le fait que les enzymes de modification de la chromatine ont une activité dérégulée dans différents cancers (Esteller, M., 2006).

L'ensemble de ces travaux indiquent que les dérégulations épigénétiques des histones jouent un rôle critique dans le processus de cancérisation, mais aussi qu'elles pourraient être un nouvel outil puissant pour le diagnostic et le pronostic. De plus, en permettant l'identification de patients à risque, elles pourraient également permettre la mise en place de protocoles thérapeutiques plus ciblés. Enfin, elles pourraient également jouer un rôle dans la réponse aux traitements comme tel est le cas de la protéine MGMT (DNA-repair enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase) dont le degré d'hyperméthylation de son promoteur est associé à une meilleure sensibilité à l'action des agents alkylants utilisés en chimiothérapie (Esteller, M. et al, 2000).

## **6.4 Une nouvelle génération de thérapies cliniques**

La découverte que des gènes liés au cancer sont réprimés par des mécanismes épigénétiques et le fait que les modifications épigénétiques soient réversibles, sont étroitement liés au design et au développement de drogues « épigénétiques ». Ces composés modulent trois processus : la méthylation des cytosines de l'ADN, les modifications des histones, ainsi que le remodelage des nucléosomes. Les deux catégories majeures sont les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et les inhibiteurs de HDACs. Certains sont déjà connus des études cliniques puisqu'ils sont actuellement employés dans le traitement de certaines pathologies non cancéreuses, telles que l'hypertension (Hydralazine) (Rich, S. et al, 1983), l'arythmie cardiaque (Procainamide) (Windle, J. et al, 1987) et les maladies épileptiques (Acide valproïque) (Strolin Benedetti, M. et al, 1984). Ils sont maintenant reconsidérés pour une utilisation dans les traitements thérapeutiques des cancers. De nombreux inhibiteurs de HDACs et de la méthylation de l'ADN, dont les effets sont prometteurs, sont actuellement développés et sont en cours de tests cliniques (pour revue Mulero-Navarro, S. & Esteller, M., 2008).

## III. L'HISTONE ACÉTYLTRANSFERASE TIP60 : STRUCTURE ET FONCTIONS.

Les lysines acétyltransférases sont subdivisées en plusieurs catégories dont l'une est la famille MYST, nommée ainsi selon le nom de ses membres fondateurs : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60. Les membres de cette famille sont impliqués dans de nombreux processus biologiques clés tels que la régulation de l'expression des gènes, la compensation de dosage, ou encore la réparation des dommages de l'ADN (Utley, R.T. et Cote, J., 2003). Bien que les protéines de la famille MYST semblent être impliquées dans des fonctions cellulaires variées, tous les membres de cette famille sont caractérisés par un domaine acétyltransférase MYST hautement conservé et la quasi-totalité de ces enzymes existent en tant que sous-unité catalytique de complexes multi-protéiques.

L'une des protéines MYST la mieux caractérisée est la protéine Tip60. Son complexe est conservé de la levure *S. Cerevisiae* à l'Homme.

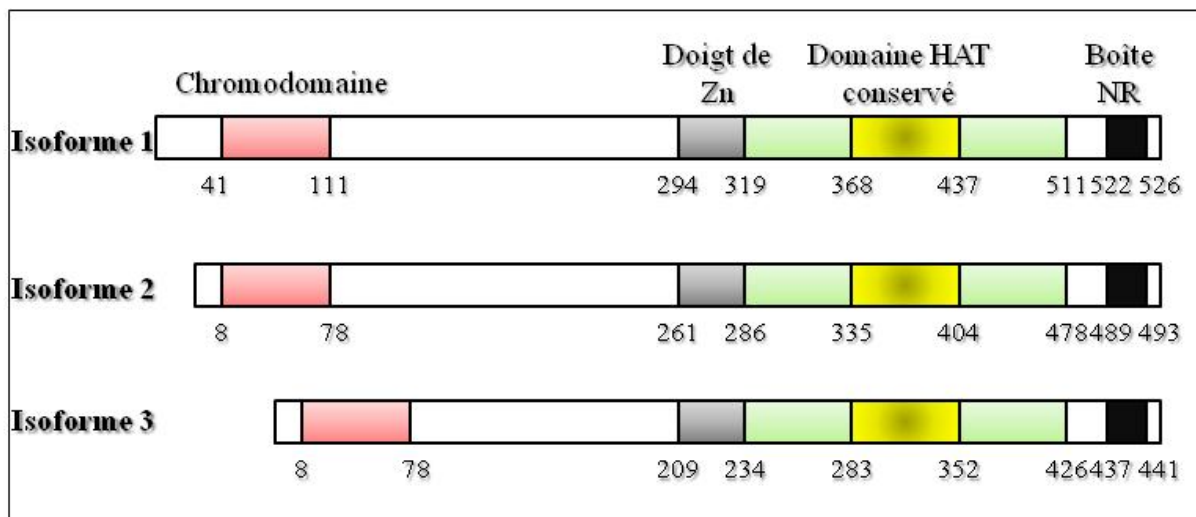
### 1. Le gène HTATIP

La protéine Tip60 a originellement été isolée comme une protéine interagissant avec la protéine Tat du virus HIV-1 (Kamine, J. et al, 1996). Le gène HTATIP codant pour la protéine Tip60 est localisé en 11q13.1 et s'organise en 14 exons. L'existence d'un épissage alternatif résulte en l'expression d'au moins trois variants d'épissage, l'isoforme 1, l'isoforme 2 (Tip60 $\alpha$ ) et l'isoforme 3 (Tip60 $\beta$ , PLA2 interacting protein, PLIP). Toutes ces isoformes de Tip60 sont exprimées à des niveaux relativement faibles dans une grande variété tissulaire et cellulaire et exhibent des fonctions spécifiques dépendantes du type cellulaire rencontré (Hlubek, F. et al, 2001). Des homologues du gène HTATIP ont été identifiés dans des organismes aussi variés que *G. gallus*, *M. musculus* et *D. melanogaster* où ils codent pour des protéines qui partagent une très forte homologie avec la protéine Tip60 humaine (57-99%) (McAllister, D. et al, 2002). L'isoforme 1 résulte de la traduction du premier intron et code pour une nouvelle protéine dont la fonction est à l'heure actuelle inconnue (Legube, G. & Trouche, D., 2003). L'isoforme 3 (Tip60 $\beta$ ) résulte de l'exclusion de l'exon 5 codant pour une région riche en prolines (Ran, Q. & Pereira-Smith, O.M., 2000) et paraît posséder des



propriétés similaires à Tip60 $\alpha$  (Sheridan, A.M. et al, 2001). Le variant de splicing le mieux caractérisé est l'isoforme 2.

L'isoforme 2 (Tip60 $\alpha$ ), que l'on nommera Tip60 tout au long de ce manuscrit, code pour une protéine de 513 acides aminés (58kDa). D'un point de vue structural, Tip60 est constituée en position N-terminal d'un chromodomaine et en C-terminal d'un domaine MYST très conservé (**Figure 7**). Le domaine MYST est le domaine catalytique et contient une petite séquence (résidus 335-404, « domaine HAT conservé ») qui lie l'acétyl-co-enzyme A et le substrat et qui est structurellement conservé au sein des autres familles d'histones acétyltransférases. Le domaine MYST possède également un doigt de zinc Cys-Cys-His-Cys, qui est essentiel à son activité acétyltransférase et pour ses interactions protéine-protéine (Nordentoft, I. & Jorgensen, P., 2003 ; Xiao, H. et al, 2003). A son extrémité C-terminale se situe une petite boîte d'interaction avec les récepteurs nucléaires (Gaughan, L. et al, 2001).



**Figure 7: Représentation schématique des différents domaines protéiques des protéines Tip60.** L'isoforme 2 est l'isoforme la mieux caractérisée. L'isoforme 1 code 33 acides aminés supplémentaires en N-Terminal, alors que l'isoforme 3 résulte de l'exclusion de 52 acides aminés entre le chromodomaine et le domaine MYST conservé.

*Adapté d'après Sapountzi et al (2006)*

---

## **2. Localisation subcellulaire et expression de Tip60**

### **2.1 Localisation subcellulaire de Tip60**

Les deux complexes Tip60 $\alpha$  et Tip60 $\beta$  sont très majoritairement localisés dans le noyau de la cellule où ils sont impliqués dans différents processus nucléaires (Cao, X. & Sudhof, T.C., 2001 ; Gavaravarapu, S. & Kamine, J., 2000 ; Ran, Q. & Pereira-Smith, O.M., 2000 ; Yamamoto, T. & Horikoshi, M., 1997). Cependant, dans certains cas, Tip60 est détecté dans le cytoplasme en association avec des récepteurs membranaires internalisés pour réguler certaines voies de signalisation ou l'expression de gènes spécifiques. Par exemple, Tip60 est impliqué dans la voie de signalisation de l'interleukine-9 (IL-9), une cytokine impliquée dans la prolifération cellulaire, la régulation de la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Tip60 interagit dans le cytoplasme avec le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) et le récepteur à l'interleukine-9 dont la stimulation par l'IL-9 cible le complexe Tip60-STAT3 dans le noyau (Sliva, D. et al, 1999 ; Xiao et al, 2003).

Bien que Tip60 puisse être retrouvé dans le cytoplasme, les mécanismes gouvernant son trafic nucléo-cytoplasmique sont très peu connus.

### **2.2 Expression de la protéine Tip60**

Tip60 est une protéine ubiquitaire instable de courte demi-vie de 30 à 190 minutes selon le type cellulaire étudié (Legube, G. et al, 2002 ; Eymin, B. et al, 2006). En l'absence de stimuli, un faible niveau d'expression est maintenu dans la cellule par la voie protéasomale.

#### **2.2.1 Modifications post-traductionnelles**

##### **2.2.1.1 Ubiquitylation**

Tip60 est mono- et poly-ubiquitylé par Mdm2 (Mouse Double Minute 2) (Legube, G. et al, 2002). Les signaux de dommages à l'ADN tel que les UV inhibent cette ubiquitylation médiée par Mdm2 et le niveau d'expression de Tip60 se stabilise rapidement

pour contribuer à cette réponse (Legube, G. et al, 2002). De plus, une étude récente a mis en avant le fait que sous des conditions physiologiques normales, le facteur de transcription ATF2 (Activating Transcription Factor 2) en coopération avec l'ubiquitine ligase Cul3 induit la dégradation de Tip60, atténuant ainsi son activité HAT (Bhoumik, A. et al, 2008). L'association de ATF2 avec Tip60 au niveau de la chromatine est inhibée en réponse à des radiations ionisantes, induisant l'accumulation de Tip60 et favorisant son activité HAT. De façon intéressante, Bhoumik et coll. ont identifié un panel de lignées cellulaires dérivées de mélanomes et de cancers de la prostate dans lesquelles l'expression de ATF2 est inversement corrélée à l'expression de Tip60 et l'activation d'ATM après radiations ionisantes. Le facteur de transcription ATF2 semble donc jouer un rôle important dans la modulation de la stabilité et de l'activité de Tip60.

#### **2.2.1.2 Phosphorylation**

La phosphorylation est l'un des grands modes de régulation des protéines. Tip60 est modifié par phosphorylation sur ses résidus sérines 86 et 90 (Lemercier, C. et al, 2003). La sérine 90 se situe au sein d'un motif consensus de reconnaissance du complexe Cycline B-cdc2 et Tip60 est phosphorylé par cdc2 *in vitro*. De plus, Tip60 phosphorylé s'accumule à la transition G2/M *in vivo*, accumulation qui est dépendante de cdc2. Les sérines 86 et 90 sont conservées chez *M. musculus*, *D. melanogaster* mais pas chez la levure *S. cerevisiae*.

#### **2.2.1.3 Acétylation**

Il a également été décrit que Tip60 peut être modifiée par acétylation par les histones acétyltransférases p300/CBP. Cette acétylation se produit au niveau du doigt de zinc de Tip60 sur les lysines 268 et 282, mais son effet sur l'expression et les fonctions de Tip60 est actuellement inconnu (Col, E. et al, 2005).

### **2.2.2 Autres modes de régulation**

La région promotrice de Tip60 contient plusieurs E boxes, et l'expression de Tip60 est régulée par le facteur de transcription circadien Clock via sa capacité à interagir avec ces séquences particulières. Cette capacité à transactiver l'expression du gène HTATIP semble

spécifique de Clock, puisque que les autres facteurs capables de reconnaître ces séquences, tels que c-Myc, Twist et USF1, ne sont pas retrouvés au niveau de la région promotrice de Tip60 (Miyamoto, N. et al, 2008).

### 3. Tip60 possède une activité histone acétyltransférase

Peu après sa découverte, il est devenu évident que Tip60 possède une activité histone acétyltransférase. La protéine Tip60 recombinante acétyle les histones de cœur H2A (K5), H3 (K14), et H4 (K5, K8, K12 et K16) (Kimura, A. & Horikoshi, M., 1998 ; Yamamoto, T. & Horikoshi, M., 1997). En tant que sous unité stable d'un complexe multi-protéique, Tip60 peut également acétyle *in vitro* les histones assemblées en nucléosome ; dans ce cas Tip60 cible spécifiquement les histones H2A et H4 nucléosomales (Ikura, T. et al, 2000). Des travaux réalisés chez *D. melanogaster* indiquent que Tip60 peut aussi acétyle des variants d'histone modifiés tel que phospho-H2Av sur la lysine 5 (Kusch, T. et al, 2004).

Par ailleurs, Tip60 a également la capacité d'acétyle des protéines non histones telles que les facteurs de transcription p53 (Tang, Y. et al, 2006 ; Sykes, S.M. et al, 2006 ; Kurash, J.K. et al, 2008), le récepteur aux androgènes (AR), UBF (Upstream Binding Transcription Factor), c-Myc (Myelocytomatosis oncogene c) (Gaughan, L. et al, 2002 ; Halkidou, K. et al, 2004 ; Patel, J.H. et al, 2004) ou encore d'autres protéines comme la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Sun, Y. et al, 2005) ou le suppresseur de tumeur Rb (Leduc, C. et al, 2006).

Le mécanisme catalytique de l'acétylation des lysines par une enzyme de la famille des MYST a été étudié en détail *in vitro* dans le cas de l'orthologue de Tip60, Esa1 (Sas family acetyltransferase 1), chez la levure *S. cerevisiae*. Le cœur catalytique des protéines MYST adopte une structure similaire aux autres lysines acétyltransférases telle que la famille GNAT (General control non depressible 5 related N-AcetylTransferases).

Des études *in vitro* suggèrent qu'il n'existerait pas de motif consensus apparent pour la fixation de Tip60 à ses substrats.

## 4. Le complexe Tip60

Selon le processus cellulaire auquel il participe, Tip60 forme des complexes distincts transitoires avec des partenaires d'interactions appropriés. La majorité des protéines Tip60 cellulaires existent en tant que complexe multi-protéique nucléaire stable (**Table 5**) constitué d'au moins 18 sous-unités.

<i>H.s.</i>	<i>D.m.</i>	<i>S.c.</i>	<i>Fonctions</i>
Tip60	dTip60	Esa1	Acétyltransférase
TRRAP	dTra1	Tra1	Domaine PIKK, composant des complexesHAT
Actine	Act87E	Act1	ATPase, cytosquelette
BAF53a	BAP55	Arp4	Réparation de l'ADN
P400/Domino	Domino	Eaf1/Swr1 <sup>a</sup>	ATPase homologue à SWI2/SNF2
RuvBL1	dPontin	Rvb1 <sup>a</sup>	Hélicase/ATPase?
RuvBL2	dReptin	Rvb2 <sup>a</sup>	Hélicase/ATPase?
Mrg15	dMrg15	Eaf3	Chromodomaine, sénescence
MrgX		Eaf3	Chromodomaine, sénescence
MrgBP	dMrgBP	Eaf7	
Epc1	E(Pc)	Epl1	Contrôle transcriptionnel, répression
Protéine homologue à Epc			Régulation de la transcription
ING3	dIng3	Yng2	Domaine PHD, inhibiteur de croissance, apoptose
Brd8/TRCp120	dBrd8	Bdf1 <sup>a</sup>	Bromodomaine, Coactivateur récepteur thyroïdique
YL-1	dYL-1	Vps72 <sup>a</sup>	Remodelage de la chromatine
DMAP	dDMAP1	Eaf2	Domaine SANT, réplication de l'ADN
Gas41	dGas41	Yaf9	Domaine YEATS, viabilité cellulaire
FLJ11730	dEaf6	Eaf6	
(H2A.X/H2A.Z)	H2Av	H2A/H2A.Z <sup>a</sup>	Histones
(H2B)	H2B	H2B <sup>a</sup>	Histones

**Table 5 : Composition du complexe Tip60 chez *H. sapiens* (*H.s.*) et des complexes homologues chez *D. melanogaster* (*D.m.*) et *S. cerevisiae* (*S.c.*) NuA4.** La présence de H2B et des variants d'histone H2A.X/H2A.Z n'est pas encore confirmée chez l'Homme.

<sup>a</sup> dénote les sous-unités du complexe Swr1 chez la levure. Domaine PIKK : phosphatidylinositol kinase-related kinase, PHD : plant homeodomain, SANT : domaine SWI3-Ada2-NCOR-TFIIB, YEATS : domaine YNK7-ENL-AF9-TFIIF

*Adapté d'après Sapountzi et al (2006)*

Il réalise la plupart des fonctions transcriptionnelles et de réponse aux dommages de l'ADN de Tip60.

En position centrale du complexe se trouve un véritable squelette protéique, la protéine TRRAP (TRansformation/tRanscription domain Associated Protein) (Ikura, T. et al, 2000) qui est aussi présente dans d'autres complexes acétyltransférases incluant P/CAF (p300/CBP Associated Factor complex) (Carrozza, M.J. et al, 2003). Un autre composant essentiel du complexe est l'ATPase p400/Domino qui possède une activité de remodelage de la chromatine (Ikura, T. et al, 2000). BAF53 (53kDa BRG-1/human BRM associated factor) et l'actine sont également présents dans le complexe (Ikura, T. et al, 2000). BAF53 possède une activité de chaperonne d'histones et chez la levure est responsable du recrutement des complexes de modification de la chromatine à l'ADN endommagé. Deux hélicases potentielles RuvBL1 et RuvBL2, impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN chez la bactérie, font partie intégrante du complexe. Le complexe Tip60 montre une activité hélicase qui cependant n'est pas attribuée aux hélicases RuvBL1/2 (Ikura et al, 2000). Le complexe contient ING3 (INHibitor of Growth 3) qui possède un domaine PHD (Plant HomeoDomain), domaine communément retrouvé dans les complexes de modification de la chromatine (Doyon, Y. et al, 2004). ING3 est aussi impliqué dans la transcription de p53 en réponse aux dommages de l'ADN, supportant ainsi le rôle de Tip60 dans la réponse aux dommages de l'ADN et l'apoptose. Le complexe Tip60 possède deux autres protéines contenant des chromodomaines : Mrg15 (Mortality factor 4 Related Gene 15) et MrgX (Mortality factor 4 Related Gene X). Ces protéines de même que Gas41 (Glioma Amplified Sequence 41) sont impliquées dans la régulation de la prolifération et de la viabilité cellulaire mais également dans la sénescence. La nouvelle protéine MrgBP (Mrg Binding Protein) est une sous-unité du complexe (Cai, Y. et al, 2003). De plus, la protéine à bromodomaine Brd8/TRCp120 (bromo-protein bromodomain containing protein 8/Thyroid Receptor Coactivator Protein 120 kDa) est aussi présente. C'est un homologue des protéines de remodelage de la chromatine chez la levure qui lie les histones modifiées (Cai, Y. et al, 2003 ; Doyon, Y. et al, 2004). Ce complexe contient également la protéine DMAP1 (DNA Methyltransferase Associated Protein 1) possédant un domaine SANT (SWI3-Ada2-NCoR-TFIIIB) qui lie les queues des histones (Cail, Y. et al, 2003 ; Doyon, Y. et al, 2004). D'autres sous-unités font également partie de ce complexe Tip60. Les complexes Tip60 $\alpha$  et Tip60 $\beta$  sont identiques (Doyon, Y. et al, 2004).

---

## 5. Les fonctions biologiques de Tip60

### 5.1. Implication dans la régulation de la transcription

#### 5.1.1 Co-activateur

La protéine Tip60 est connue pour être recrutée par un nombre varié de facteurs de transcription au niveau de leurs promoteurs cibles où elle participe à l'acétylation des histones et à l'activation transcriptionnelle. Ainsi, Tip60 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (**Table 6**). Tip60 co-régule un nombre croissant de facteurs de transcription dont seuls les principaux seront mentionnés ici.

##### 5.1.1.1 Le facteur de transcription c-Myc

Tip60 joue un rôle important dans la voie de signalisation de c-Myc. Les facteurs de transcription de la famille Myc jouent un rôle direct dans la progression G1/S du cycle cellulaire en régulant les gènes nécessaires pour la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN mais aussi l'apoptose. Le complexe TRRAP/Tip60 est un cofacteur des facteurs de transcription Myc : Tip60 acétyle directement c-Myc et le stabilise (Patel, J.H. et al, 2004) ; Tip60 interagit avec c-Myc qui le recrute au niveau de ses promoteurs cibles où il participe à l'acétylation de l'histone H4 (Frank, S.R. et al, 2003).

##### 5.1.1.2 Le facteur de transcription E2F1

Tip60 est impliqué dans le programme transcriptionnel de E2F1. Le complexe Tip60 est recruté sur les promoteurs des gènes cibles de E2F1 où il est responsable de l'acétylation de l'Histone H4. Ces gènes cibles incluent les gènes codant pour p107 (pocket protein p107), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), MCM3 et MCM4 (Minichromosome maintenance 3/4) (Taubert, S. et al, 2004). Il a également été montré que E2F1 en coopération avec Sp1 et Sp3 (transcription factor Specificity Protein 1/3) recrute Tip60 sur le promoteur de MYCN (Kramps, C. et al, 2004).

<b>Facteurs de transcription</b>	<b>Fonction</b>
APP, Fe65	Activation/répression
Récepteurs nucléaires (AR, PR, ER)	Activation
CREB	Répression
E2F	Activation
Myc	Activation
NFκB	Activation
P53	Activation
PITX2	Activation
SRF	Activation
STAT3	Répression
TCF-β-caténine	Activation
UBF	Activation
Tbx	Activation
TEL	Répression
ZEB	Répression

**Table 6 : Tip60 dans le contrôle transcriptionnel.** Les HATs sont recrutées par des facteurs de transcription au niveau de leurs promoteurs cibles où elles sont généralement impliquées dans l'activation de la transcription. Comme il est résumé dans ce tableau, Tip60 est associé à un nombre croissant de facteurs de transcription dans les cellules de mammifères, et il a été proposé pour fonctionner à la fois comme co-activateur et co-répresseur. La répression pourrait être indépendante de l'activité HAT et notamment impliquer l'histone déacétylase HDAC7. L'activation nécessite généralement l'activité HAT de Tip60, notamment via l'acétylation des histones au niveau du promoteur cible. APP, amyloïd β-precursor protein, AR, androgen receptor, ER, estrogen receptor, PITX2, paired-like homeodomain transcription factor 2, SRF, serum response factor, STAT3, signal transducer and activation of transcription 3, TCF, T cell factor, UBF, upstream binding factor, Tbx, T-box protein, TEL, translocation E26 transforming specific (ETS) leukaemia gene, ZEB, zinc finger E box binding protein.

*Adapté d'après Squatrito et al (2006)*



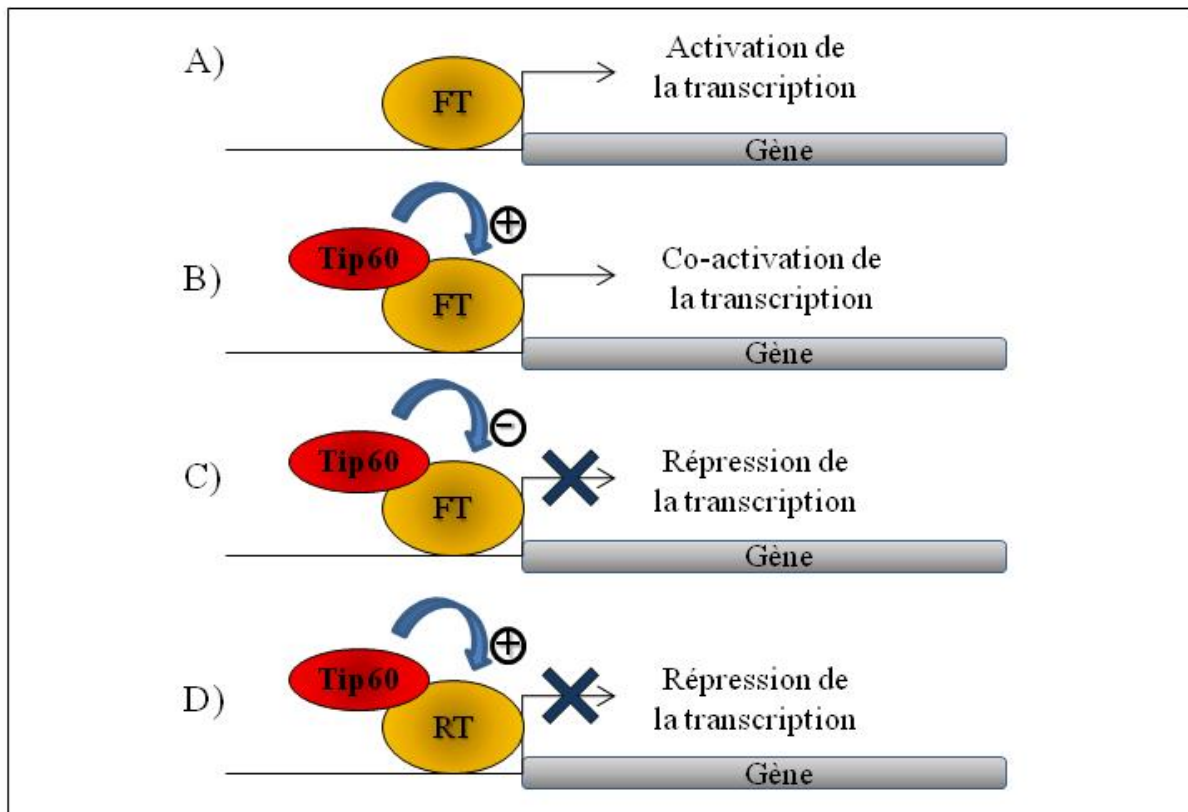
### 5.1.1.3 Autres facteurs de transcription

Tip60 est aussi impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs nucléaires où il intervient en co-régulant l'activité de ces récepteurs. Ainsi, Tip60 interagit avec le récepteur aux androgènes (AR) et co-régule l'expression des gènes sous son contrôle (Brady, M.E. et al, 1999 ; Gaughan, L. et al, 2001).

Tip60 est aussi un co-activateur de l'activité de NFκB (Nuclear Factor kappa light chain gene enhancer in B cells), un facteur de transcription homo- ou hétérodimérique qui contrôle des processus cellulaires tels que l'immunité, l'inflammation, la prolifération et l'apoptose.

### 5.1.2 Co-répresseur

Dans la grande majorité des cas Tip60 est un co-activateur de la transcription des gènes. Cependant, la présence de Tip60 ne corrèle pas obligatoirement avec une activation transcriptionnelle. A ce titre, Tip60 peut induire la répression des gènes via le recrutement d'autres complexes, notamment des histones déacétylases. CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) et STAT3 sont deux exemples de facteurs de transcription co-réprimés par Tip60 (Gavaravarapu, S. & Kamine, J., 2000 ; Xiao, H. et al, 2003). L'activation de CREB implique sa phosphorylation par la PKA (Protein Kinase A) en réponse aux hormones et aux facteurs de croissance. En interagissant avec CREB, Tip60 prévient sa phosphorylation par la PKA (Gavaravarapu, S. & Kamine, J., 2000). Quant à STAT3, son activité est réprimée par un complexe Tip60-HDAC7 (Xiao, H. et al, 2003). De façon intéressante, Tip60 a également la capacité de stimuler l'activité de répresseurs transcriptionnels tel que ZEB (zinc finger E box binding protein) (Hlubek, F. et al, 2001) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Modèle simplifié de l'implication de Tip60 dans la transcription des gènes.** Dans la plupart des cas, les facteurs de transcription (FT) possèdent une activité transcriptionnelle basale (A), qui est stimulée par Tip60 (B) qui joue un rôle de co-activateur. Cependant, Tip60 peut également réprimer l'activité de certains facteurs de transcription (C) ou encore assister des répresseurs de la transcription (D). Ainsi, en régulant un unique co-régulateur, la cellule peut affecter de différentes manières l'activation de gènes spécifiques.

*Adapté d'après Sapountzi et al (2006)*

## 5.2 Tip60 : protéine clé de la réponse aux cassures double-brins de l'ADN

Les génomes eucaryotes sont intriqués dans la chromatine ; de ce fait, une réponse aux dommages de l'ADN efficace nécessite des changements structuraux de la chromatine au site de dommage. Une accumulation de données indiquent que les acétyltransférases jouent un rôle important dans la réponse aux dommages de l'ADN.

La première indication suggérant un rôle potentiel de Tip60 dans la réponse aux dommages de l'ADN et/ou dans la réparation provient d'expériences de transfection sur des

cellules HeLa, dans lesquelles la surexpression d'un mutant dominant négatif de Tip60 réduit l'efficacité de la réparation des cassures double-brins de l'ADN (Ikura, T. et al, 2000). Cependant, ces expérimentations n'ont pas déterminé si Tip60 était nécessaire à la détection des dommages, leur signalisation ou leur réparation. Des travaux récents effectués dans différents systèmes expérimentaux ont mis en évidence que Tip60 pourrait jouer un rôle à chacun de ces niveaux et ce via différents mécanismes. De manière surprenante, ils ont en commun l'implication des différents membres de la famille des kinases PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase), qui inclue trois protéines impliquées dans la détection et la réparation des lésions de l'ADN : ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) et la DNAPKcs (DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit). Le complexe Tip60 lui-même contient un autre membre de la famille PIKK, TRRAP (TRansformation/tRansactivation domain Associated Protein), qui possède un domaine kinase catalytiquement inactif, caractéristique conservée au cours de l'évolution.

De nombreuses données de la littérature indiquent que Tip60 est impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN via au moins quatre mécanismes.

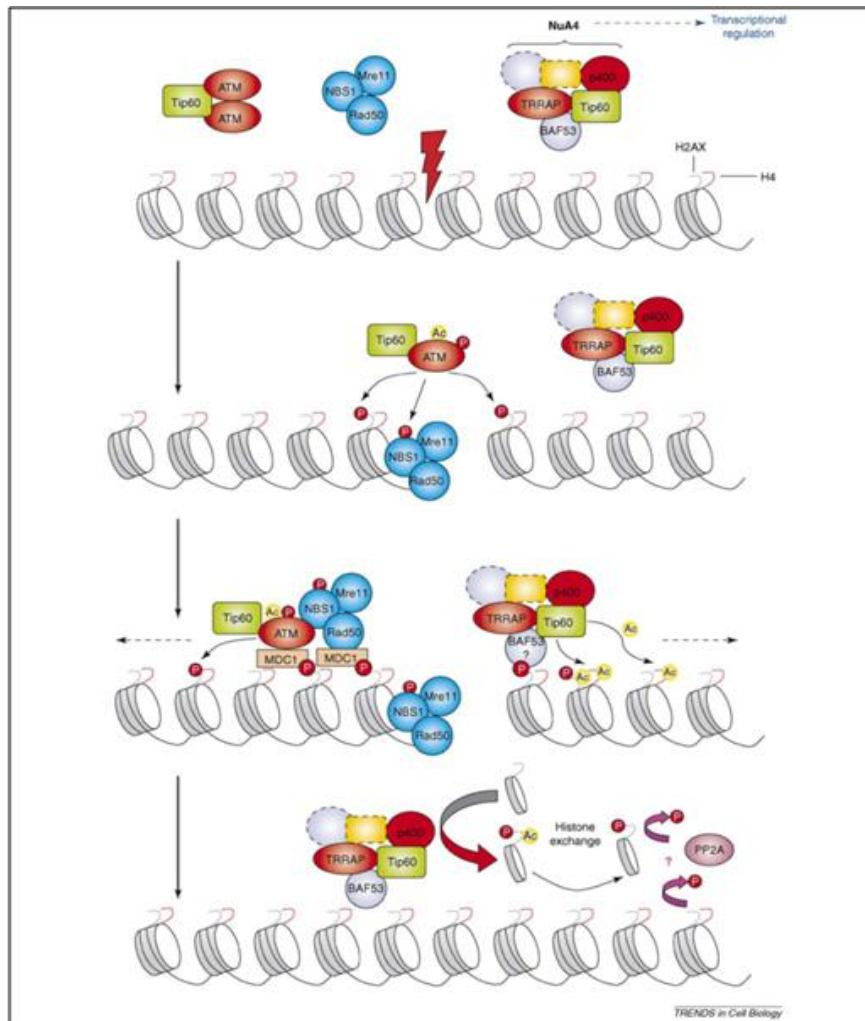
### **5.2.1 Mise en place de la réponse aux dommages de l'ADN**

Suite à l'apparition d'une cassure double-brins de l'ADN, ATM est rapidement activée et induit toute une cascade de phosphorylations nécessaires à la réparation (Sancar, A. et al, 2004). Les mécanismes responsables de la détection des lésions et de l'activation d'ATM sont seulement partiellement connus et impliquent plusieurs étapes distinctes (Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2004 ; Lee, J.H. & Paull, T.T., 2005 ; Stucki, M. & Jackson, S.P., 2006). Les cassures double-brins sont tout d'abord reconnues par des protéines nucléaires qui leurs sont dédiées tel que le complexe MRE11/RAD50/NBS1 (MRN). La sous-unité NBS1 semble recruter la kinase ATM. Sous sa forme inactive, ATM se présente sous la forme d'un dimère. Lors de son activation, ATM s'autophosphoryle sur sa sérine 1981, provoquant la dissociation du dimère et l'activation de molécules ATM supplémentaires indépendamment d'une liaison aux sites de cassure. Un substrat majeur d'ATM est le variant d'histone H2AX, qui se trouve phosphorylé au niveau des nucléosomes bordant la cassure. Chez les mammifères, cette empreinte de la chromatine laissée par ces foyers de H2AX phosphorylés, plus communément appelé  $\gamma$ -H2AX, s'étend sur plusieurs mégabases autour de

la zone de cassure (Rogakou, E.P. et al, 1999). Des travaux récents suggèrent un rôle direct de Tip60 dans l'activation d'ATM (Sun, Y. et al, 2005). En effet, ATM est rapidement acétylée suite à l'apparition de dommages à l'ADN, acétylation qui est largement dépendante de l'activité de Tip60. De façon remarquable, la plupart des molécules ATM de la cellule semblent associées à Tip60 (alors que l'opposé n'est pas vrai) et ce indépendamment de la présence de lésions. L'activité HAT du complexe Tip60/ATM est spécifiquement induite en réponse à un dommage. Ni l'activation de Tip60, ni l'acétylation d'ATM, ne dépend de l'activité kinase d'ATM, indiquant que Tip60 fonctionne en amont d'ATM. Ces résultats suggèrent ainsi que Tip60 est un partenaire obligatoire d'ATM, nécessaire pour achever la pleine activation de la kinase ATM (Sun, Y. et al, 2005). En accord avec ces données, notre groupe a récemment montré qu'en réponse à un stress génotoxique, p14<sup>ARF</sup> stabilise la protéine Tip60 pour conduire à l'activation des kinases ATM/CHK2 et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Eymin, B. et al, 2006). Dans cette étude, l'expression de Tip60 est cruciale pour l'activation de cette voie.

### 5.2.2 Relaxation de la chromatine

Chez la levure, Tip60 participe à la réponse aux dommages de l'ADN via l'acétylation de l'histone H4 (**Figure 9**). Cette acétylation induit une relaxation de la structure de la chromatine afin de faciliter l'accès à la machinerie de réparation (Tamburini, B.A. & Tyler, J.K., 2005). L'implication de Tip60 dans l'hyperacétylation de l'histone H4 et dans le processus de recombinaison homologue a été récemment confirmée dans les cellules de mammifères (Murr, R. et al, 2006). A ce titre, différentes sous-unités du complexe NuA4, l'homologue du complexe Tip60 chez la levure, sont recrutées au site de cassure *in vivo*, incluant Arp4p, Epl1p, Eaf1p et Esa1p (Downs, J.A. et al, 2004 ; Bird, A.W. et al, 2002) et TRRAP et Tip60 dans les cellules humaines (Murr, R. et al, 2006). Downs et coll. ont montré que la sous-unité Arp4 a la capacité de reconnaître la phospho-sérine 129 de l'histone H2A chez la levure (l'équivalent de la sérine 139 du variant H2AX humain) *in vitro*, et est nécessaire au recrutement de NuA4 aux cassures double-brins de l'ADN *in vivo*.



**Figure 9: Modèle de l'implication du complexe Tip60 dans la réponse aux dommages de l'ADN et leur réparation chez les mammifères.** Après l'apparition d'une cassure double-brins de l'ADN, le complexe MRN est rapidement recruté au site endommagé et recrute ATM. Tip60 semble acétyle ATM qui en conséquence s'autophosphoryle, bien que la relation entre MRN et Tip60 dans l'activation d'ATM reste à clarifier. Ensuite, ATM phosphoryle plusieurs de ses substrats (des molécules ATM additionnelles, NBS1, H2AX, p53 et d'autres). H2AX phosphorylé (ou  $\gamma$ -H2AX) fonctionne en tant que plate-forme de recrutement pour MDC1 et d'autres protéines de la réponse aux dommages de l'ADN. Le complexe Tip60 pourrait également reconnaître  $\gamma$ -H2AX, probablement via sa sous-unité BAF53, facilitant ainsi l'acétylation de l'histone H4 médiée par Tip60 aussi bien que  $\gamma$ -H2AX lui-même. Par analogie avec les résultats obtenus chez la drosophile, p400 aurait la capacité de catalyser une réaction d'échange d'histone, substituant  $\gamma$ -H2AX acétylé par un variant H2AZ non modifié. Il reste à déterminer si  $\gamma$ -H2AX est ensuite déphosphorylé par PP2A, comme il est indiqué ici, ou si cela se produit au niveau de la chromatine indépendamment de Tip60 et p400.

Les points d'interrogation indiquent les points du modèle qui restent à être confirmés.

*Adapté d'après Squatrito et al (2006)*

### 5.2.3 Echange d'histones

Des études réalisées chez *D. melanogaster* suggèrent que dTip60 est responsable de l'échange sélectif d'un variant d'histone aux sites de dommages de l'ADN (Kusch, T. et al, 2004). En effet, la récente purification biochimique du complexe Tip60 chez la drosophile (dTip60) a révélé non seulement sa conservation au cours de l'évolution, mais également son association stable avec les histones H2Av et H2AB. H2Av est l'orthologue de H2AX. Le complexe dTip60 acétyle la lysine 5 de H2Av de façon dépendante de sa phosphorylation dans une matrice nucléosomale (Kusch, T. et al, 2004). Ce résultat est en accord avec la notion que le complexe puisse reconnaître spécifiquement la forme phosphorylée de H2Av (Downs, J.A. et al, 2004). De plus, dTip60 catalyse son remplacement par une histone H2Av non modifiée, probablement via un échange de dimère H2Av-H2B, réaction catalysée par sa sous-unité ATPase p400. De ce fait, le complexe dTip60-p400 est impliqué dans une réaction d'acétylation/remodelage, réaction qui est nécessaire à la réversion de la marque phospho-H2Av (Kusch, T. et al, 2004).

Dans les étapes finales de la réparation de ces lésions,  $\gamma$ -H2AX est déphosphorylée par les phosphatases Pph3 et PP2A, chez la levure ou dans les cellules mammifères, respectivement (Keogh, M.C. et al, 2006 ; Chowdhury, D. et al, 2005). Tous ces résultats et ces observations suggèrent que la cascade d'acétylation, d'échange et de déphosphorylation de  $\gamma$ -H2AX est nécessaire pour l'éradication des marques  $\gamma$ -H2AX et leur recyclage après achèvement de la réparation de l'ADN et suggèrent un rôle critique du complexe Tip60 dans toutes les étapes de la réponse aux dommages de l'ADN.

### 5.2.4 Co-activation de p53

L'implication de Tip60 dans la voie de signalisation de p53 est supportée par le fait que Tip60 et p53 partagent quelques similarités fonctionnelles : **(i)** ces deux protéines sont régulées par HDM2 qui catalyse leur ubiquitinylation et leur dégradation protéasomale, **(ii)** les niveaux d'expression de ces deux protéines augmentent suite à un dommage de l'ADN, **(iii)** toutes les deux partagent des partenaires d'interaction tel que PIRH2 (Logan, I.R. et al, 2004). De plus, l'activité acétyltransférase de Tip60 est nécessaire à l'apoptose induite par

p53 en réponse aux dommages de l'ADN (Doyon, Y. et al, 2004 ; Tang, Y. et al, 2006) ; ce dernier point sera discuté dans le paragraphe suivant.

### 5.3 L'apoptose selon Tip60

L'activité acétyltransférase de Tip60 est nécessaire pour la détection des dommages de l'ADN et le déclenchement de l'apoptose. En effet, les cellules exprimant un mutant catalytique de Tip60 exhibent un défaut sévère de la réponse apoptotique suite à des radiations gamma (Ikura, T. et al, 2000). De plus, des sous-unités du complexe Tip60, telle que la protéine pro-apoptotique ING3, sont considérées comme impliquées dans la signalisation apoptotique de Tip60 (Cai, Y. et al, 2003 ; Doyon, Y. et al, 2004). Par ailleurs, il a été montré que Tip60 $\beta$  potentialise l'apoptose dépendante de cPLA<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>) en interagissant avec les protéines cPLA<sub>2</sub> nucléaires en réponse à la privation de sérum (Sheridan, A.M. et al, 2001).

En réponse à certains types de stress, notamment les dommages de l'ADN, la protéine suppressive de tumeur p53 induit un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose. Dans une étude récente, Tang et coll. ont mis en évidence que la protéine Tip60 est nécessaire à l'apoptose induite par p53, et que Tip60 acétyle spécifiquement p53 sur sa lysine 120, lysine située au sein de son domaine de liaison à l'ADN. Cette modification est critique pour l'activité apoptotique de p53 mais n'est pas nécessaire à son activité d'arrêt du cycle. Par conséquent, cette étude appuie non seulement l'implication critique de Tip60 dans la voie suppressive de tumeur p53, mais aussi le fait que Tip60 module le choix de la cellule en faveur d'une apoptose. De manière remarquable, cette acétylation pourrait être stimulée suite à la méthylation préalable de p53, méthylation qui serait spécifiquement reconnue par le chromodomaine de Tip60 (Kurash, J.K. et al, 2008). Il est intéressant de souligner que la lysine 120 de p53 est un site récurrent de mutation de p53 dans les cancers humains (Tang, Y. et al, 2006).

L'implication de Tip60 dans la réponse apoptotique est aussi ciblée par les protéines virales. Ainsi, en réponse à un stress génotoxique, le transactivateur viral HIV-1 Tat interfère avec la signalisation cellulaire apoptotique médiée par Tip60 en diminuant sa stabilité et en inhibant son activité catalytique. Par conséquent, la protéine Tat altère la réponse cellulaire

apoptotique dépendante de Tip60, optimisant ainsi ses fonctions (Col, E. et al, 2005 ; Creaven, M. et al, 1999).

## 6. Tip60, un nouveau paradoxe dans le cancer

Dans une étude basée sur un criblage à grande échelle chez *C. elegans*, Lehner et coll. ont identifiés 6 gènes codant pour des protéines plateformes qui modulent de nombreuses voies de signalisation, incluant les voies de l'EGF, Wnt et Notch (Lehner, B. et al, 2006). De façon remarquable, les protéines Tip60 et TRRAP sont deux de ces plateformes protéique. Ces données ainsi que l'implication des histones acétyltransférases de la famille MYST dans nombre de processus nucléaires clés suggèrent qu'une activité anormale de ces protéines et/ou de leurs complexes associés peut contribuer à la tumorigénèse.

### 6.1 Tip60, oncogène

La protéine Tip60 est un co-activateur des récepteurs aux androgènes, un facteur de transcription dont la dérégulation est fortement impliquée dans le cancer de la prostate (Brady, M.E. et al, 1999 ; Gaughan, L. et al, 2001, 2002). L'hyperexpression de Tip60 active le récepteur aux androgènes en l'absence de son ligand (Halkidou, K. et al, 2003).

Le proto-oncogène c-Myc est un puissant stimulateur de la croissance et de la prolifération cellulaire et son expression est souvent dérégulée dans les cancers humains (Nesbit, C.E. et al, 1999). L'interaction de Tip60 avec c-Myc contribue à la stimulation de son potentiel transformant (Awasthi, S. et al, 2005). Tip60 pourrait ainsi jouer un rôle dans la formation de certains lymphomes ou leucémies impliquant l'oncogène c-Myc.

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est actuellement considéré comme un oncogène de part sa capacité à activer des gènes de la prolifération cellulaire ainsi que des gènes anti-apoptotiques, et peut contribuer à la mise en place de métastases (Radhakrishnan, S.K. & Kamalakaran, S., 2006). L'implication de Tip60 dans l'expression de gènes régulés par NF- $\kappa$ B, incluant le gène suppresseur de métastase KAI1 (Baek, S.H. et al, 2002 ; Kim, J.H. et al, 2005), suggère que Tip60 pourrait jouer un rôle général dans les fonctions de NF- $\kappa$ B.

Tip60 interagit avec le récepteur de l'interleukine 9 (IL-9) (Sliva, D. et al, 1999). Bien que les conséquences fonctionnelles de cette association sont inconnues, cela pourrait



suggérer un rôle oncogénique puisque la signalisation de l'IL-9 est liée au lymphome de Hodgkin's (Renauld, J.C., 2001).

L'implication de Tip60 dans la tumorigénèse pourrait également provenir de son rôle dans le programme transcriptionnel de E2F1. En effet, le complexe Tip60 est recruté sur des promoteurs des gènes cibles de E2F1, incluant les gènes codant pour p107, PCNA, MCM3 et MCM4 (Taubert, S. et al, 2004) (pour revue Avvakumov, N. & Côté, J., 2007).

## 6.2 Tip60, suppresseur de tumeur

Dans une étude récente, Gorrini et coll. ont mis en évidence que les souris KO pour Tip60 ne sont pas viables. Ces souris KO sont caractérisées par une mort embryonnaire très précoce (avant l'étape d'implantation), alors que les souris hétérozygotes sont viables sans aucun phénotype particulier. De façon intéressante, ce groupe montre également, en utilisant des souris transgéniques *Eμ-myc* hétérozygotes pour le gène Tip60 (HTATIP), que Tip60 a la capacité de prévenir la lymphomagénèse induite par Myc de façon haplo-insuffisante et ce dans une fenêtre de temps qui est restreinte aux stades pré-tumoraux et tumoraux précoces (Gorrini, C. et al, 2007). Dans cette étude, l'hétérozygotie de Tip60 altère sévèrement la réponse aux dommages de l'ADN induite par Myc. Ce groupe a de plus observé que le gène Tip60 chez l'Homme est fréquemment affecté d'une perte mono-allélique dans les lymphomes, les carcinomes de la tête et du cou et les carcinomes mammaires, avec une réduction concomitante du niveau d'expression des messagers de Tip60. Une analyse immunohistochimique a de surcroît démontré la perte du marquage nucléaire de Tip60 dans les carcinomes du sein. Ces événements sont corrélés avec le grade de la pathologie et en parallèle souvent corrélés avec la mutation de p53.

Dans une autre étude récente, Mattera et coll. ont mis en évidence que dans les cellules normales les fonctions de Tip60 autorisent la prolifération cellulaire et une réponse normale au stress (Mattera, L. et al, 2009). Cependant, suite à une diminution de l'activité de Tip60, causée par un déséquilibre du ratio p400/Tip60, les fonctions de Tip60 qui sont toujours suffisantes pour permettre la prolifération cellulaire ne le sont plus pour la réalisation d'une réponse aux dommages de l'ADN intègre, notamment en réponse à une activation oncogénique. De manière intéressante, le ratio entre l'expression des ARN messagers de p400 et de Tip60 est altéré dans la plupart des carcinomes colorectaux. En accord avec cela, un

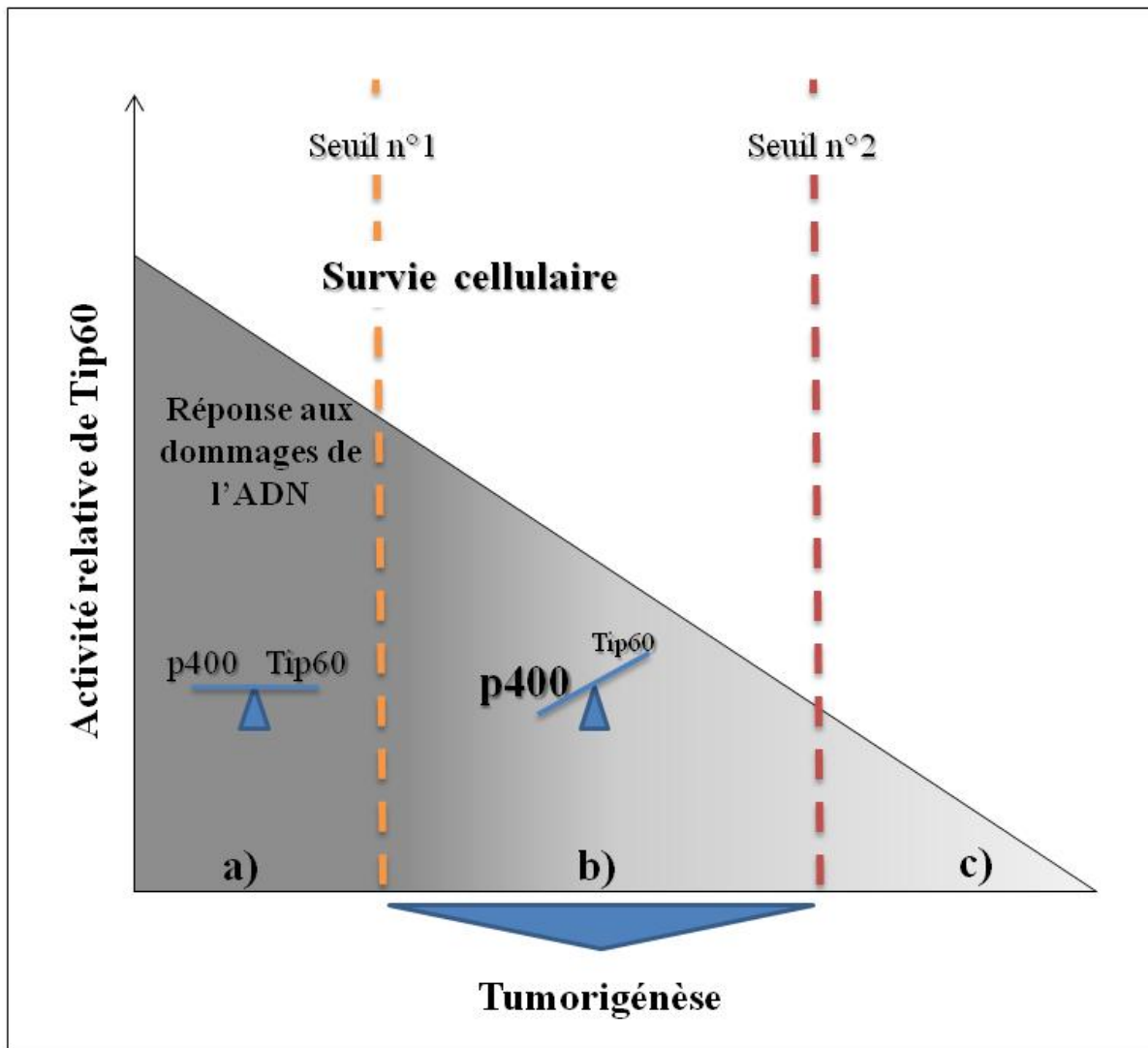
---

criblage à grande échelle a révélé une diminution significative de l'expression des ARN messagers de Tip60 dans les carcinomes coliques et pulmonaires en comparaison avec leur tissu normal (L.Leonart, M.E. et al, 2006).

Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère un modèle dans lequel Tip60 se comporterait comme un suppresseur de tumeur haplo-insuffisant. Il semble qu'un niveau critique de Tip60 soit nécessaire pour activer une réponse aux dommages de l'ADN induite par les oncogènes dans des cellules tumorales émergentes (Bartkova, J. et al, 2005 ; Gorgoulis, V.G. et al, 2005). L'altération de ce niveau seuil pourrait agir en synergie avec les mutations de p53 pour permettre la progression tumorale. Dans ce modèle, les fonctions de Tip60 ne pourraient pas décroître au dessous d'un second seuil car cette situation ne serait pas compatible avec la prolifération cellulaire (**Figure 10**) (Mattera et al, 2009).

### **6.3 Qu'en est-il des sous-unités de son complexe ?**

La HAT Tip60 fait partie intégrante d'un complexe multi-protéique, et en tant que telle, il semble important de s'intéresser également aux autres composants de ce complexe. A ce titre, une de ces sous-unités est la protéine ING3 qui est un membre de la famille ING des gènes suppresseurs de tumeur. ING3 est un co-activateur transcriptionnel de p53 et est impliqué dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et l'apoptose (Nagashima, M. et al, 2003). Un autre exemple est celui du gène codant pour la sous-unité GAS41 qui est amplifié dans les glioblastomes multiformes et les astrocytomes (Fischer, U. et al, 1997) et qui est impliqué dans la suppression de la voie p53 durant la croissance cellulaire normale (Park, J.H. & Roeder, R.G., 2006). Il existe encore d'autres sous-unités, non mentionnées ici, liées à la tumorigénèse (pour revue, Avvakumov, N. & Côté, J., 2007).



**Figure 10 : Modèle décrivant le rôle critique du niveau de l'activité de Tip60. a)** Dans les cellules normales, les fonctions de Tip60 autorisent la prolifération cellulaire et une réponse normale au stress. **b)** Cependant, suite à une diminution de l'activité de Tip60, causée par un déséquilibre du ratio p400/Tip60, les fonctions de Tip60 sont toujours suffisantes pour permettre la prolifération cellulaire mais pas pour la réalisation d'une réponse aux dommages de l'ADN intègre. Cette situation favorise l'émergence de cellules cancéreuses par l'inactivation des barrières anticancéreuses qui dépendent de la voie de réponse aux dommages de l'ADN. **c)** Dans ce modèle, les fonctions de Tip60 ne pourraient pas décroître au dessous d'un second seuil car cette situation ne serait pas être compatible avec la prolifération cellulaire.

*Adapté d'après Mattera et al. (2009)*

# IV. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1, UNE PROTEINE MULTI-FACETTES

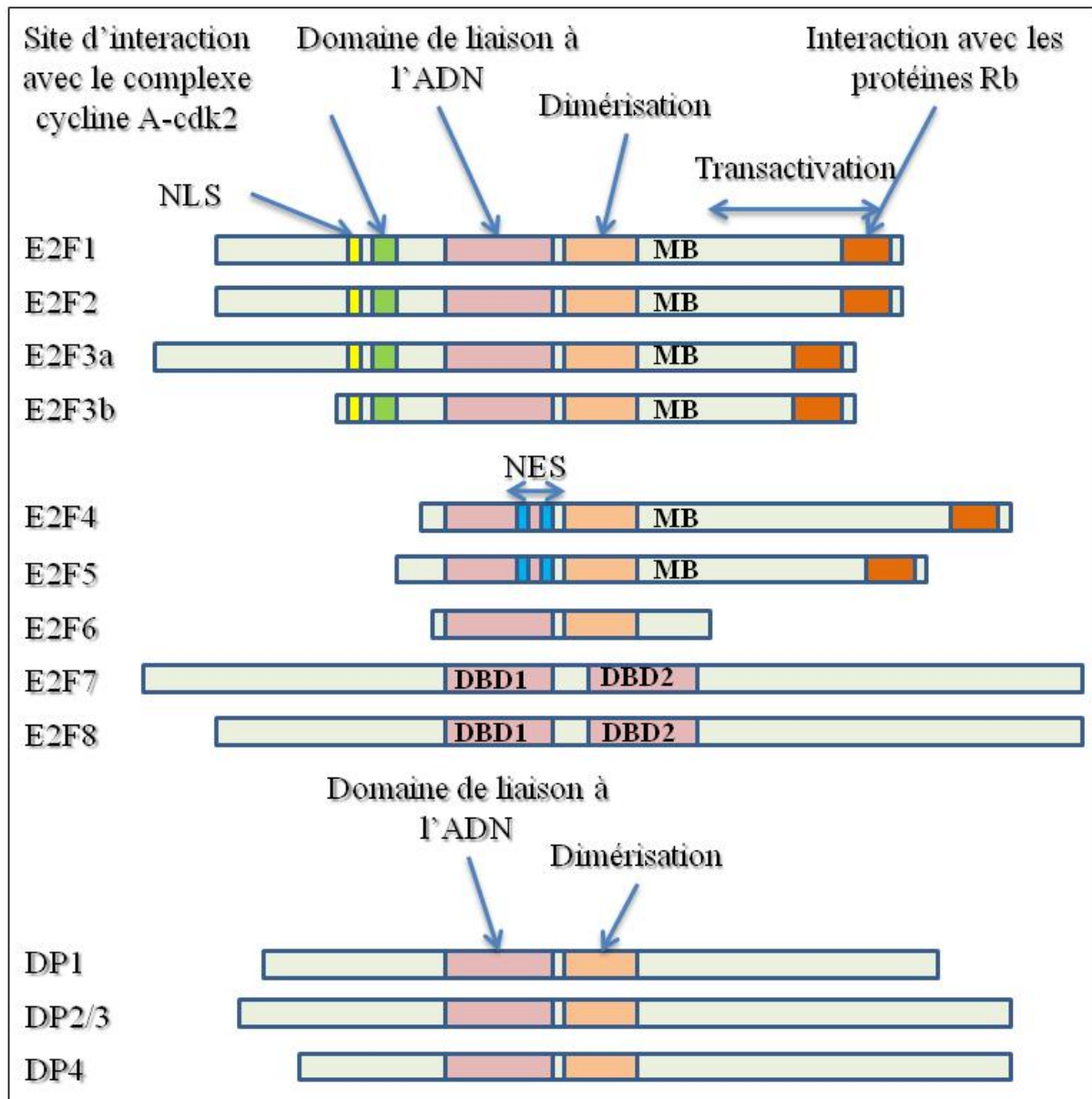
Depuis la découverte, il y a une vingtaine d'années, que les facteurs de transcription E2Fs sont étroitement régulés par les membres de la famille Rb, les recherches à leur sujet ont suscité un grand intérêt et sont passées à l'avant de la scène scientifique internationale. De ce fait, un grand nombre d'études ont été menées et ont dévoilé le rôle critique des facteurs E2Fs dans le contrôle de la transcription, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la réponse aux dommages de l'ADN, de la différenciation, de la sénescence ou encore du développement.

## 1. Organisation de la famille E2F

Les facteurs de transcription E2Fs ont originellement été identifiés comme des facteurs cellulaires interagissant avec le promoteur du gène adénoviral E2 (Kovesdi, I. et al, 1986 ; La Thangue, N.B. & Rigby, P.W., 1987). E2F1 est le premier membre de la famille à avoir été cloné et son gène a été localisé en 20q11.2. D'autres membres de la famille ont par la suite été clonés par homologie de séquence ou par leur capacité à lier les membres de la famille Rb.

### 1.1 Structure

A ce jour, huit membres de la famille E2F ont été identifiés, E2F1-8 (**Figure 11**). De plus, deux protéines E2F3 (E2F3a et E2F3b) sont produites via des promoteurs alternes (Leone, G. et al, 2000 ; He, Y. et al, 2000). Le plus haut degré d'homologie parmi les membres de cette famille se situe au niveau du domaine de liaison à l'ADN. E2F1-6 nécessitent une dimérisation avec l'une des trois protéines DP (DP1, DP2/3 ou DP4) pour former un complexe transcriptionnellement actif et lier l'ADN avec une grande affinité (DeGregori, J. & Johnson, D.G., 2006). D'un point de vue structural, E2F1-5 sont très semblables puisqu'ils partagent un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, un domaine de dimérisation avec l'une des protéines DP, un domaine conservé « marked box » impliqué



**Figure 11 : Portraits des familles E2F et DP.** Le domaine de liaison à l'ADN hautement conservé (DBD) est indiqué en violet et le domaine hydrophobe nécessaire à la dimérisation en rose. Le DBD apparaît aussi être impliqué dans la dimérisation. Les domaines nécessaires pour les interactions avec le complexe cycline A-cdk2 et les membres de la famille Rb sont également indiqués. Les E2F1-6 lient tous l'ADN sous forme d'un hétérodimère avec un membre de la famille DP, alors que E2F7 et E2F8 apparaissent interagir avec l'ADN indépendamment des protéines DP. Il existe aussi différents isoformes de splicing de DP2/3 et deux isoformes connus de E2F7 qui ne sont pas mentionnés ici. E2F1-3 possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) alors que E2F4/5 possèdent des signaux d'export nucléaire (NES).

*Adapté d'après ADeGregori & Johnson (2008)*

dans la dimérisation et la liaison à l'ADN, et en C-terminal un domaine de transactivation ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine Rb. E2F1, E2F2 et E2F3 abritent, en N-terminal, un site d'interaction avec le complexe cycline A-cdk2 (Krek, W. et al, 1994) et un signal de localisation nucléaire (NLS) (Muller, H. et al, 1997). E2F4 et E2F5 comportent quant à eux un signal d'export nucléaire (NES) (Verona, R. et al, 1997), leur permettant d'assurer des fonctions nucléaires lorsqu'ils sont complexés aux membres de la famille Rb et d'être exclus du compartiment nucléaire lorsqu'ils sont sous forme libre. Les trois derniers membres à avoir été clonés, E2F6, E2F7 et E2F8, sont très atypiques en comparaison avec les autres membres, à savoir qu'ils ne possèdent pas de site d'interaction avec la « protéine pocket » Rb, fonctionnant ainsi indépendamment du contrôle de Rb. A noter, E2F7 et E2F8 se différencient de E2F6 puisqu'ils sont caractérisés par la présence de deux domaines de liaison à l'ADN en position centrale et par l'absence de domaine de liaison avec les co-facteurs DP.

## 1.2 Les différents sous-groupes de la famille E2F

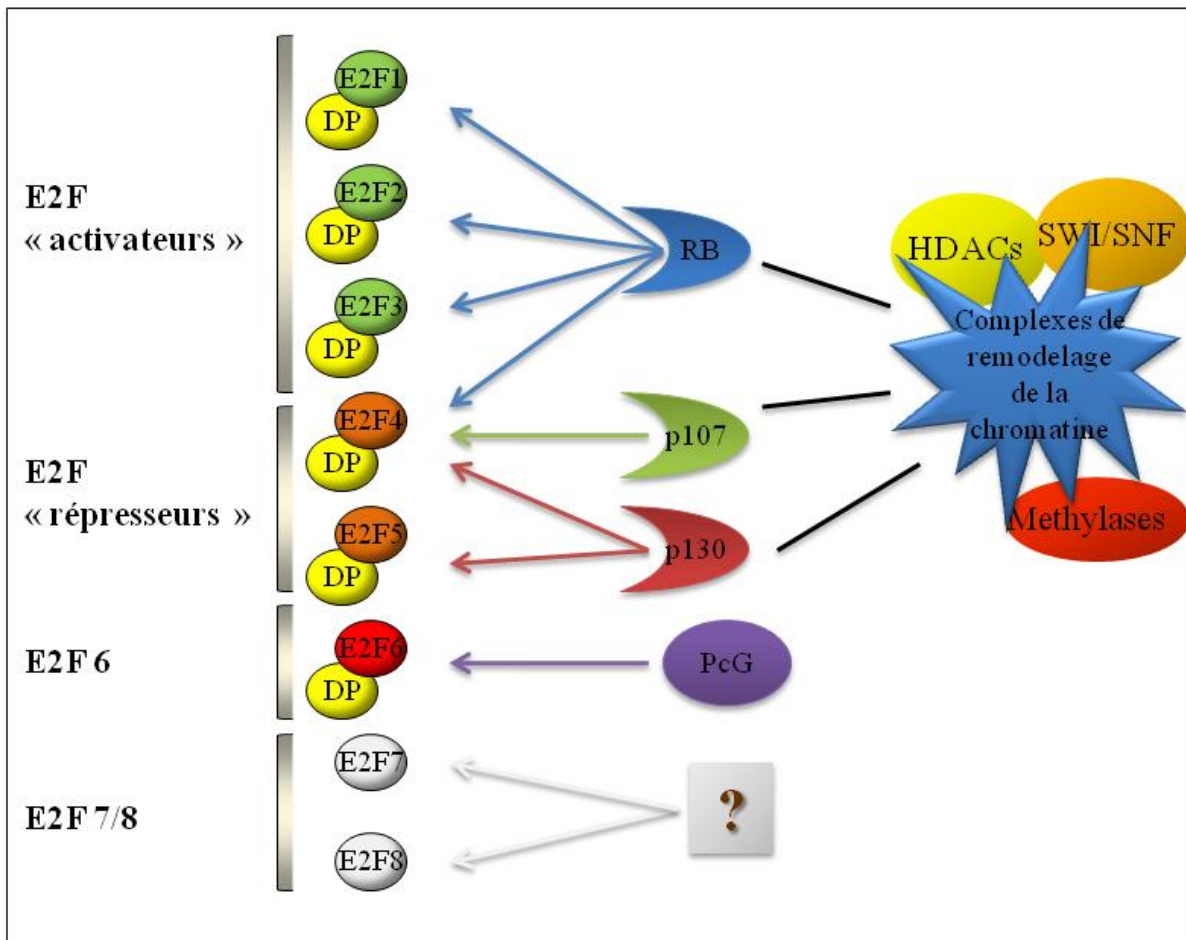
Les facteurs de transcription de la famille E2F peuvent être classifiés d'activateurs et de répresseurs transcriptionnels.

### 1.2.1 Les facteurs activateurs

Les facteurs activateurs regroupent E2F1, E2F2 et E2F3a. Ils se complexent exclusivement avec la protéine Rb (**Figure 12**) et voient leur niveau d'expression varier en fonction du cycle cellulaire avec un pic à la transition G1/S.

### 1.2.2 Les facteurs répresseurs

Les facteurs répresseurs de la transcription, quant à eux, sont représentés par E2F3b, E2F4 et E2F5. A la différence des facteurs activateurs, les niveaux d'expression de E2F3b, E2F4 et E2F5 restent constants au cours du cycle cellulaire. E2F4 peut lier tous les membres de la famille Rb, alors que E2F5 interagit seulement avec p130 et E2F3b avec Rb (**Figure 12**). Les facteurs E2F6, E2F7 et E2F8 sont aussi des facteurs répresseurs de la transcription.



**Figure 12 : Organisation du réseau E2F/Rb chez les mammifères.** Le réseau E2F/Rb chez les mammifères est constitué de plusieurs complexes E2F/protéine « pocket ». Les E2Fs activateurs (E2F1-3) interagissent uniquement avec Rb. Il existe plusieurs E2F répresseurs : E2F4 peut interagir avec les trois protéines « pocket », E2F5 lie p130, E2F6 lie des protéines polycomb (PcG). E2F6 et E2F7 ne s'associent pas avec les protéines de la famille Rb.

*Adapté d'après Dimova & Dyson (2005)*

E2F6 réaliserait cette répression via les protéines du groupe Polycomb (PcG) (Ogawa, H. et al, 2002 ; Trimarchi, J.M. et al, 2001) et réprime l'expression de gènes cibles des E2Fs dans les cellules quiescentes (Ogawa, H. et al, 2002), jouant ainsi un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Il serait également impliqué dans la régulation négative de la transcription du gène suppresseur de tumeur BRCA1 (Oberley, M.J. et al, 2003). Quant aux protéines E2F7 et E2F8, elles sont encore mal connues, cependant elles sembleraient limiter la transcription de certains gènes et de ce fait freiner la progression du cycle cellulaire (Christensen, J. et al, 2005 ; Logan, N. et al, 2005). Cette hypothèse est également soutenue par le fait que Zalmas

et coll. ont observé que E2F7 et E2F8 réprimaient les gènes cibles de E2F1 (Zalmas, L.P. et al, 2008).

Des homologues des protéines E2F et Rb ont été décrits des plantes (Ramirez-Parra, E. et al, 1999 ; Sekine, M. et al, 1999 ; Albani, D. et al, 2000 ; Magyar, Z. et al, 2000 ; Rossignol, P. et al, 2002) jusqu'à l'Homme en passant par le xénope (Suzuki, A. & Hemmati-Brivanlou, A., 2000), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ceol, C.J. & Horvitz, H.R., 2001) et la drosophile (Dynlacht, B.D. et al, 1994 ; Ohtani, K. & Nevins, J.R., 1994 ; Hao, X.F. et al, 1995 ; Du, W. et al, 1996 ; Sawado, T. et al, 1998 ; Stevaux, O. et al, 2002). Cette conservation au cours de l'évolution souligne le rôle critique de la voie E2F/Rb.

## 2. E2F1, un facteur de transcription étroitement régulé

### 2.1 Expression

L'expression du facteur E2F1 est étroitement régulée par un réseau complexe de modifications post-traductionnelles, incluant l'ubiquitinylation, la phosphorylation, et l'acétylation.

#### 2.1.1 L'ubiquitinylation

Le turn-over de E2F1 est contrôlé par la voie protéasomale de dégradation des protéines (Campanero, M.R. & Flemington, E.K., 1997 ; Hateboer, G. et al, 1996, Hofmann, F. et al, 1996), notamment en fin de S et en G2. Cet événement est lié à l'interaction spécifique de E2F1 avec la protéine F-box p45<sup>SKP2</sup>, le composant de la ligase SCF<sup>SKP2</sup> qui donne la spécificité de substrat. Cela conduit à l'ubiquitinylation de E2F1 et à sa dégradation (Marti, A. et al, 1999). Toutefois, les liens entre E2F1 et SKP2 semblent ne pas se restreindre à un contrôle du turn-over de E2F1. En effet, une étude récente réalisée au sein de notre groupe a mis en évidence que p45<sup>SKP2</sup> est une cible transcriptionnelle de E2F1 et que l'interaction physique entre E2F1 et p45<sup>SKP2</sup> stimule la fonction transactivatrice de E2F1 sur le promoteur de la cycline E (Salon, C. et al, 2007). Ces deux notions qui semblent être contradictoires, pourraient ne pas être incompatibles et prendre effet selon le contexte cellulaire.

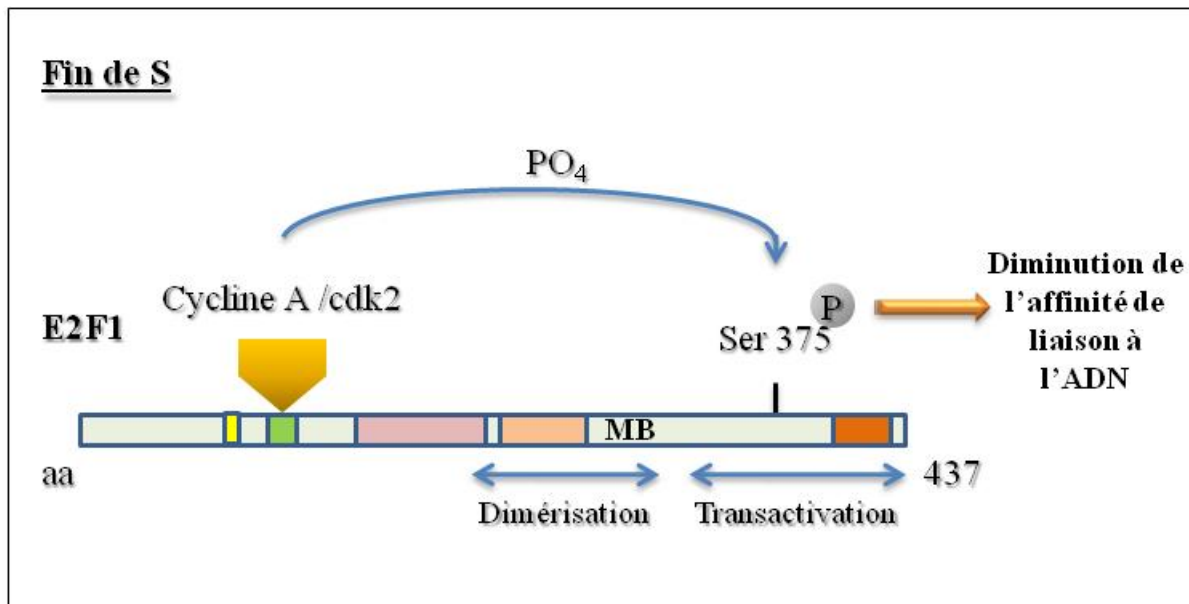


Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'ubiquitinylation et la dégradation de E2F1, catalysées par SCF<sup>SKP2</sup>, contribuerait à contrôler l'amplitude et la magnitude de la réponse E2F1, alors que l'inhibition de son affinité de liaison à l'ADN par le complexe cycline A-cdk2 (dont il sera discuté dans le chapitre suivant) serait importante pour le contrôle de la durée de la réponse E2F1 ; combinés, ces deux mécanismes pourraient donner fin à l'activité de E2F1 au niveau des phases S/G2 du cycle cellulaire.

### 2.1.2 La phosphorylation

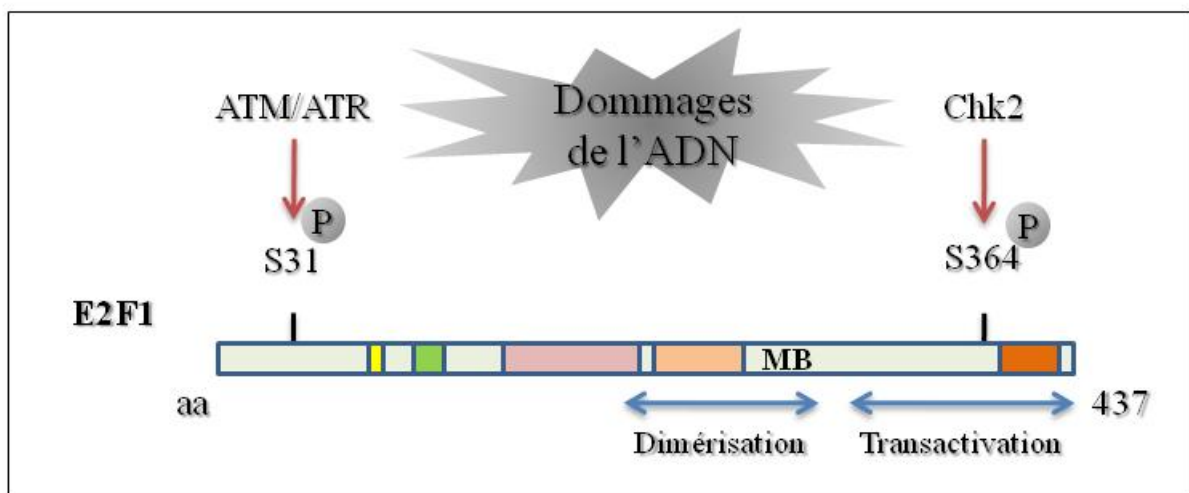
Un autre mode de régulation post-traductionnelle de l'activité de E2F1 est la phosphorylation, et notamment par le complexe cycline A-cdk2 qui interagit directement avec E2F1. Cette phosphorylation (sur son résidu sérine 375) a pour conséquence fonctionnelle de diminuer l'affinité de liaison à l'ADN de E2F1 et par conséquent d'inhiber son activité activatrice (Adams, P.D. et al, 1996 ; Dynlacht, B.D. et al, 1997 ; Peeper, D.S. et al, 1995 ; Xu, M. et al, 1994) (**Figure 13**). Cette phosphorylation a lieu en phase de la phase S du cycle cellulaire et conduit à l'accumulation de complexes E2F1/DP1 inactifs (Krek, W. et al, 1995), indiquant ainsi l'importance de l'inhibition de l'activité de E2F1 pour l'entrée en phase G2/M du cycle.

Par ailleurs, les protéines kinases ATM et ATR phosphorylent également E2F1 sur sa sérine 31, et il a été suggéré que cette phosphorylation préviendrait la dégradation de E2F1 en inhibant son interaction avec p45<sup>SKP2</sup> (Lin, W.C. et al, 2001) (**Figure 14**). De façon similaire, la protéine Chk2, autre protéine clé de la réponse aux dommages de l'ADN, phosphoryle la sérine 364 de E2F1 (Stevens, C. et al, 2003) qui est juxtaposée au site d'interaction de Mdm2 (Martin, K. et al, 1995). Ces deux modèles restent spéculatifs et attendent leur validation expérimentale, bien que p45<sup>SKP2</sup> et Mdm2 restent des candidats attractifs pour moduler l'activité de E2F1 durant la réponse aux dommages aux dommages de l'ADN.



**Figure 13 : La phosphorylation de E2F1 régule son activité transactivatrice en fin de phase S.** En fin de phase S, le complexe Cycline A-cdk2 s'associe avec E2F1 (domaine d'interaction représenté en vert) et catalyse sa phosphorylation sur sa sérine 375, induisant une diminution de son affinité de liaison à l'ADN.

*Adapté d'après Mundle & Saberwal (2003)*



**Figure 14 : E2F1 est phosphorylé par les kinases ATM/ATR et Chk2 en réponse aux dommages de l'ADN.** En réponse aux dommages de l'ADN, le résidu sérine 31 (S31) de E2F1 est phosphorylé par ATM/ATR et le résidu sérine 364 (S364) par Chk2. La double phosphorylation de E2F1 pourrait prévenir l'interaction des ubiquitines ligases p45<sup>SKP2</sup> et Mdm2 respectivement, protégeant ainsi E2F1 de la dégradation.

*Adapté d'après Stevens & LaThangue (2004) et Martin et al. (1995)*

### 2.1.3 L'acétylation

Le dernier mode de régulation post-traductionnelle de E2F1 dont nous discuterons ici est l'acétylation. En effet, il a été mis en évidence que les histones acétyltransférases P/CAF et p300/CBP ont la capacité d'acétyler E2F1 *in vitro* et que les molécules E2F1 intracellulaires sont acétylées (Martinez-Balbas, M.A. et al, 2000). Cette acétylation s'effectue spécifiquement au sein du groupe de lysines 117/120/125 (Marzio, G. et al, 2000), adjacent au domaine de liaison à l'ADN. Ceci conduit à une augmentation de la demi-vie de E2F1 et à la stimulation de son affinité de liaison à l'ADN. De façon intéressante, l'acétylation de E2F1 par P/CAF en réponse aux dommages de l'ADN privilégie ses fonctions pro-apoptotiques vis à vis de ses fonctions prolifératives (Ianari, A. et al, 2004).

## 2.2 Localisation

Le facteur de transcription E2F1 a toujours été considéré comme une protéine constitutivement nucléaire (Allen, K.E. et al, 1997 ; Verona, R. et al, 1997 ; Muller, H. et al, 1997). Cependant, une étude récente menée par Ivanova et coll. a démontré que E2F1 est sujette à un trafic nucléo-cytoplasmique continu. Dans cette étude, les auteurs ont identifié un signal d'export nucléaire (NES) dans sa séquence peptidique permettant son export vers le cytoplasme. Le processus mis en jeu est dépendant de CRM-1, une protéine hautement conservée impliquée dans l'export de protéine à NES. De façon intéressante, l'induction de la différenciation de kératinocytes en culture conduit à l'ubiquitinylation de E2F1, son export du noyau et sa dégradation. Ce mécanisme est actif dans plusieurs types cellulaires primaires et transformés, et l'un des facteurs déterminants qui établit la balance entre l'import et l'export nucléaire est l'activation de la différenciation des cellules épithéliales (Ivanova, I.A. et al, 2006, 2007, 2009).

Il a également été rapporté que la localisation subcellulaire de E2F1 est modulée en réponse aux dommages de l'ADN, avec une relocalisation au niveau de corps nucléaires distincts (Stevens, C. et al, 2003).

### **3. Les fonctions biologiques du facteur de transcription**

#### **E2F1**

Dans un premier temps, E2F1 a été considéré comme un régulateur positif de l'expression des gènes nécessaires à la synthèse de l'ADN. Les études qui ont suivies ont montré que cette façon de voir les choses était bien trop simpliste et ont permis d'étendre la diversité des activités attribuées à E2F1. L'apparition de nouvelles technologies, notamment les puces à ADN, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine et la bioinformatique, a nettement élargi le nombre et la nature des gènes potentiellement régulés par ce dernier. Cette diversité de fonctions va des gènes régulateurs traditionnels de la transition G1/S à des gènes impliqués dans la réparation aux dommages de l'ADN, l'apoptose, la différenciation et le développement, aussi bien que des gènes dont les fonctions sont encore inconnues à ce jour (DeGregori, J., 2002 ; Stevaux, O. & Dyson, N.J., 2002 ; Cam, H. & Dynlacht, B. D., 2003). Il existe d'excellentes revues dans le domaine des E2Fs (DeGregori, J., 2002 ; Trimarchi, J.M. & Lees, J.A., 2002 ; Dimova, D.K. & Dyson, N.J., 2005 ; DeGregori, J. & Johnson, D.G. 2006 ; Johnson, D.G. & DeGregori, J., 2006). Dans ce paragraphe, nous discuterons les découvertes récentes qui ont contribué à la complexité actuelle du réseau transcriptionnel de E2F1.

#### **3.1 Vue traditionnelle de E2F1 : contrôler l'entrée en phase S**

L'activité transcriptionnelle de E2F1 est régulée par son association avec la protéine Rb. En effet, Rb bloque l'activité transcriptionnelle des hétérodimères E2F1/DP1 en masquant le domaine d'activation de E2F1 situé au niveau de son extrémité C-terminale. Cette association prévient le recrutement du facteur d'initiation de la transcription TFIID, mais aussi, de co-activateurs transcriptionnels tels que p300/CBP, GCN5, TRRAP, Tip60 et ACTR/AIB1 (Trouche, D. et al, 1996 ; Ross, J.F. et al, 1999 ; McMahon, S.B. et al, 1998 ; Lang, S.E. et al, 2001 ; Taubert, S. et al, 2004 ; Louie, M.C. et al, 2004). De façon intéressante, Rb a aussi la capacité de convertir les complexes E2F1/DP1 d'un statut activateur à un statut de répresseur transcriptionnel. Pour cela, Rb recrute plusieurs facteurs de modification et de remodelage de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles

de E2F1. Ces co-répresseurs incluent les histones déacétylases, BRM/BRG1, RBP1, DNMT1, CtIP, CtBP, HPC2, mSin3b, Suv39H et PRMT5 (Ross, J.F. et al, 1999 ; Dunaief, J.L. et al, 1994 ; Dahiya, A. et al, 2001 ; Luo, R.X. et al, 1998 ; Fabbrizio, E. et al, 2002 ; Strober, B.E. et al, 1996 ; Brehm, A. et al, 1998 ; Magnaghi-Jaulin, L. et al, 1998 ; Ferreira, R. et al, 1998 ; Meloni, A.R. et al, 1999 ; Nielsen, S.J. et al, 2001 ; Zhang, H.S. et al, 2000 ; Rayman, J.B. et al, 2002 ; Ait-Si-Ali, S. et al, 2004 ; Lai, A. et al, 1999 ; Robertson, K.D. et al, 2000). De plus, la spécificité des complexes corépresseurs recrutés par les protéines de la famille Rb semble dépendre du type de promoteur et du contexte cellulaire (cellule quiescente contre cellule différenciée).

### **3.1.1 La rupture du frein Rb : un réseau complexe de phosphorylations**

Rb, sous sa forme hypophosphorylée, est établi comme le régulateur majeur de l'activité de E2F1 et le complexe E2F1/Rb fonctionne en tant que répresseur transcriptionnel actif. Lors de la transition G1/S du cycle cellulaire ou lors d'une réentrée dans le cycle, les complexes E2F1/Rb subissent toute une cascade d'évènements. Durant la phase G1, le produit du gène Rb est hypophosphorylé ce qui lui confère la capacité de se complexer à E2F1 et de le maintenir sous une forme inactive. En l'absence de signal de prolifération, des HDACs et l'histone méthyltransférase Suv39-H1 s'associent avec Rb afin de modifier la chromatine au niveau des promoteurs cibles de E2F1 et d'induire leur répression. Cependant, en réponse à des signaux mitogènes, les complexes cycline D1-cdk4/6 et cycline E-cdk2 phosphorylent RB en milieu et en fin de G1 respectivement. Puis, E2F1 est à son tour phosphorylé par le complexe cycline A-cdk2 durant la phase S. Ce réseau complexe de phosphorylations va libérer E2F1 de l'emprise de Rb (Sherr, C.J., 1996), lui permettant d'entreprendre son programme transcriptionnel.

### **3.1.2 Activation du programme transcriptionnel E2F1 : un surprenant switch moléculaire !**

Les mécanismes moléculaires de la transactivation par E2F1 ne sont pas encore élucidés en détails. Cependant, les résultats disponibles suggèrent qu'un réseau complexe de

modifications des histones se produit au niveau des promoteurs cibles de E2F1. Par exemple, E2F1 recrute et interagit avec différents complexes co-activateurs à activité histone acétyltransférase (tableau des HATs), incluant p300/CBP, P/CAF et plus récemment la HAT Tip60 (Trouche, D. et al, 1996 ; Martinez-Balbas, M.A. et al, 2000 ; Marzio, G. et al, 2000 ; Morris, L. et al, 2000 ; Taubert, S. et al, 2004). Le recrutement de ces HATs corrèle avec une hyperacétylation des histones H3 et H4. Il semblerait que ce switch moléculaire fasse intervenir la protéine humaine HCF-1 pour herpes simplex virus (HSV) host cell factor-1 qui est également un régulateur critique du cycle cellulaire (Tyagi, S. et al, 2007). Cet enchaînement d'évènements va initier l'activation du programme transcriptionnel de E2F1, induire le passage en phase S et promouvoir la prolifération cellulaire.

A côté de son rôle au cours du passage en phase S, E2F1 participe également au contrôle de la transition G2/M via l'induction de différents gènes impliqués dans le processus mitotique (Ishida, S. et al, 2001 ; Polager, S. et al, 2002).

### **3.2 E2F1 un facteur de la prolifération doté d'une fonction pro-apoptotique**

Des études chez les cellules de mammifères montrent que E2F1 peut induire la mort cellulaire quand il est surexprimé ou quand il est activé par un dommage de l'ADN. De façon similaire, des expériences conduites chez la drosophile ont ainsi mis en évidence que l'expression ectopique de E2F1 peut induire l'apoptose (Asano, M. et al, 1996 ; Du, W. et al, 1996). Plusieurs travaux montrent que cette induction de la mort cellulaire est une propriété unique à E2F1 (DeGregori, J. et al, 1997 ; Kowalik, T.F. et al, 1998 ; Lissy, N.A. et al, 2000 ; Leone, G. et al, 2001) alors que d'autres suggèrent que E2F2 et E2F3 possèdent aussi cette capacité (Dirks, P.B. et al, 1998 ; Vigo, E. et al, 1999 ; Ziebold, U. et al, 2001). Plusieurs études sur cellules en culture et modèles animaux indiquent que E2F1 peut induire l'apoptose de façon à la fois dépendante et indépendante de p53 (Trimarchi, J.M. & Lees, J.A., 2002 ; Bell, L.A. & Ryan, K.M., 2004). Les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire médiée par E2F1 ne sont pas encore totalement élucidés à ce jour. Cependant, il a été mis en évidence plusieurs voies par lesquelles E2F1 a la capacité d'induire l'apoptose ainsi qu'un grand nombre de ses cibles pro-apoptotiques. Il n'existe pas de règle générale gouvernant les effets

de E2F1 sur la réponse apoptotique. Au cours de ce paragraphe, nous discuterons les différentes voies empruntées par E2F1 pour initier la mort cellulaire.

### **3.2.1 La mort cellulaire dépendante de p53**

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'induction de la mort cellulaire dépendante de p53. En effet, E2F1 peut affecter la stabilité de p53 via la régulation du gène suppresseur de tumeur p14<sup>ARF</sup> qui est un gène cible connu de E2F1 (DeGregori, J. et al, 1997 ; Bates, S. et al, 1998 ; Parisi, T. et al, 2002 ; Aslanian, A. et al, 2004). Cependant, des études menées à la fois chez la souris et sur des fibroblastes humains indiquent que E2F1 peut induire l'apoptose via la protéine p53 et ce, en l'absence de p14<sup>ARF</sup> (Tolbert, D. et al, 2002 ; Tsai, K.Y. et al, 2002 ; Lindstrom, M.S. & Wiman, K.G., 2003), suggérant l'existence de mécanismes parallèles pour l'induction de p53.

### **3.2.2 La mort cellulaire indépendante de p53**

Jusqu'à récemment, deux mécanismes ont été proposés pour l'induction de l'apoptose indépendante de p53 médiée par E2F1. En effet, p73, qui est un membre de la famille de p53, est impliqué dans l'induction de la mort cellulaire par E2F1 (Irwin, M. et al, 2000 ; Lissy, N.A. et al, 2000 ; Stiewe, T. & Putzer, B.M., 2000). E2F1 a également la capacité d'inhiber la signalisation anti-apoptotique, et plus spécifiquement le signal de survie associé au récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Phillips, A.C. et al, 1999). De plus, E2F1 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que PUMA, Noxa, Bim, SIVA et plusieurs membres de la famille des caspases (Nahle, Z. et al, 2002 ; Cao, Q. et al, 2004 ; Fortin, A. et al, 2004 ; Hershko, T. & Ginsberg, D., 2004).

### **3.2.3 La voie TRAIL**

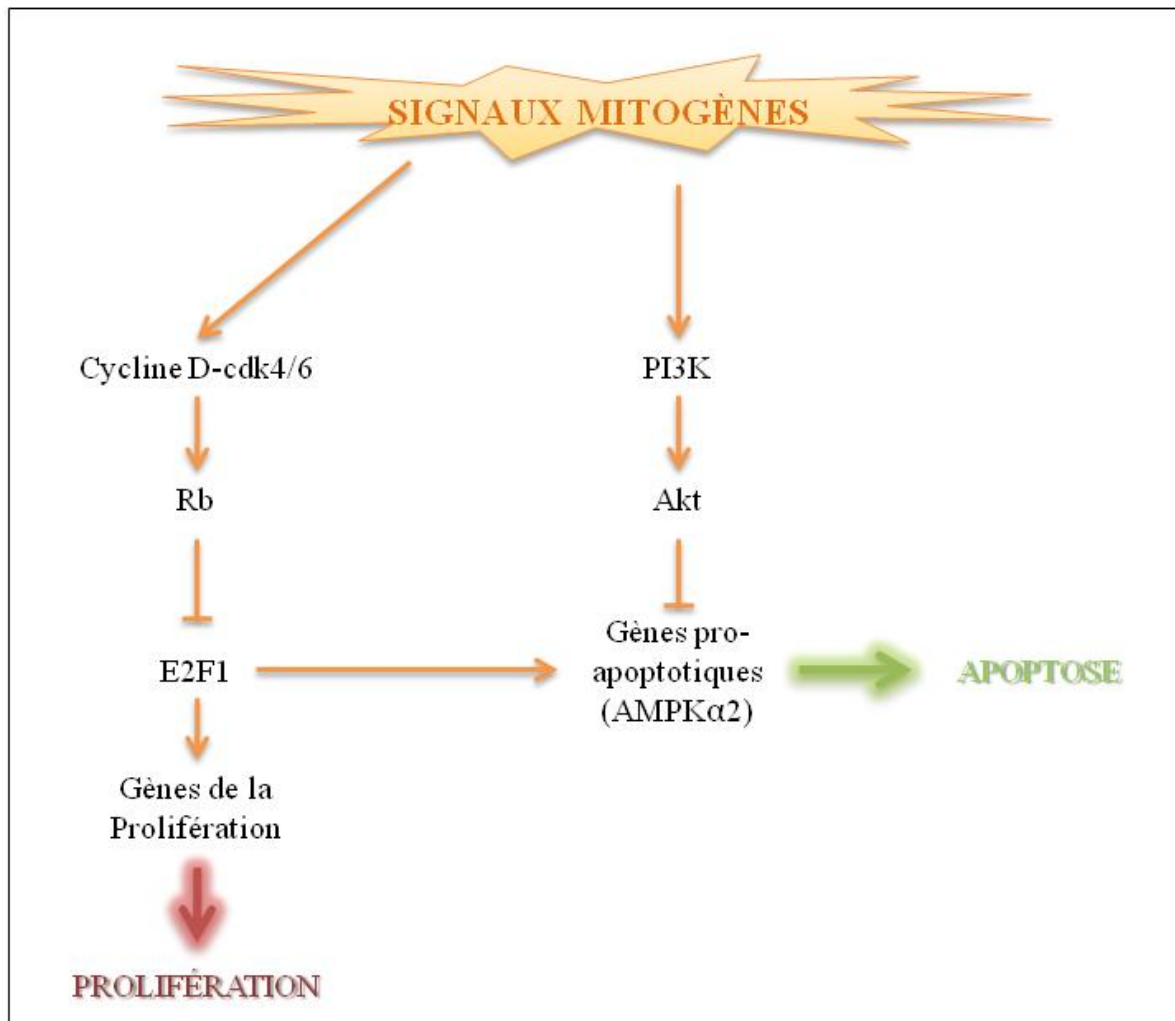
E2F1 peut induire l'apoptose via l'inhibition de FLIP<sub>short</sub> (FLICE-inhibitory protein short), conduisant à l'activation de la caspase-8 au niveau des récepteurs de mort DISC (death inducing signaling complexe) (Salon, C. et al, 2006). De façon remarquable, Caroline Salon et coll. fournissent la preuve que E2F1 sensibilise les cellules primaires et tumorales à l'apoptose médiée par le ligand FAS ou TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-

inducing ligand), et stimule la cytotoxicité des lymphocytes T contre les cellules tumorales. En investiguant les mécanismes sous-jacents à cet effet de E2F1 sur l'expression du transcrit FLIP<sub>short</sub>, notre équipe a mis en évidence l'implication du facteur d'épissage SC35 (Merdzhanova, G. et al, 2008) et a démontré la capacité de E2F1 via SC35 à moduler l'épissage alternatif des gènes apoptotiques en la faveur des variants d'épissages pro-apoptotiques. De plus, en réponse aux dommages de l'ADN, E2F1 induit l'accumulation de la protéine SC35 et une augmentation des variants de splicing pro-apoptotiques. Par conséquent, l'étude menée par Galia Merdzhanova et coll. révèle que l'épissage alternatif des transcrits contrôlé par E2F1 joue un rôle critique dans l'apoptose médiée par des dommages de l'ADN. Les études futures nous révéleront probablement que le lien entre E2F1 et le facteur d'épissage SC35, n'est peut être pas un cas isolé mais qu'il s'agit plutôt de la face émergée de l'iceberg.

### 3.2.4 La voie AKT ou le contrôle de l'apoptose

Comment la fonction apoptotique de E2F1 est-elle régulée et pourquoi l'augmentation de l'activité de E2F1, qui se produit naturellement en phase S du cycle cellulaire, n'engage-t-elle pas les cellules normales vers l'apoptose? **(i)** Rb a la capacité de bloquer l'apoptose induite par E2F1 et cela semble être un premier niveau de contrôle (Lipinski, M.M. & Jacks, T., 1999 ; Harbour, J.W. & Dean, D.C., 2000). **(ii)** La voie de signalisation de la kinase Akt semble aussi jouer un rôle. En effet, en réalisant le profil génomique de fibroblastes de rat, Hallstrom et coll. ont identifié des gènes qui sont activés sous l'expression forcée de E2F1 et réprimés de façon dépendante des PI3K en présence de sérum (Hallstrom, T.C. et al, 2008). Parmi ces gènes réprimés par le sérum, celui qui affecte le plus l'activité apoptotique de E2F1 code pour la protéine AMPK $\alpha$ 2 (AMP-activated protein kinase) qui est un régulateur central de l'homéostasie énergétique face aux nutriments et à l'ATP. Puisque E2F1 induit l'apoptose dans les cellules quiescentes par privation de facteur mitogène, il est très probable que AMPK $\alpha$ 2 joue le rôle de senseur critique d'un statut pauvre en nutriment poussant ainsi les cellules vers un processus de mort cellulaire (**Figure 15**).





**Figure 15 : Suppression du potentiel apoptotique de E2F1 durant le processus de prolifération cellulaire normale.** La stimulation par les facteurs de croissance active un certain nombre de voies de signalisation pour contrôler le devenir de la cellule (prolifération ou apoptose). Par exemple, l'activation du complexe Cycline D-cdk4/6 induit la phosphorylation et l'inactivation de Rb, libérant E2F1 de la répression. E2F1 possède alors la capacité de transactiver ses gènes cibles pour induire la prolifération ou l'apoptose. Dans ce modèle, les cellules ont la capacité, au moins en partie, de faire la différence entre une prolifération cellulaire « normale » et « oncogénique ». En effet, l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt, en réponse à des signaux mitogènes normaux, prévient l'activation des gènes cibles pro-apoptotiques de E2F1 et l'apoptose.

*Adapté d'après Hallstrom et al. (2008)*

### 3.3 E2F1, une clé pour la réparation des dommages de l'ADN

L'implication de E2F1 dans la réponse aux dommages de l'ADN provient initialement d'études montrant sa surexpression suite à des lésions de l'ADN (Blattner, C. et al, 1999 ; Hofferer, M. et al, 1999 ; O'Connor, D.J. & Lu, X, 2000). Cet effet qui est spécifique à E2F1, et pas aux autres membres de la famille, montre des cinétiques qui ressemblent étroitement à l'induction de p53. Ainsi, les protéines E2F1 et p53 pourraient être régulés selon un schéma commun (Blattner, C. et al, 1999).

#### 3.3.1 Phosphorylation et stabilisation de E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN

Il est maintenant admis que l'induction de E2F1 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN reflète sa phosphorylation par les protéines kinases ATM, ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), et Chk2 (Checkpoint 2) (Lin, W.C. et al, 2001 ; Stevens, C. et al, 2003), les trois étant des constituants clés de cette réponse. Les kinases ATM et ATR phosphorylent la sérine 31 de E2F1, et il a été suggéré que cette phosphorylation préviendrait la dégradation de E2F1 en inhibant son interaction avec p45<sup>SKP2</sup> (Lin, W.C. et al, 2001) (**Figure 14**). De façon similaire, la phosphorylation de E2F1 sur sa sérine 364 (juxtaposée au site d'interaction de Mdm2) par la kinase Chk2 pourrait inhiber son interaction avec Mdm2. La phosphorylation de E2F1 suite à une lésion de l'ADN a clairement été connectée avec une accumulation du niveau protéique de E2F1 et l'induction de l'apoptose, et ce de façon similaire à la protéine p53 (Lin, W.C. et al, 2001 ; Stevens, C. et al, 2003).

#### 3.3.2 Un rôle privilégié pour la protéine p73

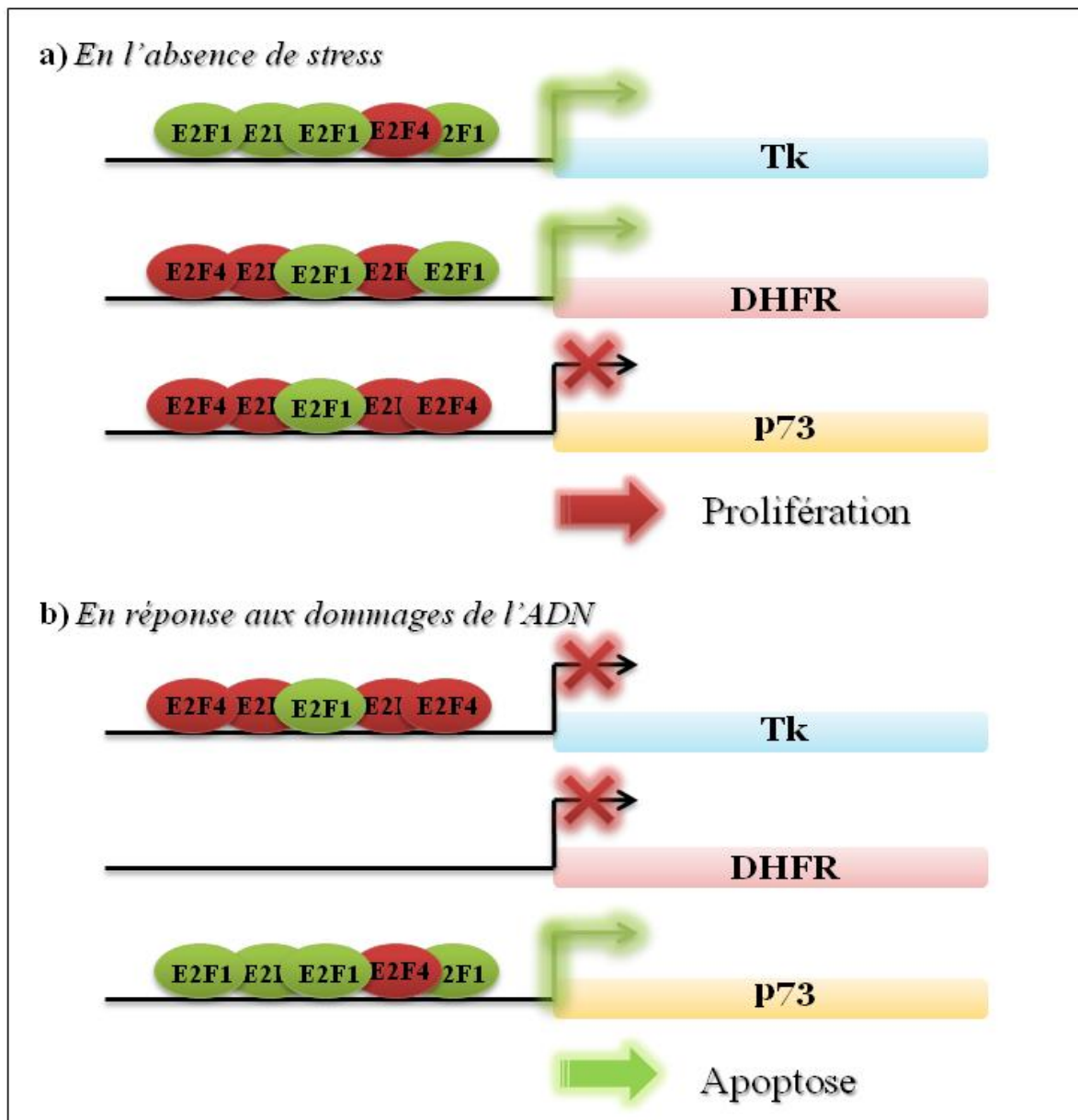
Bien qu'il soit admis, depuis plusieurs années maintenant, que les dommages de l'ADN sont un signal pour que E2F1 induise l'apoptose, le mécanisme par lequel E2F1 induit la mort cellulaire plutôt que la progression du cycle cellulaire commence juste à être élucidé. Il a été démontré qu'un traitement à la doxorubicine induit le recrutement spécifique de E2F1 sur le promoteur de p73, conduisant à l'apoptose des cellules. De façon surprenante, et dans

un même contexte, E2F1 n'est pas recruté sur le promoteur du gène Apaf-1. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'activation de p73 corrélait avec l'hyperacétylation de l'histone H4 au niveau de son promoteur. A l'inverse, les régions promotrices des gènes de la Tk et de la DHFR sont hypoacétylés (Pediconi, N. et al, 2003). Ces résultats suggèrent ainsi qu'en réponse aux dommages de l'ADN des changements spécifiques au niveau chromatinien régulent l'activité transcriptionnelle de E2F1 en faveur de ses cibles pro-apoptotiques et au détriment des gènes de la prolifération (**Figure 16**).

### 3.3.3 Acétylation de E2F1 : une étape critique de la réponse aux dommages de l'ADN

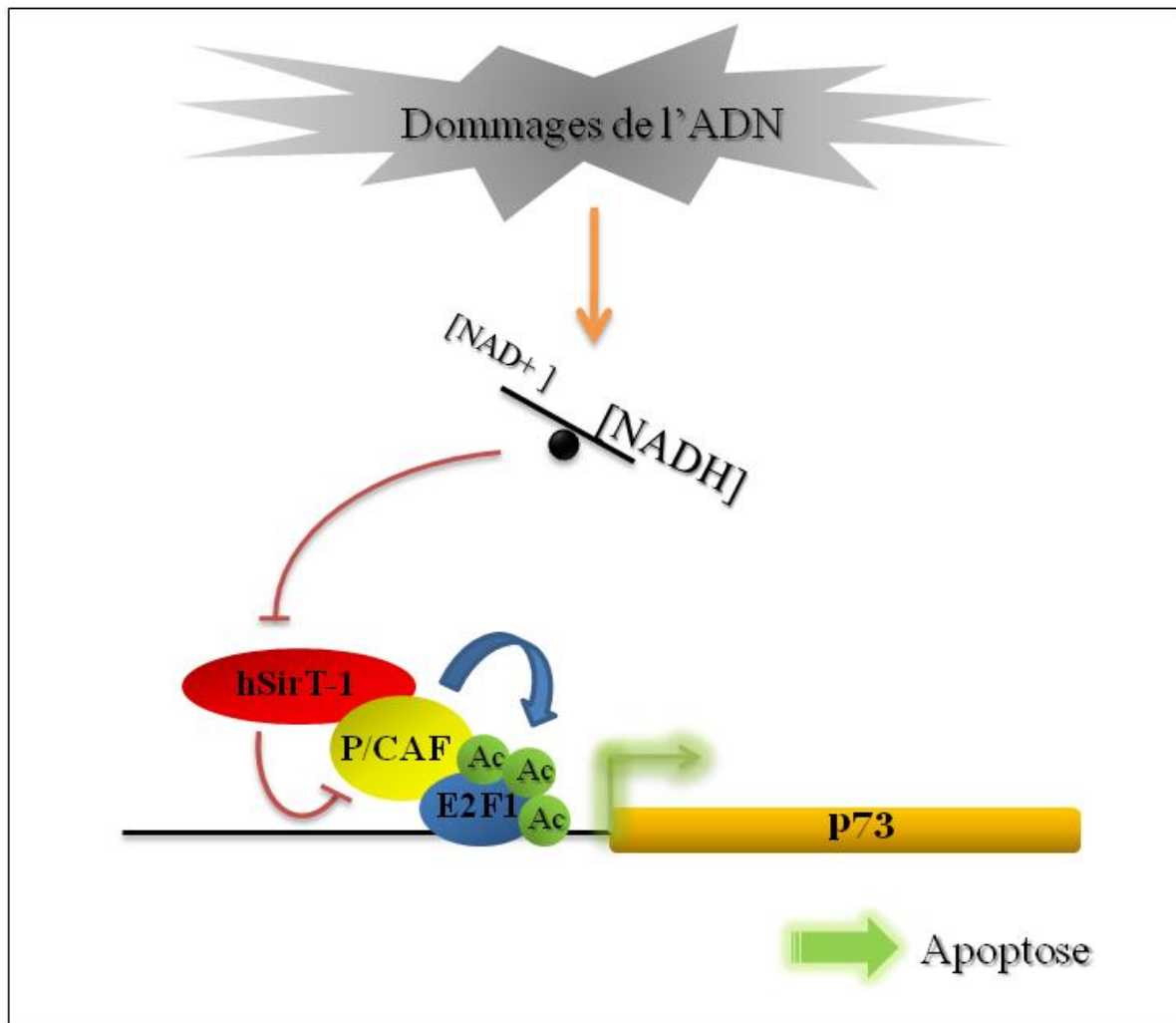
De façon remarquable, Pediconi et coll. ont connecté cette spécificité à une augmentation du niveau d'acétylation de E2F1 (Pediconi, N. et al, 2003). E2F1 est connue pour être une protéine acétylée. En effet, les HATs P/CAF et p300/CBP ont la capacité d'acétyler E2F1 *in vitro* et les molécules E2F1 intracellulaires sont acétylées *in vivo* (Martinez-Balbas, M.A. et al, 2000). Cette acétylation s'effectue spécifiquement au sein du groupe de lysines 117/120/125 (Marzio, G. et al, 2000), adjacent au domaine de liaison à l'ADN, dont les conséquences fonctionnelles sont l'augmentation de sa demi-vie et la stimulation de son affinité de liaison à l'ADN. Dans une étude récente Ianari et coll. ont observé que E2F1 est spécifiquement stabilisé en réponse à un traitement à la doxorubicine ou au cisplatine et ce même en l'absence d'ATM et de p53. Dans cette étude, l'activité HAT de P/CAF mais pas celle de p300/CBP est nécessaire à une accumulation significative de E2F1 en réponse à la doxorubicine (Ianari, A. et al, 2004). Ces données suggèrent une spécificité des HATs dans la stabilisation de E2F1, indiquant un rôle spécifique de P/CAF dans l'apoptose induite par E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN. De façon remarquable, l'histone déacétylase de classe III dépendante du NAD<sup>+</sup>, hSirT1, qui régule la survie cellulaire, la réponse aux stress et le métabolisme par inhibition de la transcription dépendante de p53 (Chen, W.Y. et al, 2005 ; Langley, E. et al, 2002), de E2F1 (Wang, C. et al, 2006) et de NFκB (Yeung, F. et al, 2004), réprime l'activité du promoteur de p73 induite par E2F1 dans des cellules non traitées. Cependant, l'exposition des cellules aux dommages de l'ADN induit l'inactivation de hSirT1, par diminution du niveau de NAD<sup>+</sup> nucléaire (Pediconi, N. et al, 2009) (**Figure 17**). Il apparaît donc que cette fine régulation de l'activité de E2F1 modifie

sa spécificité de manière à favoriser l'activation de gènes pro-apoptotiques versus les gènes du cycle comme la DHFR ou la Tk, et l'acétylation est au centre de ce processus.



**Figure 16 : Modèle de la mise en place de l'apoptose médiée par E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN.** En l'absence de stress, le promoteur du gène p73 est sous le contrôle du facteur répresseur E2F4. L'apparition d'un dommage de l'ADN induit le recrutement spécifique de E2F1 et la dissociation du facteur répresseur E2F4 au niveau du promoteur de p73. En contraste, les gènes codant pour la Thymidine kinase (Tk) et la DHFR (dihydrofolate réductase) se comportent différemment. E2F1 et E2F4 sont présent au niveau du promoteur de la Tk en l'absence de dommage et d'autres facteurs E2F4 sont recrutés en réponse aux dommages de l'ADN. Le promoteur de la DHFR est lié par E2F1 et E2F4 dans les cellules non lésées et est vacant dans les cellules endommagées.

*Adapté d'après Pediconi et al. (2003)*



**Figure 17 : Modèle de la régulation de l'expression du gène p73 en réponse aux dommages de l'ADN.** En réponse aux dommages de l'ADN, la déacétylase hSirT-1, qui est une déacétylase de classe III dépendante du NAD<sup>+</sup>, l'acétyltransférase P/CAF et le facteur de transcription E2F1 sont recrutés sur le promoteur du gène pro-apoptotique p73. hSirT-1 déacétyle P/CAF *in vitro* et module son acétylation *in vivo*. Dans une cellule exposée à des dommages de l'ADN, le niveau de NAD<sup>+</sup> nucléaire diminue induisant l'inactivation de hSirT-1, sans altérer son interaction avec P/CAF ou sa liaison au niveau du promoteur. hSirT-1 inhibée, P/CAF est alors actif et catalyse l'acétylation de E2F1 au sein du groupe de lysines 117/120/125, stimulant la formation de complexes E2F1-P/CAF actifs dans la région promotrice de p73 et l'induction concomitante de l'apoptose.

*Adapté d'après Pediconi et al. (2003), Ianari et al. (2004) et Pediconi et al. (2009)*

### 3.3.4 E2F1, senseur de dommages de l'ADN ?

La localisation cellulaire de E2F1 est également modifiée en réponse aux dommages de l'ADN. En effet, lorsqu'il est phosphorylé par Chk2, E2F1 se localise dans des corps nucléaires distincts (Stevens, C. et al, 2003). Un grand nombre de protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des lésions de l'ADN, incluant certaines activées par Chk2, se localisent dans des foyers nucléaires, plus probablement aux sites de dommages (Rouse, J. & Jackson, S.P., 2002). De façon intéressante, le complexe MRN (Mre11/Nbs1/Rad50), impliqué dans la réponse aux cassures double-brins de l'ADN (D'Amours, D. & Jackson, S.P., 2002), interagit avec E2F1 via la région N-Terminale de Nbs1 (Maser, R.S. et al, 2001). L'interaction E2F1/Nbs1 se produit à proximité de ces sites, suggérant que E2F1 puisse être nécessaire pour cibler le complexe MRN aux origines de réplication. Une seconde étude démontre que la protéine TopBP1 (DNA Topoisomerase II- $\beta$  Binding Protein1) se relocalise avec E2F1 au niveau de foyers nucléaires aux côtés de BRCA1 en réponse aux dommages de l'ADN (Liu, K. et al, 2003), appuyant l'idée que E2F1 est impliqué dans le contrôle de la réplication et de la réparation des dommages de l'ADN.

Bien qu'il ne soit pas réellement connu si cette localisation est connectée avec l'activité apoptotique de E2F1 ou avec d'autres propriétés de E2F1 liées aux points de contrôle du cycle cellulaire ou à la réponse aux dommages de l'ADN, il est tentant de spéculer que E2F1 puisse jouer un rôle de senseur de l'intégrité du génome.

## 3.4 E2F1 et Sénescence : une alliance obscure

### 3.4.1 La sénescence répllicative

Les niveaux d'expression des inhibiteurs de CDKs p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>Waf1</sup> augmentent progressivement avec le nombre de doublements de population et le raccourcissement des télomères (Campisi, J. et al, 2005), résultant en l'accumulation d'une protéine Rb hypophosphorylée dans les cellules sénescents. La pertinence de ces travaux est également appuyée par le rôle de la protéine Rb dans la répression de l'activité télomérase (Xu, H.J. et al, 1997), qui pourrait être responsable, au moins en partie, du blocage de la progression du cycle cellulaire et de la diminution de l'activité télomérase observée dans les cellules

quiescentes en culture en l'absence de sérum (Holt, S.E. et al, 1996). En fait, il a été montré que l'intégrité du statut sénescence se réalise en partie via un processus médié par Rb et la répression stable des gènes cibles de E2F1 (Narita, M. et al, 2003). Selon un mécanisme faisant intervenir la mise en place de structures chromatiniennes particulières sous la forme de foyers dénommés SAHF (Senescence Associated Heterochromatin Foci), foyers qui contiennent E2F1, la protéine Rb, HP1 (Heterochromatin Protein 1) ainsi que la HMT Suv39H1 (Narita, M. et al, 2003). De plus, Wong et coll. ont montré que l'assemblage et le désassemblage des complexes contenant E2F1, Rb, et une histone déacétylase fournissent un mécanisme de base pour la répression et l'activation de hTERT dans les fibroblastes normaux humains en cycle (Won, J. et al, 2004). Ainsi, E2F1, sous sa forme libre, a la capacité d'activer la télomérase dans les cellules normales et cancéreuses, alors que les complexes Rb/E2F1 les répriment (Alonso, M.M. et al, 2005).

### **3.4.2 La sénescence de stress**

A côté de la sénescence répliquative, il est actuellement admis que d'autres types de stress comme certains types de dommages de l'ADN (Di Leonardo, A. et al, 1994 ; Robles S.J. & Adami, G.R., 1998) ou des stimuli oncogéniques tels que les mutants oncogéniques de ras (Serrano, M. et al, 1997) peuvent induire la mise en place d'un phénotype sénescence dans des cellules humaines normales, processus que l'on appelle la sénescence prématurée ou sénescence de stress. L'expression ectopique de E2F1 dans des fibroblastes humains normaux provoque un phénotype sénescence mettant en jeu la capacité de E2F1 à induire l'expression du gène codant pour la protéine suppressive de tumeur p14<sup>ARF</sup>, selon un processus nécessitant la protéine suppressive de tumeur p53 (Dimri, G.P. et al, 2000). Ainsi, la capacité de E2F1 à induire une sénescence de stress pourrait contribuer à sa fonction suppressive de tumeur.

## 4. E2F1, un paradoxe dans la tumorigénèse

Un certain nombre de modèles murins ont été développés afin de mieux appréhender les fonctions de E2F1. Ces modèles transgéniques miment en partie la dérégulation de E2F1 qui se produit au cours de la tumorigénèse. Durant de la dernière décennie, le développement de ces modèles d'études animaux a permis de conforter le rôle critique qu'occupe E2F1 dans le processus de tumorigénèse, mettant en avant des fonctions très contrastées, oncogéniques ou suppressives de tumeur.

### 4.1 E2F1, oncogène

L'un des modèles murins souvent utilisé pour étudier le rôle de E2F1 dans le développement tumoral est le modèle de tumorigénèse cutanée. Dans ce modèle, le gène E2F1 est sous le contrôle du promoteur du gène de la kératine 5. La pertinence de ce modèle animal réside dans le fait que le promoteur de la kératine 5 n'est actif que dans les couches basales de l'épiderme et dans plusieurs autres muqueuses malpighiennes (Pierce, A.M. et al, 1998 ; Ramirez, A. et al, 1994). De façon intéressante, l'expression de ce transgène entraîne une hyperplasie et une hyperprolifération dans l'épiderme de la souris transgénique. De plus, ces souris développent des tumeurs spontanées au niveau de la peau et dans d'autres tissus épithéliaux exprimant E2F1 (Pierce, A.M. et al, 1999). Ce développement tumoral est accéléré si E2F1 est exprimé dans un contexte où p53 est inactivé, même partiellement (Pierce, A.M. et al, 1998). Il en est de même pour l'inactivation de p19<sup>Arf</sup> (Johnson, D.G. & DeGregori, J. 2006). Par ailleurs, lorsque des souris KO pour le gène Rb sont placées dans un contexte où l'expression de E2F1 est nulle, on observe une augmentation de leur espérance de vie associée à une réduction de la fréquence des tumeurs thyroïdiennes et hypophysaires (Yamasaki, L. et al, 1998). Il semble donc que la surexpression de E2F1 soit un événement critique au cours du développement tumoral.

Les propriétés oncogéniques de E2F1 semblent dépendre de sa capacité à stimuler la prolifération via la transactivation d'un certain nombre de gènes régulant la progression du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN. A ce titre, l'expression transgénique de E2F1 conduit au développement de tumeurs spontanées (Wang, D. et al, 2000). E2F1 contribue également à la suppression de la différenciation d'un certain nombre de types cellulaires,



incluant les kératinocytes et les chondrocytes (Dicker, A.J. et al, 2000 ; Scheijen, B. et al, 2003). Par ailleurs, la dérégulation de E2F1, induite en réponse à l'inactivation de Rb, induit des dommages à l'ADN et contribue ainsi au développement tumoral par l'émergence de mutations (Pickering, M.T. & Kowalik, T.F., 2006 ; Frame, F.M. et al, 2006). Enfin, il a été montré que la surexpression de Mad2, une cible de E2F1 impliquée dans la régulation de la ségrégation des chromosomes, génère une instabilité génomique et l'apparition de tumeurs variées chez la souris (Pickering, M.T. & Kowalik, T.F., 2006 ; Sotillo, R. et al, 2007). Ainsi, la dérégulation de E2F1 pourrait également être impliquée dans l'aneuploïdie caractéristique des cellules tumorales.

En accord avec un rôle oncogénique, l'amplification du gène E2F1 a été décrite dans des métastases ganglionnaires de mélanomes (Nelson, M.A. et al, 2006) et dans de rares cas de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Gorgoulis, V.G. et al, 2002). L'ensemble de ces travaux laissent entrevoir de façon nette le rôle oncogénique de E2F1 dans la tumorigénèse.

## 4.2 E2F1, suppresseur de tumeur

L'inactivation de E2F1 chez la souris prédispose au développement d'un certain nombre de tumeurs, incluant des adénocarcinomes pulmonaires, des lymphomes et des sarcomes de l'appareil génital (Yamasaki, L. et al, 1996). De plus, les souris transgéniques TgT<sub>121</sub>, exprimant un fragment de l'antigène T du virus SV40 qui inactive les membres de la famille Rb, développent des tumeurs cérébrales à croissances lentes caractérisées par une forte apoptose. Le croisement de ces souris avec des souris E2F1<sup>-/-</sup> prévient cette apoptose tumorale (Pan, H. et al, 1998). Dans ces tumeurs n'exprimant pas E2F1, la prolifération est nettement réduite et contrebalance la diminution de l'apoptose des cellules tumorales. Ces travaux suggèrent que E2F1 puisse disposer d'une fonction suppressive de tumeur. En accord avec cette hypothèse et comme nous l'avons discuté précédemment, E2F1 peut induire l'apoptose de cellules tumorales bronchique via l'inhibition de FLIP<sub>short</sub>, ce qui conduit à l'activation de la caspase-8 au niveau des récepteurs de mort DISC (Salon, C. et al, 2006) et sensibilise les cellules primaires et tumorales à l'apoptose médiée par le ligand FAS ou TRAIL. De façon intéressante, l'expression de la protéine E2F1 est très faible voire indétectable dans les adénocarcinomes broncho-pulmonaires (Eymin, B. et al, 2001). On peut ainsi penser que ce

faible niveau d'expression cellulaire de E2F1 conduit à l'émergence d'adénocarcinomes par perte de cette fonction pro-apoptotique. D'autre part, il a aussi été décrit que la perte d'expression de E2F1 chez la souris conduit à la mise en place d'une résistance à l'apoptose à l'origine de l'altération de la maturation des lymphocytes T chez le jeune animal et d'une croissance du thymus plus importante, allant de pair avec l'émergence de thymomes et de lymphomes chez la souris âgée (Field, S.J. et al, 1996). Bien que l'incidence tumorale en réponse à l'inactivation de E2F1 soit moindre que pour l'inactivation d'autres gènes suppresseurs de tumeur (approximativement 19% à 18 mois), elle est cependant significativement supérieure à l'incidence tumorale observée dans les modèles sauvages (environ 10%). L'ensemble de ces données indiquent que la protéine E2F1, outre son rôle oncogénique, possède également une fonction suppressive de tumeur.

### **4.3 Une influence tissulaire et environnementale majeure**

Sur la base de l'ensemble des travaux effectués sur les modèles murins, il apparaît aujourd'hui que la dualité de fonction de E2F1 observée au cours du développement tumoral (activité oncogénique ou suppressive de tumeur) dépend très largement du type tissulaire et du contexte cellulaire.

Dans des souris transgéniques E $\mu$ -Myc, l'inactivation de E2F1 supprime le développement de lymphomes (Baudino, T.A. et al, 2003). A l'inverse, l'inactivation de E2F1 accélère le développement tumoral dans les souris qui surexpriment Myc au niveau des tissus épithéliaux malpighiens (Rounbehler, R.J. et al, 2002). Ces données paradoxales semblent indiquer que les fonctions biologiques de E2F1 dans le contexte tumoral sont dépendantes du type tissulaire. Cependant, ce n'est pas le seul déterminant. A ce titre, une analyse récente a montré la perte de la protéine E2F1 dans les cellules carcinomateuses prostatiques par rapport aux cellules normales. A l'inverse, des niveaux d'expression bien plus élevés que dans le tissu normal sont observés dans les carcinomes mammaires, coliques (Bramis, J. et al, 2004 ; Zacharatos, P. et al, 2004), œsophagiens (Ebihara, Y. et al, 2004) ou dans les glioblastomes (Alonso, M.M. et al, 2005). L'ensemble de ces données démontrent donc une expression différentielle de E2F1 selon le type tumoral et soulignent le rôle ambiguë de cette protéine dans la tumorigénèse. De façon encore plus surprenante, notre équipe a montré que E2F1 est

surexprimé dans les carcinomes bronchiques à petites cellules, alors qu'il est quasi indétectable dans les carcinomes non à petites cellules (Eymin, B. et al, 2001).

Il apparaît également que le type de lésion initiée conditionne l'activité de E2F1. Ainsi, chez les souris K5-E2F1, E2F1 supprime le développement des cancers sous-cutanés en réponse à l'application de DMBA (7,12-DiMethylBenz(a)Anthracene), alors qu'il sensibilise les mêmes souris au développement de tumeurs cutanées suite à une exposition à des radiations UV (Russell, J.L., 2006). Cela suggère que la fonction ambivalente de E2F1, observée au cours du processus de carcinogénèse, pourrait dépendre du type de mutation engendrée par ces deux agents carcinogènes, mais aussi et peut être de fonctions différentes exercées par E2F1 en réponse à ces agents.

En somme, E2F1 est un facteur de transcription cellulaire clé qui possède de multiples activités critiques telles que le contrôle de la transcription et de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la réponse aux dommages de l'ADN, de la différenciation, ou encore de la sénescence. En réponse à cette multiplicité de fonctions, il n'est pas surprenant d'observer son implication à la fois dans des processus oncogéniques et suppresseurs de tumeur. Cette complexité fonctionnelle est étroitement régulée et il semblerait que ses différentes activités se manifestent en fonction du type cellulaire et de son environnement à un moment donné.

# **OJECTIFS DU TRAVAIL**

---

Face à l'échec des traitements actuels, le cancer du poumon reste la première cause de mort par cancer dans le monde, et le challenge thérapeutique repose sur l'identification de nouveaux biomarqueurs pouvant être utilisés pour le diagnostic précoce et l'établissement de traitements ciblés. Dans ce contexte, les objectifs de notre équipe sont d'identifier les anomalies génétiques et épigénétiques des cancers bronchiques et de caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels elles contribuent à l'initiation et la progression de ces cancers.

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait identifié l'histone acétyltransférase Tip60 comme un élément clé de l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN induites par l'exposition des cellules aux carcinogènes du tabac (Eymin et al, 2006). Sur la base de ces résultats et des données de la littérature démontrant le rôle important de Tip60 dans le contrôle de la stabilité du génome via sa capacité à réguler l'acétylation des protéines, nous avons émis l'hypothèse qu'une modification du profil d'acétylation des protéines histones et/ou non-histones pourrait constituer une nouvelle « signature épigénétique » de ces cancers.

Les objectifs généraux définis dans le cadre de mon projet de thèse s'appuient directement sur ces données et s'organisent autour de deux grands axes.

Dans une première partie, nous avons réalisé une approche globale « *in situ* » de l'étude du statut épigénétique de l'histone H4 dans les tumeurs bronchiques. Cette histone a été spécifiquement choisie car elle est la cible principale de Tip60 *in vivo* et parce que les modifications épigénétiques auxquelles elle est sujette lui confère un rôle majeur dans la structure de la chromatine, la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à approfondir le rôle de Tip60 dans la carcinogénèse bronchique en étudiant son statut dans les tumeurs bronchiques et en analysant sa capacité à réguler les fonctions biologiques de la protéine E2F1. L'équipe a en effet décrit une expression différentielle de E2F1 dans les tumeurs bronchiques et montré le rôle clé de cette protéine dans l'apoptose induite par les agents génotoxiques. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la protéine E2F1 pourrait être une nouvelle cible de la HAT Tip60 et que cette dernière pourrait contrôler son expression et ses fonctions biologiques.

# RESULTATS

# **I. Altération globale des modifications épigénétiques de l'histone H4 dans les cancers du poumon.**

## **1. Introduction**

Les modifications épigénétiques jouent un rôle critique dans la régulation de l'expression des gènes, l'architecture nucléaire, ou encore la stabilité du génome (Kouzarides, T., 2007). Il est maintenant admis que l'altération de ces marques contribue au développement des cancers. La modification épigénétique la mieux caractérisée concerne la méthylation de l'ADN. Ainsi, l'une des caractéristiques des cellules tumorales est l'hypométhylation globale du génome (à l'origine d'une instabilité génomique), associée à l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes (conduisant principalement à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur) (Shames, D.S. et al, 2006 ; Bowman, R.V. et al, 2006 ; Kerr, K.M. et al, 2007). Par ailleurs, les protéines histones sont également la cible de modifications épigénétiques qui influencent une multitude de processus cellulaires (Kouzarides, T., 2007). De façon intéressante, les travaux de Fraga et coll. et de Seligson et coll. en 2005 ont montré que la dérégulation de l'acétylation et de la méthylation des histones pouvait constituer une signature épigénétique des tumeurs humaines (Fraga, M. et al, 2005 ; Seligson, D.B. et al, 2005). A cette même époque, nous avons décrit au laboratoire l'implication de la HAT Tip60 dans la réponse cellulaire aux carcinogènes du tabac (Eymin, B. et al, 2006) suggérant une dérégulation des modifications épigénétiques des histones dans les cancers bronchiques. Sur la base de ces travaux et des données de la littérature, nous avons analysé dans les cancers bronchiques le statut acétylé et triméthylé de l'histone H4, cible majeure de la HAT Tip60 (Kouzarides T. 2007).

## 2. Résultats

### 2.1 Altération globale de l'acétylation de l'histone H4 :

Nous avons analysé le statut épigénétique de l'histone H4 par immunohistochimie (IHC) à l'aide d'anticorps spécifiques de l'acétylation (ac) des lysines (K) 5 (K5), K8, K12 et K16 de la queue N-terminale de l'histone H4. Les résultats obtenus sur 100 tumeurs bronchiques (50 adénocarcinomes et 50 carcinomes malpighiens de différents grades de malignité) montrent une altération globale de ces marques épigénétiques avec un gain de H4K5ac et H4K8ac, et une perte de H4K12ac et H4K16ac en comparaison avec le poumon normal. Ces résultats ont été confirmés par la technique de Western Blotting sur des extraits protéiques issus de coupes sériées et choisis aléatoirement parmi les mêmes échantillons tumoraux.

De manière intéressante, l'hyperacétylation de H4K5 et de H4K8 est observée préférentiellement dans les carcinomes malpighiens alors que l'hypoacétylation de H4K12 est majoritairement retrouvée dans les adénocarcinomes (Mann-Whitney,  $P = 0,016$ ,  $P < 0,0001$ , et  $P = 0,0007$ , respectivement). Par ailleurs, une forte association entre H4K8ac et H4K12ac est observée dans les carcinomes malpighien ( $P < 0,0001$ ) alors que H4K12ac et H4K16ac sont directement corrélés dans les adénocarcinomes ( $P = 0,0009$ ). De plus, une forte association entre H4K5ac et H4K8ac ( $P < 0,0001$ ) et H4K5ac et H4K12ac ( $P = 0,0007$ ) est également observée indépendamment du sous-type histologique. La signification de ces corrélations reste obscure mais pourrait refléter l'existence d'un dialogue entre ces modifications comme il a été récemment décrit pour l'histone H3 (Guccione, E. et al, 2007 ; Kirmizis, A. et al, 2007).

Aucune corrélation n'a été observée entre l'altération de ces modifications et les paramètres cliniques disponibles (stade, survie).

### 2.2 Eradication de la triméthylation de l'histone H4 :

La même série de carcinomes bronchiques a été analysée pour le statut triméthylé de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3) par immunohistochimie. Cette étude a permis de mettre évidence la perte globale de H4K20me3 dans les tumeurs bronchiques, en comparaison



avec le poumon normal qui, quant à lui, est très fortement marqué. Ces résultats ont également été confirmés sur une petite série d'échantillons par la technique de Western Blotting. La perte de H4K20me3 est plus fréquente dans les carcinomes malpighiens ( $P < 0,0001$ ) que dans les adénocarcinomes et est inversement corrélée avec l'hyperacétylation de H4K8 dans les adénocarcinomes ( $P = 0,0008$ ).

Bien que la triméthylation de H4K20 soit fortement perdue dans les carcinomes malpighiens (67%), elle ne corrèle ni avec le stade ni avec la survie des patients. Cependant, c'est un évènement qui semble précoce puisque 69% des tumeurs malpighiennes de stade I présentent cette anomalie. Nous avons pu valider cette hypothèse en analysant le statut de H4K20me3 dans une série de 18 lésions prénéoplasiques malpighiennes (4 hyperplasies, 4 métaplasies, 2 dysplasies légères, 2 modérées et, 2 sévères, et 4 carcinomes *in situ*). Les résultats obtenus montrent que la perte de H4K20me3 s'effectue dès les premiers stades de prénéoplasies et s'accroît avec la progression tumorale.

Dans les adénocarcinomes, l'altération de H4K20me3 est moins fréquemment rencontrée (28%) et ne présente pas de corrélation avec le stade des tumeurs. Cependant, la distribution des scores immunohistochimiques identifie très clairement deux populations de patients parmi les adénocarcinomes de stade I, avec une meilleure survie pour les patients porteurs d'une tumeur ayant conservé un fort niveau de triméthylation ( $P = 0,007$ ).

### **2.3 Un suspect : matricule N° Suv4-20H2**

Afin d'appréhender le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) par le(s)quel(s) la triméthylation de H4K20 est altérée dans les tumeurs bronchiques, nous avons envisagé d'étudier par IHC le statut des deux triméthyltransférases spécifiques de H4K20, Suv4-20H1 et Suv4-20H2 (aucune déméthylase n'a encore été décrite à ce jour). Cependant, l'absence d'anticorps utilisable pour une étude par IHC nous a conduit à analyser le niveau d'expression de leurs transcrits, par RT/qPCR sur 31 échantillons représentatifs, toujours sur coupes sériées. Cette étude nous a permis de montrer la diminution de l'expression des transcrits de Suv4-20H1 et de Suv4-20H2 dans 68% et 55% des tumeurs, respectivement. De façon intéressante, la perte de H4K20me3 est associée à une diminution de l'expression des transcrits de Suv4-20H2 ( $P = 0,019$ ).

### 3. Conclusion

Ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois une altération globale des modifications épigénétiques de l'histone H4 dans les cancers du poumon qui semble constituer une nouvelle « signature épigénétique » de ces cancers. Bien qu'aucune corrélation n'ait pu être mise en évidence entre la dérégulation du statut acétylé de l'histone H4 et les paramètres cliniques disponibles, nos résultats indiquent que la triméthylation de H4K20 pourrait être un biomarqueur candidat pour le dépistage précoce et la définition de protocoles thérapeutiques des cancers du poumon.

### 4. Article 1

Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.

**Clinical Cancer Research**, Volume 14 (22), 2008, Pages 7237-7245.

A. Van Den Broeck, E. Brambilla, D. Moro-Sibilot, S. Lantuejoul, C. Brambilla, B. Eymin, S. Khochbin, and S. Gazzeri.

## Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer

Arnaud Van Den Broeck,<sup>1,3</sup> Elisabeth Brambilla,<sup>1,3,5</sup> Denis Moro-Sibilot,<sup>1,3,4</sup> Sylvie Lantuejoul,<sup>1,3,5</sup> Christian Brambilla,<sup>1,3,4</sup> Beatrice Eymin,<sup>1,3</sup> Saadi Khochbin,<sup>2,3</sup> and Sylvie Gazzeri<sup>1,3</sup>

**Abstract Purpose:** Epigenetic modifications of histone have crucial roles in the control of gene activity, nuclear architecture, and genomic stability. In this respect, they may contribute to the development and progression of cancer. We investigated whether epigenetic changes of histone H4 are involved in lung carcinogenesis.

**Experimental Design:** Epigenetic modifications of histone H4 were studied by immunohistochemistry in normal lung and 157 lung carcinoma using antibodies specifically recognizing the acetylated (Ac) lysines 5 (K5), K8, K12, K16, and trimethylated (me3) K20 residues of histone H4. Western blotting was used to validate the immunohistochemistry results. H4K20me3 was also studied in 17 preneoplastic lesions. Expression of the Suv4-20h1/2 trimethyltransferases was analyzed by quantitative reverse transcription-PCR in a subset of tumor samples.

**Results:** As compared with normal lung, cancer cells displayed an aberrant pattern of histone H4 modifications with hyperacetylation of H4K5/H4K8, hypoacetylation of H4K12/H4K16, and loss of H4K20 trimethylation. Alteration of H4K20 trimethylation was frequent in squamous cell carcinoma (67%) and was observed in early precursors lesions in which the level of H4K20me3 staining strongly decreased with disease progression. In adenocarcinoma, the down-regulation of H4K20me3 was less frequent (28%) but allowed the identification of a subgroup of stage I adenocarcinoma patients with reduced survival ( $P = 0.007$ ). Loss of H4K20 trimethylation was associated with decreased expression of *Suv4-20h2*, a specific H4K20 trimethyltransferase involved in telomere length maintenance.

**Conclusions:** Our findings indicate an important role of histone H4 modifications in bronchial carcinogenesis and highlight H4K20me3 as a candidate biomarker for early detection of and therapeutic approaches to lung cancer.

Lung cancer is the leading cause of death from cancer among males in Europe and both men and women in the United States. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for almost 80% of such deaths (1–3). In spite of diagnosis and

treatment improvements, the 10-year overall lung cancer survival is less than 10%, claiming more deaths than breast, colon, and prostate cancers all together. Early diagnosis allowing surgical resection with a 60% to 80% 5-year survival is done in only less than 25% of the patients. Therefore, the identification of the molecular biomarkers of clonal selection in lung cancer as well as the comprehension of the mechanisms of their participation in the lung carcinogenesis process are required to establish the prognostic factors of progression of preneoplastic and invasive tumors toward earlier diagnosis, and to define more efficient therapies with lower side effects.

Lung cancer is the end result of a process that associates multifocal morphologic transformation and multistep accumulation of molecular abnormalities (4). The clonal selection leading to proliferation and invasion is achieved by disruption of the cell growth controls, with a tumor progression kinetic depending on the number and accumulation rate of these molecular alterations. Common genetic abnormalities in lung carcinogenesis include inactivation of tumor suppressor genes, activation of oncogenes, and chromosomal abnormalities (5). Furthermore, it is now apparent that epigenetic modifications that do not affect the primary sequence of the DNA also contribute to lung tumor formation. These involve both global genomic hypomethylation leading to chromosomal instability, and regional hypermethylation at certain promoters (6–8). By this mechanism of silencing, the expression of tumor

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon and <sup>2</sup>Equipe Epigénétique et signalisation cellulaire, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot; <sup>3</sup>Université Joseph Fourier; <sup>4</sup>Pole de Médecine Aigue Communautaire Pneumologie and <sup>5</sup>Département d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Hôpital Albert Michalon, Grenoble Cedex 09, France

Received 4/4/08; revised 6/19/08; accepted 6/24/08.

**Grant support:** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U823, La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée), INCa (Programme National d'Excellence Spécialisé, 2005-2007), PHRC 2004-2007 Micromethods in Pathology. This work was also supported by the EpiPro network (S. Gazzeri and S. Khochbin) supported by INCa and by the EpiMed program (Grenoble plateforme) supported by Rhône-Alpes canceropôle (CLARA).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

**Requests for reprints:** Sylvie Gazzeri, Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot BP170, 38042 Grenoble Cedex 09, France. Phone: 33-4-76-54-94-76; Fax: 33-4-76-54-94-13; E-mail: Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr.

© 2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0869

### Translational Relevance

In spite of improvements in diagnosis and treatment, lung cancer is the leading cause of death from cancer, with a 10-year overall survival of less than 10%. Although surgical resection of lung tumors restricted to the chest is in many cases the most effective method to control the disease, it might not be sufficient or curative for a proportion of patients with stage I non-small cell lung cancer (NSCLC) as inferred from 30% death within 5 years after surgery. The use of adjuvant chemotherapy is still a matter of debate for these patients. Several high-throughput analyses have suggested that stage I NSCLC might represent heterogeneous prognostic subgroups. In this study, by using a simple immunohistochemical approach with a specific antibody, we show that the status of histone H4K20 trimethylation stratifies patients with stage I adenocarcinoma tumors for risk of cancer death. Therefore, studying H4K20me3 status might represent a useful genomic tool to identify prognostic subgroups of stage I patients that could justify the use of adjuvant chemotherapy.

Suppressor genes in the cancer cell can be reduced or eliminated as an alternative mechanism to genetic mutation. Chromatin modifications represent another mechanism of epigenetic regulation. They occur at the level of histones that are the targets for several posttranslational covalent modifications that allow regulable contacts with the underlying DNA and thus affect higher-order chromatin structures (9). In this regard, histone covalent modifications influence a multitude of cellular processes (10–12), and aberrant histone acetylation and methylation patterns were recently reported in human tumors (13, 14). Histone H4 is one of the nucleosomal core histones. Acetylation and methylation of lysine residues in its NH<sub>2</sub>-terminal tail have been reported to affect higher-order chromatin structure, transcriptional regulation, and DNA repair, suggesting that alteration of these histone marks might play a role in tumorigenesis (12). Accordingly, loss of lysine 16 acetylation and lysine 20 trimethylation has been recently shown in cancer cells from liver, breast, and colon as well as in lymphoma (1, 14, 15). The aim of this study was to analyze the role of histone H4 modifications in lung cancer. We examined the acetylation and methylation pattern of histone H4 in human normal lung and NSCLC by using immunohistochemistry and specific antibodies, and analyzed the relationships with clinicopathologic parameters and clinical outcome. Our results show a global distorted pattern of histone H4 modifications in lung tumors and provide evidence that loss of H4K20 trimethylation plays a crucial role in lung tumorigenesis.

### Materials and Methods

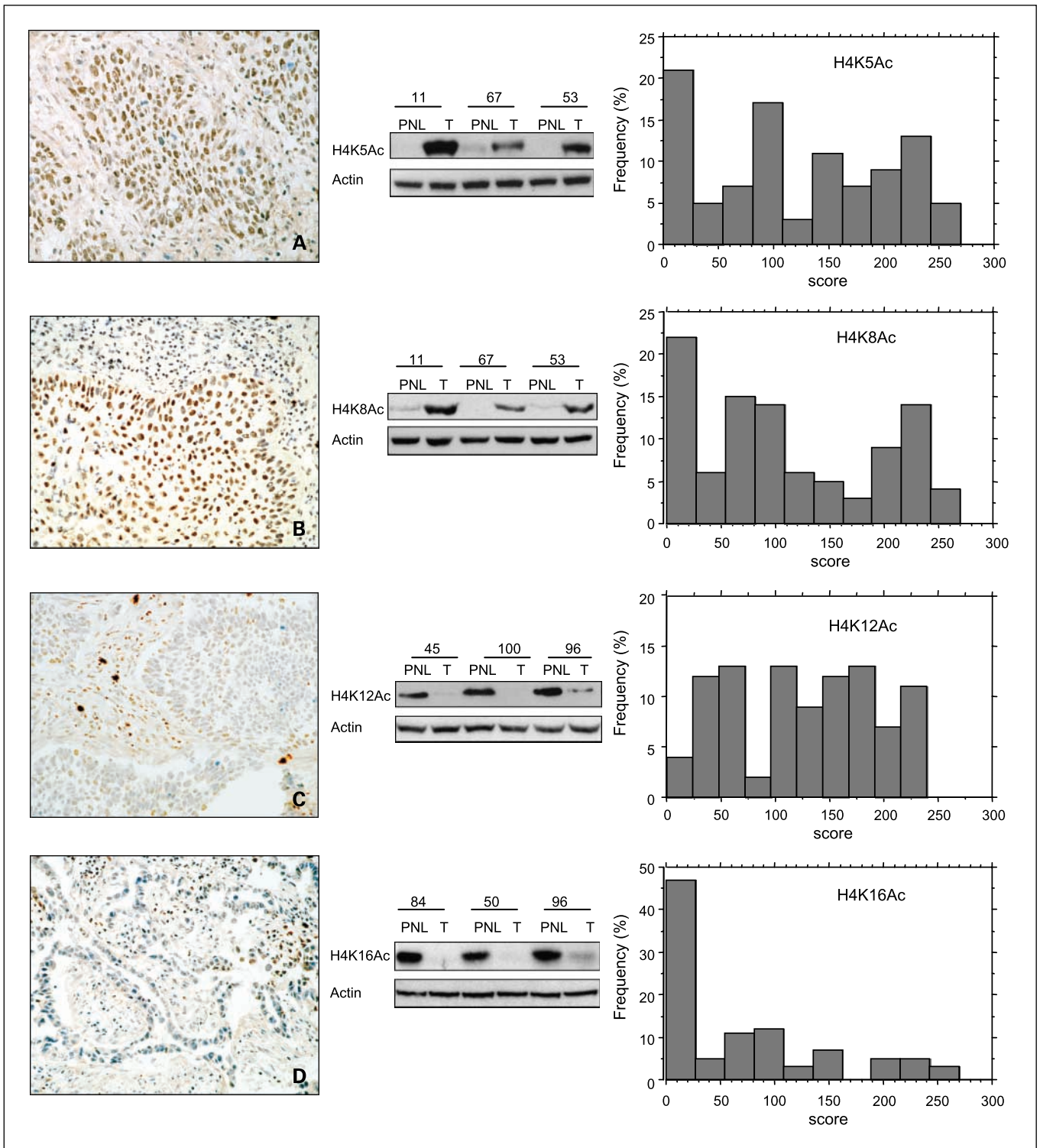
**Patients and tissue samples.** Patient selection was based on consecutive collection of cases in the tumor bank balanced between histopathologic subtypes, and completeness of clinical data (date and cause of death, at least 5 y of follow-up, absence of chemotherapy given before or after surgical resection). One hundred and fifty-seven human lung tumors were included in this study. Tissue samples were taken at surgical resection of lung tumors in all cases. Tumor tissue and normal lung parenchyma taken at distance from the bulk of the tumor were

immediately frozen and stored at -80°C until use. For histologic classification, tumor samples were fixed in formalin and diagnosis was made on paraffin-embedded material using the current WHO classification of lung criteria (16). They consisted of 50 squamous cell carcinoma (13 stage I, 11 stage II, 25 stage III, and 1 stage IV) and 107 adenocarcinoma (80 stage I, 7 stage II, 17 stage III, and 3 stage IV). Tumors were used according to the ethical laws of France. The median time of follow-up calculated by the Schemper and Smith method (17) was 67 mo. Bronchial intraepithelial preinvasive lesions were obtained from lung resection done for lung cancer in seven patients. Preinvasive lesions were classified according to the WHO classification criteria (16). Squamous metaplasia and mild dysplasia were considered as low-grade dysplasia, whereas moderate dysplasia, severe dysplasia, and carcinoma *in situ* were considered as high-grade dysplasia.

**Immunohistochemistry.** Seven-micrometer-thick serial frozen sections were incubated at 42°C with primary antibodies antiacetylated H4K5 (Abcam, 1/100), antiacetylated H4K8 (Abcam, 1/2,000), antiacetylated H4K12 (Upstate, 1/750), antiacetylated H4K16 (Abcam, 1/400), and antitrimethylated H4K20 (Upstate, 1/800). Fixation was with 3.7% paraformaldehyde for 10 min. A three-stage indirect immunoperoxidase technique was done using the Ventana Discovery Autostainer (Ventana Medical International, Inc.), which guarantees full reproducibility of immunostaining. Negative control consisted in omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype. Immunostaining was done on whole sections and evaluated independently by two pathologists (E.B. and S.L.) who were blinded to all clinicopathologic variables. Selectivity and validation of the antibodies was ensured by recognition of different pattern of stained cells for acetylated (Ac) H4K5 (H4K5Ac), H4K8Ac, H4K12Ac, H4K16Ac, and trimethylated (me3) H4K20 (H4K20me3) on serial sections of 3-μ intervals, as well as on tumor blots. Reproducibility of staining was validated in 10 cases stained at several-days interval times: the variability between the two score assessments by pathologists was less than 10% of global score. Scores of staining were ascribed to each case and antibody by multiplying the percentage of positive cells (0 to 100%) by the staining intensity (0, null; 1, faint; 2, moderate; 3, strong). They ranged from 0 to 300. Normal bronchi and alveolar epithelial cells were used as positive internal controls. These normal structures exhibited low staining scores for H4K5Ac and H4K8Ac (20 and 40, respectively) and high staining scores for H4K12Ac, H4K16Ac, and H4K20me3 (300, 240, and 250, respectively).

**Immunoblotting.** Immunoblotting was done on 15 representative tumor samples and their matched normal lung tissues. Proteins were extracted from sections taken at the immediate vicinity of those studied by immunohistochemistry. Immunoblotting experiments were done as previously described (18) with the same antibodies used for immunohistochemistry. Dilutions of the primary antibodies were 1:500 for H4K5Ac and 1/1,000 for H4K8Ac, H4K12Ac, H4K16Ac, and H4K20me3 antibodies. To ensure equal loading and transfer of proteins, the membranes were subsequently probed with a polyclonal actin antibody (1:500; Sigma-Aldrich).

**Quantitative real time-PCR.** Total RNA was extracted from normal and human lung tumors samples using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using Eppendorf Biophotometer AG22331, and RNA integrity was assessed using the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Quantitative real-time reverse transcript (RT)-PCR for *Suv4-20H1* and *Suv4-20H2* mRNA (Genbank accession no. NM\_017635 and NM\_032701) was done on Stratagene MX3005P apparatus. One microgram of total RNA was subjected to cDNA synthesis with Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and subsequently amplified during 40 PCR cycles (10 min at 95°C, 15 s at 95°C, 1 min at 60°C) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The specific primers used for mRNA amplification were as follows: *Suv4-20H1* forward: 5'-CGCCCTGCACCTACATAACT-3'; reverse: 5'-ACACTTTGCCTCCCC-TTTT-3'; *Suv4-20H2* forward: 5'-CGGTGAGAATGACTTCAGCA-3';



**Fig. 1.** Global modification of histone H4 acetylation in lung tumors. Left, immunostaining of lung cancer tissue on frozen sections using antiacetylated H4K5, H4K8, H4K12, and H4K16 antibodies (immunoperoxidase,  $\times 200$ ). Strong nuclear staining of acetylated H4K5 (A) and H4K8 (B) in squamous cell carcinoma. Low nuclear staining of acetylated H4K12 (C) and H4K16 (D) in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, respectively. Middle, representative Western blots showing a high level of acetylated H4K5/K8 and low level of acetylated H4K12/K16 in lung tumors compared with their matched normal lung tissues. Hybridization with actin antibody was used as a loading control. Right, distribution of staining for the four antibodies across all the 100 tumor samples; Y axis, fraction of samples showing the indicated score of staining (X axis).

reverse: 5'-CTCACAGGTGTGGCATTAC. In parallel, RT-PCR detecting the reference gene *glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase* was done for each sample. Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of *Suv4-20H1* or *Suv4-20H2* copy number (target

gene) to *glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase* mRNA copy number multiplied by 100, thus normalizing *Suv4-20H1* or *Suv4-20H2* mRNA expression for sample to sample differences in RNA input.



**Statistical analyses.** To test whether variables were correlated within patients, we used the Spearman test. Descriptive analyses comparing continuous and two-level categorical variables were carried out using the Mann-Whitney test. The  $\chi^2$  test was used to test the association between two categorical variables. Overall survival was calculated from the date of surgery to the last day of follow-up or cancer death. Univariate survival analyses were done using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Statistics were done using Statview 4.1 software (Abacus Concept Inc.). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

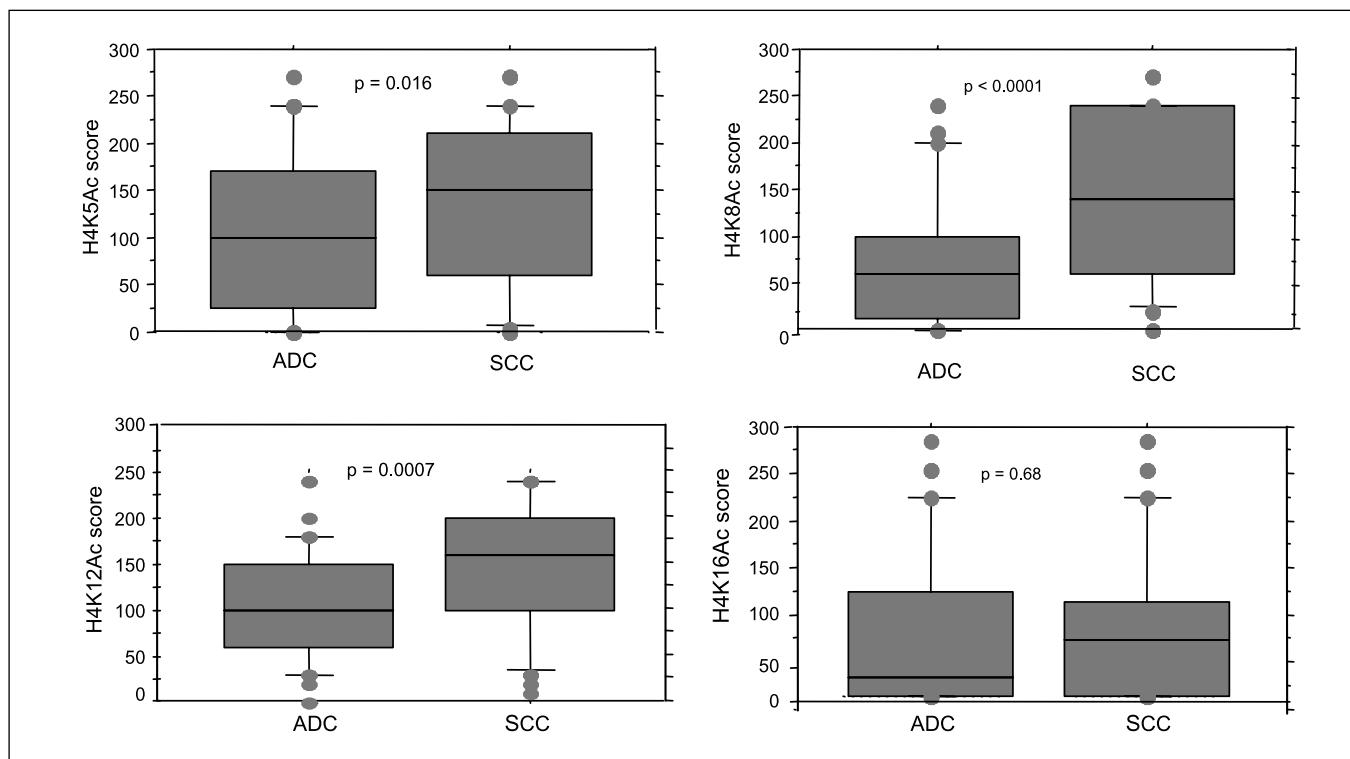
## Results

**Global modification of histone H4 acetylation in lung cancer.** One hundred NSCLCs comprising 50 squamous cell carcinoma and 50 adenocarcinoma were analyzed by immunohistochemistry using antibodies specifically recognizing the acetylated lysines 5 (K5), K8, K12, or K16 residues of histone H4. Low levels of nuclear H4K5Ac and H4K8Ac staining were found in normal lung parenchyma adjacent to or distant from tumor bulk, whereas high levels of immunostaining were observed for H4K12Ac and H4K16Ac (Fig. 1; Supplementary Fig. S1). Therefore, these data show that the lysine residues of the H4 tail exhibit a differential pattern of acetylation in the normal lung.

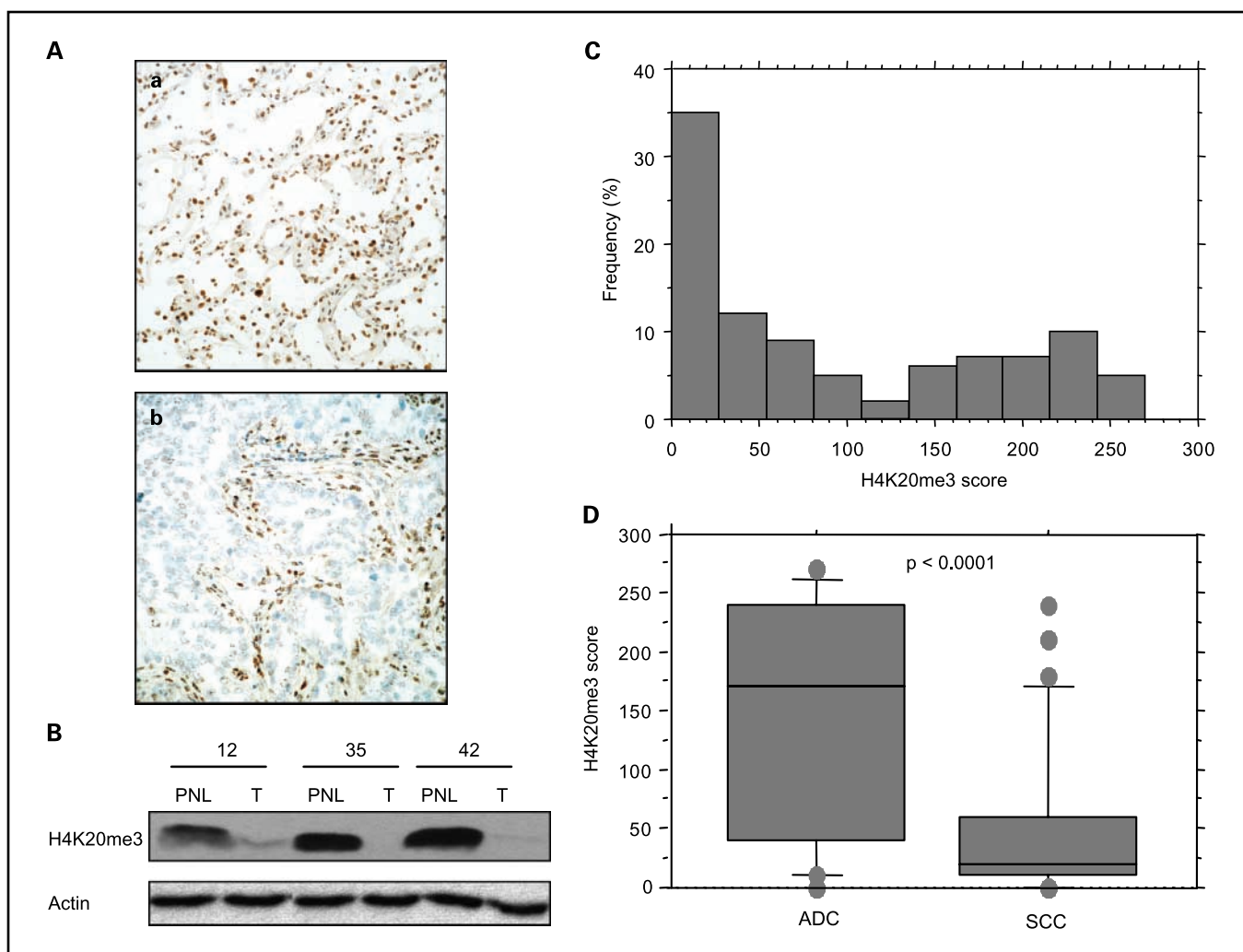
As compared with normal lung parenchyma, the study of lung tumors revealed a general increase of H4K5Ac/H4K8Ac expression (Fig. 1A and B) and a decrease of H4K12Ac/H4K16Ac expression (Fig. 1C and D). The immunohistochemistry data were validated for each antibody by immunoblotting in 15 representative tumor samples and their matched normal lung tissues. Figure 1 (middle) illustrates an example of the

results. As compared with normal lung, acetylation of H4K16 was clearly down-regulated in lung tumors, with more than 70% of samples displaying a score between 0 and 100 (Fig. 1, right). Distribution of H4K16Ac staining was very similar between both histologic types (Fig. 2). By contrast, a broader distribution of H4K5Ac, H4K8Ac, and H4K12Ac stainings was observed. Furthermore, high levels of H4K5Ac and H4K8Ac were more frequent in squamous cell carcinoma whereas low levels of H4K12Ac were predominantly observed in adenocarcinoma (Fig. 2; Mann-Whitney,  $P = 0.016$ ,  $P < 0.0001$ , and  $P = 0.0007$  respectively). A strong association between H4K8Ac and H4K12Ac was observed in squamous cell carcinoma (Spearman's correlation coefficient,  $r = 0.6038$ ;  $P < 0.0001$ ) whereas H4K12Ac and H4K16Ac were correlated in adenocarcinoma (Spearman's correlation coefficient,  $r = 0.49$ ;  $P = 0.0009$ ). A strong association between H4K5Ac and H4K8Ac (Spearman's correlation coefficient,  $r = 0.409$ ;  $P < 0.0001$ ) or H4K5Ac and H4K12Ac (Spearman's correlation coefficient,  $r = 0.347$ ;  $P = 0.0007$ ) was also found independently of the histologic type. The significance of these correlations is still unclear but could reflect a thorough crosstalk between histone H4 modifications as recently described for histone H3 (19, 20). No additional significant relationships were observed between H4K5Ac, H4K8Ac, H4K12Ac, and H4K16Ac stainings and clinicopathological parameters (stage, clinical outcome).

**Loss of trimethylation at H4K20 in lung tumors.** The same series of lung carcinoma was studied for H4K20me3 by immunohistochemistry using a specific antitrimethylated K20 antibody. As shown in Fig. 3A, a global loss of H4K20me3 was observed in lung tumors (b) compared with normal lung that expressed strong H4K20me3 staining (a). These results were



**Fig. 2.** Distribution of H4K5Ac, H4K8Ac, H4K12Ac, and H4K16Ac staining scores according to histologic type of lung tumors. Statistical analyses were done using the Mann-Whitney test.

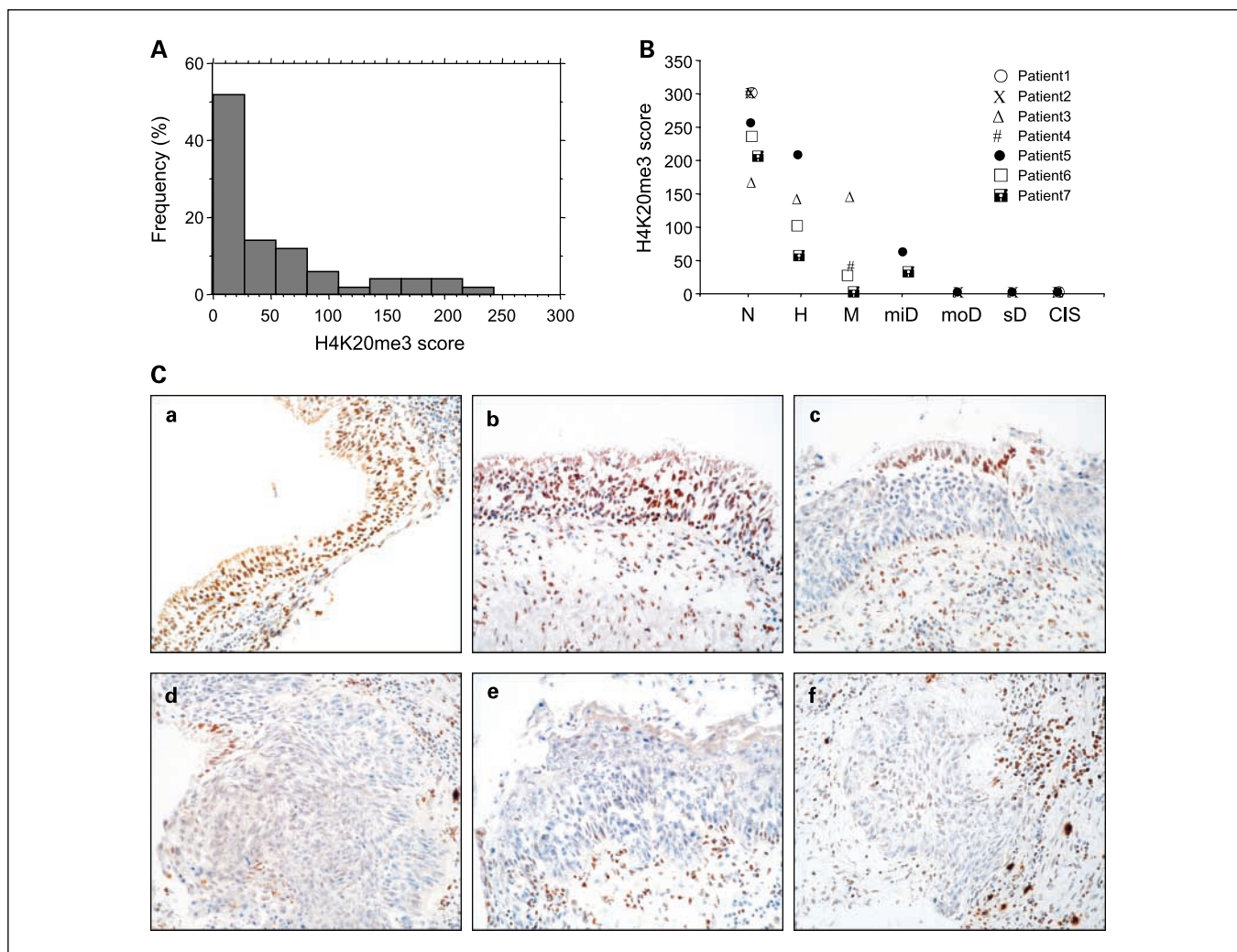


**Fig. 3.** Global modification of H4K20 trimethylation in lung tumors. *A*, immunostaining of normal lung parenchyma and lung cancer tissue on frozen sections using antitrimethylated H4K20 antibody. (*a*; immunoperoxidase,  $\times 200$ ). Strong nuclear staining of trimethylated H4K20 is observed in normal lung parenchyma (*b*). Loss of H4K20me3 staining in an adenocarcinoma. *B*, representative Western blot showing decreased expression of trimethylated H4K20 in lung tumors compared with their matched normal lung tissues. Hybridization with actin antibody was used as a loading control. *C*, distribution of H4K20me3 staining across all the 100 tumor samples; Y axis, fraction of samples showing the indicated score of staining (X axis). *D*, distribution of H4K20me3 scores according to histologic type of lung tumors. Statistical analysis was done using a Mann-Whitney test.

confirmed by Western blotting in representative cases (Fig. 3B). The distribution of H4K20me3 staining scores showed that 70% of the tumor samples had a H4K20me3 score between 0 and 100 (Fig. 3C). As the mean score of the normal lung was 250, it can be stated that trimethylation of H4K20 is frequently and strongly decreased in lung tumors. Strikingly, loss of H4K20me3 was more frequent in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma (Fig. 3D; Mann-Whitney,  $P < 0.0001$ ). Moreover, a strong inverse association between H4K8Ac and H4K20me3 modifications was detected in adenocarcinoma (Spearman's correlation coefficient,  $r = -0.487$ ;  $P = 0.0008$ ).

**Trimethylation at H4K20 is lost in squamous preneoplasia.** Trimethylation of H4K20 was strongly down-regulated in squamous cell carcinoma as revealed by the distribution of H4K20me3 scores (67% of cases with a score  $< 60$ ; Figs. 3D and 4A). In these tumors, no relationship was observed between H4K20me3 immunohistochemistry status and stage or clinical outcome, but we noticed that a large proportion (69%) of stage I tumor samples exhibited very low levels of

H4K20me3 (score  $< 60$ ). This led us to investigate the possibility that this histone modification could take place early during squamous carcinogenesis. Stepwise morphologic changes accompanying this transformation process have been described in smokers and include squamous hyperplasia, metaplasia, dysplasia of progressive severity (mild, moderate, and severe), and carcinoma *in situ* (21). According to the criteria provided by the WHO classification of lung cancers and precursors, metaplasia, dysplasia, and carcinoma *in situ* represent preinvasive lesions of the bronchial epithelium (16) whereas basal hyperplasia are very common reactive lesions in adults. To assess whether loss of trimethylation at H4K20 might be involved in the development of squamous cell carcinoma, we analyzed its immunohistochemical status in a series of 18 preinvasive lesions observed in 7 surgical resection frozen specimens for cancer. They consisted of four basal hyperplasia, four metaplasia, two mild dysplasia, two moderate dysplasia, two severe dysplasia, and four carcinoma *in situ*. As compared with normal bronchial epithelium in which basal cells



**Fig. 4.** Modification of H4K20 trimethylation in squamous preinvasive lesions. *A*, distribution of H4K20me3 staining across squamous cell carcinoma; Y axis, fraction of samples showing the indicated score of staining (*X axis*). *B*, distribution of H4K20me3 staining across squamous preinvasive lesions; Y axis, score of H4K20me3 staining for the indicated preinvasive lesions (*X axis*). N, normal lung; H, hyperplasia; M, metaplasia; miD, mild dysplasia; moD, moderate dysplasia; sD, severe dysplasia; CIS, carcinoma *in situ*. *C*, immunostaining on frozen sections of squamous preneoplasia from patient 7 using antitrimethylated H4K20 antibody. *a*, strong nuclear immunostaining in normal bronchial epithelium. *b*, immunostaining in hyperplastic bronchial epithelium. Note the absence of staining in some suprabasal cells. *c*, immunostaining in a moderate dysplasia surrounded by severe dysplasia. Note the strong positive staining of epithelial cells above dysplastic cell. *d*, immunostaining in a severe dysplasia. *e*, immunostaining in CIS. *f*, immunostaining in invasive carcinoma. *a, f*, immunoperoxidase staining,  $\times 200$ .

exhibited a strong nuclear staining, we noticed that hyperplasia displayed a less intense H4K20me3 immunostaining with the appearance of some negative nuclei. Strikingly, the level of H4K20me3 strongly decreased with disease progression from cell hyperplasia to metaplasia, dysplasia (mild, moderate, severe), and then to carcinoma *in situ* (Fig. 4B and C). Therefore, these results show that trimethylation of H4K20 is lost in early precursors lesions of squamous cell carcinoma.

**Loss of H4K20me3 correlates with a poor survival in stage I adenocarcinoma patients.** In contrast with squamous cell carcinoma, the down-regulation of H4K20me3 was less frequent in adenocarcinoma (28% of cases with a score  $< 60$ ; Fig. 3D). Interestingly, the distribution of H4K20me3 scores clearly identified two populations of stage I adenocarcinoma tumor samples with distinct clinical outcome, a longer cancer-related survival being observed for patients whose tumors expressed higher levels (score  $> 100$ ; Fig. 5A;  $P = 0.0125$ ). To validate the prognostic power of H4K20me3 in early-stage

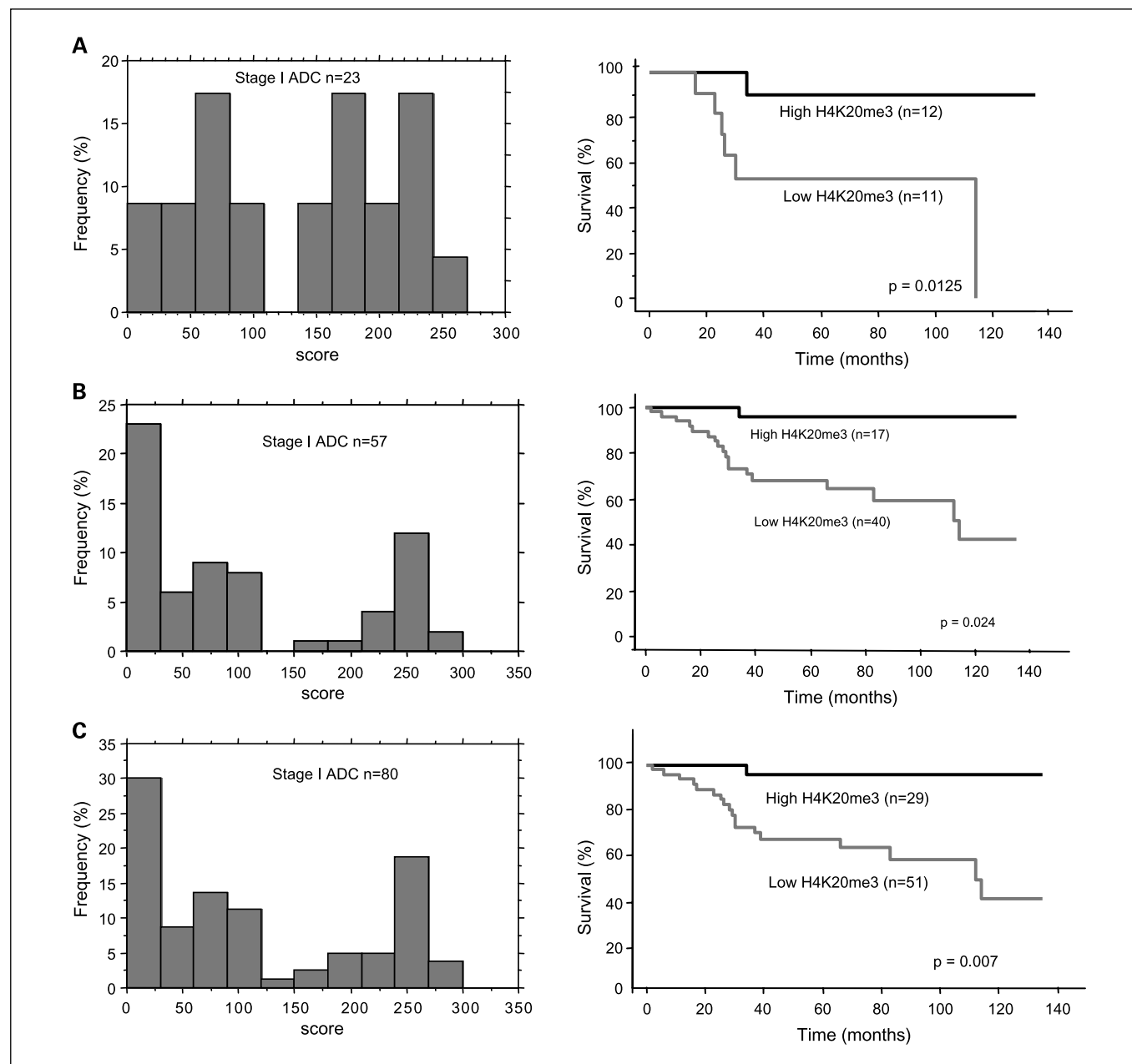
adenocarcinoma, we studied H4K20me3 immunostaining in another set of stage I adenocarcinoma. Analysis of these new series of 57 stage I adenocarcinoma samples confirmed the existence of two distinct H4K20me3 staining groups (Fig. 5B). According to Kaplan-Meier analysis recording cancer related death, 30% of low H4K20me3 staining carriers (score  $\leq 100$ ) had died from lung cancer at 5 years after diagnosis compared with 5% of noncarriers. The median survival time for low-H4K20me3 carriers was  $114 \pm 2.8$  months, whereas it was not reached for patients who had high H4K20me3. Therefore, carrying low levels of H4K20me3 was associated with reduced survival for patients with stage I adenocarcinoma compared with cases with high levels of H4K20me3 ( $P = 0.024$ ). Finally, the influence of loss of H4K20 trimethylation was evaluated on the entire stage I population combining test series and validation cases. In this population of 80 stage I adenocarcinoma, the median survival time was  $140 \pm 4$  months. The results showed that low H4K20me3 staining correlated with



shorter cancer-related survival (median  $114 \pm 2.8$ ) compared with cases with high H4K20me3 staining (median nonreached,  $P = 0.007$ ). Age (<60 years versus >60 years), sex (male versus female), and T stage (IA versus IB) were not associated with survival in univariate analyses. Thus, we did not associate these variables with H4K20me3 in a multivariate Cox proportional hazard model.

**Loss of *Suv4-20h2* expression correlates with reduced H4K20me3.** The mechanistic basis of H4K20me3 modification may be related to altered expression of various histone-modifying enzymes. Enzymes that demethylate H4K20 have not yet been identified. By contrast, it is well-known that

trimethylation of histone H4 lysine 20 is catalyzed by the histone methyltransferases *suv4-20h1/2* (also called KMT5B/C; ref. 22). To uncover the mechanisms involved in H4K20me3 deregulation in lung tumors, we analyzed the expression of *suv4-20h1/2* histone methyltransferases. Because available *suv4-20h1/2* antibodies did not work for immunohistochemical application in our hands, we did quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from 31 representative tumor samples exhibiting either very low ( $\leq 60$ ) or very high ( $\geq 210$ ) scores of H4K20me3 according to immunohistochemistry, as well as from their matched normal lung. Tumors were considered having an altered expression of *suv4-20h1* or



**Fig. 5.** H4K20me3 influences survival of patients with stage I adenocarcinoma. *A*, tested series of 23 stage I adenocarcinoma (ADC) patients. *B*, validation series of 57 independent stage I ADC patients. *C*, global population of stage I ADC patients combining test series and validation cases (80 cases). *A*, *B*, *C*, left, distribution of H4K20me3 staining identifies two groups of tumors with low ( $\leq 100$ ) or high ( $>100$ ) H4K20me3 score; Y axis, fraction of samples showing the indicated score of staining (X axis). Right, Kaplan-Meier analysis recording cancer related death of the two groups of patients according to high ( $>100$ ) or low ( $\leq 100$ ) H4K20me3 score.

*suva-20h2* when a modification of at least 50% of the transcript level was observed compared with matched normal lung. The data showed that 68% (21 of 31) and 55% (17 of 31) of tumor samples had a decreased level of *suva-20h1* and *suva-20h2* transcripts, respectively, compared with normal lung (Table 1), thereby indicating that expression of *suva-20h* transcripts is globally down-regulated in lung tumors. Importantly, we observed that low levels of H4K20me3 were associated with a decrease of *suva-20h2* transcripts ( $P = 0.019$ ). By contrast, no significant association was found between H4K20me3 staining and *suva-20h1* mRNA level ( $P = 0.37$ ). Altogether these results suggest that alteration of *suva-20h2* expression might play a role in the deregulation of H4K20 trimethylation in lung tumors.

## Discussion

The prognosis of lung cancer is affected by the difficulties of diagnosing early-stage disease amenable to surgery. Thus, novel diagnostic, risk assessment, and therapeutic approaches are urgently needed for this common and devastating cancer. Epigenetic has become an increasingly important aspect of cancer biology. Epigenetic changes encompass an array of molecular modifications to both DNA and chromatin, the most extensively investigated of which is DNA methylation. Recently, aberrant histone acetylation and methylation patterns have been reported in tumors (13, 14), suggesting that perturbation in chromatin structure may also contribute to tumorigenesis. In this study, we show that lung tumors exhibit an altered pattern of histone H4 modifications compared with normal lung. Furthermore, we show that trimethylation at lysine 20 of histone H4 is dramatically reduced in squamous preneoplastic lesions and provide evidence that loss of H4K20me3 predicts a bad prognosis for patients with early-stage adenocarcinoma. Altogether, our results highlight the role of chromatin disorders in lung carcinogenesis and support the idea that posttranslational modifications of histone H4 are relevant steps in the lung transformation process.

It is becoming clear that aberrant modification of histones can play a major role during the multistep process of cancer development. In this study we show that human lung tumors display a clear down-regulation of H4K20 trimethylation. As loss of H4K20 trimethylation has been reported in lymphoma, colon, and breast cancer as well as in various cancer cell lines (14, 15), our results are consistent with the notion that aberrant H4K20me3 is a common hallmark of human cancer. Adenocarcinoma and squamous cell carcinoma are the main histologic subtypes of NSCLC. They can be distinguished not

only on the basis of pathologic features but also by distinct molecular alterations that contribute to their development. This is best illustrated by the quite selective occurrence of Ras and epidermal growth factor receptor mutations in adenocarcinoma (5). In this study, we show that aberrant H4K20 trimethylation is frequent in squamous cell carcinoma and occurs early in preneoplastic precursor lesions in which the level of H4K20me3 strongly decreases along the sequential progression from cell hyperplasia to metaplasia, dysplasia, and then to carcinoma *in situ*. In contrast, whereas altered trimethylation of H4K20 is less frequent in adenocarcinoma, it was found to influence the disease outcome. Altogether, these data support the idea that aberrant trimethylation of H4K20 might play a role in the early steps of squamous cell carcinoma development, whereas it could contribute to the progression and aggressivity of adenocarcinoma. However, we have not excluded the possibility that atypical adenomatous hyperplasia, the precursor lesions of adenocarcinoma with bronchioloalveolar features, display loss of H4K20 trimethylation. These lesions are not available in frozen lung tissue, a requirement for our antibody performance.

The mechanism involved in the loss of H4K20me3 is not yet elucidated. Two histone methyltransferases, namely *suva-20h1* and *suva-20h2*, are responsible for H4K20 trimethylation (22). Importantly, we show that loss of H4K20me3 is associated with a decrease of *suva-20h2* transcripts. These data suggest that disruption of *suva-20h2* expression might contribute to altered H4K20me3 pattern at least in lung tumors. Although we cannot exclude the possibility that yet unidentified demethylase(s) specific for H4K20me3 might be abnormally expressed in cancer cells, it is important to notice that similar correlation between H4K20me3 and *suva-20h2* expression has been previously reported in human breast cancer cell lines as well as in a model of hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats (1, 15).

Approximately 45% of all lung carcinoma are limited to the chest, where surgical resection is not only an important therapeutic modality, but in many cases, the most effective method to control the disease. However, surgical treatment might not be sufficient or curative for a proportion of patients with NSCLC and especially adenocarcinoma, as inferred from the 30% death within 5 years after surgery at stage I. Adjuvant chemotherapy is presently considered as a standard of care because beneficial effects have been shown in stages IIA to IIIA (23). Some controversies still exist, however, over the effect of adjuvant chemotherapy in stage IB (24, 25). Based on a gene expression profile called the lung metagene model,

**Table 1.** Correlation between H4K20me3 and *Suva-20h1/2* status in lung tumors

		<i>Suva-20h1</i> *		<i>P</i>	<i>Suva-20h2</i> *		<i>P</i>
		NI	Low		NI	Low	
H4K20me3 †	High	6	9	0.37	10	5	0.019
	Low	4	12		4	12	

Abbreviation: NI, normal, low.

\*Expression level according to quantitative RT-PCR; NI  $\leq 50$ ,  $\chi^2$  test.

† Immunohistochemical score, high  $\geq 210$ , low  $\leq 60$ .

Potti et al. have identified a subgroup of patients with stage IA disease who were at high risk of recurrence (26), thereby indicating that stage I NSCLC might represent heterogeneous prognostic subgroups. Recently, acetylation of H3K9 was reported to predict outcome of patients with stage I adenocarcinoma (27). In this study we show that loss of histone H4K20 trimethylation correlates with a poor survival for stage I adenocarcinoma patients. Altogether these data indicate that histone modifications might represent useful genomic tools to identify prognostic subgroups of patients that could justify the use of adjuvant chemotherapy, and suggest that analysis of combined histone modifications may

help to better define prognostic subgroups. Further prospective studies are now required to evaluate their predictive power to chemosensitivity.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Acknowledgments

We thank Pascal Perron, Céline Lampréa, Laurence David-Boudet, and Sylvie Veirenc for technical assistance.

### References

- Pogribny IP, Ross SA, Tryndyak VP, Pogribna M, Poirier LA, Karpinets TV. Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis* 2006;27:1180–6.
- Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 2000;355:479–85.
- Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:379–92.
- Mao L, Lee JS, Kurie JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:857–62.
- Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 2002;21:7421–34.
- Shames DS, Girard L, Gao B, et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3:e486.
- Bowman RV, Yang IA, Semmler AB, Fong KM. Epigenetics of lung cancer. *Respirology* 2006;11:355–65.
- Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, Laird PW, Laird-Offringa IA. The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. *Diseases* 2007;23:5–30.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074–80.
- Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 2007;128:721–33.
- Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007;128:707–19.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
- Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005;435:1262–6.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391–400.
- Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther* 2006;5:65–70.
- Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 2005;40:90–7.
- Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials* 1996;17:343–6.
- Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene* 2002;21:2750–61.
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, et al. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 2007;449:933–7.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, et al. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* 2007;449:928–32.
- Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking, 1955-1960 vs. 1970-1977. *N Engl J Med* 1979;300:381–5.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, et al. A silencing pathway to induce H3-9 and H4-20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 2004;18:1251–62.
- Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351–60.
- Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2589–97.
- Douillard J, Rosell R, Delena M, et al. ANITA: phase III adjuvant vinorelbine (N) and cisplatin (P) versus observation in completely resected (stage I-III) non small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts): final results after 70-month median follow-up. On behalf of the Adjuvant Navelbine International Trialist Association. 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol* 2005;23(16S):7013.
- Potti A, Mukherjee S, Petersen R, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:570–80.
- Barlesi F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, et al. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:4358–64.

---

## **II. Le facteur de transcription E2F1 est régulé par Tip60 en réponse aux stress génotoxiques.**

### **1. Introduction**

Ce projet découle directement d'une étude récente menée au sein du laboratoire mettant en évidence le rôle critique de la HAT Tip60 dans l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN, suite à une exposition des cellules aux carcinogènes du tabac et/ou à des agents alkylants (Eymin, B. et al, 2006). Ces données nous ont ainsi conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la dérégulation d'une signalisation par acétylation, dépendante de Tip60, pouvait contribuer au développement tumoral via la modulation du statut et/ou des fonctions biologiques de protéines non-histones.

Outre ses fonctions bien connues dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, le facteur de transcription E2F1 apparaît aussi comme un élément important de la réponse aux dommages de l'ADN (Lin, W.C. et al, 2001 ; Stevens, C. et al, 2003). De plus, il est connu que son statut et ses fonctions biologiques sont étroitement régulés par acétylation et notamment par la HAT P/CAF, en réponse à certains dommages de l'ADN (Pediconi, N. et al, 2003). De façon intéressante, nous avons décrit au laboratoire l'existence d'une expression différentielle de E2F1 dans les cancers pulmonaires (Eymin, B. et al., 2001) et montré le rôle de cette protéine dans la réponse cellulaire induite par les agents génotoxiques (Merdzhanova, G. et al, 2008).

Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la protéine E2F1 pourrait être une nouvelle cible de la HAT Tip60 et que cette dernière pourrait contrôler, au moins en partie, son expression et ses fonctions biologiques.

---

## 2. Résultats

### 2.1 La HAT Tip60 interagit avec le facteur de transcription E2F1 et l'acétyle sur ses lysines 120 et 125

En accord avec notre hypothèse, nous avons montré par des expériences de co-immunoprécipitation et de GST-pull down que Tip60 interagit de façon directe avec E2F1. De plus, l'observation d'une forte co-localisation entre les deux protéines par immunofluorescence en microscopie confocale est en accord avec ce résultat.

Via la réalisation d'un test d'acétylation *in vitro* et par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-lysine acétylée *in vivo*, nous montrons que Tip60 possède une activité acétyltransférase envers la protéine E2F1. A l'aide de mutants de délétion de E2F1, nous avons localisé la région ciblée entre les acides aminés 1 et 284 de E2F1. Puis, par mutagenèse dirigée, nous avons dans un premier temps montré que Tip60 acétyle E2F1 au niveau des résidus 117/120/125, puis, dans un second temps, en mutant deux à deux les lysines de ce groupe, que les résidus 120 et 125 de E2F1 sont spécifiquement ciblés par Tip60. Il est important de souligner que ce sont les deux lysines les plus conservées de ce groupe, suggérant un rôle conservé de cette acétylation au cours de l'évolution.

### 2.2 L'acétylation de E2F1 par Tip60 conduit à sa stabilisation

Nous avons montré par Western Blotting et microscopie confocale que la protéine E2F1 s'accumule en réponse à l'expression ectopique de Tip60. En accord avec ce résultat, la neutralisation de Tip60 induit une diminution de l'expression physiologique de E2F1 et la demi-vie de E2F1 est augmentée en réponse à Tip60.

De façon intéressante, l'utilisation d'un mutant catalytique de Tip60 dépourvu d'activité HAT n'entraîne pas d'accumulation de E2F1, suggérant que l'acétylation de E2F1 par Tip60 est indispensable à ce phénomène. En accord avec cette hypothèse, l'expression d'un mutant de E2F1 dont les lysines 120 et 125 (acétylées par Tip60) ont été mutées en arginine (acide aminé non acétylable), n'est pas affectée par Tip60.

## 2.3 E2F1 s'accumule sous une forme acétylée dépendante de Tip60 en réponse au cisplatine

De façon importante, nous observons l'accumulation de E2F1 sous une forme acétylée dépendante de la HAT Tip60 dans des cellules H358 exposées durant 24h à un traitement au cisplatine (50 $\mu$ M). L'accumulation de E2F1 médiée par Tip60 dans ce contexte n'est pas impliquée dans l'apoptose induite en réponse au cisplatine, mais corrèle avec la surexpression de ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1), une protéine essentielle au mécanisme de réparation par excision de nucléotides, le système de réparation majeur des lésions de l'ADN induites par cet agent. De manière intéressante, l'accumulation de ERCC1 en réponse au cisplatine dépend à la fois de Tip60 et de E2F1.

## 3. Conclusion

Ces résultats identifient Tip60 comme un nouveau régulateur de l'expression et des fonctions biologiques de E2F1. Ils indiquent aussi que ces deux protéines jouent un rôle coordonné dans la réponse aux dommages de l'ADN induits par le cisplatine et suggèrent leur implication dans le mécanisme de réparation par excision de nucléotides.

## 4. Article 2

DNA Damage-responsive acetylation of E2F1 by Tip60.

A. Van Den Broeck, D. Nissou, P. Ozenne, E. Coll, C. Brambilla, S. Khochbin, E. Brambilla, B. Eymin, and S. Gazerri.

*En préparation.*

# DNA Damage-responsive acetylation of E2F1 by Tip60

Arnaud Van Den Broeck<sup>1,2</sup>, Damien Nissou <sup>1,2</sup>, Peggy Ozenne <sup>1,2</sup>, Edwige Coll<sup>2,3</sup>, Christian Brambilla<sup>1,2</sup>, Saadi Khochbin<sup>2,3</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2</sup>, Beatrice Eymin<sup>1,2</sup> and Sylvie Gazzeri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble Cedex 09, France, <sup>2</sup> Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble Cedex 09, France, <sup>3</sup> Equipe Epigénétique et signalisation cellulaire, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble Cedex 09, France,

**Grant support:** Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U823, Equipe Labellisée LIGUE 2007, INCa (Programme National d'Excellence Spécialisé, 2005-2007), PHRC 2004-2007 Micromethods in Pathology. This work was also supported by EpiPro network (SG and SK) supported by INCa and by EpiMed program (Grenoble plateforme) supported by Rhône-Alpes cancéropôle (CLARA).

## Request for reprints:

Sylvie Gazzeri

Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot BP170, 38042 Grenoble Cedex 09 France

Phone: 33 4 76 54 94 76, Fax: 33 4 76 54 94 13, [Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr](mailto:Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr)

**Running Title:** Tip60 regulates E2F1 acetylation

**Key words:** E2F1, Tip60, acetylation, DNA repair

**Abstract**

It is now clear that beside its central role in coordinating cell cycle progression, the E2F1 transcription factor integrates cellular signals to genotoxic stresses. Here, new insights into the involvement of E2F1 in the DNA damage response are provided. We show that Tip60 directly interacts with E2F1 and promotes its accumulation through acetylation of its Lysine residues 120/125. Strikingly, Tip60 acetyltransferase activity is required for the accumulation of E2F1 protein following cisplatin exposure but the two proteins are not involved in the execution of the apoptotic program. Expression of Tip60 and E2F1 is required for the accumulation of ERCC1, a protein involved in the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway. Overall, these results indicate that E2F1 and Tip60 play interrelated roles in the DNA damage response and suggest their involvement in DNA repair pathways.



## Introduction

The E2F1 family of transcription factors plays a central role in regulating cellular growth by controlling the expression of genes required for cell cycle progression, particularly DNA synthesis, and those involved with apoptosis. Mounting evidence also implicates E2F1 as an important component of the DNA damage response. Several studies have shown that E2F1 protein is phosphorylated and stabilized by ATM/ATR and Chk2 kinases ((1-4), both of which are integral component of the DNA damage signaling pathway. The high level of E2F1 protein allows the binding and activation of a different spectrum of genes involved in the induction of apoptosis such as Apaf-1, ARF, Chk1, ATM and p73 (for review(4)). In addition, it is becoming apparent that E2F1 co-localizes and/or interacts with the MNR checkpoint protein complex (5) as well as with TopBP1 and the BRCA1-repair complex (6) in response to DNA damage. These data support the idea that E2F1 may have an additional role in DNA repair and influence replication control.

Tip60 is an Histone Acetyl Transferase (HAT) that belongs to the MYST family of HAT, named after its founding members : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60. MYST family members function in a broad range of biological processes, such as gene regulation, DNA damage repair and tumorigenesis (7). Tip60 was originally described as an HIV-1 Tat interactive protein (8). Soon after its discovery it became apparent Tip60 possesses an acetyltransferase activity against histones (9) as well as non-histone proteins such as androgen receptor or the c-Myc transcription factor (10, 11). The first evidence involving Tip60 in the DNA damage response came from the fact that cells expressing a catalytically inactive Tip60 accumulate DNA double strand breaks (DSBs), thus suggesting that Tip60 is crucial for the repair of damage (12). Moreover, Tip60 was reported to acetylate the key DNA damage sensor protein ATM (13). In this context, acetylation by Tip60 is required for the efficient activation of ATM kinase activity, indicating that Tip60 might function upstream of ATM. Beside its functions in the process of DNA repair, Tip60 is also believed to play a crucial role in the activation of the apoptotic pathways, since cells expressing a Tip60 protein with impaired HAT activity show severe defects in apoptosis following  $\gamma$ -radiation (12).

Therefore, both E2F1 and Tip60 are multi-functional damage responsive proteins that are involved in numerous aspects of the DNA damage response. Genotoxic stress has been reported to stabilize E2F1 through post-transcriptional modifications and it has been shown that acetylation induces E2F1-dependent apoptotic response in damaged cells (14). Although the p300 and P/CAF HATs have been involved in E2F1 acetylation and accumulation following exposure to DNA damaging agents (14, 15), the role of the Tip60 HAT has never been investigated. In this study, we demonstrate that Tip60 HAT activity is required for E2F1 protein accumulation in response to cisplatin. We also provide evidence that E2F1 stabilization is not involved in the apoptotic response induced by cisplatin exposure but that both proteins are required for ERCC1 upregulation. These data point to a new aspect of E2F1 function in DNA repair.

## Results

### E2F1 binds to Tip60

To investigate whether E2F1 is a target of Tip60, we first examined the existence of a Tip60/E2F1 complex. SAOS2 cells were transiently transfected with HA-Tagged Tip60 and immunolocalization of endogenous E2F1 was studied in cells overexpressing Tip60. A nuclear colocalization of E2F1 and Tip60 was clearly observed suggesting that both proteins interact (Figure 1A). To confirm that Tip60 binds to E2F1, U2OS cells were cotransfected with HA-Tagged Tip60 and/or E2F1 expression vectors and coimmunoprecipitation was performed using anti-E2F1 antibody. Immunoblotting with an anti-HA antibody showed that Tip60 was present in E2F1 immunoprecipitates indicating that both proteins interact (Figure 1B). Furthermore, an endogenous E2F1-Tip60 complex was also detectable in nuclear fractions of H1299 cells thus revealing that both proteins can associate *in vivo* (Figure 1C). Since E2F1 and Tip60 have already been physically linked to RB (16), their coprecipitation could be the result of RB binding. To test whether E2F1 and Tip60 could directly interact we performed GST-pull down assays. Figure 1D shows that *in vitro* translated

Tip60 associated with GST-E2F1 but not with a control GST. We concluded from these data that E2F1 is a new direct Tip60 binding partner.

### **Tip60 acetylates E2F1 at lysines 120/125**

As Tip60 displays an intrinsic HAT activity and E2F1 exhibits several lysine residues, we wanted to establish whether Tip60 catalyses E2F1 acetylation. To analyze whether E2F1 is acetylated by Tip60 *in vivo*, we transfected H358 cells with either a HA-Tip60 expression vector or siRNA raised against Tip60. Anti-acetylated antibody was then used to precipitate endogenous acetylated E2F1 which was detected by western blotting using an anti-E2F1 antibody. The data showed that the anti-acetylated antibody precipitated more E2F1 when cells were transfected with Tip60 than with a control plasmid (Figure 2A). On the other hand, the level of acetylated E2F1 immunoprecipitates was clearly diminished when expression of Tip60 was knock-down (Figure 2B). Taken together, these results indicate that Tip60 can acetylate E2F1 *in vivo*. To go further, we wanted to identify the lysines modified by Tip60. By using *in vitro* acetyltransferase assays (HAT) with C<sup>14</sup>-Acetyl-CoA and a panel of E2F1 GST fusion fragments spanning the full length protein, we demonstrated that recombinant Tip60 acetylated the N-terminal half of E2F1(89-284) in a region restricted to amino acids 109 to 127 (Figure 3A and B). As a cluster of three lysines resides in this region, we then generated a series of mutant proteins in which two out of the three lysine residues were mutated to arginine, and tested their acetylation by Tip60 in *in vitro* HAT assays. As shown in Figure 3C, arginine substitution at lysines 120/125 (K120/125R) abolished acetylation whereas mutating the 117/120 (K117/120R) or 117/125 (K117/125R) residues resulted in a reduced capacity for Tip60-mediated acetylation (Figure 3C). Therefore, these results indicate that lysines 120 and 125 are the substrates for Tip60 acetylation. Finally, we asked if the K120/125R mutant was defective for acetylation by Tip60 *in vivo*. SAOS2 cells were transfected with Tip60 along with either wild type E2F1 or mutant K120/125R E2F1 expression vectors. Anti-acetylated antibody was then used to precipitate acetylated E2F1 which was detected by immunoblotting using an anti-E2F1 antibody. As expected, only the wild type form of

E2F1 was precipitated (Figure 3D) although equivalent protein levels of wild type and mutant E2F1 were used (data not shown).

### **Tip60 acetylation stabilizes E2F1 protein**

Because we reproducibly observed that the expression level of E2F1 was modified when cells were cotransfected with E2F1 and HA-Tip60 expression vectors (Figure 1B right panel), we postulated that Tip60 could control E2F1 expression. By using various cellular models, we showed that transfection of an expression vector for HA-Tip60 increased the expression level of both cotransfected (Figure 4A) and endogenous E2F1 (Figure 4B). In addition, depriving cells of Tip60 using siRNAs downregulated the expression of endogenous E2F1 protein (Figure 3C). To strengthen the notion that Tip60 affects the stability of the E2F1 protein we transfected SAOS2 cells with HA-Tip60 and analysed the amount of E2F1 remaining after different periods of time of cycloheximide treatment. The results showed that E2F1 half-life increased significantly in the presence of Tip60 (Figure 4D) whereas those of a control actin protein did not change (data not shown). Altogether these data indicate that Tip60 induces the accumulation of the E2F1 protein. Having demonstrated that Tip60 acetylates and also stabilizes E2F1 protein, we questioned whether both phenomenons could be linked. To test this hypothesis, we first used a mutated Tip60 (Tip60G<sup>380</sup>) containing a mutation severely impairing its HAT activity (Iemercier et al 2003). E2F1 was co-expressed in H358 cells with either HA-Tip60 or HA-TipG<sup>380</sup> and western blots experiments were performed. As compared to wild type Tip60 whose transfection clearly increased the level of E2F1, the mutant Tip60 did not have a significant effect on E2F1 expression (Figure 4A) although it was expressed at levels equal to wild type and was still able to interact with E2F1 (Data not shown). These data supported the fact that Tip60 HAT activity is required for the increase of E2F1. Therefore, we reasoned that expression of the E2F1-K120/125R mutant might not be regulated by Tip60. This was verified in SAOS2 cells that were co-transfected with Tip60 and WT E2F1 or E2F1-K120/125R (Figure 4B). Collectively, these results show that acetylation by Tip60 stabilizes E2F1 protein.

## **Tip60 and E2F1 play a coordinated role in the DNA damage response induced by cisplatin exposure**

Both Tip60 and E2F1 play active roles in the DNA damage response (4, 18). As several studies have shown that E2F1 is stabilized by DNA damaging agents (3, 19), we wondered whether Tip60 could be involved. To test our hypothesis, H358 cells were transfected with siRNAs against Tip60 and the expression of E2F1 was analyzed in the presence or absence of a cisplatin treatment. As expected, accumulation of E2F1 protein was observed when the cells were treated for 20h with cisplatin (50 $\mu$ M) (Figure 5A). Strikingly, the neutralization of Tip60 prevented the upregulation of E2F1 in that case, therefore revealing a direct involvement of Tip60 in the accumulation of E2F1 in response to cisplatin. As we demonstrated that acetylation by Tip60 controls E2F1 expression levels (Fig 5), the acetylation status of E2F1 was analyzed. The results showed that acetylated E2F1 accumulated when cells were exposed to cisplatin, a phenomenon diminished by the use of Tip60 siRNAs (Figure 6A). Taken together, these data demonstrate that cisplatin induces the accumulation of a Tip60-dependent acetylated E2F1 protein. Importantly, we observed that apoptosis induced by a 20 hours cisplatin treatment was not affected by the use of Tip60 siRNAs (Figure 6B) suggesting a role for Tip60 at earlier steps of the DNA damage response. Accordingly, accumulation of E2F1 was observed from 1 hour of cisplatin exposure (Figure 6C) and was dependent on the presence of Tip60 (Figure 6D). E2F1 was already acetylated by Tip60 at this time (data not shown) and apoptosis was not observed (supplementary Figure 1). Interestingly, the levels of E2F1 expression paralleled those of ERCC1 (Figure 6C), a protein involved in Nucleotide Excision Repair (NER), a DNA repair mechanism induced by cisplatin lesions. Knocking-down Tip60 diminished ERCC1 expression (Figure 6D) suggesting that Tip60 controls ERCC1 expression in the absence of genotoxic stress, as previously reported (20). When cells were exposed to cisplatin, neutralization of Tip60 abolished ERCC1 accumulation (Figure 6D) revealing a direct involvement of Tip60 in the upregulation of ERCC1 expression induced by cisplatin. Knocking-down E2F1 in cisplatin treated cells also prevented the upregulation of ERCC1 despite Tip60 expression (Figure 6D) indicating that E2F1 is crucial for a proper Tip60-dependent response to cisplatin. Of note, the neutralization of E2F1 in the absence of

genotoxic treatment resulted in the accumulation of ERCC1 protein, suggesting that E2F1 controls ERCC1 expression in the absence of DNA damaging agents. Collectively, these results indicate that E2F1 and Tip60 play interrelated roles in non apoptotic DNA damage response to cisplatin and suggest their involvement in DNA repair pathway.

## **Discussion**

The E2F1 pathway is centrally involved in the highly complex networks coupling cellular proliferation and apoptosis. An emerging role of E2F1 in the DNA damage response and checkpoint control is also gaining support and several studies have highlighted acetylation as a driving modification for the execution of an E2F1-dependent apoptotic program in damaged cells. Here we show that acetylation could also involved E2F1 in a DNA repair pathway.

Our results show that Tip60 catalyzes E2F1 acetylation and further accumulation after a 20 hours cisplatin treatment. Surprisingly, modification of E2F1 by Tip60 does not affect cell cycle progression (data not shown) nor apoptosis in these conditions as demonstrated by the use of siRNAs against Tip60. Furthermore, both Tip60 and E2F1 accumulate soon after cisplatin treatment and before apoptosis takes place, and Tip60 HAT activity is required for E2F1 upregulation in this setting. Together, these results support a specific role for E2F1 acetylation in an apoptotic-independent response to DNA damage. Cisplatin is a genotoxic agent that disrupts the structure of the DNA molecule through the formation DNA adducts and further intrastand or interstand cross-links (21). Nucleotide Excision Repair (NER) is a highly conserved DNA repair pathway that repairs DNA lesions induced by cisplatin. The Excision Repair Cross-Complementation group1 (ERCC1) protein plays a key role during NER by excising the damage portion of the DNA (22). In this study, we show that expression of both Tip60 and E2F1 is required for the accumulation of ERCC1 in response to cisplatin suggesting that acetylation by Tip60 promotes E2F1-dependent DNA repair program.

Whether ERCC1 might be a new transcriptional target of E2F1 is under investigation as we identified several putative E2F1 specific binding sites in ERCC1 promoter.

A very amazing finding is our demonstration that Tip60 acetylates E2F1 on two lysines residus (K120/125) previously reported to be also modified by the P/CAF and p300 HATs (23, 24). In these last cases however, the lysine 117 is also acetylated and this preferentially boost E2F-driven transcription of pro-apoptotic genes in response to doxorubicin (14). In this study, we demonstrate that acetylation by Tip60 does not promote an E2F1-dependent apoptotic program but rather controls the expression of a DNA repair gene after cisplatin exposure. Altogether, these results support the idea that the nature of the damaging agent and/or the type of the lesions could govern the recruitment of a specific HAT to acetylate E2F1 and further activate distinct cellular responses (DNA repair or apoptosis). Alternatively, we cannot exclude the possibility that DNA damaging agents could induce the acetylation of E2F1K120/125 by Tip60 to promote DNA repair and further E2F1K117 acetylation by P/CAF to induce apoptosis if DNA lesions cannot be repaired.

It was previously reported that E2F1 binds to Tip60 and induced the recruitment of five units of the Tip60 complex to target promoters in vivo (25). It is thus tempting to speculate that Tip60 could act in physiological conditions as a transcriptional cofactor of E2F1 to drive the expression of cell cycle target genes. In a context of genotoxic stress, the Tip60/E2F1 complex could behave as a sensor of DNA damage and could regulate the expression of genes involved in DNA repair. The Tip60/E2F1 complex could thus facilitate cell cycle progression while guaranteeing genome stability.

## References

1. Lin WC, Lin FT, Nevins JR. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 2001;15:1833-44.
2. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003;5:401-9.

3. Blattner C, Sparks A, Lane D. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* 1999;19:3704-13.
4. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1071-9.
5. Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, et al. Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 2001;21:6006-16.
6. Liu K, Lin FT, Ruppert JM, Lin WC. Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 2003;23:3287-304.
7. Utley RT, Cote J. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;274:203-36.
8. Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 1996;216:357-66.
9. Kimura A, Horikoshi M. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* 1998;3:789-800.
10. Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 2002;277:25904-13.
11. Patel JH, Du Y, Ard PG, et al. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* 2004;24:10826-34.
12. Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 2000;102:463-73.
13. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13182-7.
14. Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, et al. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003;5:552-8.
15. Ianari A, Gallo R, Palma M, Alesse E, Gulino A. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2004;279:30830-5.
16. Leduc C, Claverie P, Eymin B, et al. p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* 2006;25:4147-54.
17. Eymin B, Karayan L, Seite P, et al. Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 2001;20:1033-41.
18. Squatrito M, Gorrini C, Amati B. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 2006;16:433-42.



19. Hofferer M, Wirbelauer C, Humar B, Krek W. Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:491-5.
20. Miyamoto N, Izumi H, Noguchi T, et al. Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem* 2008;283:18218-26.
21. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9-23.
22. Westerveld A, Hoeijmakers JH, van Duin M, et al. Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* 1984;310:425-9.
23. Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 2000;19:662-71.
24. Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, Cartwright P, Helin K, Giacca M. E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 2000;275:10887-92.
25. Taubert S, Gorrini C, Frank SR, et al. E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* 2004;24:4546-56.

## **Acknowledgments**

We thank Céline Barial and Pascal Perron for technical assistance.

## **Material and methods**

### **Cell culture, transfection and treatments**

H358 and H1299 cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in RPMI (invitrogen) medium supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum. U2OS cells were cultured in McCoy's (Invitrogen) medium with 10% (vol/vol) heat-inactivated calf serum and grown at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Transient transfection experiments were carried out using Fugene 6 (Roche Diagnostic) according to manufacturer's instructions. The amounts of expression vectors were normalized with the

corresponding empty vectors. Cells were harvested 24 or 48h post-transfection. pcDNA3-HA-tagged Tip60, pcDNA3-HA-tagged Tip60<sup>G380</sup> and production of His-Tip were previously described (16). pcDNA3-E2F1 was a gift from D.Trouche. E2F1 truncated mutants pGEX-E2F1<sup>1-191</sup> and pGEX-E2F1<sup>1-284</sup> were a gift from K. Helin, pGEX-E2F1<sup>41-108</sup> and pGEX-E2F1<sup>41-127</sup> from W. Krek and pGEX-E2F1<sup>1-120</sup> and pGEX-E2F1<sup>89-191</sup> from M. Giacca. Transfection of siRNA was carried out using oligofectamine (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The sequences designed to target specifically human *E2F1* and *Tip60* mRNAs were as follow: E2F1: 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3' and 5'-ACAAGGCCCGAUCGAUGUUTT-3'; Tip60: 5'-GAAGAUC CAGU UCCCCAAGTT-3' and 5'-CGAAACGGAAGGUGGAGGUTT-3'. The cells were analyzed 72h post-transfection. For experiments with genotoxic agents, cells were transfected for 72h with siRNAs and genotoxic agents were added. Treatment of cells with Cis-platin (Calbiochem) (50μM) was carried out at the indicated times. For the study of E2F1 acetylation, cells were incubated with TSA (Sigma Aldrich) (100ng/ml) for 18h before lysis.

### ***In vitro* translations and pull-down assays**

*In vitro* translation and pull-down assays were performed essentially as described previously using beads coated either with GST or GST-E2F1 fusion proteins and equivalent amounts of *in vitro*-translated wild-type Tip60 protein (17).

### ***In vitro* acetyltransferase assays and site-directed mutagenesis**

*In vitro* acetyltransferase assays were performed as described previously using GST and a panel of E2F1 GST fusion fragments spanning the full length protein and equivalent amounts of recombinant His-tagged Tip60<sup>212-513</sup> (Leduc et al 2006). Site-directed mutagenesis was carried out with the QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) using pGST-E2F1 as template.

### **Immunoblotting and immunoprecipitation**

Immunoblotting was performed by using whole cell extracts prepared in RIPA buffer. For immunoprecipitation of acetylated E2F1, TSA (100ng/ml) was added to RIPA buffer and 500 µg of proteins were used. For immunoblotting of Tip60, nuclear extracts were prepared by lysing the cells in 5 volumes of pre-cold hypotonic buffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, and 0,5mM DTT) supplemented with 1% NP40 for 10 min on ice. Nuclei were pelleted by centrifugation for 15 min at 3000 rpm, lysed in Urea (3M) and subjected to sonication (300W). One hundred microgram of total nuclear extracts were loaded onto 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. For coprecipitation of endogenous Tip60 and E2F1, nuclear extracts were prepared as described above but nuclei were lysed in a buffer containing 150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 0.5% NP40, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, supplemented with protease inhibitors. Three milligrams of nuclear extracts were subjected to immunoprecipitation using the anti-E2F1 antibody.

Antibodies used are as follows: anti-Ha (HA-11; Covance), anti-E2F1 (KH95; BD Pharmingen), anti-acetylated lysine (Cell Signaling), rabbit anti-Tip60 (from laboratory), anti ERCC1 (FL-297, Santa Cruz) and anti-actin (Sigma).

### **Indirect Immunofluorescence**

Cells were fixed in 0.5% paraformaldehyde-PBS for 10 min at 4°C, washed one time in PBS and permeabilized in 0.1% triton for 5 min at room temperature (RT). After extended washes, non specific binding sites were saturated for 30 min at RT in the presence of 5% bovin serum albumin and 5% goat serum in PBS, and incubation was carried out with appropriate antibody. Cells were then incubated with Alexa 568 or Alexa 488, counterstained with Hoechst 33352 and observed with confocal microscope.

## Figure legends

### Figure 1 : Tip60 interacts with E2F1

A, Confocal laser microscopy analysis of E2F1 and Tip60 subcellular distribution was performed in U2OS cells transfected with HA-tagged Tip60 expression vector. Magnification amplitude : X60. B, pcDNA3-E2F1 and pcDNA3-HA-Tip60 were co-transfected or transfected together with empty pcDNA into H1299. Whole cell extracts were immunoprecipitated with anti-E2F1 antibody and immunoblotted with anti-HA antibody. An irrelevant IgG was used as a negative control for immunoprecipitation. C, Endogenous E2F1 was immunoprecipitated from H358 nuclear-enriched extracts with anti-E2F1 antibody or irrelevant IgG as a negative control. E2F1 and Tip60 were revealed by western blotting using anti-E2F1 and anti-Tip60 antibodies respectively. D, GST or GST-E2F1 fusion protein was incubated with <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* translated (IVT) Tip60 in a pull-down experiment and analysed by SDS-PAGE followed by autoradiography.

### Figure 2 : Tip60 acetylates E2F1

H358 cells were transfected either with HA-Tip60 expression vector (A) or with siRNA raised against Tip60 (B). Anti-acetylated antibody was used to precipitate endogenous acetylated E2F1 which was detected by western blotting using anti-E2F1 antibody.

### Figure 3 : Lysines 120/125 of E2F1 are acetylated by Tip60

A, *In vitro* acetyltransferase assays with C<sup>14</sup>-Acetyl-CoA, *in vitro* translated Tip60 and a panel of recombinant GST-E2F1 fragments. Acetylated proteins were resolved by 10% SDS-PAGE. Upper panel , Coomassie stained gel, lower panel , autoradiography. B, schematic representation of the E2F1 fragments used for the experiments in A. Minimal acetylated domain of E2F1 is represented as a grey bar. C, GST-E2F1 proteins mutated for two out of three lysines (K117/K120/K125) were treated as in A. Upper panel , Coomassie stained gel, lower panel , autoradiography. D, pcDNA3-HA-Tip60 was

transfected together with wild type or mutant E2F1 expression vector into SAOS2 cells. Anti-acetylated antibody was used to precipitate endogenous acetylated E2F1 which was detected by western blotting using anti-E2F1 antibody.

#### **Figure 4 : Tip60 stabilizes E2F1 protein**

A, SAOS2 cells were transfected with pcDNA3.1-E2F1 in the presence or absence of pcDNA3.1-HA-Tip60. Western blotting was carried out with anti-E2F1 or anti-HA antibody. Actin was used as a loading control. B, U2OS cells were transfected with pcDNA3.1-HA-Tip60. Whole cells extracts were treated as in A. C, H358 cells were transfected with control siRNA or si RNA against Tip60. Expression of endogenous E2F1 was studied by western blotting. Neutralisation efficiency of Tip60 expression was studied by quantitative PCR. D,

#### **Figure 5 : Acetylation by Tip60 stabilizes E2F1 protein**

A, H358 cells were transfected with pcDNA3.1-E2F1 in the presence or absence of pcDNA3.1-HA-Tip60 or pcDNA3.1-HA-Tip60G380. Western blotting was carried out with anti-E2F1 or anti-HA antibody. Actin was used as a loading control. B, U2OS cells were transfected with pcDNA3.1-E2F1 or pcDNA3.1-E2F1K120/125R in the presence or absence of pcDNA3.1-HA-Tip60. Western blotting was carried out with anti-E2F1 or anti-HA antibody. Actin was used as a loading control.

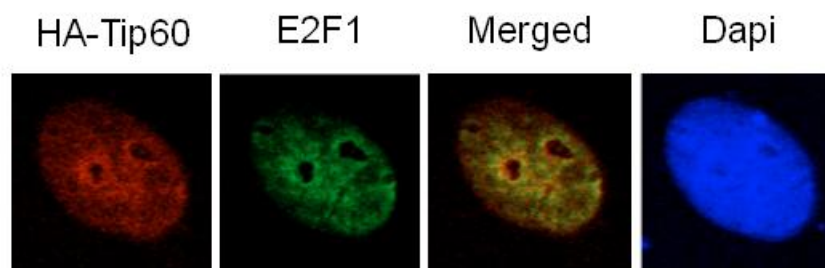
#### **Figure 6 : Acetylation by Tip60 is required for E2F1 stabilization in response to DNA damage**

A, E2F1 is acetylated by Tip60 in response to DNA damage. H358 cells were transfected for 48h with either mismatch or Tip60 siRNA and treated or not treated for an additional 24h with cisplatin (50µM). Acetylation of E2F1 was studied by immunoprecipitation as described in Figure 2. B, Tip60 is not involved in the apoptotic response induced by cisplatin. Cells were treated as in A. Apoptosis was evaluated using anti-Caspase3 staining and FACS analysis. C, Cells were exposed for the

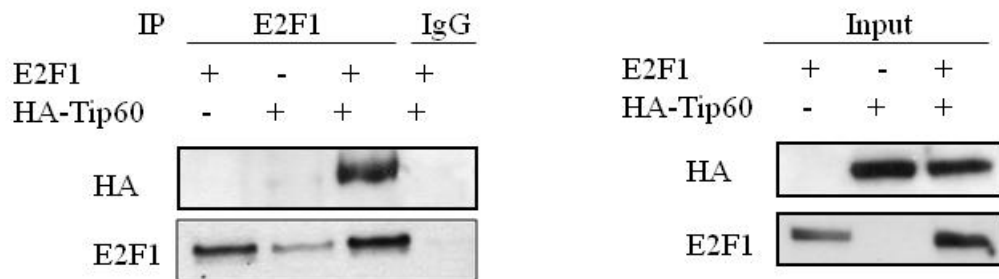
indicated times to cisplatin (50 $\mu$ M). Western blot analyses were performed with the indicated antibodies. D, H358 cells were transfected for 48h with either mismatch, Tip60 or E2F1 siRNAs and treated or not treated for an additional 24h with cisplatin (50 $\mu$ M). Western blot analyses were performed with the indicated antibodies.

# Figure 1

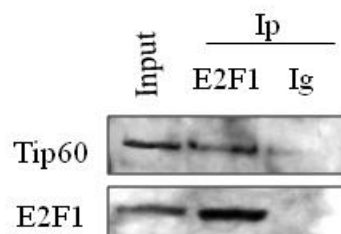
**A**



**B**



**C**



**D**

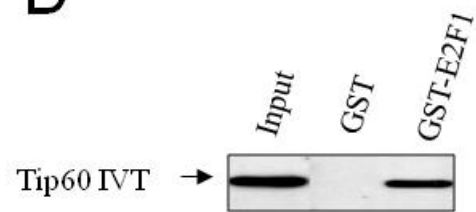
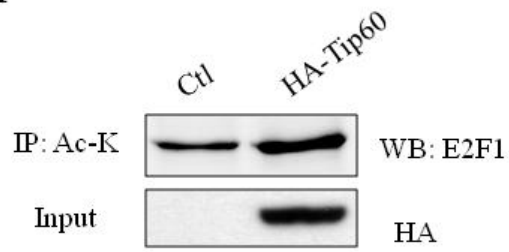
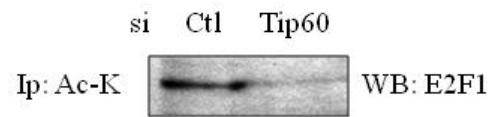


Figure 2

A

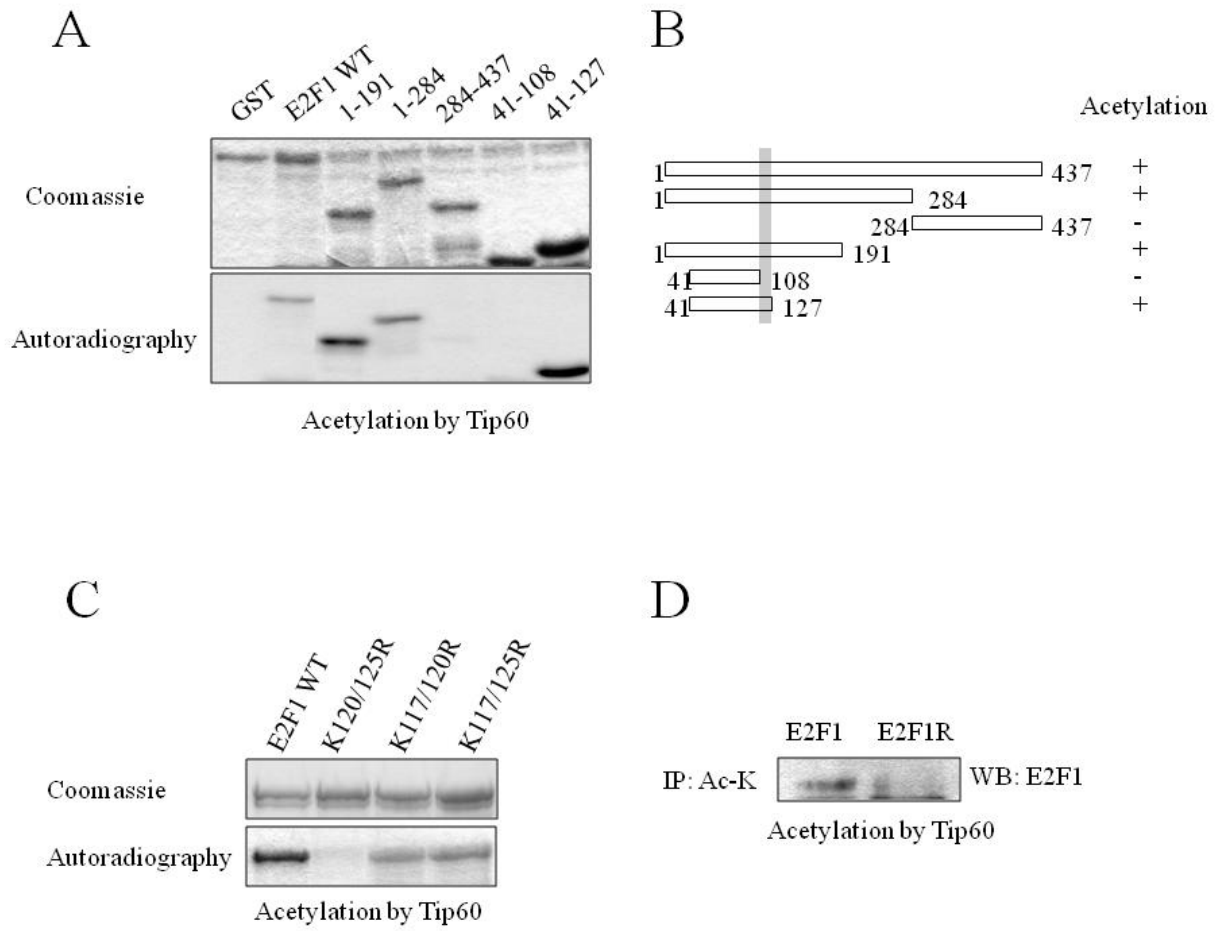


B

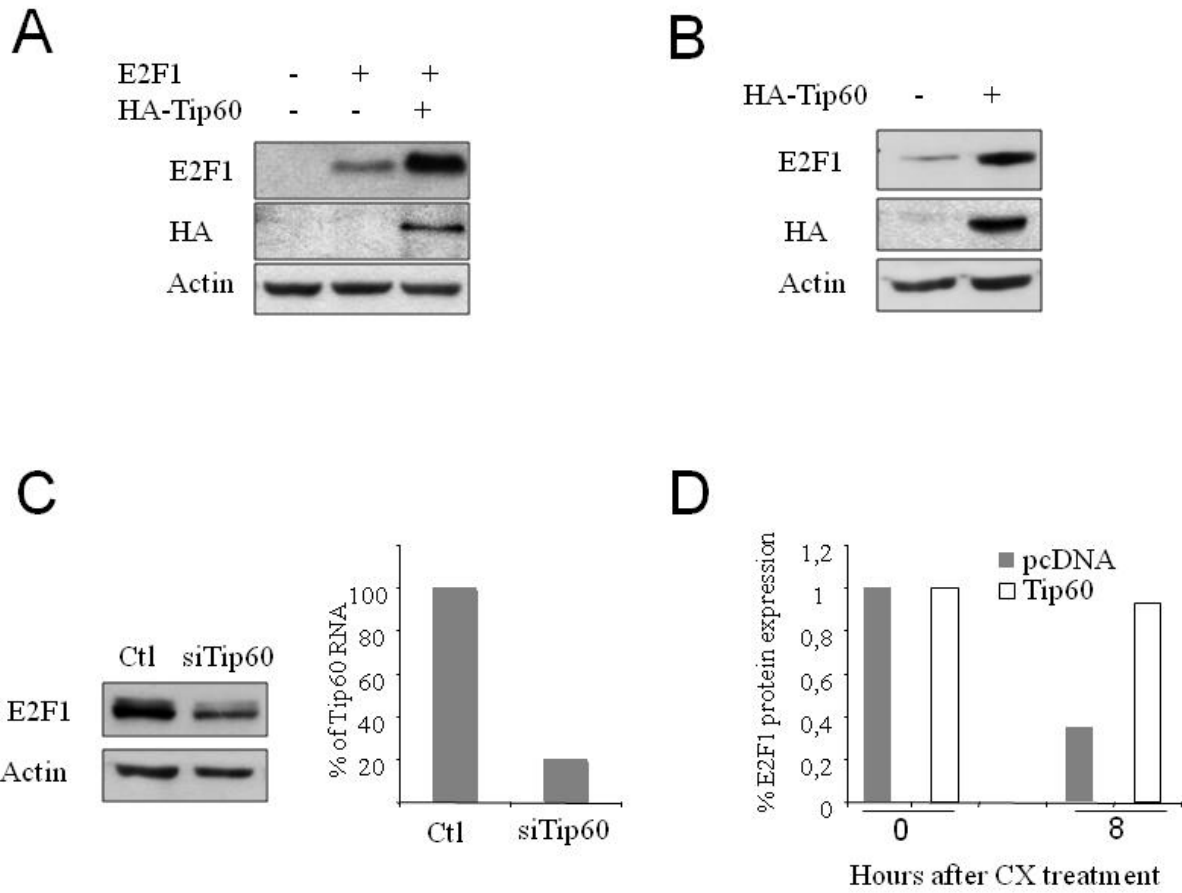




# Figure 3



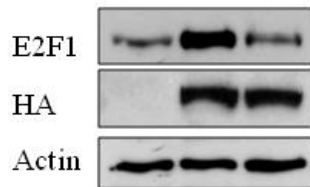
# Figure 4



# Figure 5

## A

E2F1	+	+	+
HA-Tip60	-	+	-
HA-TipG380	-	-	+



## B

E2F1	-	+	+	-	-
E2F1K(120/125)R	-	-	-	+	+
HA-Tip60	-	-	+	-	+

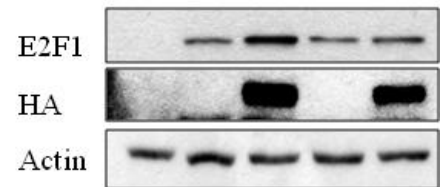
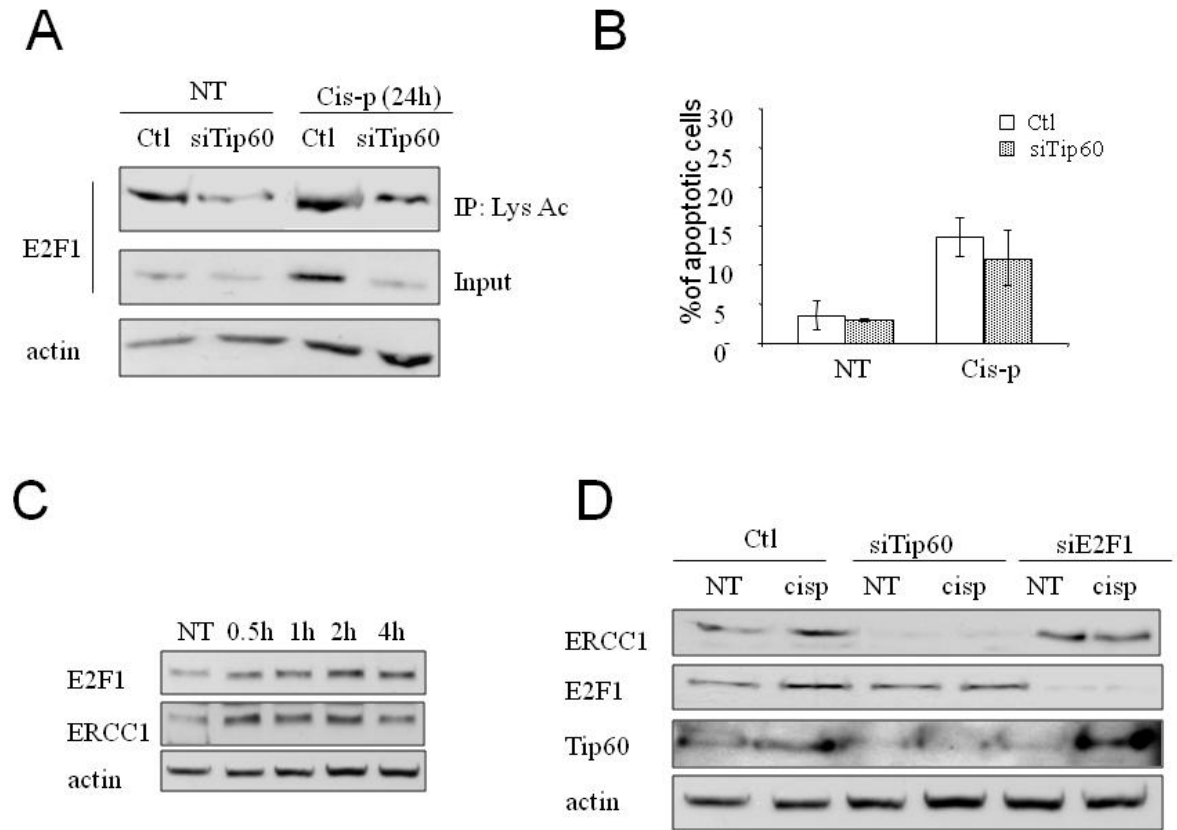
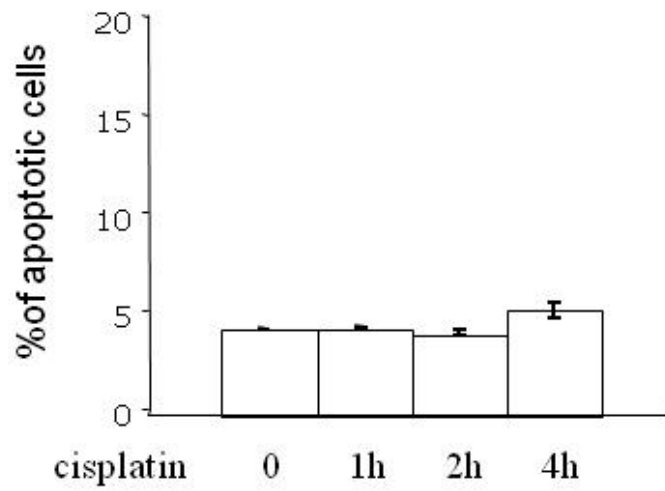


Figure 6





**Supplementary figure 1:** H358 cells were exposed for the indicated times to cisplatin (50mM). Apoptosis was evaluated using anti-Caspase3 staining and FACS analysis.

# **RESULTATS NON PUBLIES**

---

# Statut de l'histone acétyltransférase Tip60 dans les cancers broncho-pulmonaires.

## 1. Introduction

Nous avons montré que Tip60 est un élément clé de la réponse aux dommages de l'ADN induit par les carcinogènes du tabac et le cisplatine. Nous avons aussi montré que l'acétylation de l'histone H4 (cible de Tip60) est fortement perturbée dans les cancers bronchiques. De plus, nous avons identifié le facteur de transcription E2F1 comme une nouvelle cible de la HAT Tip60 et montré que son expression est régulée par Tip60. L'ensemble de ces résultats implique Tip60 dans le maintien de la stabilité du génome et suggère que sa dérégulation pourrait contribuer à la carcinogénèse bronchique. L'objectif de ce travail était donc d'étudier le statut de la protéine Tip60 dans les cancers bronchiques.

## 2. Résultats

### 2.1 Production et validation d'un anticorps dirigé contre la protéine Tip60

Nous avons tout d'abord testé plusieurs anticorps du commerce. L'utilisation de ces anticorps en Western Blotting met en évidence plusieurs bandes dont le signal ne décroît pas lors de la neutralisation de Tip60. Ces résultats nous ont donc conduit à produire notre propre anticorps (Société Eurogentec). N'ayant pas réussi à produire une protéine Tip60 recombinante dans son entier, des lapins ont été immunisés à l'aide de deux peptides tagués Histidine correspondant aux moitiés N-terminale et C-terminale de la protéine Tip60. L'anticorps a ensuite été immunopurifié à partir du sérum des animaux à l'aide de billes de Nickel-Agarose ayant une forte affinité pour le tag Histidine. Les deux peptides utilisés pour l'immunisation des lapins ont servi d'appât pour l'anticorps.

Nous avons ensuite testé l'efficacité et la spécificité de notre anticorps par la technique de Western Blotting. Nous mettons ainsi en évidence que notre anticorps détecte la

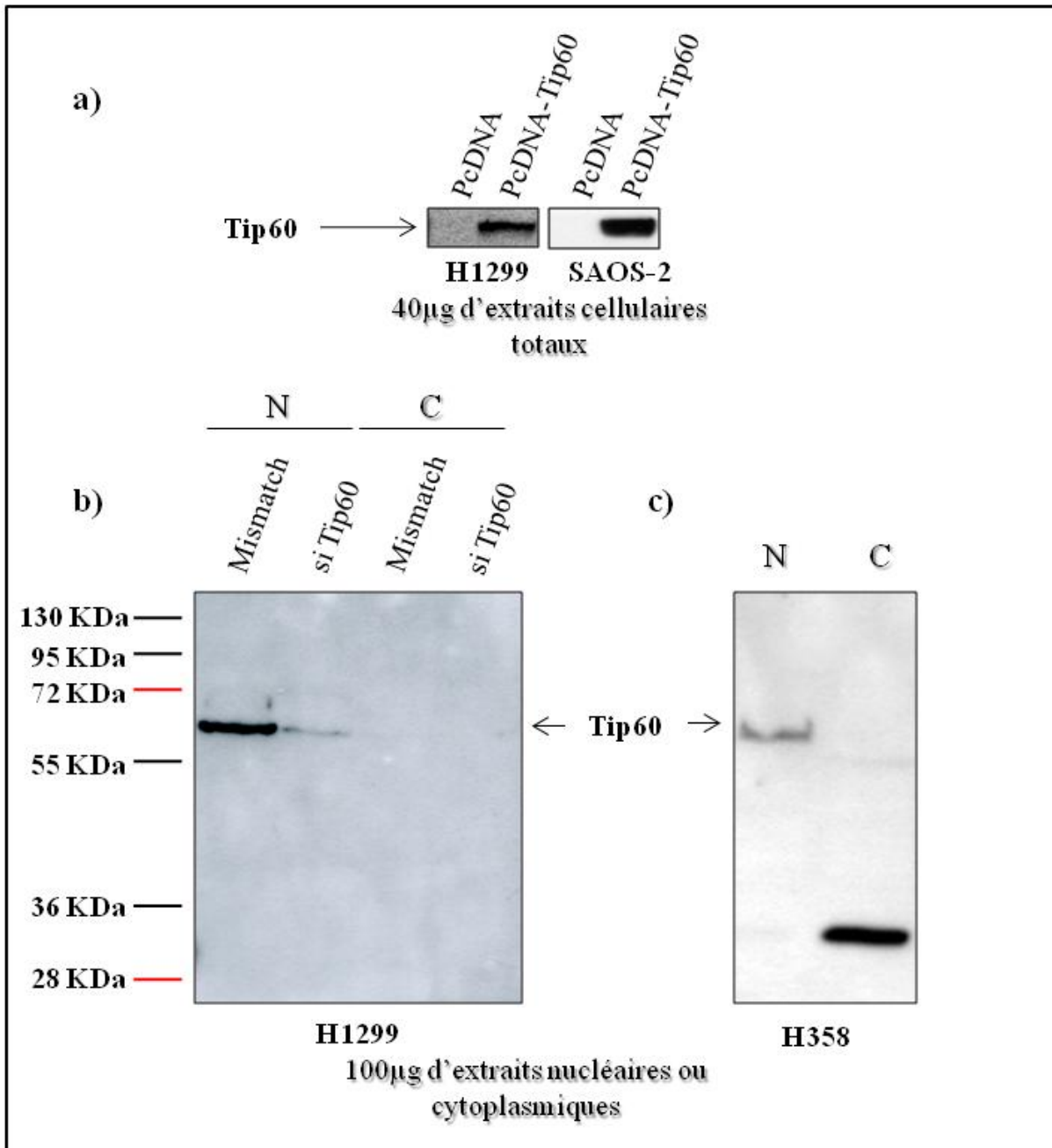
---

protéine Tip60 ectopique à la taille attendue (environ 60KDa) sur des extraits protéiques totaux réalisés à partir de lignées cellulaires tumorales transfectées avec un vecteur codant pour Tip60 (**Figure 18a**). Il reconnaît également une protéine d'environ 60 KDa à partir d'extraits nucléaires de cellules H1299 non transfectées (**Figure 18b**). Cet anticorps semble spécifique puisque la neutralisation de Tip60 par ARN interférence conduit à une extinction du signal dans ces mêmes extraits (**Figure 18b**). Cependant, il est important de noter que nous avons très récemment observé que notre anticorps reconnaît également, dans certaines lignées (H358), une protéine cytoplasmique d'environ 36KDa (**Figure 18c**) dont nous sommes en train d'analyser la spécificité.

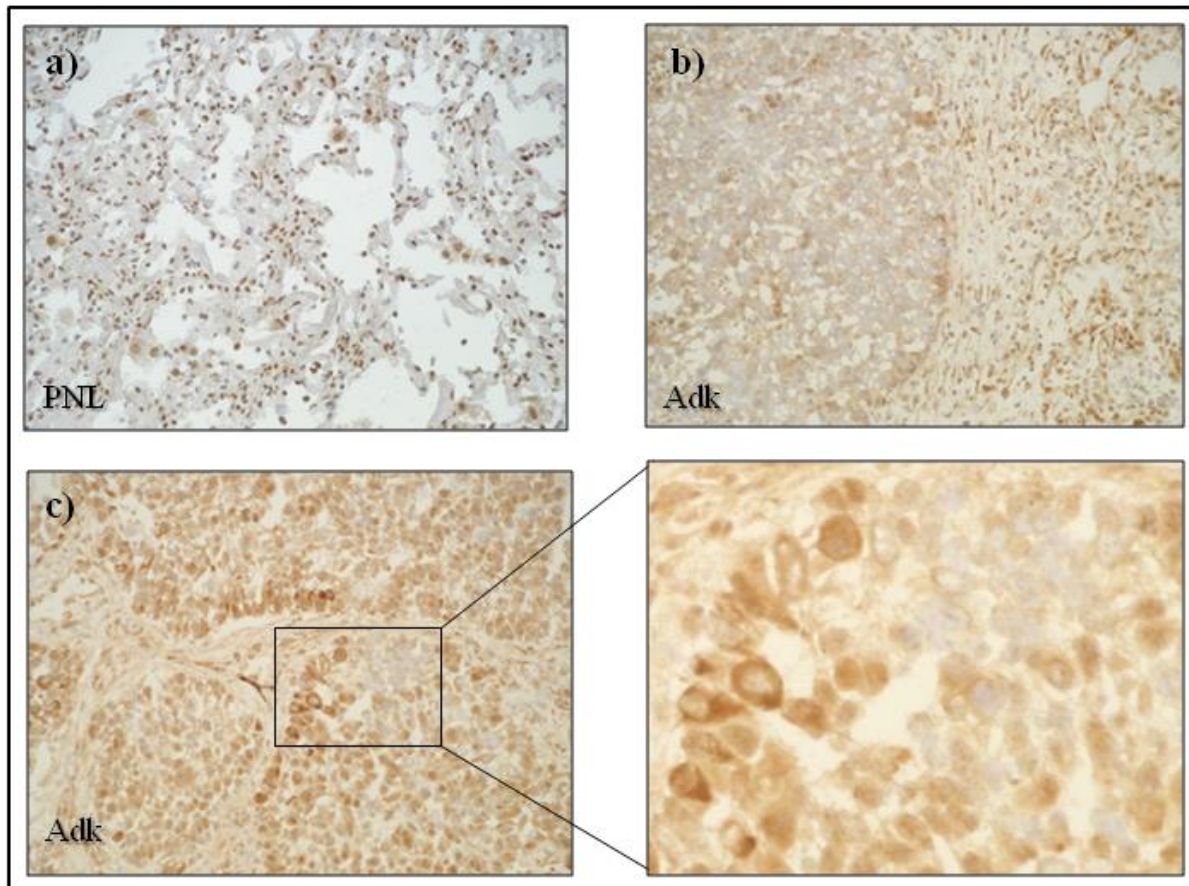
## **2.2 Analyse "in situ" de l'expression de la protéine Tip60 dans les tumeurs bronchiques**

Sur la base de ces données, nous avons entrepris une analyse du statut de Tip60 dans une série de 100 tumeurs bronchiques non à petites cellules (50 adénocarcinomes et 50 carcinomes malpighiens), à l'aide de l'anticorps que nous avons produit au laboratoire. Comme attendu, son utilisation en immunohistochimie conduit à un marquage nucléaire mais aussi à un marquage cytoplasmique que nous ne pouvons pas prendre en compte dans l'analyse des résultats du fait de l'absence d'éléments clés sur sa spécificité à l'heure actuelle (**Figure 19**). En effet, l'utilisation d'un peptide compétiteur n'éteint qu'en partie le signal. Cependant, il ne peut pas être exclu qu'il puisse tout de même exister un marquage cytoplasmique spécifique étant donné que le signal s'éteint en partie et qu'une expression cytoplasmique de Tip60 a été décrite dans les cancers du sein (Gorrini, C. et al, 2007). Quoiqu'il en soit, nous observons une forte diminution de l'expression nucléaire de Tip60 dans 44% des tumeurs étudiées suggérant que la dérégulation de cette protéine participe à la carcinogénèse bronchique.





**Figure 18: Caractérisation d'un anticorps anti-Tip60.** a) L'anticorps immunopurifié reconnaît clairement la protéine Tip60 surexprimée dans différentes lignées cellulaires tumorales. b) Le signal détecté par cet anticorps est spécifique de la protéine Tip60 puisque la neutralisation de cette dernière par ARN interférence conduit à son extinction. c) Cependant, dans certains cas, cet anticorps détecte également une protéine cytoplasmique non déterminée d'environ 36KDa. N, noyau, C, cytoplasme.



**Figure 19: Expression de la protéine Tip60 dans les cancers bronchiques.** a) Le poumon normal est caractérisé par un marquage nucléaire intense. b) Exemple d'une perte d'expression nucléaire de Tip60 dans un adénocarcinome bronchique. c) Adénocarcinome bronchique présentant une absence d'expression nucléaire de Tip60 et un fort marquage cytoplasmique. PNL, poumon normal, Adk, adénocarcinome.

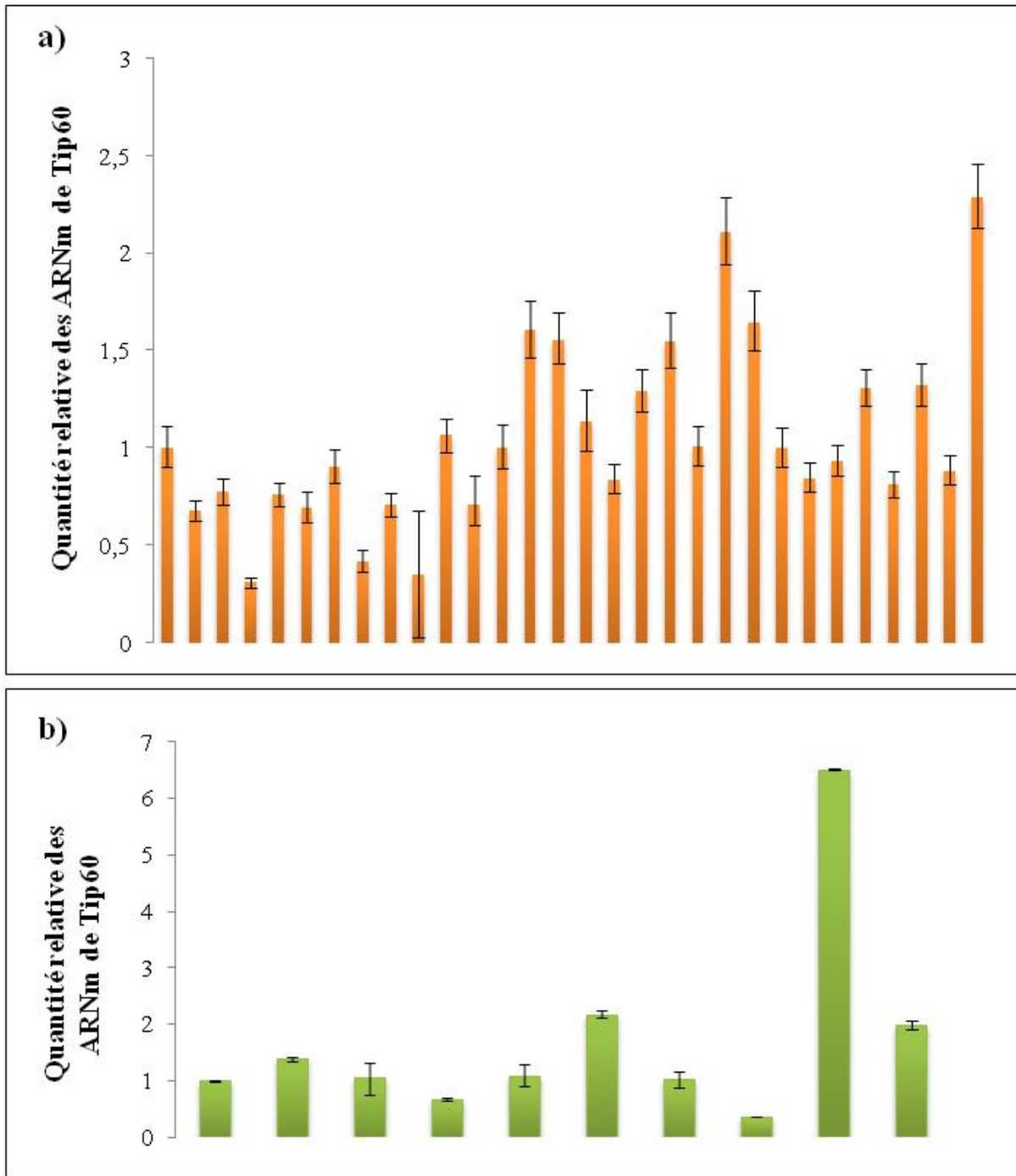
### 2.3 Perte de l'expression de l'ARNm de Tip60

Afin d'appréhender le mécanisme sous-jacent à cette perte, nous avons décidé d'analyser par RT/PCR quantitative le niveau d'expression des ARN messagers de Tip60 dans 30 couples Tumeur/Poumon normal pour lesquels une absence de marquage nucléaire par immunohistochimie avait été observée dans la tumeur en comparaison avec le poumon normal. De manière intéressante, nos résultats mettent en évidence l'existence de variations du niveau d'expression de Tip60 au sein des poumons normaux (**Figure 20a**), en accord avec les observations de Gorrini et coll. (Gorrini, C. et al, 2007). Cette même variation a été aussi constatée sur une série de 10 poumons normaux n'ayant jamais développés de cancer (**Figure 20b**), suggérant que celle-ci n'est pas obligatoirement associée à un processus de

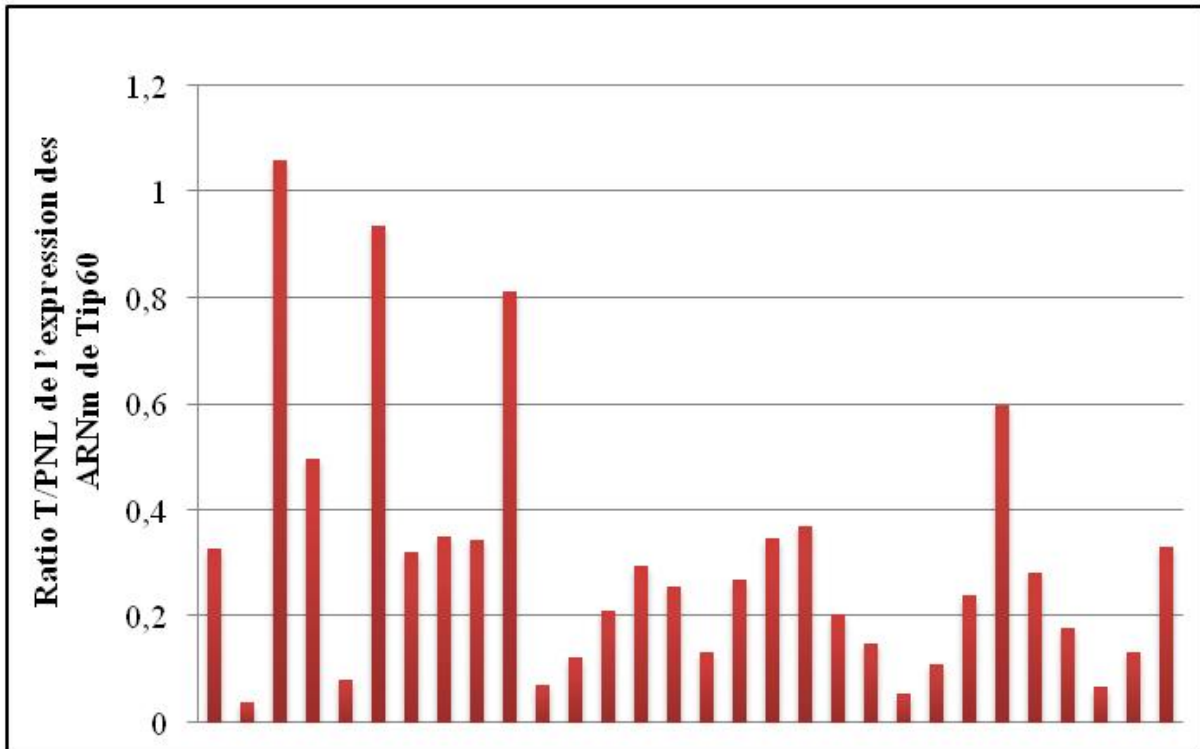
tumorigénèse. Compte tenu de ces données, nous avons systématiquement comparé l'expression des ARNm de Tip60 de chaque tumeur avec son tissu normal associé (**Figure 21**). Ainsi, nos résultats indiquent que la perte d'expression de la protéine Tip60 s'effectue principalement au niveau de son ARN messenger (87%, 26/30 cas), suggérant par la même un mécanisme d'inhibition transcriptionnelle et/ou une perte de stabilité des messagers.

## **2.4 Le promoteur du gène HTATIP codant pour Tip60 n'est pas méthylé.**

Nous avons montré que la perte de l'expression de Tip60 intervient au niveau de son ARN messenger. Etant donné que l'extrémité 5' du gène HTATIP contient un îlot CpG, nous avons dans un premier temps suspecté une éventuelle hyperméthylation du promoteur. Afin d'investiguer cette hypothèse, nous avons utilisé la technique de PCR MSP (Methylation Specific PCR), avec des amorces spécifiques des statuts méthylé et non méthylé du promoteur de Tip60. Cette étude a été réalisée sur 12 cas de cancers bronchiques non à petites cellules présentant une forte diminution de l'expression de leurs ARN messagers. Aucune méthylation n'a été détectée dans ces échantillons (**Figure 22b**). Nous avons également testé cette hypothèse à l'aide de deux lignées cellulaires tumorales caractérisées par un faible niveau d'expression des ARNm de Tip60 et hyperméthylées sur le promoteur de p16<sup>INK4a</sup>. Les résultats obtenus montrent que le traitement de ces cellules avec le 5-azadéoxycytidine (5-AZA), qui est un agent déméthylant, ne restaure pas le niveau d'expression de Tip60 (**Figure 22a**) alors qu'une forte induction de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est observée. L'ensemble de ces données suggère donc fortement que la méthylation du promoteur de Tip60 n'est pas le mécanisme princeps à l'origine de sa perte d'expression dans les cancers du poumon. Ce résultat est en accord avec une étude récente menée par Gorrini et coll. qui a mis en évidence l'absence de méthylation du promoteur de Tip60 dans les lymphomes, les cancers de la tête et du cou et dans le cancer du sein (Gorrini, C. et al, 2007).

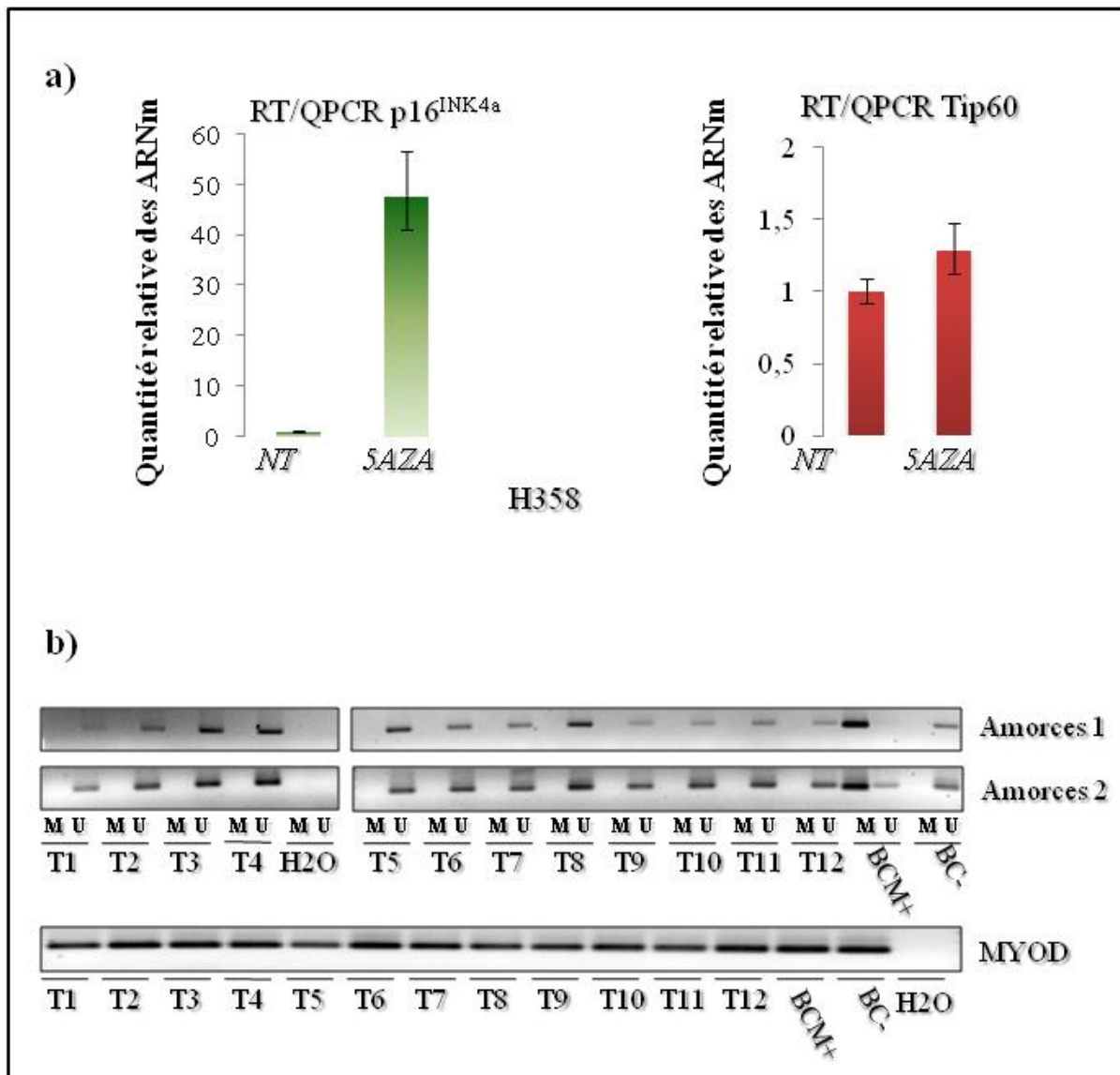


**Figure 20: Expression des ARNm de Tip60 dans les poumons normaux.** L'expression des ARNm de Tip60 est analysée par RT-PCR quantitative. **a)** Poumons normaux de patients avec cancer bronchique. **b)** Poumons normaux de patients n'ayant pas de cancer.



**Figure 21: Perte d'expression des ARNm de Tip60 dans les cancers bronchiques.** L'étude de l'expression des ARNm de Tip60 a été réalisée sur une série de 30 couples T/PNL dont les tumeurs présentent une absence de marquage nucléaire par immunohistochimie. L'expression de Tip60 au sein d'une tumeur est à chaque fois comparée à celle du poumon normal associé. Le graphique représente le ratio T/PNL de l'expression des ARNm de Tip60. T, tumeur, PNL, poumon normal.

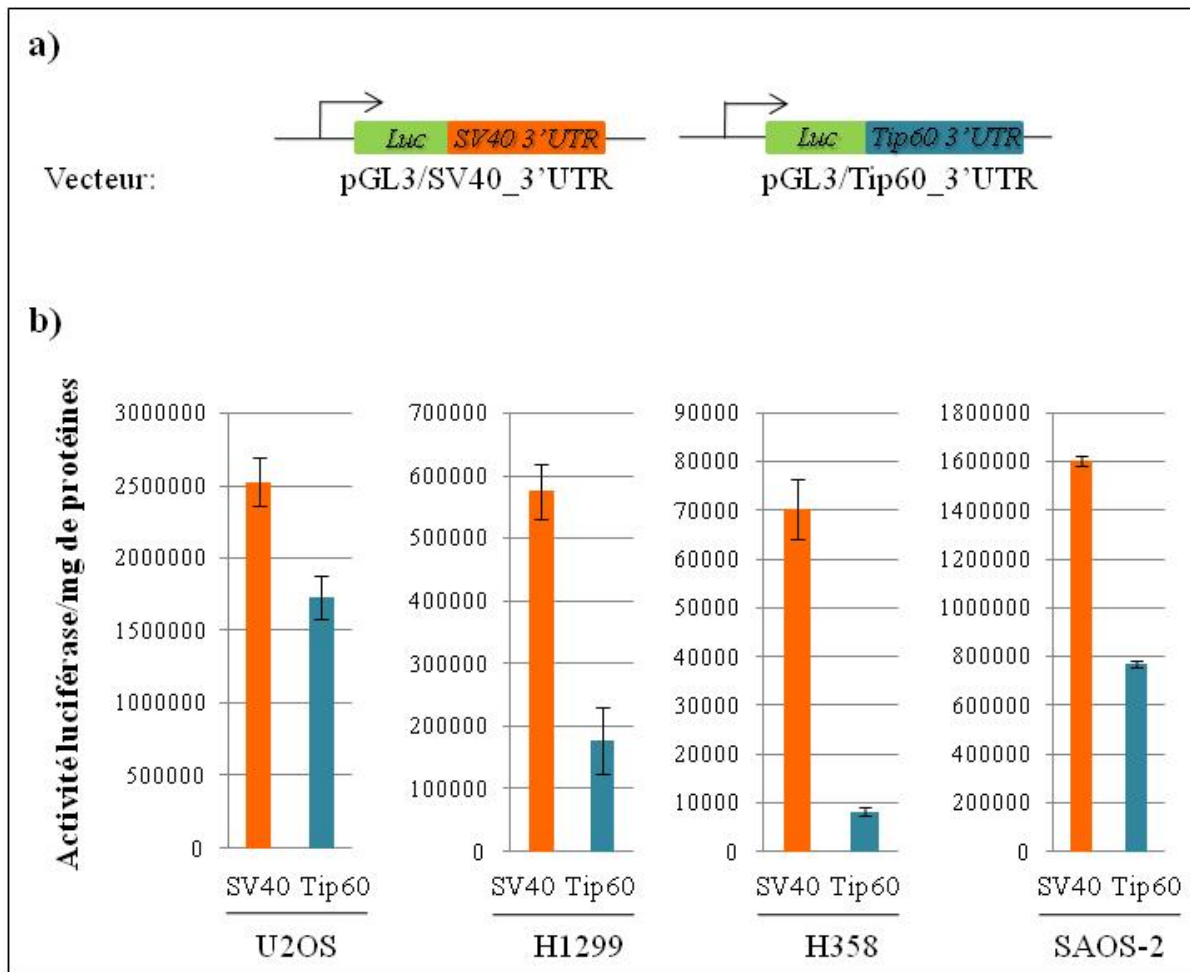




**Figure 22: Le promoteur du gène HTATIP n'est pas hyperméthylé dans les cancers bronchiques. a)** Les cellules H358 sont incubées ou non pendant 96h avec du 5-azadeoxycytidine (1µM par jour). L'ARN messager de Tip60 est analysé par RT/qPCR. **b)** Analyse par PCR MSP (Methylation Specific PCR) de 12 échantillons tumoraux présentant une forte diminution de l'expression des ARNm de Tip60 par RT/qPCR. U, non méthylé, M, méthylé, Tx, échantillon tumoral, MYOD, contrôle de PCR, H2O, contrôle sans ADN génomique, BCM+, Buffy Coat Méthylé *in vitro*, BC-, Buffy Coat non méthylé.

## 2.5 Rôle des microARNs ?

Les microARNs sont de petits ARNs non codant de 19 à 23 nucléotides. Ils ont la capacité de réguler la traduction et/ou la stabilité des ARN messagers sur la base de leur complémentarité, par appariement au niveau de la région 3'UTR (UnTRanslated) non traduite. Ils réguleraient ainsi l'expression d'environ 30% des protéines (pour revue, Filipowicz, W. et al, 2008). Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse d'une éventuelle implication de microARNs dans l'altération de l'expression de Tip60 (ARNm et/ou protéine) dans les cancers bronchiques. Afin d'investiguer cette hypothèse, nous avons cloné l'extrémité 3'UTR de Tip60 en aval du gène codant pour la luciférase (**Figure 23a**). Une même construction a été réalisée avec l'extrémité 3'UTR de SV40, connue pour ne pas être régulée par les microARNs, et nous servant ainsi de contrôle. Nous avons par la suite transfecté transitoirement ces deux plasmides en quantité équivalente dans différentes lignées cellulaires tumorales (2 issues de cancers bronchiques et 2 d'ostéosarcomes). De façon intéressante, nous observons que l'expression de la luciférase codée par le vecteur pGL3Luc-Tip60/3'UTR est significativement inférieure à celle du vecteur contrôle dans ces quatre lignées (**Figure 23b**). Il est ainsi envisageable que la perte d'expression de Tip60 dans les cancers bronchiques puisse dépendre de l'expression de microARNs.

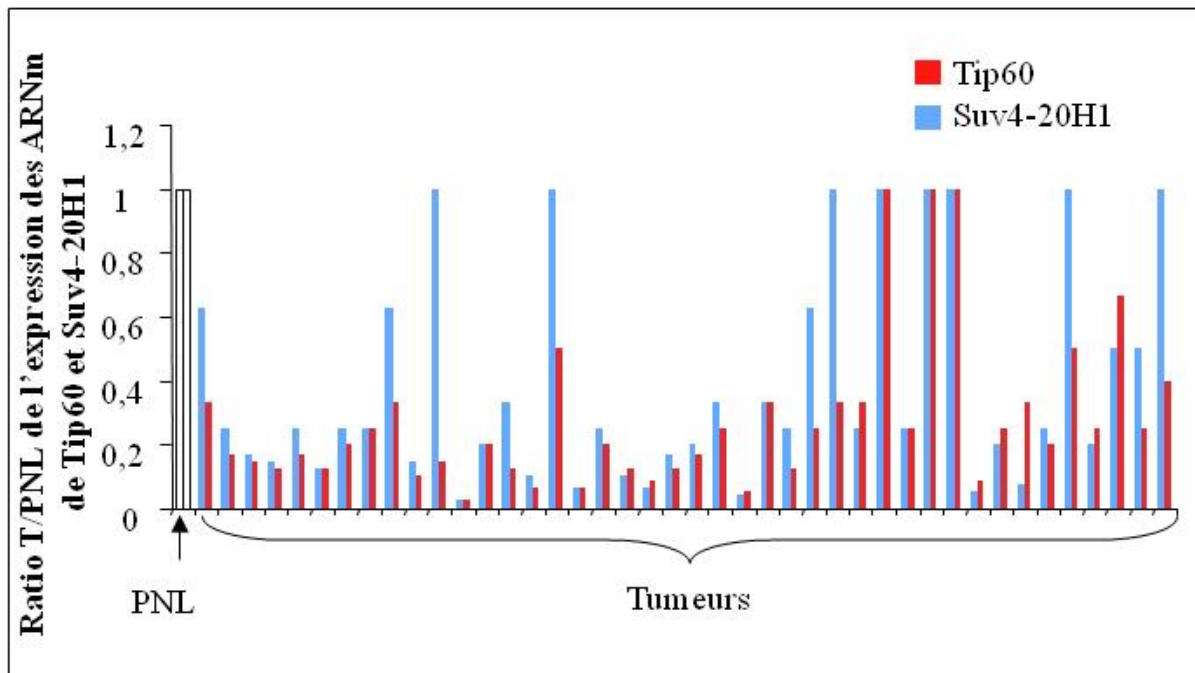


**Figure 23: La HAT Tip60 est potentiellement régulée par des microARNs.** a) Représentation schématique des vecteurs pGL3/SV40\_3'UTR et pGL3/Tip60\_3'UTR. b) L'activité luciférase du plasmide pGL3\_Tip60\_3'UTR est systématiquement plus faible que celle du vecteur pGL3/SV40\_3'UTR dans différents modèles cellulaires, suggérant l'implication potentielle de microARNs dans la dérégulation de l'expression de Tip60.



### 3. Conclusion/Discussion

Nos résultats mettent donc en évidence la perte de l'expression nucléaire de la HAT Tip60 dans 44% des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. Il n'est cependant pas exclu qu'une localisation cytoplasmique anormale de Tip60 puisse exister dans ces tumeurs. Des études sont actuellement en cours pour analyser la spécificité du marquage cytoplasmique observé dans les lignées cellulaires et les tumeurs. L'inhibition de l'expression de Tip60 s'effectue au niveau de son ARN messager, selon un mécanisme qui ne semble pas faire intervenir l'hyperméthylation du promoteur du gène HTATIP. Nous avons obtenu des données préliminaires suggérant qu'une régulation par des microARNs pourrait être mise en jeu. Cependant, il est intéressant de souligner que les niveaux d'expression des ARNm de Suv4-20H1, dont le gène est situé à moins de 2,5 Mb du gène HTATIP, suivent de très près ceux de Tip60 au sein des échantillons tumoraux (**Figure 24**). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la perte de l'expression de Tip60 dans les tumeurs bronchiques pourrait refléter l'existence d'une perte d'hétérozygotie comme cela a été décrit dans les lymphomes, les cancers de la tête et du cou et dans le cancer du sein (Gorrini, C. et al, 2007). Pour répondre à cette question, nous avons entrepris l'étude de 4 polymorphismes SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) présents tout au long du gène HTATIP et caractérisés par un pourcentage d'hétérozygotie raisonnable au sein de la population européenne. Il s'agit des polymorphismes rs2236682, rs573589, rs535111, et rs4244812 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Nous procédons actuellement à cette analyse par la technique de pyroséquençage. Toutefois, comme 1/3 des tumeurs présentent une forte perte d'expression de l'ARNm de Tip60 (80 à 95% de perte), il est tentant d'envisager qu'une régulation par des microARNs pourrait aussi contribuer à l'extinction quasi-totale de l'expression de Tip60 dans ces tumeurs.



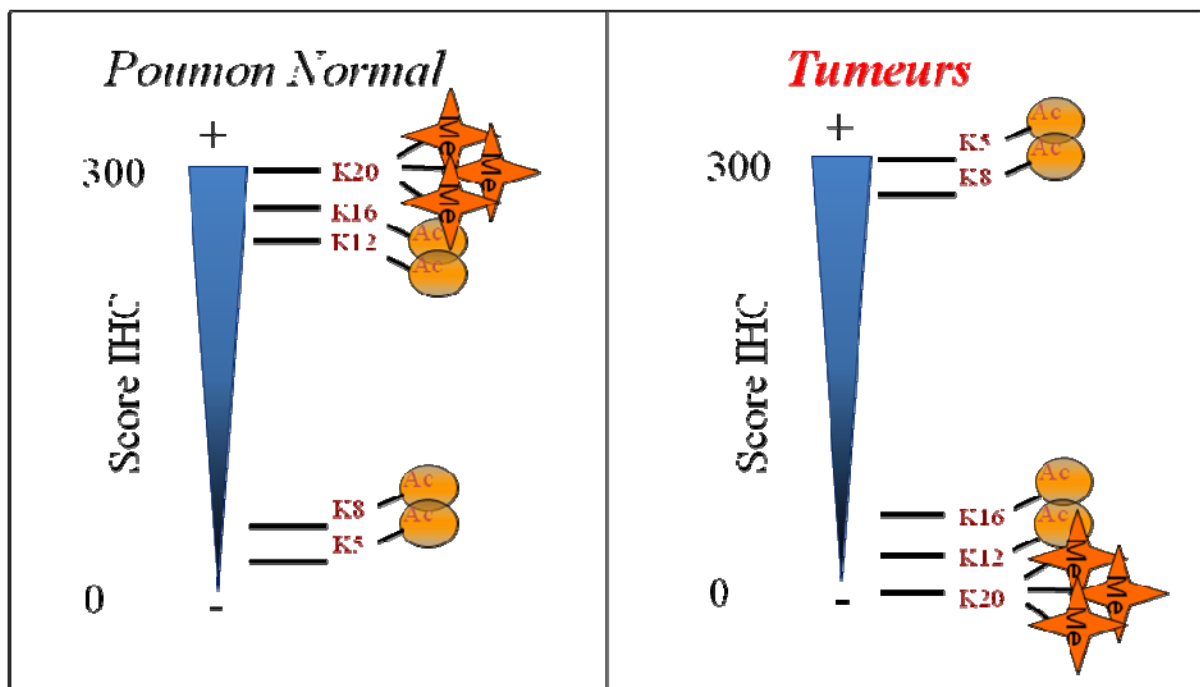
**Figure 24: Expression des ARNm de Tip60 et Suv4-20H1 dans les cancers bronchiques.** L'expression des ARNm de Tip60 et de Suv4-20H1 a été étudiée par RT/qPCR sur une série de 30 couples T/PNL dont les tumeurs présentent une absence de marquage nucléaire de Tip60 par immunohistochimie. L'expression des ARNm au sein d'une tumeur est à chaque fois comparée à celle du poumon normal associé. Le graphique représente le ratio T/PNL de l'expression des ARNm de Tip60 et de Suv4-20H1. T, tumeur, PNL, poumon normal.

## **DISCUSSION**

# I. Une signature épigénétique pour les cancers du poumon.

## 1. L'altération globale des marques épigénétiques de l'histone H4

Nos résultats mettent en évidence pour la première fois l'ampleur de la dérégulation des modifications épigénétiques de l'histone H4 dans les cancers broncho-pulmonaires. En effet, la totalité des marques analysées au cours de cette étude (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, et H4K20me3) est altérée dans ces tumeurs, et ce, avec un gain de H4K5ac et H4K8ac, et une perte de H4K12ac, H4K16ac, et H4K20me3 en comparaison avec le poumon normal (**Figure 25**).



**Figure 25 : Altération globale du « paysage épigénétique » de l'histone H4 dans les cancers bronchiques.** Le score immunohistochimique (IHC) correspond au produit du pourcentage de cellules marquées et de l'intensité du marquage de 1 à 3. Ce score peut ainsi varier entre 0 (absence de marquage) et 300 (fort marquage). Les tumeurs broncho-pulmonaires sont caractérisées par un profil épigénétique inversé en comparaison avec les poumons normaux. Ac, acétylation, Me, méthylation.

De façon remarquable, nous notons que les altérations épigénétiques semblent suivre un schéma qui est dépendant du type histologique concerné (carcinomes malpighiens ou adénocarcinomes). Cette observation conforte ainsi l'idée de l'existence de mécanismes distincts à l'origine de la transformation de l'épithélium bronchique en un type histologique donné.

## **1.1 Les lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4**

Les fonctions spécifiques reliées à l'acétylation des lysines 5 et 8 de l'histone H4 sont peu connues. Cependant, étant donné que l'acétylation est une marque qui est intimement liée à l'activation de la transcription, il est envisageable que l'hyperacétylation de H4K5 et H4K8 observée dans les cellules tumorales puisse être la résultante d'une forte activité transcriptionnelle de ces cellules.

En contraste, différents travaux ont impliqués l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 dans la réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, l'histone acétyltransférase Hat1 est spécifiquement recrutée aux sites de cassures double brins de l'ADN, où elle acétyle H4K12 (Qin, S. & Parthun, M.R., 2006). De plus, la délétion du gène codant pour cette HAT entraîne une sensibilité au MMS (Methyl MethanSulfonate) dans différents systèmes biologiques (Benson, L.J. et al, 2007 ; Barman, H.K. et al, 2006), suggérant que cette fonction de la HAT-1 est conservée au cours de l'évolution. On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'en altérant les mécanismes de réponses aux dommages de l'ADN, la perte d'H4K12ac pourrait contribuer à la mise en place d'une instabilité génétique et favoriser l'émergence de mutations, fournissant par là même un avantage de croissance aux cellules.

## **1.2 La lysine 16 de l'histone H4, une lysine à part**

L'histone H4 est majoritairement acétylée au niveau de K16 chez les mammifères (Zhang, K. et al, 2002). L'acétylation de H4K16 joue un rôle crucial dans la structuration du génome et de nombreuses données de la littérature lui attribuent un rôle singulier. En effet, l'acétylation de H4K16 est la seule modification d'histones capable d'affecter de manière directe le processus de compaction de la fibre de chromatine (Shogren-Knaak, M. et al, 2006). L'acétylation de H4K16 est nécessaire pour la spécification de domaines chromatiniens

favorables à la transcription sur de vastes portions du génome, voire sur des chromosomes entiers. Ainsi, chez la levure, l'acétylation de H4K16 est essentielle à la détermination de la position de la frontière entre les gènes transcrits de l'euchromatine et ceux épigénétiquement réprimés de l'hétérochromatine (Suka, N. et al, 2002 ; Shia, W.J. et al, 2006). L'acétylation de H4K16 est également impliquée dans le processus de compensation de dosage chez la Drosophile (Akhtar, A. & Becker, P.B., 2000), et pourrait ainsi inhiber la compaction du chromosome.

Ainsi, étant donné la fonction clé de H4K16ac dans la structuration des grands domaines chromatiniens et notamment dans l'inhibition de la propagation de l'hétérochromatine au niveau de régions euchromatiques, il est tentant de spéculer que sa perte dans les tumeurs puisse contribuer à l'hétérochromatinisation de régions qui sont activement transcrites dans les cellules normales, et notamment réprimer l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeur.

### **1.3 H4K20me3, une marque de l'hétérochromatine**

L'hétérochromatine est impliquée dans le maintien de la structure chromatinienne des régions centromériques (Bernard, P. & Allshire, R., 2002) et télomériques (Benetti, R. et al, 2007) et dans la préservation de l'intégrité génomique par la répression des éléments transposables (Birchler, J.A. et al, 2000). Il est actuellement admis que la triméthylation de H4K20 est intimement associée au statut hétérochromatique du génome (Schotta, G. et al, 2004). Ainsi, la perte de H4K20me3 que nous observons dans les tumeurs bronchiques pourrait engendrer une altération de la structure de la chromatine (relaxation) et la réactivation d'éléments transposables, contribuant ainsi à l'instabilité génomique caractéristique des cellules tumorales.

De façon remarquable, la perte de H4K20me3 s'effectue très tôt durant le processus de carcinogénèse bronchique puisque l'atténuation du niveau global de H4K20me3 s'observe dès le stade hyperplasique, pour conduire à une quasi éradication de cette marque dans les métaplasies malpighiennes. Or, il est de première importance de noter qu'à ces stades prénéoplasiques, ce ne sont encore que des lésions réactionnelles qui peuvent soit régresser soit conduire à l'émergence de cellules potentiellement tumorales. Dans ce contexte, il est

envisageable que la perte de H4K20me3 puisse être un marqueur prédictif de la survenue d'un carcinome de type malpighien. Cette hypothèse est actuellement testée au laboratoire.

H4K20 peut se présenter sous une forme mono-, di-, ou triméthylée. A ce titre, il est probable que la perte de H4K20me3 soit associée à des variations des niveaux de mono- (H4K20me1) et/ou diméthylation (H4K20me2) de H4K20. De façon intéressante, H4K20me1 est étroitement associée à l'activation transcriptionnellement des gènes (Talaszy, H. et al, 2005 ; Barski, A. et al, 2007), alors que H4K20me3 est intimement liée aux régions hétérochromatiques et est ainsi connectée à la répression de la transcription. De façon importante, H4K20me2 est une marque qui est spécifiquement reconnue par les protéines de la réponse aux dommages de l'ADN Crb2 et 53BP1 chez *S. pombe* et chez l'Homme, respectivement (Botuyan, M.V. et al, 2006). Ainsi, un enrichissement en H4K20me1 par perte de H4K20me3 et/ou H4K20me2 pourrait être considéré tel un moteur pour la mise en place d'une instabilité génétique via l'altération des structures hétérochromatiniennes constitutives (centromériques et/ou télomériques), contribuant ainsi à la réactivation de séquences normalement réprimées (ex : rétrotransposons, séquences virales ancestrales) et/ou facultatives, et participant à la réexpression de gènes dont l'activité s'est éteinte au cours du développement, et/ou des différentes étapes de la différenciation. Il est peu probable qu'un enrichissement en H4K20me2 ait une répercussion sur le devenir de la cellule puisque les histones H4 semblent être très majoritairement diméthylées en K20 chez la drosophile et les mammifères (jusqu'à 90%) (Yang, H. et al, 2008 ; Schotta, G. et al, 2008 ; Pesavento, J.J. et al, 2008), suggérant ainsi la dispersion de cette marque au travers du génome entier, sans association particulière avec l'euchromatine et l'hétérochromatine. En revanche, sa perte pourrait jouer un rôle critique dans la carcinogénèse étant donné son implication dans la détection des cassures double brins de l'ADN, même si cette fonction reste encore peu documentée. En effet, il est tentant de spéculer qu'une diminution de la distribution cellulaire en H4K20me2 puisse contribuer à une diminution de la capacité des cellules à détecter ces lésions et par conséquent affecter leur prise en charge, puisque chez les mammifères H4K20me2 semble agir de concert avec  $\gamma$ -H2AX dans cette fonction (Sanders, S.L. et al, 2004 ; Nakamura, T.M., et al, 2004).

Par ailleurs, la monométhyltransférase PR-Set7, spécifique de H4K20, semble jouer un rôle important dans la réplication et la stabilité du génome (Tardat, M. et al, 2007). Par conséquent, il est envisageable que la perte de H4K20me1 puisse être à l'origine d'une

instabilité génétique, bien que dans cette étude la perte de PR-Set7 conduit non seulement à la perte de H4K20me1 mais également à la disparition de H4K20me3.

Afin de mieux appréhender la régulation du statut méthylé d'H4K20 dans la carcinogénèse broncho-pulmonaire, nous avons pour projet au laboratoire d'investiguer les statuts mono- et diméthylé de ce résidu dans les lésions préneoplasiques et de rechercher si des fluctuations des marques H4K20me1, H4K20me2 et/ou H4K20me3 contribuent à la séquence de développement des préneoplasies et/ou conditionnent le développement d'un cancer (H4K20me3, puis H4K20me2, et enfin H4K20me1).

## **2. Mise en évidence d'un « dialogue épigénétique »**

Il est maintenant clairement établi qu'il existe un « dialogue » entre les différentes marques épigénétiques de la chromatine : la modification d'un résidu pouvant conduire à la modification d'un second (pour revue, Suganuma, T. & Workman, J.L., 2008). Nos résultats semblent être en accord avec cette théorie du code histone puisque nous démontrons l'existence de très fortes corrélations entre les différentes marques épigénétiques de l'histone H4 dans les tumeurs. Certaines de ces associations sont communes aux tumeurs bronchiques dans leur ensemble suggérant qu'un code épigénétique global est caractéristique de la transformation de l'épithélium bronchique. De façon plus intéressante, nous montrons aussi l'existence de corrélations spécifiques au sein des différents types histologiques suggérant qu'un code épigénétique particulier pourrait déterminer l'évolution des cellules tumorales vers un type histologique donné.

## **3. Mécanismes moléculaires à l'origine des altérations...**

### **3.1 ...de l'acétylation de l'histone H4 ?**

L'acétylation est une modification épigénétique très dynamique et étroitement régulée par le ratio des activités HAT/HDAC. Ainsi, il est très probable que l'altération des modifications épigénétiques de la queue N-terminale de l'histone H4 ait pour origine la dérégulation de cette balance HAT/HDAC.



Contrairement à certaines modifications pour lesquelles des activités spécifiques ont été décrites, les HATs et HDACs régulent le niveau d'acétylation de plusieurs résidus distincts. Ainsi, chez l'Homme, la HAT Tip60 a la capacité d'acétyler les quatre lysines N-terminales d'H4, HBO1 les lysines K5, K8 et K12, et les HATs p300 et CBP les lysines K5 et K8 (pour revue Kouzarides, T., 2007). Par ailleurs, exception faite des HDACs de classe III, SirT1, SirT2, et SirT3 qui sont les seules enzymes actuellement connues pour déacétyler H4K16 chez les eucaryotes supérieurs (pour revue, Vaquero, A. et al, 2007), aucune donnée n'indique de spécificité pour les HATs de classe I et II.

Le statut des HATs et HDACs a été très peu investigué dans les tumeurs bronchiques. La seule étude existante concerne une analyse par immunohistochimie de l'expression de la HAT HboI qui met en évidence sa surexpression dans les carcinomes testiculaires, ovariens, du sein, de l'estomac, de l'œsophage, et de la vessie, mais pas dans les tumeurs pulmonaires (Iizuka, M. et al, 2009). De façon intéressante, nos résultats d'immunohistochimie concernant le statut de la HAT Tip60 dans les cancers du poumon indiquent sa perte d'expression dans 44% des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. Cette absence d'expression est la conséquence de la perte de son ARN messenger dans 87% des échantillons négatifs pour l'expression de Tip60 en immunohistochimie (26/30 cas), selon un mécanisme ne faisant pas intervenir l'hyperméthylation du promoteur du gène HTATIP (0/12 cas), codant pour Tip60. A l'heure actuelle, les données de la littérature et nos résultats préliminaires semblent plutôt indiquer l'existence d'une perte d'hétérozygotie de son locus génomique. Par ailleurs, dans d'autres types tumoraux, il a été rapporté une altération de l'expression des HATs Tip60 et p300/CBP. En effet, une étude récente menée par Gorrini et coll., décrit la perte mono-allélique fréquente du gène HTATIP dans les lymphomes, les cancers de la tête et du cou, ou encore dans le cancer du sein (Gorrini, C. et al, 2007). Quant à la HAT p300, celle-ci est fréquemment ciblée par LOH dans une grande variété de tumeurs solides, incluant les cancers du colon, du sein, ou encore du foie (pour revue Iyer, N.G. et al, 2004). De même, un criblage sur lignées cellulaires a montré une LOH de p300 et de CBP dans 51% et 35% des cas (Tillinghast, G.W. et al, 2003).

Le statut des HDACs dans les cancers broncho-pulmonaires n'est pas documenté. De manière importante, H4K16 est le seul résidu d'histone pour lequel des HAT/HDAC spécifiques ont été décrites, suggérant l'étroite régulation de cette marque. Il en est ainsi chez l'Homme et la Drosophile de la HAT MOF ou bien encore du couple HAT Sas2 et HDAC Sir2 chez *S. cerevisiae* (pour revue Miotto, B. & Struhl, K., 2007). Ainsi, la perte de H4K16ac

pourrait s'expliquer par l'altération de l'expression de la HAT MOF puisque celle-ci est nécessaire à l'acétylation de H4K16 dans les cellules de mammifères (Taipale, M. et al, 2005). De plus, cette HAT a déjà été identifiée dans des réarrangements chromosomiques associés à des leucémies présentant une activité HAT H4K16 réduite, de même que les HATs MOZ et MORF qui acétylent aussi H4K16 (Fraga, M.F. et al, 2005). Enfin, la HDAC de classe III SirT1 (spécifique de H4K16) est surexprimée dans les stades avancés des cancers de la prostate (Kuzmichev, A. et al, 2005), du sein (Ashraf, N. et al, 2006) et du colon (Pruitt, K. et al, 2006).

### 3.2 ...de la triméthylation de H4K20 ?

De même, la méthylation des histones est régulée par le ratio d'activité des HMT/HDM (histones méthyltransférases/histones déméthylases). Il est connu que les HMTs Suv4-20H1 et Suv4-20H2 catalysent la triméthylation de H4K20 (Schotta, G. et al, 2004). Par contre, aucune déméthylase spécifique de H4K20me3 n'a encore été décrite à ce jour. De façon intéressante, nous avons décrit la perte d'expression des messagers codant pour Suv4-20H1/2 et connecté la perte globale de H4K20me3 à la diminution de l'expression des transcrits de Suv4-20H2 ( $P = 0,019$ ). Bien que l'on ne puisse exclure la possibilité qu'une déméthylase encore non identifiée à ce jour puisse être anormalement exprimée dans les cellules tumorales, il est important de noter qu'une corrélation similaire entre H4K20me3 et Suv4-20H2 a précédemment été rapportée dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines du sein aussi bien que dans un modèle d'hépatocarcinogénèse induite par une déficience en méthyle chez des rats (Pogribny, I.P. et al, 2006 ; Tryndyak, V.P. et al, 2006). Il est également envisageable que la perte de H4K20me3 provienne en partie de l'altération de l'expression d'une autre histone méthyltransférase, Suv3-9H1, spécifique de l'histone H3, puisque la triméthylation de H3K9 est nécessaire à la triméthylation de H4K20 (Schotta, G. et al, 2004). Etant donné le « dialogue épigénétique » qui semble exister entre ces deux modifications, la dérégulation de Suv3-9H1 pourrait aussi contribuer à la perte de H4K20me3 lorsque Suv4-20H2 n'est pas inactivée. Il en est de même pour la monométhyltransférase PR-Set7 dont l'expression est nécessaire pour la maintenance de H4K20me1 mais aussi et de façon surprenante de H4K20me3, mais pas de H4K20me2 (Tardat, M. et al, 2007).

## **4. H4K20me3, un outil potentiel pour une meilleure prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes de stade I ?**

A l'heure actuelle, le traitement des cancers broncho-pulmonaires de stades précoces (stade I-II) est la résection chirurgicale de la tumeur, associée ou non à une chimiothérapie adjuvante. Les essais cliniques réalisés à ce jour ont montré le bénéfice de l'association de cette chimiothérapie pour les stades IB, II et IIIA (Arriagada, R. et al, 2004), mais pas pour le stade IA, qui n'est donc traité que par ablation de la masse tumorale. Cependant, les données actuelles indiquent que 30% de ces patients rechutent dans les 5 années suivant l'acte chirurgical. Ce résultat suggère ainsi l'existence d'une sous-population de patients pour laquelle se pose la question d'une chimiothérapie adjuvante. La problématique actuelle se situe dans la caractérisation de cette sous-population. Dans ce contexte, Potti et coll. ont mis en évidence un profil d'expression de gènes (« The Lung Metagene Model ») caractéristique d'un sous-groupe de patients porteurs d'un CBnPC de stade IA caractérisé par un fort risque de rechute (Potti, A. et al, 2006). Cela suggère l'existence d'une certaine hétérogénéité parmi les CBnPCs de stade I. Dans une étude récente, Barlési et coll. ont également montré que les patients porteurs d'un adénocarcinome de stade I avec une hyperacétylation de H3K9 présentent un mauvais pronostic (Barlési, F. et al, 2007). De façon similaire, nos données indiquent que la perte de H4K20me3, chez les patients porteurs d'un adénocarcinome de stade I, est associée à une survie réduite. L'ensemble de ces données démontrent donc que les adénocarcinomes de stade I constituent une population hétérogène de tumeurs. Dans ce contexte, les modifications épigénétiques des histones pourraient se révéler comme des outils très utiles pour sélectionner les patients pour lesquels l'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante serait bénéfique. Il est également envisageable que l'analyse des combinaisons des marques épigénétiques des protéines histones puisse aider à cette caractérisation. Pour cela, nous recherchons actuellement au laboratoire si une combinaison particulière H4K20me3/H3K9ac dans les adénocarcinomes de stades précoces pourrait permettre d'améliorer la définition de ces sous-groupes pronostics.

## **II. E2F1 s'accumule sous une forme acétylée dépendante de la HAT Tip60 en réponse au stress génotoxique.**

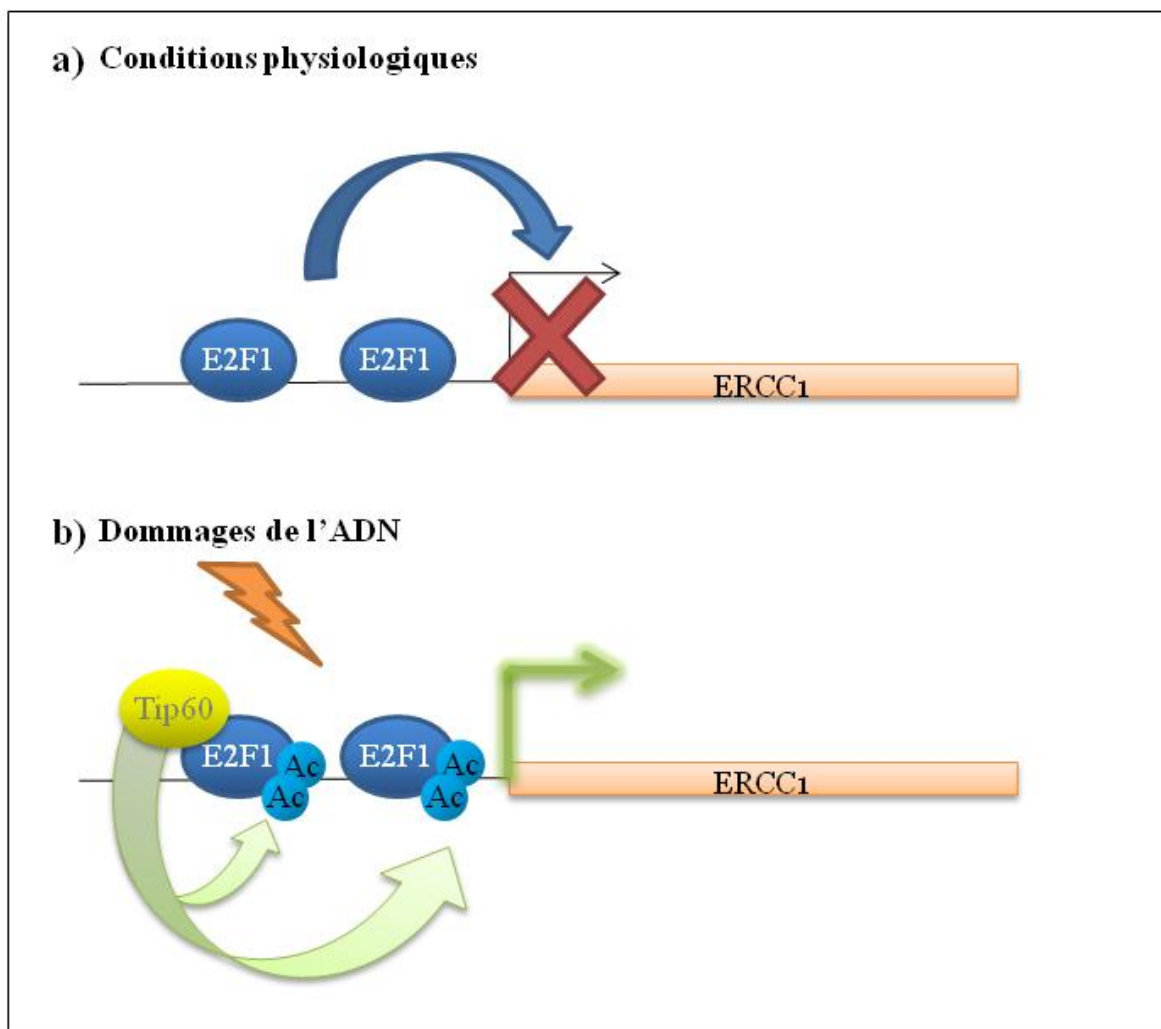
### **1. Une nouvelle implication de E2F1 dans la réparation des dommages de l'ADN**

Nous montrons que E2F1 s'accumule sous une forme acétylée dépendante de la HAT Tip60, après 20 heures de traitement au cisplatine. De façon surprenante, cette acétylation n'affecte pas le cycle cellulaire ni l'apoptose induite par cet agent génotoxique. De plus, Tip60 et E2F1 s'accumulent précocement en réponse au cisplatine, et ce, dans une fenêtre de temps précédant l'induction de la mort cellulaire. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un rôle de l'acétylation de E2F1 dans un processus autre que l'induction de l'apoptose.

Un certain nombre d'études basées sur des analyses à haut débit suggère fortement l'implication de E2F1 dans des voies de signalisation autres que la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, plusieurs gènes impliqués dans différents mécanismes de réparation des dommages de l'ADN ont été décrits comme des cibles potentielles de E2F1 (Ren, B. et al, 2002 ; Ishida, S. et al, 2001 ; Polager, S. et al, 2002 ; Vernell, R. et al, 2003 ; Semizarov, D. et al, 2004 ; Lin, P.S. et al, 2009). Bien que la signification fonctionnelle de l'ensemble de ces données ne soit pas encore bien établie, celles-ci suggèrent fortement un rôle de E2F1 dans la réparation des dommages de l'ADN.

Le cisplatine est un agent génotoxique qui interagit avec l'ADN pour former des adduits, ce qui entraîne la formation de ponts intra- et/ou inter-brins et déstabilise la structure de la double hélice (Rabik, C.A. & Dolan, M.E., 2007). Le système de réparation par excision de nucléotides (NER) est la voie de signalisation clé impliquée dans la réparation des lésions induites par le cisplatine. La réparation de ces lésions semble être rapide, et il est probable que la majorité d'entre elles soit réparée dans l'heure (pour revue, Helleday, T. et al, 2008). De manière intéressante, nous observons une accumulation concomitante à celle de E2F1 d'un élément clé du système NER, la protéine ERCC1. De plus, nous montrons que l'expression de Tip60 et de E2F1 est nécessaire pour l'accumulation de ERCC1 en réponse au cisplatine. Ces

résultats suggèrent que l'acétylation de E2F1 par Tip60 pourrait jouer un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN, mais aussi que ERCC1 pourrait être une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1. Nous testons actuellement cette hypothèse, d'autant que nous avons identifié plusieurs sites consensus de liaison de E2F1 dans la région promotrice de ERCC1. De façon surprenante, bien que la protéine E2F1 soit nécessaire pour l'activation de ERCC1 en réponse au cisplatine, nous notons que sa neutralisation conduit à une forte accumulation de ERCC1. Il est ainsi tentant d'émettre l'hypothèse qu'en absence de stress E2F1 réprime l'expression basale de ERCC1 et que son acétylation par Tip60 dans un contexte de dommages de l'ADN conduise à la dérégulation de l'expression de ERCC1 pour induire la réparation (**Figure 26**).



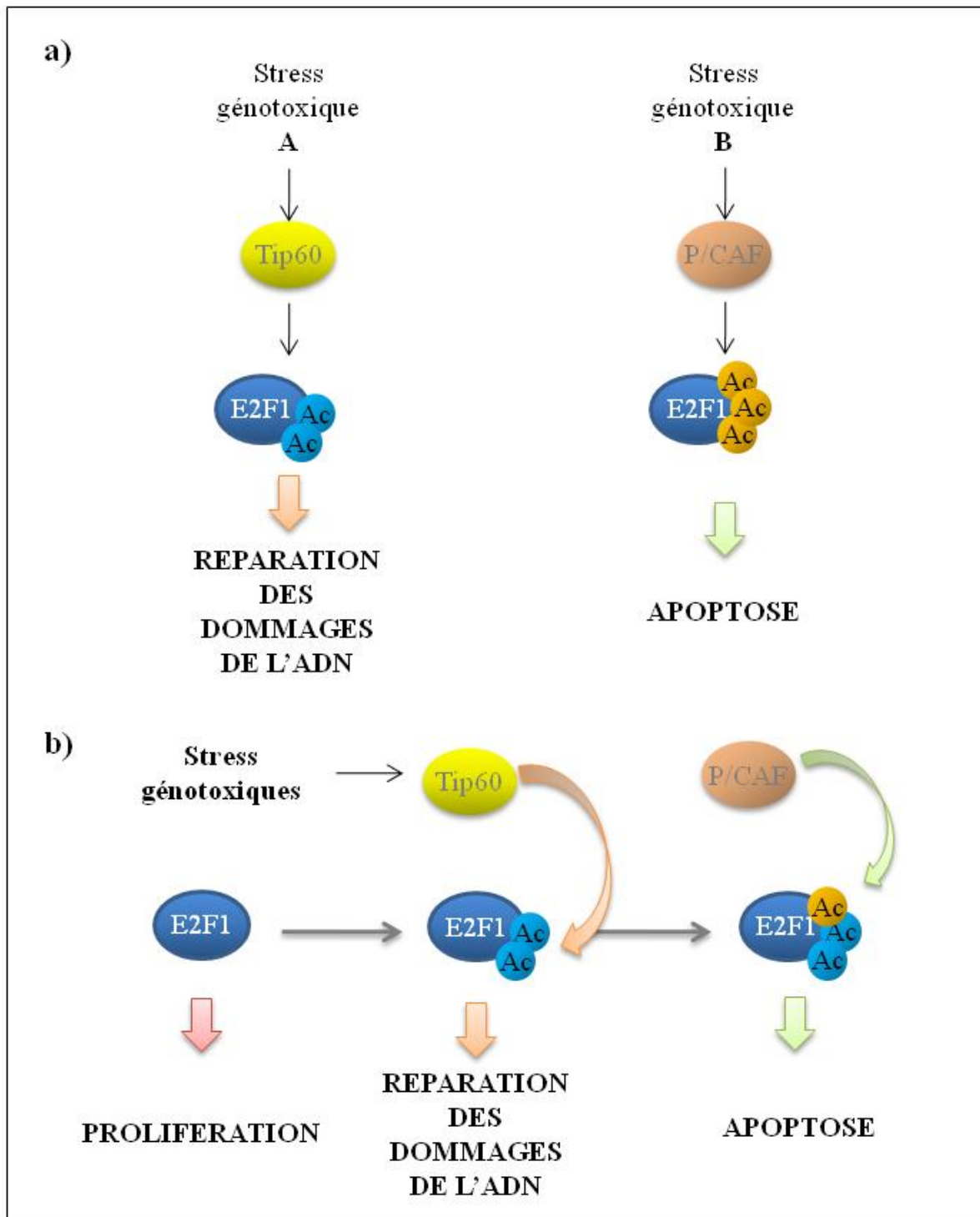
**Figure 26: Modèle du mode de régulation du gène ERCC1 en réponse au cisplatine. a)** Dans des conditions physiologiques, le facteur de transcription E2F1 pourrait réprimer l'expression basale du gène ERCC1. **b)** Son acétylation par la HAT Tip60, en réponse à un dommage de l'ADN, conduirait à la dérégulation de ERCC1.

---

## 2. Tip60 vs P/CAF : Deux HATs pour une même cible !

De façon intéressante, la neutralisation de Tip60 par ARN interférence n'altère en rien l'apoptose médiée par E2F1 après 20 heures de traitement des cellules au cisplatine, indiquant que l'acétylation de E2F1 dans ce contexte n'est pas impliquée dans l'induction de l'apoptose, au moins à 20 heures.

L'acétylation de E2F1 sur ses lysines 117/120/125 par P/CAF conduit à l'activation transcriptionnelle de cibles pro-apoptotiques de E2F1 (Pédiconi, N. et al, 2003). La divergence de nos données avec les résultats rapportés par Pediconi et coll. pourrait être expliquée en partie par une spécificité différente des lysines ciblées par les HATs P/CAF (117/120/125) et Tip60 (120/125) en réponse aux dommages de l'ADN. De façon intéressante, l'acétylation de E2F1 par P/CAF conduit à l'induction de l'apoptose en réponse à la doxorubicine mais pas aux UVBs (Pediconi, N. et al, 2003). Ainsi, il est envisageable que la nature des lésions induites par les agents génotoxiques influence le recrutement d'une HAT spécifique pour acétyler E2F1 et conditionne le choix de la réponse cellulaire (**Figure 27a**). Cependant, on ne peut exclure la possibilité que les agents génotoxiques puissent dans un premier temps induire l'acétylation de E2F1 par Tip60 sur ses lysines 120/125 pour faciliter la réparation des dommages de l'ADN, et dans un second temps, si les lésions sont trop importantes pour être prises en charge par la cellule, que P/CAF complète l'acétylation de E2F1 sur sa lysine 117 pour induire l'apoptose (**Figure 27b**).



**Figure 27: Modèle de la régulation de l'acétylation de E2F1 en réponse aux dommages de l'ADN. a)** Le type de stress génotoxique pourrait dicter le recrutement d'une HAT spécifique et moduler le choix de la cellule entre la réparation des dommages de l'ADN et l'apoptose. **b)** E2F1 pourrait aussi être d'abord acétylé par Tip60 pour favoriser la réparation des lésions, puis par P/CAF pour induire l'apoptose, si les lésions sont trop importantes pour être réparées.

### **3. E2F1, senseur de dommages de l'ADN ?**

Une étude très récente menée par Prost et coll. a montré que la protéine DDB2 (DNA Damage Binding protein 2) est une nouvelle cible transcriptionnelle de E2F1 (Prost, S. et al, 2007). De plus, d'autres données suggèrent fortement l'implication de E2F1 en tant que régulateur transcriptionnel du gène XPC (Xeroderma Pigmentosum groups C) (Lin, P.S. et al, 2009). DDB2 et XPC sont deux protéines clés de la réparation par excision de nucléotides impliquées dans la détection de lésions génotoxiques qui leur sont propres. Ces deux études situeraient ainsi E2F1 en amont de protéines jouant un rôle dans la détection de lésions de l'ADN. Différents travaux impliquent Tip60 dans la détection des cassures double brins de l'ADN (pour revue Squatrito, M. et al, 2006). Il serait donc intéressant de rechercher si Tip60 pourrait aussi contribuer au contrôle de l'expression de DDB2 et XPC médiée par E2F1.

Il a été montré que E2F1 interagit avec Tip60 et induit le recrutement de différentes sous-unités du complexe Tip60 au niveau de ses promoteurs cibles pour favoriser leur transcription (Taubert, S. et al, 2004). Il est ainsi tentant d'émettre l'hypothèse qu'en l'absence de stress, Tip60 agirait comme cofacteur transcriptionnel de E2F1 pour faciliter la transcription des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire. En réponse à un stress génotoxique, le complexe Tip60/E2F1 pourrait fonctionner en tant que senseur de dommages et induire l'expression de gènes impliqués dans les étapes les plus précoces de la réparation. Par conséquent, l'interaction fonctionnelle entre E2F1 et Tip60 pourrait faciliter la progression du cycle cellulaire tout en garantissant la stabilité du génome.

### **4. Vers une meilleure compréhension de la résistance des cellules tumorales aux sels de platine.**

Bien que les agents chimiothérapeutiques à base de sels de platine tels que le carcoplatine, le cisplatine, et l'oxaliplatine soient couramment utilisés dans le traitement de nombreuses tumeurs solides, et notamment dans les cancers du poumon, leur efficacité est très souvent limitée par le développement de mécanismes de résistance des tumeurs. Ainsi, la résistance des cellules tumorales envers ces agents est un problème clinique majeur, puisqu'il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement adjuvant pouvant être associé à cette thérapie



pour passer outre la résistance tumorale. Il y a donc nécessité d'approfondir la compréhension de ce(s) mécanisme(s) de résistance.

Le biomarqueur prédictif majeur de la survie des patients, après résection chirurgicale complète d'un cancer bronchique non à petites cellules et recevant du cisplatine en chimiothérapie adjuvante, est la protéine clé de la réparation par excision de nucléotides, ERCC1 (Olaussen, K.A., et al, 2006). Nos résultats établissent un lien étroit entre cette dernière et Tip60 et suggèrent que Tip60 pourrait être un facteur de résistance au cisplatine. Nous montrons aussi la perte de l'expression de Tip60 dans une forte proportion de cancers broncho-pulmonaires. De manière importante, il apparaît qu'une perte partielle de l'expression de Tip60 (1/2) inhibe son activité dans la réponse aux dommages de l'ADN induits par l'oncogène c-myc sans affecter ses autres fonctions biologiques (Gorrini, C. et al, 2007). Il est de ce fait envisageable que la perte d'expression de Tip60 dans les cancers bronchiques puisse conduire à une altération de la réparation de l'ADN, et fournir un avantage prolifératif aux cellules tumorales par apparition de mutations. Ainsi, le statut de Tip60 dans ces tumeurs pourrait expliquer leur réponse différentielle aux chimiothérapies à base de sels de platine et par la même constituer un biomarqueur candidat de la réponse au traitement.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

## A

Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG, Jr. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* **16**: 6623-33.

Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Fritsch L, Yahi H, Sekhri R, Naguibneva I *et al* (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J* **23**: 605-15.

Akhtar A, Becker PB (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* **5**: 367-75.

Albani D, Mariconti L, Ricagno S, Pitto L, Moroni C, Helin K *et al* (2000). DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J Biol Chem* **275**: 19258-67.

Allen KE, de la Luna S, Kerkhoven RM, Bernards R, La Thangue NB (1997). Distinct mechanisms of nuclear accumulation regulate the functional consequence of E2F transcription factors. *J Cell Sci* **110** (Pt 22): 2819-31.

Alonso MM, Fueyo J, Shay JW, Aldape KD, Jiang H, Lee OH *et al* (2005). Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1589-600.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J (2004). Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **350**: 351-60.

Asano M, Nevins JR, Wharton RP (1996). Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **10**: 1422-32.

Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, Payne AP, George WD *et al* (2006). Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer* **95**: 1056-61.

Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, Lees JA (2004). Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev* **18**: 1413-22.

Avvakumov N, Cote J (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* **26**: 5395-407.

Awasthi S, Sharma A, Wong K, Zhang J, Matlock EF, Rogers L *et al* (2005). A human T-cell lymphotropic virus type 1 enhancer of Myc transforming potential stabilizes Myc-TIP60 transcriptional interactions. *Mol Cell Biol* **25**: 6178-98.

---

**B**

Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* **110**: 55-67.

Bakkenist CJ, Kastan MB (2004). Initiating cellular stress responses. *Cell* **118**: 9-17.

Bannister AJ, Kouzarides T (2005). Reversing histone methylation. *Nature* **436**: 1103-6.

Barlesi F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P *et al* (2007). Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **25**: 4358-64.

Barman HK, Takami Y, Ono T, Nishijima H, Sanematsu F, Shibahara K *et al* (2006). Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochem Biophys Res Commun* **345**: 1547-57.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z *et al* (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-37.

Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K *et al* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864-70.

Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL *et al* (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**: 124-5.

Baudino TA, Maclean KH, Brennan J, Parganas E, Yang C, Aslanian A *et al* (2003). Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. *Mol Cell* **11**: 905-14.

Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton PS, Travis WD *et al* (2003). The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol* **34**: 136-42.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E *et al* (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11891-6.

Bell LA, Ryan KM (2004). Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ* **11**: 137-42.

Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T *et al* (2007). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* **178**: 925-36.

- Benson LJ, Phillips JA, Gu Y, Parthun MR, Hoffman CS, Annunziato AT (2007). Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair. *J Biol Chem* **282**: 836-42.
- Bernard P, Allshire R (2002). Centromeres become unstuck without heterochromatin. *Trends Cell Biol* **12**: 419-24.
- Bernstein E, Hake SB (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol* **84**: 505-17.
- Bhoumik A, Singha N, O'Connell MJ, Ronai ZA (2008). Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation. *J Biol Chem* **283**: 17605-14.
- Birchler JA, Bhadra MP, Bhadra U (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 211-6.
- Bird AP (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-13.
- Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC *et al* (2002). Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* **419**: 411-5.
- Blattner C, Sparks A, Lane D (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* **19**: 3704-13.
- Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J *et al* (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**: 1361-73.
- Bowman RV, Yang IA, Semmler AB, Fong KM (2006). Epigenetics of lung cancer. *Respirology* **11**: 355-65.
- Brady ME, Ozanne DM, Gaughan L, Waite I, Cook S, Neal DE *et al* (1999). Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* **274**: 17599-604.
- Brambilla E, Gazzeri S, Lantuejoul S, Coll JL, Moro D, Negoescu A *et al* (1998). p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 1609-18.
- Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C (1999). Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* **188**: 351-60.
- Bramis J, Zacharatos P, Papaconstantinou I, Kotsinas A, Sigala F, Korkolis DP *et al* (2004). E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. *Anticancer Res* **24**: 3041-7.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**: 597-601.

---

Bruske-Hohlfeld I (2009). Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods Mol Biol* **472**: 3-23.

Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP *et al* (2005). Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**: 232-41.

## C

Cai Y, Jin J, Tomomori-Sato C, Sato S, Sorokina I, Parmely TJ *et al* (2003). Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem* **278**: 42733-6.

Cairns BR (2007). Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 989-96.

Cam H, Dynlacht BD (2003). Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* **3**: 311-6.

Cameron EE, Baylin SB, Herman JG (1999). p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* **94**: 2445-51.

Campanero MR, Flemington EK (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2221-6.

Campisi J (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* **309**: 886-7.

Cao Q, Xia Y, Azadniv M, Crispe IN (2004). The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J Immunol* **173**: 1111-7.

Cao X, Sudhof TC (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**: 115-20.

Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK *et al* (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**: 581-92.

Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321-9.

Celic I, Masumoto H, Griffith WP, Meluh P, Cotter RJ, Boeke JD *et al* (2006). The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr Biol* **16**: 1280-9.

Ceol CJ, Horvitz HR (2001). dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol Cell* **7**: 461-73.

Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**: 437-48.

Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* **20**: 801-9.

Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E *et al* (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* **33**: 5458-70.

Col E, Caron C, Chable-Bessia C, Legube G, Gazzeri S, Komatsu Y *et al* (2005). HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *EMBO J* **24**: 2634-45.

Cosgrove MS, Wolberger C (2005). How does the histone code work? *Biochem Cell Biol* **83**: 468-76.

Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X *et al* (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* **24**: 132-8.

Coutinho G, Mitui M, Campbell C, Costa Carvalho BT, Nahas S, Sun X *et al* (2004). Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: seven new mutations. *Am J Med Genet A* **126A**: 33-40.

Creaven M, Hans F, Mutskov V, Col E, Caron C, Dimitrov S *et al* (1999). Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry* **38**: 8826-30.

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M *et al* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-53.

## D

D'Amours D, Jackson SP (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-27.

Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, Dean DC (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* **8**: 557-69.

Daujat S, Bauer UM, Shah V, Turner B, Berger S, Kouzarides T (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* **12**: 2090-7.

- de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* **27**: 164-75.
- de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R *et al* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**: 663-76.
- DeGregori J (2002). The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* **1602**: 131-50.
- DeGregori J, Johnson DG (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* **6**: 739-48.
- DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7245-50.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**: 2540-51.
- Dicker AJ, Popa C, Dahler AL, Serewko MM, Hilditch-Maguire PA, Frazer IH *et al* (2000). E2F-1 induces proliferation-specific genes and suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes. *Oncogene* **19**: 2887-94.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F (2005). The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* **27**: 29-41.
- Dimova DK, Dyson NJ (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**: 2810-26.
- Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**: 273-85.
- Dirks PB, Rutka JT, Hubbard SL, Mondal S, Hamel PA (1998). The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells. *Oncogene* **17**: 867-76.
- Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M (2004). Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther* **101**: 1-15.
- Downs JA (2007). Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. *Oncogene* **26**: 7765-72.
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N *et al* (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**: 979-90.



Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W *et al* (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51-64.

Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Cote J (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* **24**: 1884-96.

Driscoll R, Hudson A, Jackson SP (2007). Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* **315**: 649-52.

Du W, Vidal M, Xie JE, Dyson N (1996). RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 1206-18.

Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J *et al* (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**: 119-30.

Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen CJ (1995). A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* **11**: 21-9.

Dynlacht BD, Brook A, Dembski M, Yenush L, Dyson N (1994). DNA-binding and trans-activation properties of *Drosophila* E2F and DP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6359-63.

Dynlacht BD, Moberg K, Lees JA, Harlow E, Zhu L (1997). Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **17**: 3867-75.

## E

Ebihara Y, Miyamoto M, Shichinohe T, Kawarada Y, Cho Y, Fukunaga A *et al* (2004). Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Dis Esophagus* **17**: 150-4.

Esteller M (2006). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* **94**: 179-83.

Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-59.

Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn PG, Meltzer SJ, Pohar KS, Watkins DN *et al* (2001a). p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res* **61**: 2816-21.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001b). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **61**: 3225-9.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V *et al* (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**: 1350-4.

Eymin B, Claverie P, Salon C, Leduc C, Col E, Brambilla E *et al* (2006). p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **26**: 4339-50.

Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E (2001). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* **20**: 1678-87.

## F

Fabbrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH *et al* (2002). Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* **3**: 641-5.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* **18**: 581-92.

Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**: 177-80.

Ferreira R, Magnaghi-Jaulin L, Robin P, Harel-Bellan A, Trouche D (1998). The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10493-8.

Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Jr., Livingston DM *et al* (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85**: 549-61.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**: 102-14.

Fischer U, Heckel D, Michel A, Janka M, Hulsebos T, Meese E (1997). Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I. *Hum Mol Genet* **6**: 1817-22.

Fisher LD, Fletcher KE, Blake DR (2004). Can the diagnosis of pelvic inflammatory disease be excluded without a bimanual examination? *Clin Pediatr (Phila)* **43**: 153-8.

Fortin A, MacLaurin JG, Arbour N, Cregan SP, Kushwaha N, Callaghan SM *et al* (2004). The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem* **279**: 28706-14.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G *et al* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**: 391-400.

Fraga MF, Esteller M (2002). DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* **33**: 632, 634, 636-49.

Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, Cress WD, Kowalik TF (2006). E2F1 induces MRN foci formation and a cell cycle checkpoint response in human fibroblasts. *Oncogene* **25**: 3258-66.

Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM *et al* (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* **4**: 575-80.

Fry WA, Phillips JL, Menck HR (1999). Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* **86**: 1867-76.

Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Ishida H, Kohno N, Inai K (2004). Aberrant methylation of p14(ARF), p15(INK4b) and p16(INK4a) genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. *Pathol Int* **54**: 549-55.

## G

Gaughan L, Brady ME, Cook S, Neal DE, Robson CN (2001). Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* **276**: 46841-8.

Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2002). Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* **277**: 25904-13.

Gavaravarapu S, Kamine J (2000). Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 758-66.

Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E (1998a). The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res* **58**: 3926-31.

Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E (1998b). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* **16**: 497-504.

Giaccia AJ, Kastan MB (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**: 2973-83.

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T *et al* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907-13.

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Mariatos G, Kotsinas A, Bouda M, Kletsas D *et al* (2002). Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* **198**: 142-56.

Gorrini C, Squatrito M, Luise C, Syed N, Perna D, Wark L *et al* (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* **448**: 1063-7.

Gouyer V, Gazzeri S, Bolon I, Drevet C, Brambilla C, Brambilla E (1998). Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**: 188-96.

Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* **128**: 721-33.

Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H *et al* (2007). Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933-7.

## H

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**: 32-42.

Halkidou K, Gnanapragasam VJ, Mehta PB, Logan IR, Brady ME, Cook S *et al* (2003). Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* **22**: 2466-77.

Halkidou K, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2004). Putative involvement of the histone acetyltransferase Tip60 in ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res* **32**: 1654-65.

Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR (2008). An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* **13**: 11-22.

Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu RM, Zhang Z (2007). Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**: 653-5.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hao XF, Alphey L, Bandara LR, Lam EW, Glover D, La Thangue NB (1995). Functional conservation of the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F and its pathway of control in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* **108** ( Pt 9): 2945-54.

Harbour JW, Dean DC (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**: E65-7.

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* **241**: 353-7.

---

Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D *et al* (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* **37**: 254-64.

Hateboer G, Kerkhoven RM, Shvarts A, Bernards R, Beijersbergen RL (1996). Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev* **10**: 2960-70.

He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD (2000). Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene* **19**: 3422-33.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **8**: 193-204.

Hershko T, Ginsberg D (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 8627-34.

Hlubek F, Lohberg C, Meiler J, Jung A, Kirchner T, Brabletz T (2001). Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *J Biochem* **129**: 635-41.

Hofferer M, Wirbelauer C, Humar B, Krek W (1999). Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* **27**: 491-5.

Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Wang Z (1996). The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **10**: 2949-59.

Holt SE, Wright WE, Shay JW (1996). Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* **16**: 2932-9.

Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SC (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* **115**: 110-22.

Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ *et al* (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**: 406-11.

## I

Ianari A, Gallo R, Palma M, Alesse E, Gulino A (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* **279**: 30830-5.

Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM (2006). Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol* **26**: 1098-108.

---

Iizuka M, Takahashi Y, Mizzen CA, Cook RG, Fujita M, Allis CD *et al* (2009). Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers. *Gene* **436**: 108-14.

Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M *et al* (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**: 463-73.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W *et al* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**: 645-8.

Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M *et al* (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* **21**: 4684-99.

Ivanova IA, D'Souza SJ, Dagnino L (2006). E2F1 stability is regulated by a novel-PKC/p38beta MAP kinase signaling pathway during keratinocyte differentiation. *Oncogene* **25**: 430-7.

Ivanova IA, Dagnino L (2007). Activation of p38- and CRM1-dependent nuclear export promotes E2F1 degradation during keratinocyte differentiation. *Oncogene* **26**: 1147-54.

Ivanova IA, Nakrieko KA, Dagnino L (2009). Phosphorylation by p38 MAP kinase is required for E2F1 degradation and keratinocyte differentiation. *Oncogene* **28**: 52-62.

Iyer NG, Ozdag H, Caldas C (2004). p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**: 4225-31.

## J

Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* **22**: 151-3.

Johnson DG, Degregori J (2006). Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med* **6**: 731-8.

Joshi AA, Struhl K (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* **20**: 971-8.

## K

Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G (1996). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* **216**: 357-66.

Karras GI, Kustatscher G, Buhecha HR, Allen MD, Pugieux C, Sait F *et al* (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J* **24**: 1911-20.

- Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC *et al* (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**: 497-501.
- Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR *et al* (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**: 593-605.
- Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, Laird PW, Laird-Offringa IA (2007). The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. *Dis Markers* **23**: 5-30.
- Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C *et al* (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* **434**: 921-6.
- Kimura A, Horikoshi M (1998). Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* **3**: 789-800.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M *et al* (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**: 928-32.
- Kishimoto Y, Sugio K, Mitsudomi T, Oyama T, Virmani AK, McIntire DD *et al* (1995). Frequent loss of the short arm of chromosome 9 in resected non-small-cell lung cancers from Japanese patients and its association with squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **121**: 291-6.
- Klose RJ, Bird AP (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**: 89-97.
- Knaak SJ (2006). The problem with breastfeeding discourse. *Can J Public Health* **97**: 412-4.
- Kornberg RD (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-71.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**: 285-94.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
- Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45**: 219-28.
- Kowalik TF, DeGregori J, Leone G, Jakoi L, Nevins JR (1998). E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ* **9**: 113-8.
- Kramps C, Strieder V, Sapetschnig A, Suske G, Lutz W (2004). E2F and Sp1/Sp3 Synergize but are not sufficient to activate the MYCN gene in neuroblastomas. *J Biol Chem* **279**: 5110-7.

Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Jr., Livingston DM (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78**: 161-72.

Krek W, Xu G, Livingston DM (1995). Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* **83**: 1149-58.

Kurash JK, Lei H, Shen Q, Marston WL, Granda BW, Fan H *et al* (2008). Methylation of p53 by Set7/9 mediates p53 acetylation and activity in vivo. *Mol Cell* **29**: 392-400.

Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR, 3rd *et al* (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**: 2084-7.

Kusch T, Workman JL (2007). Histone variants and complexes involved in their exchange. *Subcell Biochem* **41**: 91-109.

Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A *et al* (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1859-64.



---

## L

La Thangue NB, Rigby PW (1987). An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* **49**: 507-13.

Lai A, Marcellus RC, Corbeil HB, Branton PE (1999). RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene* **18**: 2091-100.

Lang SE, McMahon SB, Cole MD, Hearing P (2001). E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J Biol Chem* **276**: 32627-34.

Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S *et al* (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* **21**: 2383-96.

Leduc C, Claverie P, Eymin B, Col E, Khochbin S, Brambilla E *et al* (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* **25**: 4147-54.

Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* **26**: 147-70.

Lee JH, Paull TT (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**: 551-4.

Lee JS, Shilatifard A (2007). A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat Res* **618**: 130-4.

Legube G, Linares LK, Lemercier C, Scheffner M, Khochbin S, Trouche D (2002). Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *EMBO J* **21**: 1704-12.

Legube G, Trouche D (2003). Identification of a larger form of the histone acetyl transferase Tip60. *Gene* **310**: 161-8.

Lehner B, Crombie C, Tischler J, Fortunato A, Fraser AG (2006). Systematic mapping of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* identifies common modifiers of diverse signaling pathways. *Nat Genet* **38**: 896-903.

Lemercier C, Legube G, Caron C, Louwagie M, Garin J, Trouche D *et al* (2003). Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem* **278**: 4713-8.

Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L *et al* (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* **20**: 3626-32.

Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH *et al* (2001). Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol Cell* **8**: 105-13.

- Lin PS, McPherson LA, Chen AY, Sage J, Ford JM (2009). The role of the retinoblastoma/E2F1 tumor suppressor pathway in the lesion recognition step of nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*.
- Lin WC, Lin FT, Nevins JR (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**: 1833-44.
- Lindstrom MS, Wiman KG (2003). Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene* **22**: 4993-5005.
- Lipinski MM, Jacks T (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**: 7873-82.
- Lippman SM, Spitz MR (2001). Lung cancer chemoprevention: an integrated approach. *J Clin Oncol* **19**: 74S-82S.
- Lissy NA, Davis PK, Irwin M, Kaelin WG, Dowdy SF (2000). A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* **407**: 642-5.
- Liu K, Lin FT, Ruppert JM, Lin WC (2003). Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol* **23**: 3287-304.
- Logan IR, Sapountzi V, Gaughan L, Neal DE, Robson CN (2004). Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome. *J Biol Chem* **279**: 11696-704.
- Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G *et al* (2005). E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* **24**: 5000-4.
- Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, Chen HW (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* **24**: 5157-71.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-60.
- Luo RX, Postigo AA, Dean DC (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**: 463-73.

## M

- Maas NL, Miller KM, DeFazio LG, Toczyski DP (2006). Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell* **23**: 109-19.
- Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP *et al* (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**: 601-5.

- Magyar Z, Atanassova A, De Veylder L, Rombauts S, Inze D (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **486**: 79-87.
- Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ *et al* (1995). A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* **55**: 2995-7.
- Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* **1**: 14-9.
- Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sorensen TS, La Thangue NB, Kouzarides T (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* **375**: 691-4.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* **19**: 662-71.
- Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, Cartwright P, Helin K, Giacca M (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* **275**: 10887-92.
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA *et al* (2001). Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **21**: 6006-16.
- Mattera L, Escaffit F, Pillaire MJ, Selves J, Tyteca S, Hoffmann JS *et al* (2009). The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* **28**: 1506-17.
- McAllister D, Merlo X, Lough J (2002). Characterization and expression of the mouse tat interactive protein 60 kD (TIP60) gene. *Gene* **289**: 169-76.
- McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**: 363-74.
- ME LL, Vidal F, Gallardo D, Diaz-Fuertes M, Rojo F, Cuatrecasas M *et al* (2006). New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. *Oncol Rep* **16**: 603-8.
- Meloni AR, Smith EJ, Nevins JR (1999). A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9574-9.
- Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van den Broeck A, Corcos L, Brambilla C *et al* (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* **15**: 1815-23.
- Miotto B, Struhl K (2007). [Histone H4 lysine 16 acetylation: from genome regulation to tumoral progression]. *Med Sci (Paris)* **23**: 735-40.

Mitsuuchi Y, Testa JR (2002). Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* **115**: 183-8.

Miyamoto N, Izumi H, Noguchi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, Shiota M *et al* (2008). Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance. *J Biol Chem* **283**: 18218-26.

Mohamed MA, Greif PA, Diamond J, Sharaf O, Maxwell P, Montironi R *et al* (2007). Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *BJU Int* **99**: 908-15.

Morris L, Allen KE, La Thangue NB (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* **2**: 232-9.

Mulero-Navarro S, Esteller M (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* **68**: 1-11.

Muller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K (1997). Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* **17**: 5508-20.

Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ *et al* (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**: 91-9.

## N

Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K *et al* (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **22**: 343-50.

Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M *et al* (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* **4**: 859-64.

Nakamura TM, Du LL, Redon C, Russell P (2004). Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24**: 6215-30.

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL *et al* (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**: 703-16.

Nelson MA, Reynolds SH, Rao UN, Goulet AC, Feng Y, Beas A *et al* (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther* **5**: 407-12.

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**: 3004-16.

Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D *et al* (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561-5.

Nordentoft I, Jorgensen P (2003). The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem J* **374**: 165-73.

## O

O'Connor DJ, Lu X (2000). Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb. *Oncogene* **19**: 2369-76.

Oberley MJ, Inman DR, Farnham PJ (2003). E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J Biol Chem* **278**: 42466-76.

Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**: 1132-6.

Ohtani K, Nevins JR (1994). Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene. *Mol Cell Biol* **14**: 1603-12.

Oikemus SR, McGinnis N, Queiroz-Machado J, Tukachinsky H, Takada S, Sunkel CE *et al* (2004). Drosophila atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes Dev* **18**: 1850-61.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V *et al* (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* **355**: 983-91.

Osada H, Takahashi T (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**: 7421-34.

Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ (1994). Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* **9**: 3375-8.

## P

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG *et al* (2000). Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* **60**: 5954-8.

- Pan H, Yin C, Dyson NJ, Harlow E, Yamasaki L, Van Dyke T (1998). Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell* **2**: 283-92.
- Panani AD, Roussos C (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* **239**: 1-9.
- Parisi T, Pollice A, Di Cristofano A, Calabro V, La Mantia G (2002). Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 1138-45.
- Park JH, Roeder RG (2006). GAS41 is required for repression of the p53 tumor suppressor pathway during normal cellular proliferation. *Mol Cell Biol* **26**: 4006-16.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ *et al* (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* **24**: 10826-34.
- Pediconi N, Guerrieri F, Vossio S, Bruno T, Belloni L, Schinzari V *et al* (2009). hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **29**: 1989-98.
- Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, Belloni L, Gallo R, Cimino L *et al* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**: 552-8.
- Peeper DS, Keblusek P, Helin K, Toebes M, van der Eb AJ, Zantema A (1995). Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro. *Oncogene* **10**: 39-48.
- Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA (2008). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol* **28**: 468-86.
- Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* **4**: 771-81.
- Pickering MT, Kowalik TF (2006). Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene* **25**: 746-55.
- Pierce AM, Fisher SM, Conti CJ, Johnson DG (1998a). Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene* **16**: 1267-76.
- Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG (1998b). Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8858-63.

Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG (1999). E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol* **19**: 6408-14.

Pogribny IP, Ross SA, Tryndyak VP, Pogribna M, Poirier LA, Karpinets TV (2006). Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis* **27**: 1180-6.

Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* **21**: 437-46.

Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J *et al* (2006). A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **355**: 570-80.

Prost S, Lu P, Caldwell H, Harrison D (2007). E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. *Oncogene* **26**: 3572-81.

Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN *et al* (2006). Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* **2**: e40.

Pusarla RH, Bhargava P (2005). Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J* **272**: 5149-68.

## Q

Qin S, Parthun MR (2006). Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **26**: 3649-58.

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**: 993-1000.

## R

Rabik CA, Dolan ME (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33**: 9-23.

Radhakrishnan SK, Kamalakaran S (2006). Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1766**: 53-62.

Ramirez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**: 3527-33.

- Ramirez A, Bravo A, Jorcano JL, Vidal M (1994). Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**: 53-64.
- Ran Q, Pereira-Smith OM (2000). Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (Tip60), Tip60(beta). *Gene* **258**: 141-6.
- Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ *et al* (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* **16**: 933-47.
- Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA *et al* (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* **16**: 245-56.
- Renauld JC (2001). New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* **54**: 577-89.
- Rich S, Ganz R, Levy PS (1983). Comparative actions of hydralazine, nifedipine and amrinone in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* **52**: 1104-7.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338-42.
- Robles SJ, Adami GR (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**: 1113-23.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-16.
- Ross JF, Liu X, Dynlacht BD (1999). Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell* **3**: 195-205.
- Rossignol P, Stevens R, Perennes C, Jasinski S, Cella R, Tremousaygue D *et al* (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* **266**: 995-1003.
- Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG (2002). Inactivation of E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. *Cancer Res* **62**: 3276-81.
- Rouse J, Jackson SP (2002). Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Mol Cell* **9**: 857-69.
- Russell JL, Weeks RL, Berton TR, Johnson DG (2006). E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway. *Oncogene* **25**: 867-76.



## S

- Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C *et al* (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* **13**: 260-72.
- Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B (2007). E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* **26**: 6927-36.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.
- Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG *et al* (1999). Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **18**: 5843-9.
- Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**: 603-14.
- Sawado T, Yamaguchi M, Nishimoto Y, Ohno K, Sakaguchi K, Matsukage A (1998). dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 409-15.
- Scheijen B, Bronk M, van der Meer T, Bernards R (2003). Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **23**: 3656-68.
- Schneider J, Bajwa P, Johnson FC, Bhaumik SR, Shilatifard A (2006). Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *J Biol Chem* **281**: 37270-4.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G *et al* (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**: 1251-62.
- Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callen E *et al* (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev* **22**: 2048-61.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD (2003). Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* **54**: 73-87.
- Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* **460**: 117-22.
- Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M *et al* (2005). Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* **435**: 1262-6.

- Semizarov D, Kroeger P, Fesik S (2004). siRNA-mediated gene silencing: a global genome view. *Nucleic Acids Res* **32**: 3836-45.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602.
- Shahbazian MD, Grunstein M (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* **76**: 75-100.
- Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N *et al* (2006). A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* **3**: e486.
- Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D *et al* (1995). Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* **55**: 6200-9.
- Sharpless NE, DePinho RA (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 22-30.
- Sheridan AM, Force T, Yoon HJ, O'Leary E, Choukroun G, Taheri MR *et al* (2001). PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production. *Mol Cell Biol* **21**: 4470-81.
- Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-7.
- Shia WJ, Pattenden SG, Workman JL (2006). Histone H4 lysine 16 acetylation breaks the genome's silence. *Genome Biol* **7**: 217.
- Shields PG (2002). Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* **21**: 6870-6.
- Shigematsu H, Gazdar AF (2006). Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* **118**: 257-62.
- Shiio Y, Eisenman RN (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13225-30.
- Shilatifard A (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**: 243-69.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844-7.
- Sidransky D (1995). Importance of chromosome 9p loss in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **87**: 1201-2.

- Sliva D, Zhu YX, Tsai S, Kamine J, Yang YC (1999). Tip60 interacts with human interleukin-9 receptor alpha-chain. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 149-55.
- Sotillo R, Hernando E, Diaz-Rodriguez E, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Lowe SW *et al* (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* **11**: 9-23.
- Soussi T, Dehouche K, Beroud C (2000). p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* **15**: 105-13.
- Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS (1997). The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* **27**: 319-65.
- Squatrito M, Gorrini C, Amati B (2006). Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* **16**: 433-42.
- Stevaux O, Dimova D, Frolov MV, Taylor-Harding B, Morris E, Dyson N (2002). Distinct mechanisms of E2F regulation by Drosophila RBF1 and RBF2. *EMBO J* **21**: 4927-37.
- Stevaux O, Dyson NJ (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 684-91.
- Stevens C, Smith L, La Thangue NB (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**: 401-9.
- Stiewe T, Putzer BM (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* **26**: 464-9.
- Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D *et al* (1995). Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* **55**: 2988-94.
- Strober BE, Dunaief JL, Guha, Goff SP (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol* **16**: 1576-83.
- Strolin Benedetti M, Rumigny JF, Dostert P (1984). [Mechanisms of action and biochemical toxicology of valproic acid]. *Encephale* **10**: 177-88.
- Stucki M, Jackson SP (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* **5**: 534-43.
- Suganuma T, Workman JL (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* **135**: 604-7.
- Suka N, Luo K, Grunstein M (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* **32**: 378-83.

Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13182-7.

Suzuki A, Hemmati-Brivanlou A (2000). Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol Cell* **5**: 217-29.

Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS *et al* (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **24**: 841-51.

## T

Taipale M, Rea S, Richter K, Vilar A, Lichter P, Imhof A *et al* (2005). hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **25**: 6798-810.

Talasz H, Lindner HH, Sarg B, Helliger W (2005). Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J Biol Chem* **280**: 38814-22.

Tamburini BA, Tyler JK (2005). Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol Cell Biol* **25**: 4903-13.

Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* **24**: 827-39.

Tardat M, Murr R, Herceg Z, Sardet C, Julien E (2007). PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J Cell Biol* **179**: 1413-26.

Taubert S, Gorrini C, Frank SR, Parisi T, Fuchs M, Chan HM *et al* (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* **24**: 4546-56.

Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1025-40.

Testa JR, Liu Z, Feder M, Bell DW, Balsara B, Cheng JQ *et al* (1997). Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **95**: 20-32.

Tie Y, Mao JP, Liu B, Song Y, Dong Y, Sun ZX (2004). [Effect of papillary thyroid carcinoma related gene PTC1 on subcellular localization and function of ATM cell]. *Ai Zheng* **23**: 487-92.

Tillinghast GW, Partee J, Albert P, Kelley JM, Burtow KH, Kelly K (2003). Analysis of genetic stability at the EP300 and CREBBP loci in a panel of cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **37**: 121-31.

Tolbert D, Lu X, Yin C, Tantama M, Van Dyke T (2002). p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol Cell Biol* **22**: 370-7.

Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M (2007). Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* **445**: 214-8.

Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, Lees JA (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1519-24.

Trimarchi JM, Lees JA (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 11-20.

Trouche D, Cook A, Kouzarides T (1996). The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res* **24**: 4139-45.

Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP (2006). Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther* **5**: 65-70.

Tsai KY, MacPherson D, Rubinson DA, Crowley D, Jacks T (2002). ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos. *Curr Biol* **12**: 159-63.

Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* **27**: 107-19.

## U

Utey RT, Cote J (2003). The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 203-36.

## V

Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW *et al* (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* **20**: 1256-61.

Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D (2007). NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* **26**: 5505-20.

Vernell R, Helin K, Muller H (2003). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem* **278**: 46124-37.

Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* **17**: 7268-82.

Vigo E, Muller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC *et al* (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* **19**: 6379-95.

Volkel P, Angrand PO (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**: 1-20.

Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A *et al* (1998). Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene* **17**: 2779-85.

## W

Walter W, Clynes D, Tang Y, Marmorstein R, Mellor J, Berger SL (2008). 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol Cell Biol* **28**: 2840-9.

Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y *et al* (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **8**: 1025-31.

Wang D, Russell JL, Johnson DG (2000). E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol Cell Biol* **20**: 3417-24.

Weake VM, Workman JL (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**: 653-63.

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL *et al* (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* **37**: 853-62.

Weinberg RA (1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**: 1138-46.

Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Lee EC, Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF *et al* (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23). *Science* **215**: 181-2.

Williams MD, Sandler AB (2001). The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat Res* **105**: 31-52.

Windle J, Prystowsky EN, Miles WM, Heger JJ (1987). Pharmacokinetic and electrophysiologic interactions of amiodarone and procainamide. *Clin Pharmacol Ther* **41**: 603-10.

Won J, Chang S, Oh S, Kim TK (2004). Small-molecule-based identification of dynamic assembly of E2F-pocket protein-histone deacetylase complex for telomerase regulation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11328-33.

Woodcock CL (2006). Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 213-20.

Woodcock CL, Skoultchi AI, Fan Y (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res* **14**: 17-25.

Wu RS, Tsai S, Bonner WM (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell* **31**: 367-74.

## X

Xiao H, Chung J, Kao HY, Yang YC (2003). Tip60 is a co-repressor for STAT3. *J Biol Chem* **278**: 11197-204.

Xu F, Zhang K, Grunstein M (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**: 375-85.

Xu HJ, Zhou Y, Ji W, Perng GS, Kruzelock R, Kong CT *et al* (1997). Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* **15**: 2589-96.

Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**: 8420-31.

## Y

Yamamoto T, Horikoshi M (1997). Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* **272**: 30595-8.

Yamasaki L, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet* **18**: 360-4.

Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**: 537-48.

Yang H, Pesavento JJ, Starnes TW, Cryderman DE, Wallrath LL, Kelleher NL *et al* (2008). Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J Biol Chem* **283**: 12085-92.

Yang XJ (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**: 1076-87.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA *et al* (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* **23**: 2369-80.

## Z

Zacharatos P, Kotsinas A, Evangelou K, Karakaidos P, Vassiliou LV, Rezaei N *et al* (2004). Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* **203**: 744-53.

Zalmas LP, Zhao X, Graham AL, Fisher R, Reilly C, Coutts AS *et al* (2008). DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* **9**: 252-9.

Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX *et al* (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 K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM *et al* (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**: 500-8.

Ziebold U, Reza T, Caron A, Lees JA (2001). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* **15**: 386-91.

Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **61**: 249-55.

Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* **64**: 681-708.



# ANNEXES



**A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells**

Journal:	<i>Nucleic Acids Research</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	2 Standard Manuscript - UK Editorial Office
Key Words:	satellite DNA, centromeric sequences, pericentric sequences, transcription, chromatin



Review

1  
2  
3  
4  
5 A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and  
6 tumor cells  
7  
8  
9

10 Angéline Eymery<sup>1</sup>, Béatrice Horard<sup>2</sup>, Michèle El Atifi-Borel<sup>3</sup>, Geneviève Fourel<sup>2</sup>, François  
11 Berger<sup>3</sup>, Anne-Laure Vitte<sup>1</sup>, Arnaud Van den Broeck<sup>1</sup>, Elisabeth Brambilla<sup>1</sup>, Alexandra  
12 Fournier<sup>1</sup>, Mary Callanan<sup>1</sup>, Sylvie Gazzeri<sup>1</sup>, Saadi Khochbin<sup>1</sup>, Sophie Rousseaux<sup>1</sup>, Eric  
13 Gilson<sup>2</sup> and Claire Vourc'h\*<sup>1</sup>  
14  
15  
16  
17

18  
19 Address

20 1- Université Joseph Fourier ; INSERM ; Institut Albert Bonniot U823 La Tronche F-38706  
21 Grenoble  
22

23 2- Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule ; UMR 5239 ; CNRS ; ENS-LYON ;  
24 Université LYON 1/ HCL. 165, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France  
25  
26

27 3- Université Joseph Fourier ; INSERM ; Institut de Neurosciences U836 La Tronche, F-  
28 38700 Grenoble  
29  
30  
31

32  
33  
34  
35 (\*) corresponding author:

36 claire.vourch@ujf-grenoble.fr ; Telephone 33 4 76 54 94 70 ; Fax 33 4 76 54 95 95  
37  
38  
39

40 running title : Transcriptomic analysis of human satellite sequences

41 keywords : satellite, pericentric sequences, centromeric sequences, transcription, chromatin  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

Although there is now evidence that the expression of centromeric (CT) and pericentric (PCT) sequences are key players in major genomic functions, their transcriptional status in human cells is still poorly known. The main reason for this lack of data is the complexity and high level of polymorphism of these repeated sequences, which hampers straightforward analyses by available transcriptomic approaches. Here a transcriptomic macro-array dedicated to the analysis of CT and PCT expression is developed and validated in heat-shocked HeLa cells. For the first time, the expression status of CT and PCT sequences is analyzed in a series of normal and cancer human cells and tissues demonstrating that they are repressed in all normal tissues except in the testis, where PCT transcripts are found. Moreover, PCT sequences are specifically expressed in heat-shocked cells in a Heat Shock Factor 1 (HSF1)-dependent fashion, and we show here that another independent pathway, involving DNA hypo-methylation, can also trigger their expression. Interestingly, CT and PCT were found illegitimately expressed in somatic cancer samples, whereas PCT were repressed in testis cancer, suggesting that the expression of CT and PCT sequences may represent a good indicator of epigenetic deregulations occurring in response to environmental changes or in cell transformation.

## Introduction

Since its first description by Emile Heitz in 1928, heterochromatin has mainly been portrayed as a transcriptionally inactive condensed nuclear compartment, inaccessible to transcription factors. The discovery that specific PCT transcripts play an essential role in the formation and maintenance of heterochromatin in fission yeast has considerably changed this view (1, 2, reviewed in 3).

Repetitive DNA is a common feature of centromeric (CT) and pericentromeric (PCT) regions, often grouped under the concept of "centromeric heterochromatin". Although CT and PCT sequences are spatially related, their structure and function are clearly distinct. While CT regions are enriched in the histone variant CenH3 and bind centromeric specific proteins, PCT regions are enriched in the epigenetic repressive marks H3K9me3 and HP1. During mitosis, whereas CT sequences play a direct role in spindle attachment, PCT regions ensure sister chromatids cohesion (4). CT and PCT regions also differ in the nature of their repetitive sequences. CT sequences, also named alpha satellites or alphoids, consist of repetitions of an AT rich motif of 171 pb, whereas PCT sequences mainly contain satellite II and III sequences, both enriched in GGAAT motif (5,6 and reviewed in 7).

The existence of conserved features within the general organization of CT and PCT regions in yeast, mouse and human argues in favour of a conserved role for CT and PCT transcripts across species. Indeed, evidence is accumulating that these sequences are transcriptionally competent in mammalian cells in diverse biological contexts (reviewed in 7).

In human cells, the most dramatic example of transcriptional activation of PCT repeats is that occurring in response to cell stress (8,9). Indeed, we and others have shown that, during heat shock, the hyperphosphorylated form of HSF1 binds to the 9q12 locus, enriched in satellite III sequences, forming nuclear structure also known as nuclear Stress Bodies or nSBs (reviewed in 10). Within nSBs, these transcripts remain associated with the 9q12 region from which they originate (8). The functional implication of this observation is still unknown. Moreover, the possibility that other sites of non-coding repeated sequences could be actively transcribed during this process and/or under other physiological or pathological circumstances remains to be investigated. These questions are particularly difficult to address in human cells due to the repetitive nature and high degree of polymorphism of these sequences, which represent major drawbacks to the qualitative and quantitative analysis of their expression.

In order to circumvent this problem, we have designed a transcriptomic macro-array allowing a quantitative analysis of CT and PCT sequences expression in human cells, taking into account their sequence specificities as well as the orientation of the generated transcripts.

1  
2  
3 The presence and levels of the transcripts were assessed in both normal and tumor cells and  
4 tissues. The impact of known chromatin remodelers on the expression of CT and PCT  
5 sequences was also investigated. Altogether, our data strengthen the idea that CT and PCT  
6 transcripts represent good indicators of the cell response to environmental changes and broad  
7 alterations of the epigenome. These transcripts may also represent additional markers for the  
8 detection of cancers and related diseases.  
9  
10  
11  
12  
13

## 14 **Material and Methods**

### 15 *Cell culture and treatments*

16 Cell lines: HeLa cells, from cervix adenocarcinoma, and A431 cells, from vulva epidermoid  
17 carcinoma, were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, VA, USA).  
18 IMR90 primary fibroblasts from embryonic lung were purchased from Coriell Institute  
19 (Camden NJ, USA). HCT116 cells, from colon epithelial carcinoma, and HSF1 non  
20 expressing HeLa cells were obtained from Dr Bert Volgenstein (John Hopkins University,  
21 USA) and Lea Sistonen (University of Turku, Finland) respectively.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 Stress conditions: Heat-shock experiments were performed by immersion of the culture flasks  
31 in a warm water bath. Unless mentioned, heat shock was performed for one hour at 43°C  
32 (cancer cells) or 45°C (normal cells). Recovery experiments following heat shock were  
33 performed in an incubator at 37°C.  
34  
35  
36

37 Drug treatments: Incubation with 5-Azacytidine (Aza-C) (Sigma) was performed for a period  
38 of 72 hours, at a concentration of 5µM. Aza-C was renewed every 24 hours. Trichostatin A  
39 (TSA) (Sigma) and butyrate (BUT) were used at a concentration of 330nM and 10mM  
40 respectively with incubation time of 2h (TSA) and 7h (BUT).  
41  
42  
43

44 SiRNA: Two SiRNA against Dicer were used : DicerA 5'UUUGUUGCGAGGCUGAUUC3'  
45 and DicerB 5'UCUAUUAGCACCUUGAUGU3' (Chendrimada et al. 2005). Double  
46 transfections (DicerA + DicerB) were performed in HeLa cells with oligofectamine  
47 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.  
48  
49  
50  
51

### 52 *RNA*

53 For all cell lines, RNA extraction was performed with TRI-Reagent (Sigma) according to the  
54 manufacturer's instructions and RNA quality was assessed by the integrity of rRNA bands  
55 following gel electrophoresis. Total RNA was then quantified by UV spectrophotometry.  
56  
57  
58  
59

60 RNA pools from adrenal gland, bone marrow, whole brain, fetal brain, fetal liver, heart,  
kidney, liver, whole lung, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, testis, thymus,

1  
2  
3 thyroid gland, trachea, uterus, colon and spinal cord were purchased from Clontech (Human  
4 Total RNA Master Panel II, 636643).

5  
6 The set of RNA from Human normal/tumor tissues from the same patient were obtained from  
7 Ambion. Ovary: AM7256 (papillary cystadenocarcinoma, 32 years old female patient); Liver:  
8 AM7244 (hepatoblastoma, 3 months old male patient); Lung: AM7224 (squamous cell  
9 carcinoma stage 2A, 60 years old male patient); Testis AM7260 (seminoma stage 1, 43 years  
10 old male patient). Tumor tissue and normal lung parenchyma take, at distance from the bulk of  
11 the tumor from the same patient were obtained from Dr. Gazzeri (11). RNA from the lymph  
12 node biopsies of patients diagnosed with diffuse large B cell lymphoma were obtained from  
13 the Grenoble hospital lymphoma collection. Normal spleen B cells were used as a control. All  
14 samples were obtained following informed consent and in accordance with institutional  
15 ethical guidelines.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 RepChip

29  
30 Oligonucleotides: Oligonucleotides (listed in supplementary Table 2) were obtained from  
31 Invitrogen.

32  
33 Macro array support: The combination of nylon array with radiolabeled probes is a valuable  
34 tool to detect low expressed RNA due to the very high absorption capacity of nylon and to the  
35 sensitivity of radioactive labeling (12). Oligonucleotides of about 50-mer at 100 nM were  
36 loaded in four 96 wells plates and colored with Bromophenol Blue in order to detect the  
37 presence of potential spotting default. Oligonucleotides were printed in duplicate onto the  
38 nylon membrane (Hybond N+, Amersham) by GMS 417 Arrayer automatic system. After  
39 spotting, targets were cross-linked to nylon membrane with short UV irradiation at 260 nm.

40  
41 RNA labeling and Hybridization: 3  $\mu\text{g}$  of total RNA were reverse-transcribed using both  
42 hexanucleotides (Roche) and dT25 (Invitrogen Life Technologies) priming and  $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP  
43 (Amersham or Perkin-Elmer) labeling. RNA annealing was performed with 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of dT25  
44 during 8 min at 70°C and progressively cooled to 42°C. The reverse transcription was carried  
45 out in a reaction mixture containing 40U RNasin (RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega),  
46 30  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP, 0.4 mM unlabeled dATP, dTTP and dGTP, 2.4  $\mu\text{M}$  dCTP (all from  
47 Promega), 1X reverse transcription buffer (Promega) and 400U Reverse Transcriptase  
48 (Promega), during 2h at 42°C. Radiolabeled cDNA were purified using an exclusion column  
49 (YM-30, Millipore). Reverse transcription efficiency was checked by radioactive counting of  
50 1  $\mu\text{L}$  of the reaction on Ready Cap™ in a Spectrometer (Beckman). Template RNA was  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 removed by treatment at 68°C for 30 minutes with 10% SDS, 0.5M EDTA and 3M NaOH.  
4 Neutralization was done by adding 1M Tris-HCl and 3N HCl. After denaturation at 100°C for  
5 5 minutes, the probe was incubated with the pre-hybridized nylon membrane in hybridization  
6 buffer (5X SSC, 5X Denhardt's, 12% BSA) for 5 days at 50°C. Membranes were then washed  
7 for 2 hours at 45°C in 5X SSC and 0.5% SDS. Dry membranes were exposed onto a  
8 phosphorimaging plate in a Fujifilm BAS cassette for 24h then scanned with a radio-imager  
9 BAS 5000 (Fuji). Radio-imagerFLA-8000, (Fuji) was used for the analysis of CT and PCT in  
10 lung tissues.  
11

12  
13  
14  
15  
16  
17 Signal analysis: The intensity of the different signals was quantified with the radio-imager  
18 (BAS 5000, Fuji) or with the and corrected with Image Gauge software (Fuji) so that any data  
19 with intensity lower than the background plus three standard deviations was excluded. The  
20 inter-assays normalization for each group is indicated in the text. Results are presented as  
21 box-plots with the thick line representing the median, the cross the mean, the top and bottom  
22 boundaries of the boxes corresponding to the 75 and 25 percentiles respectively and the top  
23 and bottom circles the maximum and minimum values respectively. P values were calculated  
24 using a paired-T-test.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 33 Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) assay

34 Genomic DNA was prepared using DNeasy Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer  
35 instructions. The quality of the DNA was controlled by gel analysis and spectrometry. MeDIP  
36 experiment was performed as already described (Horard et al, accompanying paper). Briefly,  
37 sonicated DNA was denatured and immunoprecipitated with anti 5-methyl-cytosine antibody  
38 (Megabase Research Products). Control immunoprecipitation was performed with anti IgG  
39 antibody (Sigma). Real-time PCR was then performed with specific primer pairs. The relative  
40 enrichment of target sequences after immunoprecipitation was calculated by comparing the  
41 number of cycles between MeDIP-enriched samples and input DNA for sequences of interest  
42 and a control sequence.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

### 52 53 Immunofluorescence and western-blot

54 Immunofluorescence: HeLa cells were grown on glass slides. The heat-shock experiment was  
55 performed by immersion of Petri dishes containing the slides in a warm-bath at 43°C for one  
56 hour. Immunofluorescence was performed on formaldehyde-fixed cells as previously  
57 described (13). The working dilution for the rabbit anti-HSF1 antibody (Stressgen) was 1:500.  
58  
59  
60



1  
2  
3 Western Blot: HeLa were heat-shocked for one hour at 43°C. Protein extraction was realized  
4 in 8M Urea. The western blot analysis of extracts was performed on 8% acrylamide gels for  
5 HSF1 detection. The working dilution for the rabbit anti-HSF1 antibody and the mouse anti-  
6 Dicer (Abcam) antibody were respectively 1:5000 and 1:100.  
7  
8  
9

### 10 11 RT-PCR and qPCR

12 RT-PCR: 1µg of total RNA was reverse transcribed thanks to Super Script III first strand  
13 synthesis system for PCR (Invitrogen) according to manufacturer instructions. PCR was  
14 performed in presence of Taq polymerase. Primers for Dicer are  
15 5'CATGGATAGTGGGATGTAC3' and 5'CTACTTCCAGAGTGACTCTG3' (14). The  
16 amplification profile was 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds.  
17  
18

19 qPCR: qPCR reactions were performed using Brilliant SYBR Green qPCR MasterMix  
20 (Stratagene) on an Mx3005p cycler (Stratagene).  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 Results

#### 29 Design of an oligonucleotide array aiming to detect CT and PCT specific transcripts

30 Human CT and PCT sequences display a higher level of polymorphism than in the  
31 mouse, hampering the efficiency and interpretation of PCR-based approaches for the analysis  
32 of their expression.  
33  
34  
35

36 We have designed oligonucleotides aiming to represent all CT and PCT sequences  
37 present in the human genome. Several approaches were undertaken with two main objectives.  
38 First, our aim was to design a set of probes as representative as possible of all human CT and  
39 PCT sequences in order to detect the corresponding transcripts if present. Second we also  
40 designed a set of chromosome specific probes enabling the detection of specific patterns of  
41 expression in different environmental or cellular contexts.  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 Chromosome specific CT sequences were designed according to the approach  
49 described by Horard et al. in the accompanying paper. These probes were obtained by  
50 multiple alignments of chromosome specific sequences with the "Multalin DNA sequences"  
51 software (Horard et al. accompanying paper). Three oligonucleotides specific for  
52 chromosome 7, 10 and 16 respective centromeric regions (CT7', CT10' and CT16') were  
53 added to the set of CT chromosome specific sequences. These sequences correspond to  
54 regions spanning preferential sites of integration of latent HIV virus in infected cells (15).  
55 CT7' and CT10' sequences were also present in human EST database (Supplementary Table  
56 1). Sequences corresponding to two non overlapping regions of the 170bp alphoid sequence  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (CTcons1 and 3) described by Vissel and Choo (6) were also added together with a sequence  
4 restricted to the cenpB motif (CTcons2) (16). These probes correspond to consensus  
5 sequences of alphoid sequences.  
6  
7

8  
9 An extensive search for the presence of CT and PCT expression in EST databases was  
10 undertaken using the various genomic CT and PCT probes available in the literature. This  
11 analysis suggested that these sequences display a tissue-specific expression.  
12

13  
14 All PCT sequences described in the literature were blasted against EST libraries.  
15 Probes specific for chromosome 1 (PCT1) (17), chromosome 9 (PCT9b) (18), chromosome  
16 14 (PCT14) (19) and chromosome 16 (PCT16a) (18) were designed, when possible within  
17 regions of homologies with EST sequences but within regions devoid of long stretches of  
18 GGAAT repeat. A well-characterized sat III genomic sequence of unknown chromosome  
19 origin (5) was also used (PCTncs). For chromosome 9, an oligonucleotide was also designed  
20 (PCT9a), spanning a region of lesser homology with EST sequences with the idea that  
21 differences of frequency within EST databases might reveal distinct patterns of expression.  
22 For chromosome 16, an oligonucleotide containing a duplication of a consensus sequence  
23 specific for chromosome 16 and available in the literature was also used (PCT16b) (18). The  
24 specificity of three of these probes was tested by fluorescent in situ analysis confirming the  
25 specificity of PCT1, PCT9a while PCT16b recognized both chromosome 1 and 16 (data not  
26 shown). Four consensus sequences were also designed and added to the list of PCT specific  
27 oligonucleotides. One is a succession of GGAAT motifs (PCTcons3), one corresponds to a sat  
28 III specific sequence already described in the literature (PCTcons2) (20). Two other  
29 consensus sequences PCTcons1 and PCTcons4, were obtained by multiple alignment of a set  
30 of sat II and sat III sequences (Horard et al. accompanying paper).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

44 In order to globally assess the transcriptional activity of CT and PCT sequences,  
45 oligonucleotides for CT and PCT sequences were designed in both orientations, which were  
46 arbitrarily termed "sense" and "antisense". For CT sequences, the term "sense" refers to the  
47 A/T rich transcripts in the same orientation as the consensus alphoid sequence of 170 bp,  
48 displayed in the paper by Vissel and Choo (6). For PCT transcripts the term "sense" refers to  
49 G-rich transcripts.  
50  
51  
52  
53

54 The sequences of the selected set of CT and PCT specific oligonucleotides are given in  
55 supplementary Table 2 together with control oligonucleotides corresponding to Actin B,  
56 histone H4, 18S and 28S ribosomal genes and hsp genes (hsp40, hsp70).  
57  
58  
59  
60

Characterization of the PCT and CT sequences expression in response to heat shock

1  
2  
3 Since heat-shock is known to induce the expression of PCT sequences, primarily at the  
4 9q12 locus (8,9) our objective was to perform a quantitative analysis of PCT and CT  
5 transcripts in both orientations. Indeed, while the transcriptional activation of chromosome 9  
6 specific PCT sequences has been clearly documented in the heat shock response, the  
7 transcriptional capacity of other PCT sequences and of CT sequences has not been yet fully  
8 addressed (8,9).  
9

10  
11  
12 The expression of CT and PCT sequences was measured in HeLa cells over a  
13 continuous heat shock exposure of half an hour to one hour, and in HeLa cells submitted to a  
14 one-hour of continuous heat shock followed by a recovery period from one to six hours.  
15  
16  
17

18  
19 As shown in Figure 1a, no stress-dependent variation of signal intensity was observed  
20 for the control actin B, histone H4, and rRNA genes. In contrast, an accumulation of  
21 transcripts was detected with the whole set of oligonucleotides specific for PCT sequences  
22 with a peak of accumulation observed after one hour of recovery following heat-shock. This  
23 pattern of expression, closely correlated with that of hsp genes, indicated that the whole set of  
24 chromosome specific PCT sequences behaved similarly during heat shock. No expression of  
25 any of the CT sequences was detected upon heat-shock in HeLa cells, demonstrating that PCT  
26 sequences are globally and specifically activated during heat shock, and that the respective  
27 expression of CT and PCT sequences are submitted to independent pathways and control  
28 mechanisms.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37 To compare the levels of expression of sense and antisense PCT transcripts in non  
38 heat-shocked and heat-shocked cells the data obtained with the whole set of PCT sequences  
39 were combined. The corresponding values are represented as box plots in figure  
40 1b. Interestingly, the respective levels of induction of sense and antisense PCT transcripts  
41 during heat-shock were different, since they were increased 44.9 and 11.6 times respectively.  
42 The possibility that antisense transcripts, which are less abundant, could represent artifacts of  
43 the reverse transcription procedure (21) was examined using 9q12 specific PCT transcripts.  
44 The products of reverse transcription of sense or antisense 9q12 specific transcripts generated  
45 *in vitro*, were hybridized to sense and antisense oligonucleotides. As expected, reverse  
46 transcripts obtained from sense 9q12 specific PCT transcripts only hybridized to sense  
47 oligonucleotides while reverse-transcripts generated from antisense transcripts only  
48 hybridized to antisense oligonucleotides, indicating that the expression of PCT sequences in  
49 an antisense orientation actually occurs in the cell and is not the mere consequence of the  
50 experimental procedure (data not shown).  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

HSF1 is known to be a key determinant in the heat shock response (8). The question of whether PCT expression was dependent on the HSF1 pathway was therefore addressed. Comparative analysis of PCT sequences expression in heat-shocked HeLa cells expressing HSF1 (WT) or knocked down for HSF1 (KD) was performed. As shown in Figure 1c, heat-induced accumulation of PCT transcripts was severely impaired in KD HeLa cells. This demonstrates that HSF1 is necessary for the heat shock induced expression of PCT transcripts.

So far, the only cellular model for which a heat-induced expression of PCT sequences has been formally demonstrated was cervical carcinoma HeLa cells. The capacity of other cell types to express PCT sequences, and possibly CT sequences, was therefore also assayed in colon cancer (HCT116) and vulva carcinoma (A431) cancer cell lines as well as in primary IMR90 fibroblasts. These cells were submitted (or not) to a one hour heat-shock followed (or not) by a three hours recovery at 37°C (Fig. 2). Our results show that the heat-induced expression of PCT sequences is not restricted to HeLa cells, but represents a common feature of all cell lines studied here, including normal and cancer cells. In these different cell lines, all PCT sequences displayed a profile of expression similar to that displayed in Figure 1a, with no variation in the relative level of intensity values obtained with the different oligonucleotides (data not shown). We also demonstrate that the kinetics of accumulation of PCT transcripts is different between cell types. Indeed, the peak of PCT transcripts accumulation was observed after three hours of recovery in A431 and IMR90 cells, and only after one hour of heat shock in HeLa and HCT116 cells. In all analyzed cell lines, the kinetics of accumulation of antisense PCT transcripts was found to follow the same pattern than that of sense PCT transcripts. The difference in the kinetics of PCT accumulation in heat-shocked A431 and IMR90 cell lines on one hand, and in HeLa and HCT116 cell lines on the other hand, may reflect differences of cell sensitivity to heat-shock. Supporting this hypothesis, in both cases, the kinetics of PCT transcripts accumulation was similar to that of hsp specific transcripts.

CT sequences were not found transcribed in neither IMR90, HeLa nor HCT116 cells (data not shown). Interestingly, a sporadic expression of transcripts corresponding to three CT sequences (CTcons3, CT10' and CT16) was detected in a sense orientation in both non heat-shocked and heat-shocked A431 cells (data not shown). The fact that the transcription of CT sequences are not induced by heat-shock indicates that the control of CT and PCT sequences relies on different mechanisms and reinforces the idea that PCT sequences fulfil specific functions in heat-shocked cells (reviewed in 22 and 7) .

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

These results show that the expression of all PCT sequences is induced by heat shock through an HSF1 dependent pathway and occurs mainly in a sense orientation, whereas most CT sequences remain silent. Moreover, we show that the heat-induced expression of PCT sequences occurs in all tested normal and cancer cell lines. We then addressed the question of the expression of CT and PCT sequences *in vivo*, in normal differentiated tissues, as well as in tumors.

### Expression of CT and PCT sequences in normal and cancer tissues

To assess the transcriptional capacities of CT and PCT sequences *in vivo*, their expression was analyzed in a panel of RNA fractions from different normal tissues. RNA fractions from adult tissues of different origins (immunity system, central nervous system, muscle, endocrine system, digestive system, cardiovascular system, reproductive system, respiratory system) were analyzed together with tissues from fetal and extraembryonic origin (liver, brain and placenta) (Table 1).

Most of the normal tissues showed no expression of CT sequences. However, transcripts corresponding to two different CT sequences, CT7' in a sense orientation and CT10' in an antisense orientation, were detected in ovary, placenta and fetal liver (data not shown). Interestingly our *in silico* analysis show that these two CT sequences were found to give the highest numbers of blast hits among the whole set of CT sequences (see supplementary Table 1) suggesting that they indeed display a specific expression profile with regards to other CT sequences.

PCT sequences were not expressed in any of the normal somatic tissues, but, surprisingly, antisense PCT transcripts were detected in the testis (Fig. 3). This observation was confirmed in three testis samples from different individuals (data not shown). Since no accumulation of hsp specific transcripts was observed in testis, in this case, the transcription of PCT sequences does not seem to be related to the heat shock pathway.

We then wished to compare the expression of CT and PCT sequences between normal and cancer cells originated from the same patient, using pairs of normal and cancer tissues from testis, liver, ovary and lung were each obtained from one patient. Differences in the general pattern of CT or PCT sequences were clearly detected in two of the pairs.

Interestingly, a loss of antisense PCT transcripts was observed in testis cancer when compared to normal testis showing that, in this particular case, the tumor phenotype is associated with a down-regulation of PCT sequences expression (Fig. 4a). A striking difference between normal and cancer tissues was also observed in lung where an

1  
2  
3 accumulation of sense and antisense CT (CTcons1s, CTcons2s, CTcons3s, CTcons3as, CT8  
4 and CT16) and PCT transcripts was detected in the tumor sample. The absence of induction of  
5 hsp genes, confirmed by qPCR analyses, suggests that, in this case again, the heat shock  
6 pathway is not involved (Fig. 4b). CT specific transcripts were also detected in normal  
7 liver tissues as well as in normal ovary tissue (CT7' and CT10'). The presence of CT  
8 transcripts in normal liver might represent a specific feature of early differentiating liver cells,  
9 since the samples representing the normal and cancer liver tissues were obtained from a three  
10 months old baby and since, as mentioned above, the expression of CT sequences was also  
11 observed in normal foetal liver cells. The importance of CT and PCT transcripts expression in  
12 lung cancer tissue prompted us to extend the analysis of lung cancer tissues to a larger number  
13 of tumor tissues samples for which normal tissues corresponding to the same patients were  
14 also available (11). The result of this analysis is displayed in Figure 5 showing a major and  
15 global expression of CT and PCT sequences in both orientation in tumor tissues. The list of  
16 CT sequences detected in the four tumor samples analysed is given in Table 2. No induction  
17 of hsp genes expression was detected by transcriptomic (Fig. 5) and qPCR (data not shown)  
18 approaches in cancer tissues, suggesting that the heat shock pathway is not involved in the  
19 expression of CT and PCT sequences. The above results suggest that a de-regulation of CT  
20 and PCT sequences can occur in cancers, leading to the illegitimate expression of these  
21 sequences in some somatic tumors, or to the aberrant repression of PCT sequences in testis  
22 cancer.

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41 The possibility that a de-regulation of CT and PCT sequences could represent a  
42 specific features of certain types of cancer, such as lung cancer for which CT and PCT  
43 transcripts were detected in five out of five samples, is suggested by an additional study that  
44 we also performed on B cell lymphoma. In this case, CT and PCT sequences in both  
45 orientations were only detected in three out of ten patients, independent of the heat shock  
46 pathway (data not shown).

#### 51 52 53 Impact of chromatin remodelers on the expression of PCT and CT sequences

54  
55 To get an insight into the mechanisms involved in the transcriptional control of PCT  
56 and CT sequences, we next sought to determine the impact of two major epigenetic landmarks  
57 on the expression of CT and PCT sequences.

58  
59  
60 The impact of histone acetylation was assessed using Trichostatin A (TSA), a potent  
inhibitor of class I and butyrate (BUT), a specific inhibitor of class I and class II HDAC but



1  
2  
3 HDAC6. The effect of these HDACs inhibitors on the expression of CT and PCT sequences  
4 was monitored in HeLa cells. No significant increase of constitutive expression of PCT (Fig.  
5 6a) or CT sequences (not shown) was observed in cells treated with TSA or butyrate,  
6 supporting that global changes in histone acetylation levels are not sufficient to induce an  
7 activation of satellite sequences expression.  
8  
9

10  
11  
12 We then explored the effect of a drug-induced DNA demethylation on the expression  
13 of CT and PCT sequences in HeLa cells treated with 5 Aza-Cytidine (Aza-C), a potent  
14 demethylating agent. The hypomethylated status of PCT sequences in Aza-C treated HeLa  
15 cells was confirmed by MeDIP (Fig. 6b). As shown in Figure 6a, an accumulation of PCT  
16 specific transcripts was observed in Aza-C treated HeLa cells. All chromosome specific PCT  
17 sequences were expressed. The relative levels of expression of the different probes were  
18 similar to those found in heat-shocked cells (data not shown). The absence of CT specific  
19 transcripts (data not shown) in these cells despite demethylation of these sequences (Fig. 6b),  
20 strengthens the hypothesis made above, that CT and PCT sequences are not regulated by the  
21 same pathways. The expression of CT and PCT sequences was also analyzed in HCT116 cells  
22 knock-out for *dnmt3b* (3bKO), a DNA methyltransferase involved in *de novo* DNA  
23 methylation, as well as in HCT116 cells double knock-out (DKO) for *dnmt3b* and *dnmt1*,  
24 involved in DNA methylation maintenance. In the parental HCT116 cell line, no expression  
25 of CT and PCT sequences was detected (data not shown). Despite a lower level of DNA  
26 methylation at PCT sequences in both 3bKO and DKO cell lines (Horard et al, accompanying  
27 paper), no de-repression of PCT sequences expression was observed when compared to the  
28 parental HCT116 cells (Fig. 6a). This apparent discrepancy between the respective effect of  
29 drug-induced and genetically-induced DNA demethylation suggests the existence of other  
30 mechanisms repressing PCT sequences, despite DNA hypomethylation in KO cells.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 The transcriptional activation of PCT sequences in Aza-C treated cells could involve  
47 the heat-shock pathway. In order to test this hypothesis, the level of hsp genes transcripts was  
48 quantified by qPCR while the presence of the hyperphosphorylated/DNA binding competent  
49 form of HSF1 was assessed by western blot analysis and *in situ* approaches. Upon stress,  
50 HeLa cells displayed reduced electrophoretic mobility and active HSF1 was present within  
51 nSBs in HeLa cells (Fig. 6d). In Aza-C treated HeLa cells, no accumulation of hsp specific  
52 transcripts (Fig. 6c) and no formation of nSBs enriched in active HSF1 was observed  
53 (Fig.6d), showing that the accumulation of PCT transcripts in Aza-C treated cells is HSF1  
54 independent.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Since hypomethylation of PCT sequences allows an accumulation of PCT transcripts  
4 in Aza-C treated cells, we next assayed whether accumulation of PCT specific transcripts in  
5 heat-shocked cells conversely involved demethylation of these sequences. This hypothesis  
6 was examined using MeDIP with DNA from non heat-shocked and heat-shocked HeLa cells.  
7 As shown in Figure 6e, no variation of DNA methylation of PCT sequences was observed  
8 between non heat-shocked and heat-shocked cells suggesting that demethylation of PCT  
9 sequences is not a prerequisite to their expression and that the expression of PCT sequences in  
10 response to DNA hypomethylation and heat-shock relies on two independent pathways.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

### 19 Impact of Dicer on CT and PCT sequences expression

20  
21 In *S.pombe*, small-sized PCT transcripts, generated by Dicer, through targeting by the  
22 RITS complex, play a role in both the structure and the function of heterochromatin regions  
23 (23,24). Thus, by analogy to what occurs in the yeast model, long transcripts detected in  
24 human cells may represent precursors of small dsRNA (reviewed in 7). No direct evidence  
25 exists so far for an implication of Dicer in heterochromatin structure in human cells (25). To  
26 address the possibility that accumulation of long PCT transcripts might be generated by an  
27 alteration of Dicer activity during heat shock, HeLa cells were treated with siRNA targeting  
28 Dicer. The efficiency of the siRNA procedure was determined at a transcriptional and post-  
29 transcriptional level (Fig. 7a). The absence of PCT (Fig. 7b) or CT (data not shown) specific  
30 transcripts in Dicer deficient HeLa cells suggests that the accumulation of PCT transcripts is  
31 not a consequence of an alteration of the Dicer machinery.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

### 42 Discussion

43  
44 The expression of centromeric (CT) and pericentric (PCT) sequences has been shown  
45 to be involved in major genomic functions in lower eukaryotes. We and others have also  
46 shown that satellite sequences are actively transcribed under stress in several mammalian  
47 species including human (reviewed in 7) but the functional significance of this expression is  
48 still poorly understood. Our objective was to explore the extent of expression of satellite  
49 sequences in human cells. However, in human cells, this question is particularly difficult to  
50 address because of the repetitive nature and high degree of polymorphism of these sequences.  
51 A macro-array specifically dedicated to study the expression of human satellite sequences was  
52 therefore designed here. It contains a set of oligonucleotides representative of the large  
53 spectrum of CT and PCT specific repeats, which allowed an exhaustive analysis of the  
54 expression of satellite sequences in different physiological and pathological contexts. In order  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 to optimize the sensitivity of detection, we chose to use nylon membranes and radioactive  
4 labeling rather than glass supports and fluorescent labeling. Accordingly we show here that  
5 this approach allows the detection of transcripts, even expressed at low levels, with no need  
6 for PCR amplifications.  
7  
8  
9

10 Using this tool we show that PCT sequences behave as a coherent entity and that  
11 chromosome 9 specific PCT sequences are not the only ones to be expressed. This  
12 observation suggests that, although primarily forming at the 9q12 locus, secondary sites of  
13 HSF1 accumulation, which can be detected on other chromosomes enriched in satellite II or  
14 satellite III sequences including chromosome 1 (7, in preparation), are actively transcribed.  
15 The fact that in heat-shocked cells the expression of all PCT sequences is HSF1 dependent  
16 and correlated with that of hsp genes also suggests that their expression is finely controlled  
17 and coordinated. Our comparison of the kinetics of expression of PCT sequences and hsp  
18 genes between normal and cancer cell lines suggests that, as for hsp genes expression,  
19 differences in the kinetics of PCT sequences expression reveals differences of cell sensitivity  
20 to heat shock.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 For the first time, the expression of satellite sequences was explored in a large set of  
31 human tissues, revealing that in normal adult somatic cells these sequences are not expressed.  
32 Interestingly, in adult testis, PCT sequences are expressed in an antisense orientation and our  
33 results suggest that this expression is not correlated to a general activation of the heat shock  
34 response. Recent published data have shown that Y chromosome specific PCT sequences in  
35 an antisense orientation are involved in transplicing events (26). We show here that other PCT  
36 sequences are involved in this testis specific expression. The fact that, among the large panel  
37 of tested tissues, testis is the only one in which an expression of PCT sequences was observed  
38 could be related to their specific reprogramming during spermatogenesis (27). In some  
39 somatic cancers we found that these sequences are abnormally expressed, whereas in testis  
40 tumor PCT sequences become aberrantly repressed. Interestingly this pattern of expression is  
41 similar to that of several testis-specific genes, which are normally exclusively expressed in the  
42 testis, repressed in normal somatic tissues, but sporadically and illegitimately expressed in  
43 some somatic cancers (reviewed in 28). In cancer, the expression of CT and PCT sequences  
44 could reflect a global and major epigenetic deregulation. Indeed, in lung cancer tissue and to a  
45 lesser extend , in lymphoma, in contrast to the expression observed in heat-shocked cells or in  
46 testis, PCT sequences are expressed in both orientations, suggesting a non-regulated process.  
47 Similarly the PCT expression observed in Aza-C treated cells, occurs in both orientations,  
48 suggesting that DNA methylation is, at least partly, associated with the repression of PCT  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 sequences in adult somatic cells. However, our data in HCT116 cells deficient for dnmt1 and  
4 dnmt3b suggest that DNA hypomethylation per se is not always associated to a de-repression  
5 of PCT sequences expression, in agreement with observations in mouse ES cells (29,30).  
6  
7 Other mechanisms could also overcome DNA methylation and maintain a transcriptional  
8 repressive status of these sequences.  
9

10  
11  
12 Interestingly Fraga et al. (31) have reported a global change of histone marks in a large  
13 panel of cancer cells, including a loss of H4K20 methylation, a repressive mark normally  
14 enriched at PCT sequences. They also correlated this loss with a DNA hypomethylation at  
15 PCT sequences. A global loss of the repressive epigenetic mark H4K20me3 has also been  
16 described in cancer lung (10). However, in the small set of patients used in our study,  
17 different levels of global H4K20me3 were detected (data not shown) suggesting that other  
18 modifications, including DNA demethylation may be related to the de-repression of CT and  
19 PCT sequences that we observe. It has been suggested that PCT transcripts could play a role  
20 in stabilizing heterochromatic structures at PCT regions (reviewed in 7). Increased  
21 transcription of PCT sequences in Aza-C treated cells and of CT and PCT sequences in cancer  
22 cells is therefore probably associated to the destabilization of heterochromatin in these cells.  
23 Our study in dnmt 1 and dnmt3b cells suggests that adaptative mechanisms probably also  
24 exist to maintain transcriptional repression of PCT sequences when these sequences are  
25 demethylated.  
26  
27

28  
29 The existence of at least two independent pathways allowing an expression of PCT  
30 sequences, one involving HSF1 and the other involving DNA hypomethylation, indicates that  
31 expression of these sequences relies on various mechanisms involved in the control of either  
32 CT or PCT or both sequences expression. A recent publication by the group of G. Biamonti  
33 clearly shows, for example, that another transcription factor, tonEBP, involved in the response  
34 to hypertonic stress, also activates PCT sequences expression (32)  
35  
36

37  
38 In conclusion, our study represents the first description of CT and PCT sequences  
39 expression in normal and cancer human cells and highlights the complexity of the  
40 mechanisms involved in the regulation of these sequences. This work suggests that expression  
41 of CT and PCT sequences may represent a good indicator of large-scale epigenetic  
42 modifications occurring in response to environmental conditions and/or in different contexts  
43 of cell differentiation and cell transformation. In addition, the expression of these sequences  
44 could serve as a source of new markers of cell transformation in future transcriptomic  
45 analyses.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### **Fundings**

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (EPISTRESS project) ; Association de la Recherche sur le Cancer [#3449 to C.V.]; ARECA framework program) [C.V., S.K. and E.G.] ; Agence Nationale pour la Recherche (Episperm et empreinte) [S.K.]; Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes through EPIPRO and EPIMED framework programs [C.V., S.K., M.C., and E.G.]; Institut national du Cancer (Epistress) [C.V., S.K.]; by EC 6<sup>th</sup> framework program grant RISCRAAD [E.G]), A.E. was the recipient of a fellowship from the region Rhône-Alpes (Emergence) and the Fondation pour la Recherche Medicale.

### **Acknowledgements**

We B. thank Jacquiau for expertise in statistical analysis. We also thank Dr B.Volgestein for the gift of HCT116 wild type and mutant cells for dnmt1 and dnmt3b (John Hopkins University, Baltimore) , Drs L.Sistonen and A.Sandqvist (University of Turku, Finland) for the gift of wild type and knocked-down Hela cells for HSF1, J-M. Escudier (Plateforme de synthèse d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse-France) for the synthesis of oligonucleotide probes for in situ analysis. We also thank L. de Koenig and Dr G. Almouzni (Curie Institute-Paris), C.Ranquet and H.Geiselman (I J.Roget-Grenoble), Drs A.Verdel, C.Jolly and C.Souchier (IAB) for helpful discussion, comments, and help in data analysis.

## References

- 1- Grewal,S.I. and Elgin,S.C. (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* ., 447, 399-406.
- 2- Volpe,T.A., Kidner,C., Hall,I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen,R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*., 297, 1833-1837.
- 3- Zaratiegui, M., Irvine, D.V. and Martienssen,R.A. (2007) Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*., 128,763-776.
- 4- Amor, D.J., Kalitsis,P., Sumer,H. and Choo,K.H. (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.*, 14,359-368.
- 5- Prosser,J., Frommer,M. Paul,C. and Vincent. P.C. (1986) Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol.*, 187, 145-155.
- 6- Vissel,B. and Choo,K.H. (1987) Human alpha satellite DNA--consensus sequence and conserved regions. *Nucleic Acids Res.*, 15, 6751-6752.
- 7- Eymery, A., Callanan, M. and Vourc'h. C. (2008) The secret message of heterochromatin: new insights from mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int. J. Dev. Biol.*, In press
- 8- Jolly,C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner,B.M., Khochbin,S. and Vourc'h,C. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol.*, 164, 25-33.
- 9- Rizzi,N., Denegri,M., Chiodi,I., Corioni,M., Valgardsdottir,R., Cobianchi,F., Riva,S. and Biamonti,G. (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell.*, 15, 543-551.
- 10- Biamonti,G. (2004) Nuclear stress bodies: a heterochromatin affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 493-8.
- 11- Van den Broek,A., Brambilla,E., Moro-Sibilot,D., Lantuejoul,S., Brambilla,C., Eymin,B., Khochbin,S. and Gazzeri, S. (2008) Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non Small Cell Lung Cancer.*Clin Cancer Res.*, 14, 7237-45.
- 12- Bertucci,F., Bernard,K., Lorioid,B., Chang,Y.C., Granjeaud,S., Birnbaum,D., Nguyen,C., Peck,K. and Jordan,B.R. (1999) Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* ., 8, 1715-1722.

- 1  
2  
3 13, Jolly,C., Konecny,L., Grady,D.L., Kutsikova,Y.A., Cotto,J.J., Morimoto,R.I. and  
4 Vourc'h,C. (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human  
5 chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol.*, 156, 775-781.  
6  
7  
8 14- Chendrimada,T.P., Gregory,R.I., Kumaraswamy,E., Norman,J. Cooch,N. Nishikura,K.  
9 and Shiekhattar.R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA  
10 processing and gene silencing. *Nature.*, 436, 740-744.  
11  
12 15- Jordan,A., Bisgrove,D. and Verdin,E. (2003) HIV reproducibly establishes a latent  
13 infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.*, 15, 1868-77.  
14  
15 16- Matera,A.G. and Ward,D.C. (1992) Oligonucleotide probes for the analysis of specific  
16 repetitive DNA sequences by fluorescence in situ hybridization. *Hum Mol Genet.*, 1, 535-9.  
17  
18 17- Cooke,H.J. and Hindley,J. (1979) Cloning of human satellite III DNA: different  
19 components are on different chromosomes. : *Nucleic Acids Res.*, 6, 3177-97.  
20  
21 18- Moyzis, R.K., Albright, K.L, Bartholdi, M.F., Cram, L.S., Deaven, L.L., Hildebrand,  
22 C.E., Joste, N.E., Longmire,J.L., Meyne,J. and Schwarzacher-Robinson,T. (1987) Human  
23 chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel markers for genetic analysis.  
24 *Chromosoma.*, 95, 375-86.  
25  
26 19- ChooK.H., Earle,E., Vissel,B. and Kalitsis,P.A. (1992) Chromosome 14-specific human  
27 satellite III DNA subfamily that shows variable presence on different chromosomes 14. *Am J*  
28 *Hum Genet.*, 50, 706-16.  
29  
30 20- Tagarro,I., Fernández-Peralta,A.M. and González-Aguilera,J.J. (1994) Chromosomal  
31 localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes.  
32 *Hum Genet.* 93, 383-8.  
33  
34 21- Perocchi,F., Xu,Z. Clauder-Munster,S. and Steinmetz,L.M. (2007) Antisense artifacts in  
35 transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acids Res.*, 35,  
36 e128.  
37  
38 22- Jolly,C. and Lakhota S.C. (2006) Human sat III and *Drosophila* hsr omega transcripts: a  
39 common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells. *Nucleic Acids*  
40 *Res.*, 34, 5508-14.  
41  
42 23- Verdel, A., Jia, S., Gerber,S., Sugiyama,T., Gygi,S., Grewal,S.I. and Moazed,D. (2004)  
43 RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.*, 303, 672-676.  
44  
45 24- Buhler,M. and Moazed,D. (2007) Transcription and RNAi in heterochromatic gene  
46 silencing. *Nat Struct Mol Biol.*, 14, 1041-1048.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 25- Fukagawa, T., Nogami,M., Yoshikawa,M. Ikeno,M., Okazaki,T., Takami, Y., Nakayama,  
4 T. and Oshimura, M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure  
5 in vertebrate cells. *Nat Cell Biol.*, 6, 784-791.  
6  
7  
8 26- Jehan,Z., Vallinayagam,S. Tiwari,S., Pradhan,S., Singh,L., Suresh,A., Reddy,H.M.  
9 Ahuja,Y.R. and Jesudasan,R.A. (2007) Novel noncoding RNA from human Y distal  
10 heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res.*, 17,  
11 433-440.  
12  
13  
14 27- Govin,J., Escoffier,E., Rousseaux,S., Kuhn,L., Ferro,M., Thévenon,J., Catena,R.,  
15 Davidson,I., Garin,J., Khochbin,S. and Caron,C. (2007) Pericentric heterochromatin  
16 reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol.*, 176, 283-  
17 94.  
18  
19  
20 28- Simpson,A.J., Caballero,O.L., Jungbluth, A., Chen,Y.T. and Old,L.J (2005) .Cancer/testis  
21 antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 615-25.  
22  
23  
24 29- Lehnertz,B., Ueda,Y., Derijck,A.A., Braunschweig,U., Perez-Burgos,L., Kubicek,S.,  
25 Chen,T., Li,E., Jenuwein,T. and Peters,A.H. (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9  
26 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin.  
27 *Curr Biol.*, 13, 1192-1200.  
28  
29  
30 30- Martens,J.H., O'Sullivan,R.J., Braunschweig,U., Opravil,S., Radolf,M., Steinlein,P. and  
31 Jenuwein, T. (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the  
32 mouse epigenome. *Embo J.*, 24, 800-812.  
33  
34  
35 31- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet,M., Espada,J., Schotta,G.,  
36 Bonaldi,T., Haydon,C., Roperio,S., Petrie, K., Iyer,N.G., Pérez-Rosado, A. Calvo, E. Lopez,  
37 J.A. Cano A. , Calasanz, M.J. Colomer, D. Piris,M.A. Ahn,N. Imhof,A. Caldas,C. Jenuwein,  
38 T. and Esteller. M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone  
39 H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* , 37, 391-400.  
40  
41  
42 32- Valgardsdottir,R., Chiodi,I., Giordano,M., Rossi,A., Bazzini,S., Ghigna,C., Riva,S. and  
43 Biamonti, G. (2008) Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress  
44 response in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 36, 423-434.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



### Figure Legends

#### **Figure 1: Kinetics of PCT sequence expression during heat shock response in HeLa cells, detected by RepChip**

*a-* Expression of sense PCT transcripts in the course of the heat shock response. The expression of PCT sequences was evaluated in non heat-shocked HeLa cells (NHS), in HeLa cells over a continuous heat shock exposure of 30 minutes to 60 minutes, as well as in HeLa cells submitted to a one-hour of continuous heat shock followed by a recovery period of one to six hours. A peak of accumulation of hsp and PCT specific sense transcripts was observed after one hour of recovery following heat shock. No heat shock dependent variation of expression was observed for control genes.

*b-* Sense and antisense PCT sequences expression in non heat-shocked and heat-shocked cells. Raw values of signal intensities corresponding to sense and antisense PCT sequences expression in non heat-shocked HeLa cells (NHS) and in HeLa cells submitted to a one hour of heat shock (HS) are displayed as box plots. The p values were calculated using a paired t-test. The induction rates of sense and antisense PCT sequences upon stress are respectively 44.9 and 11.6 fold indicating that PCT transcripts in sense and antisense orientations are more abundant in heat shocked cells than in non heat shocked cells.

*c-* Impact of HSF1 on PCT sequence expression. PCT sequence expression induction was determined in HSF1 expressing (WT) and non-expressing (KD) HeLa cells. The values of signal intensities corresponding to sense and antisense PCT sequences expression in heat-shocked (HS) versus non heat-shocked (NHS) HeLa cells are displayed as ratios (HS/NHS). Heat induced accumulation of sense and antisense PCT transcripts and of hsp transcripts is severely impaired in KD HeLa cells.

#### **Figure 2: PCT sequence expression upon stress is a common feature of normal and cancer cell lines.**

The amount of sense and antisense PCT transcripts was analyzed in HeLa, HCT116, A431 and IMR90 cell lines submitted or not to a one hour heat shock with or without a period of recovery of three hours following heat shock. For each condition and cell type, the relative levels of expression of PCT sequences and of genes were normalized using the corresponding values in non heat-shocked cells. Heat-induced accumulation of PCT transcripts in both orientations is observed in all cell lines with marked differences in the amplitude and kinetics of accumulation. NHS: non-heat shock, HS: heat shock, REC: recovery.

**Figure 3: Comparative analysis of PCT sequences expression in HeLa cells and testis**

The intensity values obtained for control genes, heat shock genes and PCT sequences expression in testis, in non heat-shocked (NHS) and heat-shocked (HS) HeLa cells are presented as box plots. For each condition the relative levels of expression of PCT sequences and of control genes were normalized using the corresponding values in non heat-shocked HeLa cells. In contrast to heat-shocked HeLa cells, where PCT transcripts are detected in both orientations, PCT sequences in testis are mostly expressed in an antisense orientation. The accumulation of PCT transcripts in testis does not seem to involve the heat shock signalling pathway since the intensity values corresponding to the heat shock genes remained at a lower level than in heat-shocked HeLa cells.

**Figure 4: Variations in CT and PCT sequences expression in normal and tumor tissues**

*a- Expression of PCT transcripts in testis, liver, ovary and lung normal and tumor tissues.* For each tissue, the RNA fractions from normal and tumor tissues originating from the same patient were analyzed. Signal intensities corresponding to control and hsp genes and to PCT sequences in a sense and antisense orientations are represented as box plots. An accumulation of antisense PCT sequences is observed in normal testis. PCT transcripts in both orientations are abundant in tumor lung tissue.

*b- hsp genes expression in testis and lung normal and tumor tissues.* Hsp genes expression were analysed by qPCR. No variation of hsp genes expression was detected between normal and tumor testis tissues. No induction of hsp genes expression was observed in tumor lung tissue compared to normal lung tissue.

**Figure 5 : Variations in CT and PCT sequences expression in normal and tumor lung tissues**

Analysis of the expression of CT and PCT in normal and tumor lung tissues was extended to a set of lung tumors of a different origin than those presented in Fig 4a.

Signal intensities corresponding to control and hsp genes and to CT and PCT sequences are represented as box plots. An accumulation of sense and antisense CT and PCT sequences in both orientations is observed in tumor lung tissues. N: normal, T: tumoral, #: patient identification



**Figure 6: Impact of epigenetic modifiers on the expression of PCT sequences**

**a-** *Drug-induced DNA demethylation can induce PCT sequences expression.* Comparative analysis of PCT sequences expression was performed in non-heat shocked (NHS) HeLa cells treated with Trichostatin A (TSA), butyrate (BUT) or 5-Azacytidin (Aza-C). Expression of PCT sequences was also analyzed in HCT116 cells deficient for dnmt3b (3bKO) and for both dnmt1 and dnmt3b (DKO) genes. The relative levels of expression of PCT sequences and of control genes were normalized using the corresponding values in non heat-shocked (HeLa) HeLa cells (left) or in normal HCT116 cells (right). PCT sequences expression is only detected in Aza-C treated cells (in both orientations).

**b-** *PCT sequences are hypomethylated in Aza-C treated cells.*

MeDIP analyses of PCT and CT sequences were performed in Aza-C treated cells. The hypomethylated status of CT and PCT sequences in HCT116 dnmt mutated cells, described in Horard et al (Horard et al, accompanying paper) is not represented herein. The histograms indicate the relative enrichment in 5 methyl-cytosine of target sequences after normalization to a reference promoteur (GAPDH promoter). IP-IgG: immunoprecipitation with non specific IgG, IP-5mC: immunoprecipitation with antibody specific for 5 methyl-cytosine.

**c-** *Expression of PCT sequences in Aza-C treated cells is not correlated to accumulation of hsp specific transcripts.* Hsp gene (hsp 90, hsp40 and hsp70) expression was evaluated by qPCR in Aza-C treated cells and in control HeLa cells (HeLa). Results were normalized thanks to 3 control genes (GAPDH, U6 and histone H4). No induction of hsp genes was detected in these cells.

**d-** *Expression of PCT sequences in Aza-C treated cells is HSF1 independent.* The status of HSF1 activation in non-heat shock (NHS) and heat-shocked (HS) HeLa cells, Aza-C treated HeLa cells was determined by western blot analysis (right) and immunofluorescence with an antibody against HSF1 (left). Active HSF1 which displays a lower electrophoretic mobility was only detected in heat-shocked cells, but not in non heat-shocked Aza-C treated cells. Similarly, nuclear foci formed of active HSF1 and which form primarily form at the 9q12 locus were only present in HeLa heat-shocked cells.

**e-** *PCT sequences expression upon stress is not associated with DNA demethylation.* MeDIP analysis of PCT sequences was performed in non-heat-shocked (NHS) and heat-shocked (HS) HeLa cells. The histograms indicate the relative enrichment of PCT sequence after normalization to histone H4 promoter. No variation of DNA methylation of PCT sequences was observed between non heat-shocked and heat-shocked cells. IP-IgG: immunoprecipitation

1  
2  
3 with non specific IgG, IP-5mC: immunoprecipitation with antibody specific for 5 methyl-  
4 cytosine.  
5  
6  
7

8  
9 **Figure 7: Impact of Dicer (dcr) knock-down on PCT sequences expression.**

10 **a- siRNA efficiency.** siRNA efficiency to generate a knock down of Dicer expression was  
11 validated by RT-PCR (left) and western blot analysis (right) on siRNA treated (Si-dcr) and  
12 control (Ctl) cells. U6 snRNA expression was used as a control in RT-PCT analysis while anti  
13 HSF1 was used as a control in western blot analysis. Dicer mRNA and Dicer protein rates  
14 were greatly decreased in Si-dcr cells.  
15  
16  
17

18 **b- Knock down of Dicer does not induce PCT sequences expression.** Signal intensities  
19 corresponding to control genes, hsp genes and PCT sequences expression in Ctl and Si-dcr  
20 HeLa cells are displayed as box plots. No significant difference in the expression of any of the  
21 sequences was observed between Ctl and Si-dcr treated cells.  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 **Tables**

29  
30 **Table 1: Expression of CT and PCT sequences in normal tissues.**

31 CT and PCT sequences expression was analyzed by the RepChip approach in twenty-one  
32 different tissues. The expression of PCT sequences was only detected in testis, in an antisense  
33 orientation, while an expression of CT sequences was detected in embryonic liver, placenta  
34 and ovary. In these tissues, CT7' and CT10' specific transcripts were respectively expressed in  
35 both sense and antisense orientations.  
36  
37  
38  
39  
40

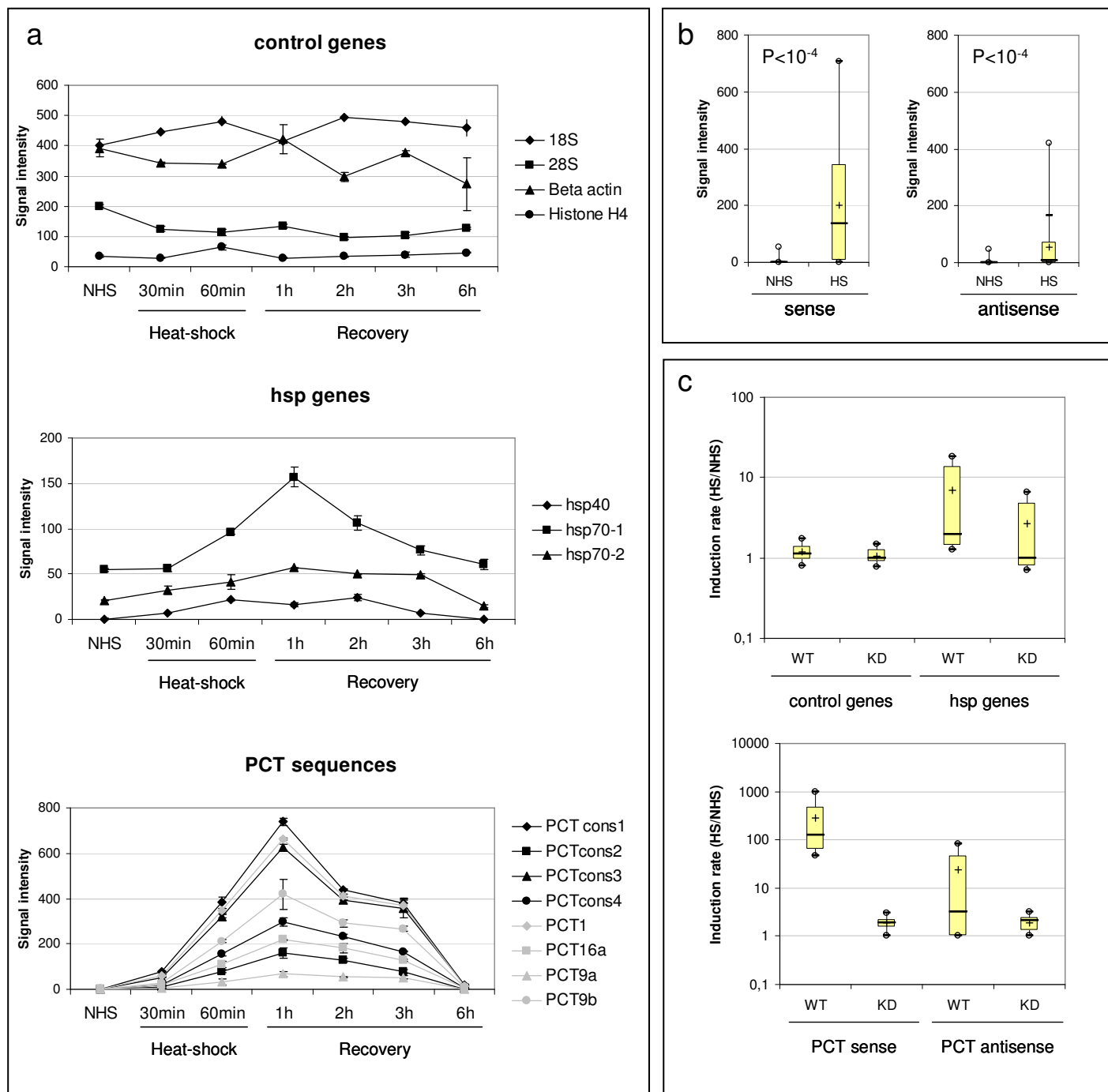
41  
42 **Table 2 : Expression of CT sequences in normal and tumor lung tissues.**

43 List of oligonucleotides which detect CT specific transcripts in normal and tumour lung  
44 tissues. In all cases, an expression of PCT sequences in both orientations was also detected.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

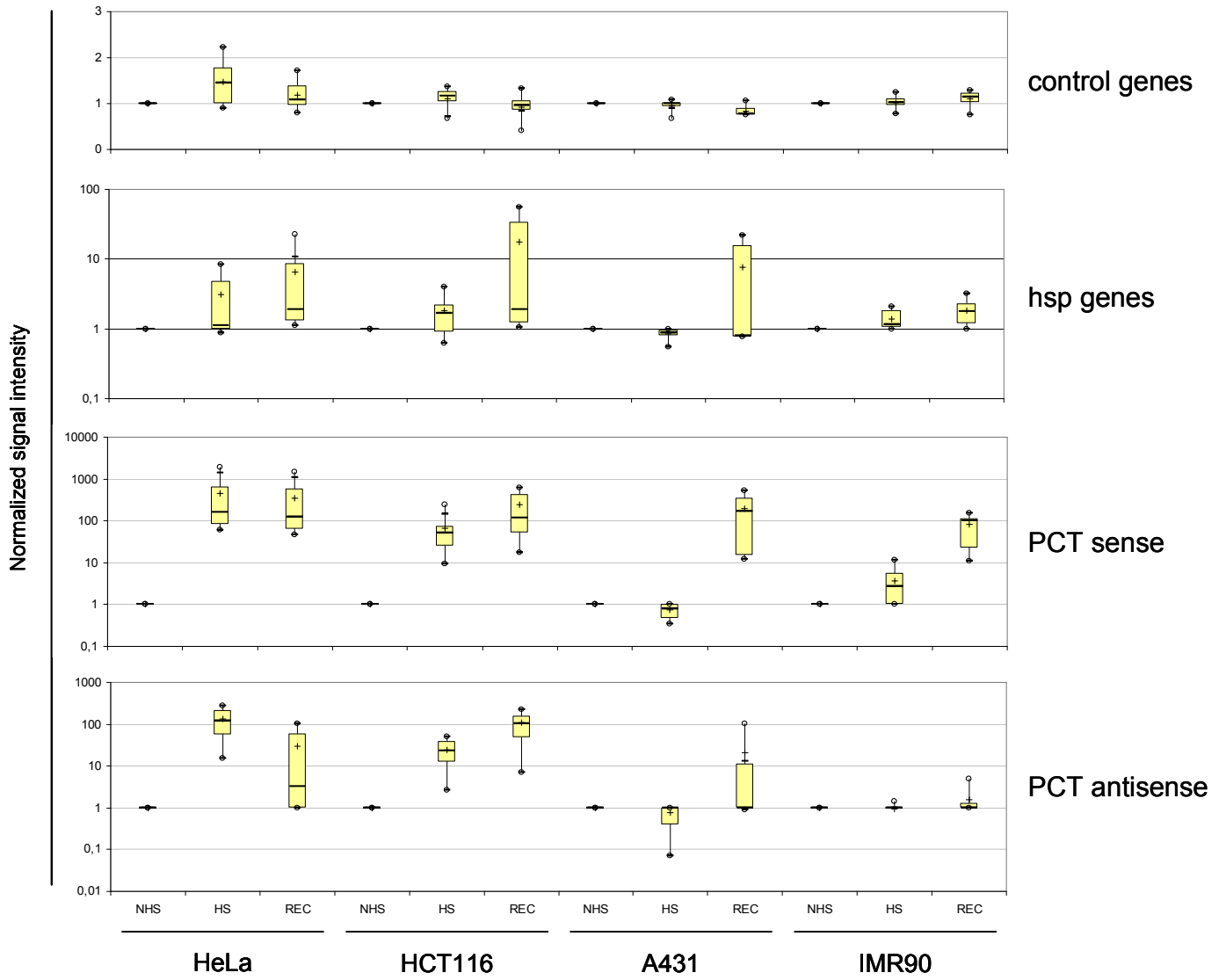
For Peer Review

Eymery et al. Figure 1



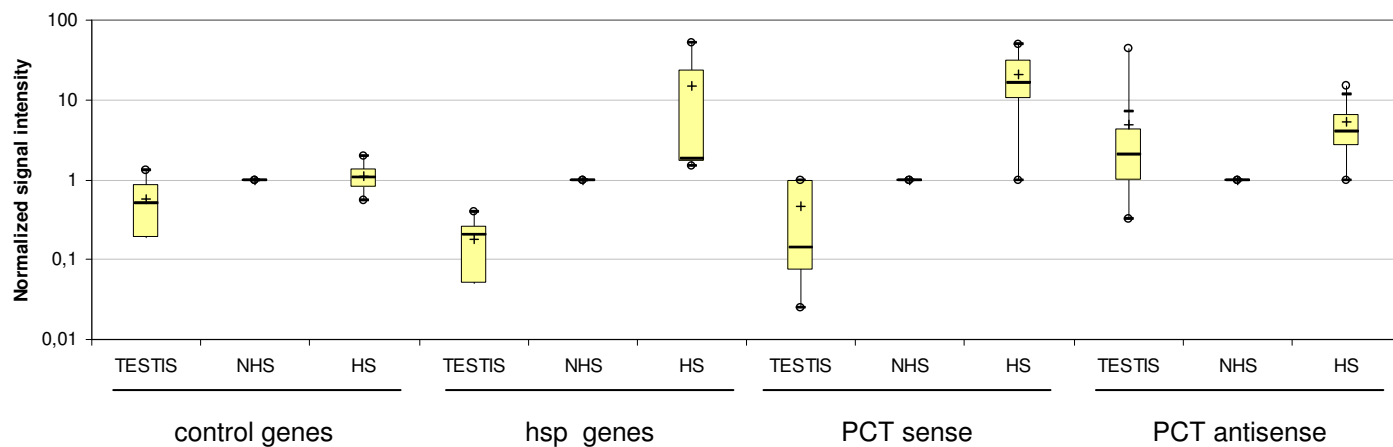
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Eymery et al. Figure 2



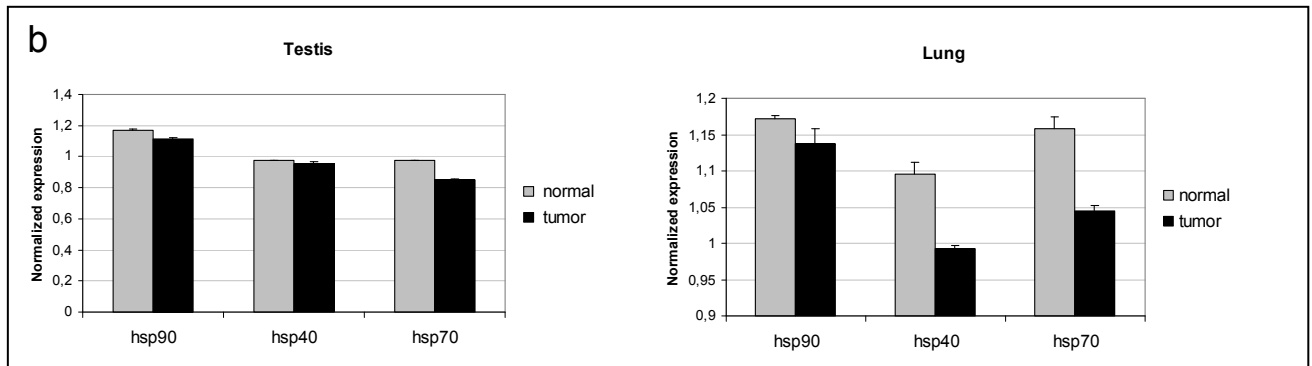
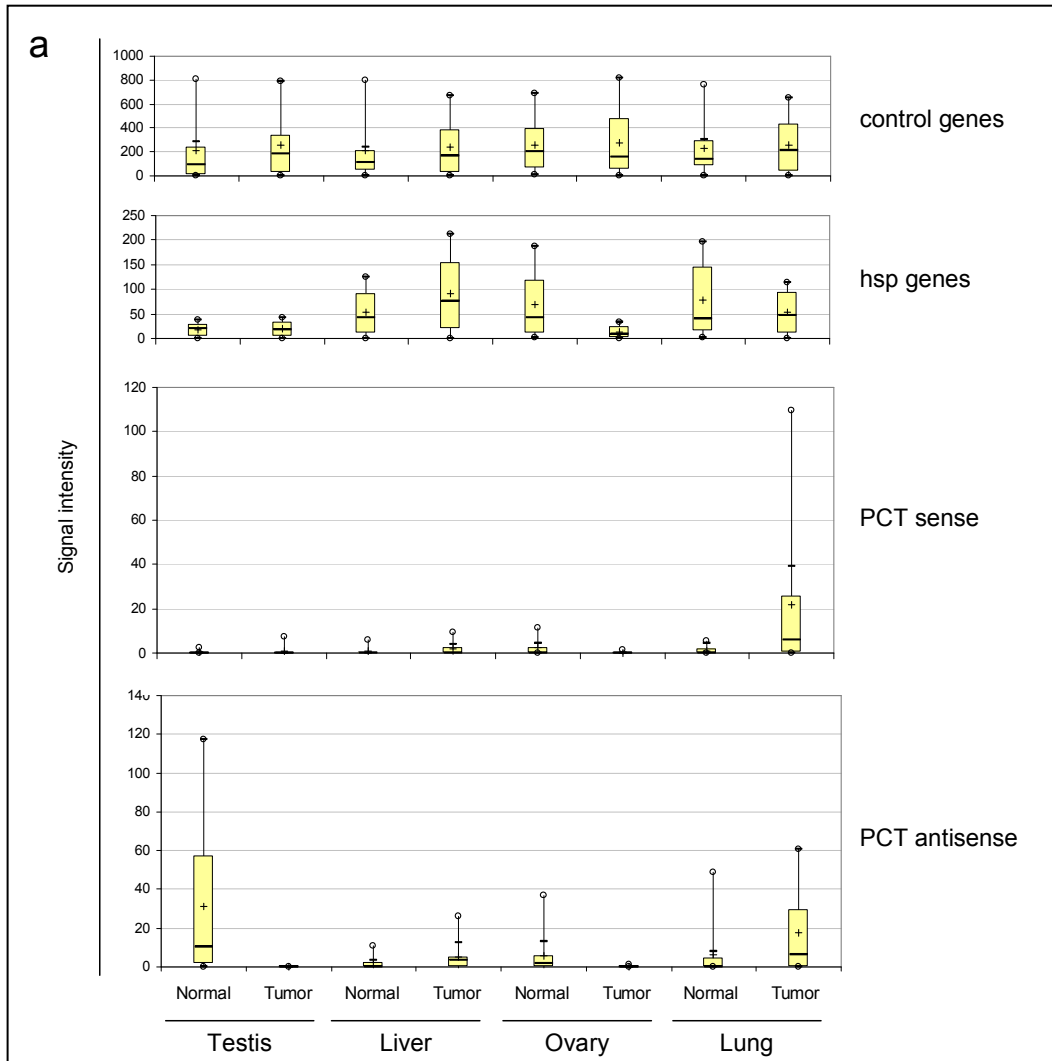
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Eymery et al. Figure 3



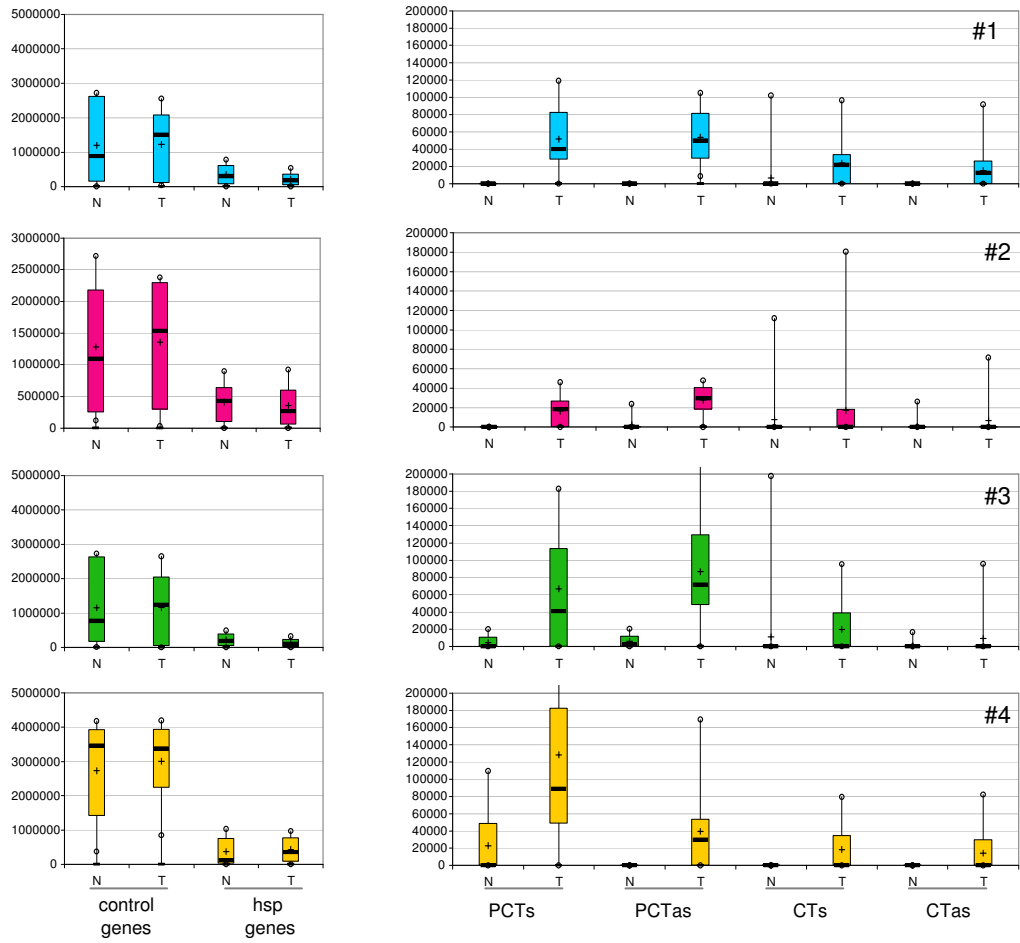
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Eymery et al. Figure 4



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

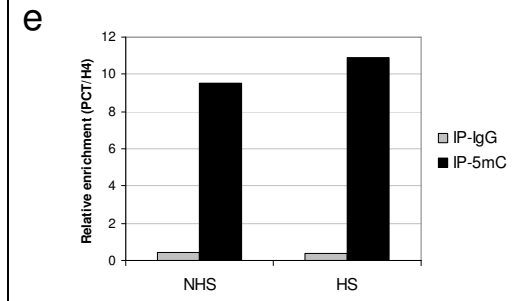
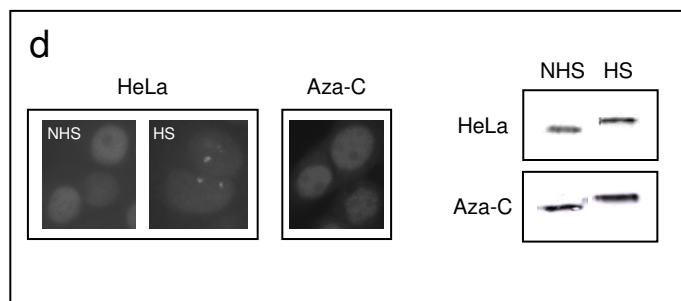
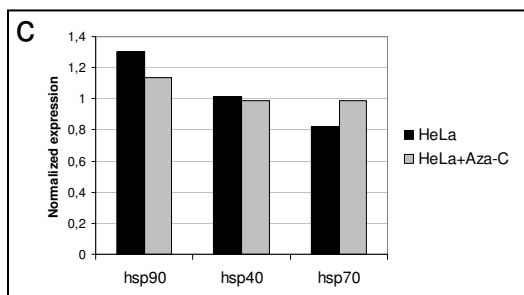
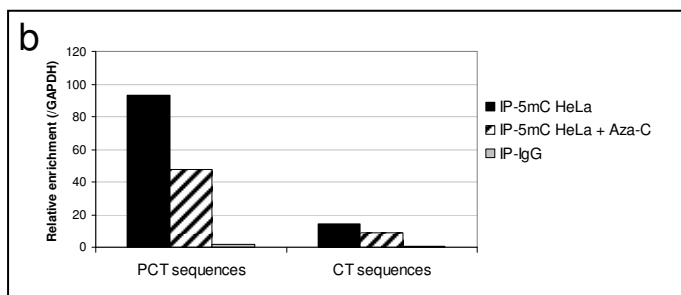
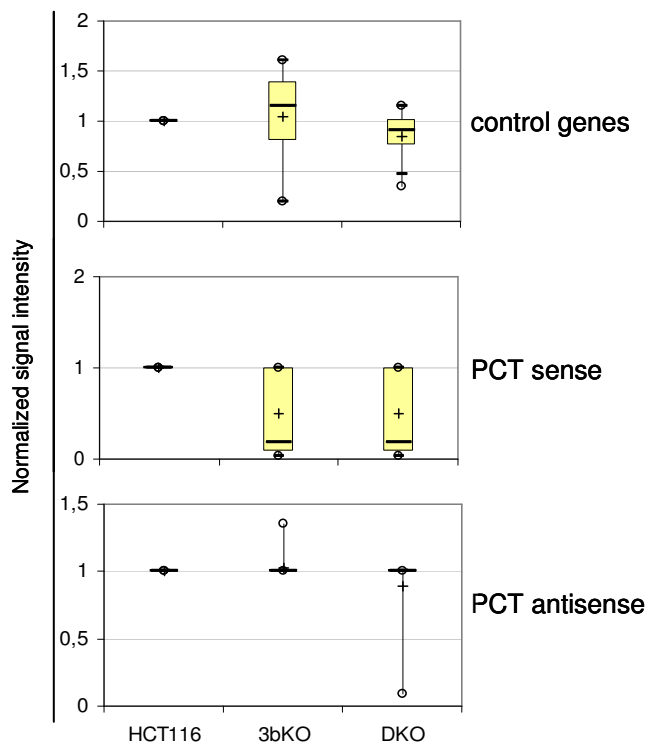
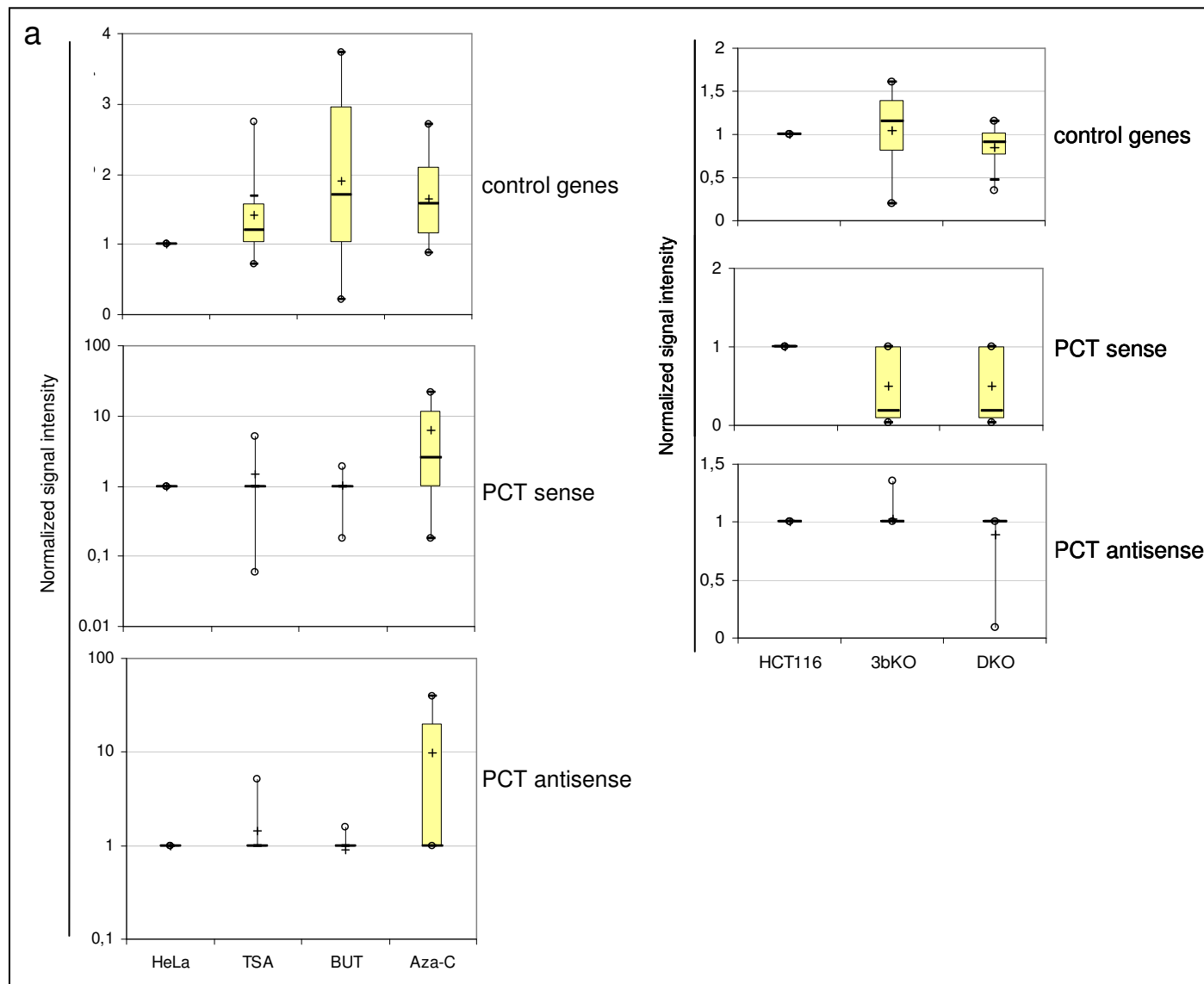
Eymery et al. Figure 5



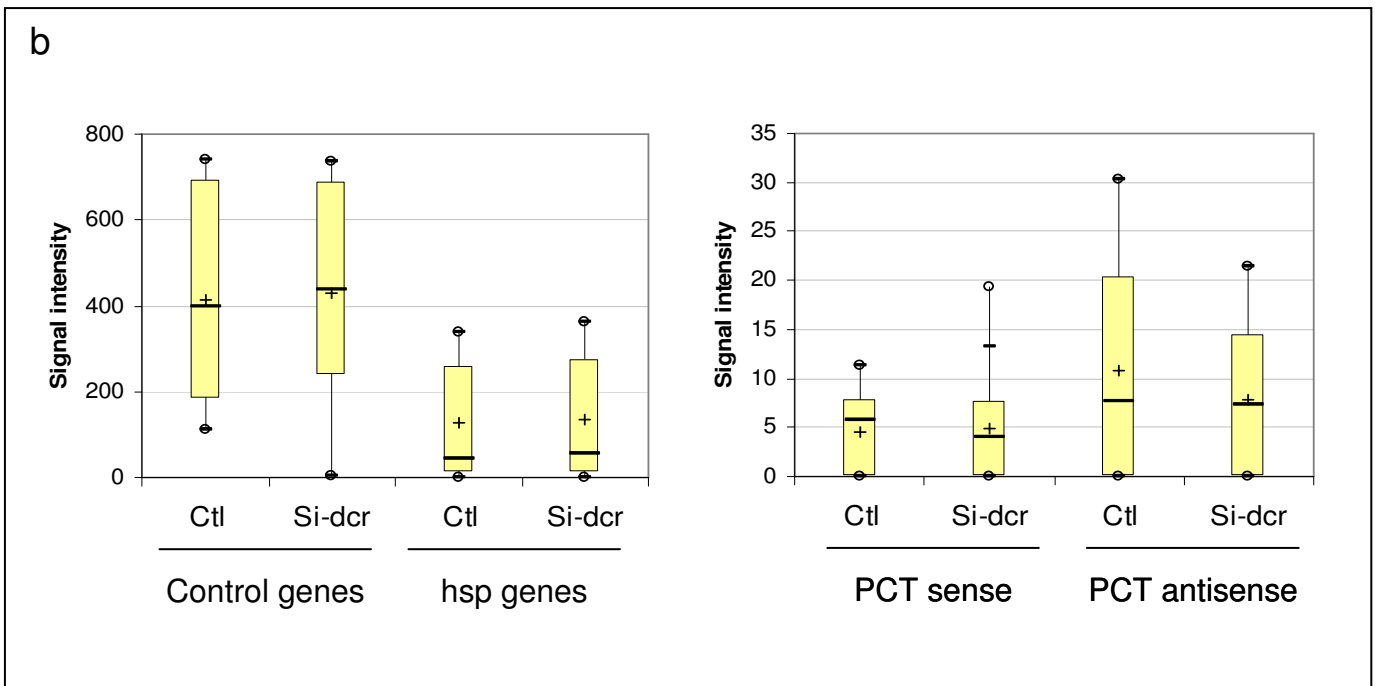
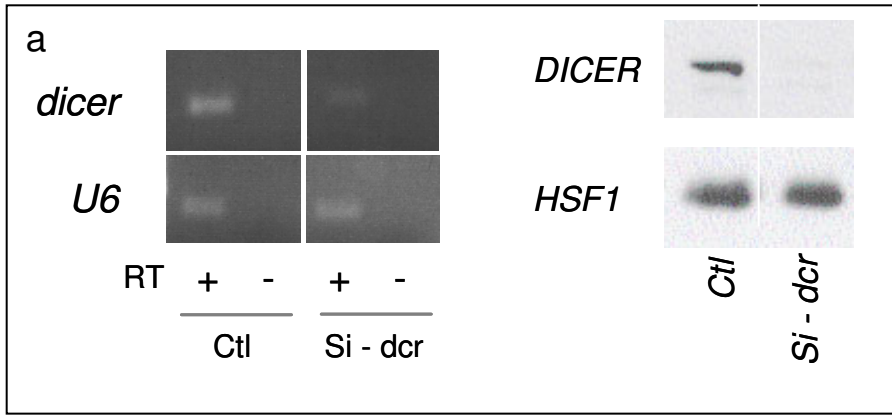
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Eymery et al. Figure 6



Eymery et al. Figure 7



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Eymery et al. Table 1

	Immunity system		Central nervous system and effector muscles			Endocrine system		Digestive system		
	thymus	bone marrow	brain	spinal cord	skeletal muscle	thyroid gland	adrenal gland	salivary gland	liver	colon
PCT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
CT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no

	Cardiovascular system	Reproductive system				Respiratory system		Embryo and placenta		
	heart	testis	prostate	uterus	ovary	trachae	lung	liver	brain	placenta
PCT	no	YES	no	no	no	no	no	no	no	no
CT	no	no	no	no	YES	no	no	YES	no	YES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Eymery et al. Table 2

Patient #	Normal tissue	Tumor tissue
1	21s	cons1s, cons1as, cons2s, cons3s, cons3as, 1as, 2s, 2as, 3s, 3as, 4s, 4as, 7's, 7'as, 8s, 8as, 9s, 9as, 10's, 10'as, 12s, 12as, 16s, 16as, 16's, 16'as, 17as, 18s, 20s, 20as, 21s, 22s, 22as
2	21s	cons1s, cons1as, cons2s, cons3s, cons3as, 1as, 2s, 2as, 3s, 9s, 10's, 10'as, 12s, 13s, 13as, 16as, 16's, 16'as, 21s
3	21s	cons1s, cons1as, cons2s, cons3s, cons3as, cons4s, cons4as, 2s, 2as, 4s, 7's, 7'as, 10's, 10'as, 16s, 16as, 21s
4		cons1s, cons1as, cons3s, cons3as, 2s, 2as, 3s, 8s, 8as, 9s, 9as, 10's, 12s, 16s, 16as, 16's, 17as, 18s, 18as, 20s, 20as

# E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35

G Merdzhanova<sup>1,2</sup>, V Edmond<sup>1,2</sup>, S De Seranno<sup>1,2</sup>, A Van den Broeck<sup>1,2</sup>, L Corcos<sup>3</sup>, C Brambilla<sup>1,2</sup>, E Brambilla<sup>1,2</sup>, S Gazzeri<sup>1,2</sup> and B Eymin<sup>\*1,2</sup>

The transcription factor E2F1 has a key function during S phase progression and apoptosis. It has been well-demonstrated that the apoptotic function of E2F1 involves its ability to transactivate pro-apoptotic target genes. Alternative splicing of pre-mRNAs also has an important function in the regulation of apoptosis. In this study, we identify the splicing factor SC35, a member of the Ser-Rich Arg (SR) proteins family, as a new transcriptional target of E2F1. We demonstrate that E2F1 requires SC35 to switch the alternative splicing profile of various apoptotic genes such as *c-flip*, *caspases-8* and *-9* and *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic splice variants. Finally, we provide evidence that E2F1 upregulates SC35 in response to DNA-damaging agents and show that SC35 is required for apoptosis in response to these drugs. Taken together, these results demonstrate that E2F1 controls pre-mRNA processing events to induce apoptosis and identify the SC35 SR protein as a key direct E2F1-target in this setting. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 1815–1823; doi:10.1038/cdd.2008.135; published online 19 September 2008

Pre-mRNA splicing is an essential step for the expression of most genes in higher eukaryotic cells. This process has emerged as an important mechanism of genetic diversity as about 74% of human genes undergo alternative splicing, leading to the production of various protein isoforms.<sup>1</sup> SC35 belongs to the serine/arginine-rich (SR) protein family, one of the most important class of splicing regulators. Members of the SR family have a modular structure consisting of one or two copies of an N-terminal RRM (RNA-recognition motif) followed by a C terminus rich in serine and arginine residues known as the RS domain. They act at multiple steps of spliceosome assembly and participate in both constitutive and alternative splicing.<sup>2</sup> Together with most of the other splicing factors, SR proteins localize to nuclear subregions termed nuclear speckles.<sup>3</sup> Extensive serine phosphorylation of the RS domain has an important function in the regulation of both the localization and the activities of SR proteins.<sup>4</sup> Although the splicing functions of SR proteins have been well documented *in vitro*, their roles and physiological targets *in vivo* are less well known. However, based on gene targeting experiments demonstrating that they are required for cell viability and/or animal development, SR proteins undoubtedly control essential biological functions.

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has an important regulatory function. Indeed, a remarkable number of transcripts that encode proteins involved in the apoptotic pathway are subjected to alternative splicing. This usually drives the expression of proteins with opposite functions, either pro- or anti-apoptotic.<sup>5</sup> Interestingly, changes in

SR protein phosphorylation have been observed upon apoptotic stimulation following activation of the Fas receptor.<sup>6</sup> In addition, *in vitro* overexpression experiments have suggested a potential role for SR proteins in the control of the splicing of pre-mRNAs encoding apoptotic regulators.<sup>7–8</sup> Moreover, depletion of the ASF/SF2 SR protein has been reported to induce apoptosis.<sup>8–9</sup> Nevertheless, whether individual SR proteins are necessary to modulate alternative splicing of mRNAs encoding apoptotic factors remains largely unknown, as well as the factors that control expression and/or activity of SR proteins in this context.

The E2F1 transcription factor belongs to the E2F family encompassing eight members involved in a diverse array of essential cellular functions.<sup>10</sup> E2F1 is best-known for its role in driving cell cycle progression in S phase. In addition, E2F1 can induce apoptosis by mechanisms involving with or without transcriptional function. We previously demonstrated the ability of E2F1 to trigger apoptosis through caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex and showed that E2F1 acts through specific downregulation of the cellular FLICE-inhibitory protein short isoform, c-FLIP<sub>short</sub>.<sup>11</sup> As *c-flip* predominantly encodes two isoforms arising from alternative splicing, namely c-FLIP<sub>short</sub> and c-FLIP<sub>long</sub>, we postulated that E2F1 could control the expression and/or activity of some splicing factors. In this study, we identify the SC35 splicing factor as a direct transcriptional target of E2F1 and show that SC35 is involved in the ability of E2F1 to trigger apoptosis through downregulation of c-FLIP<sub>short</sub>. Importantly, we demonstrate that E2F1 and SC35

<sup>1</sup>INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France; <sup>2</sup>Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38041, France and <sup>3</sup>INSERM, U613, Brest, 29238, France

\*Corresponding author: B Eymin, INSERM U823, Equipe 2: Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Institut Albert Bonniot, BP170, Domain de la merci, 38042 Grenoble, Cedex 09, France. Tel: +33 4 76 54 94 76; Fax: +33 4 76 54 94 13; E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

**Keywords:** alternative splicing; apoptosis; E2F1; SC35; SR proteins

**Abbreviations:** CAT, chloramphenicol acetyl transferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Fas L, Fas ligand; FLIP, FLICE inhibitory protein; MEF, murine embryonic fibroblast; p54nrb, p54 nuclear RNA-binding protein; PSF, polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor; RRM, RNA recognition motif; siRNA, small interfering RNA; SR, ser-rich; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Received 22.1.08; revised 13.8.08; accepted 14.8.08; Edited by B Dijnlacht; published online 19.9.08

also cooperate to switch the alternative splicing pattern of *caspases-8* and *-9* as well as of *Bcl-x*, towards the expression of pro-apoptotic isoforms. Finally, we provide evidence that E2F1 promotes the accumulation of SC35 in cells treated with DNA-damaging agents, and show that SC35 is required for induction of apoptosis in this setting. Taken together, these results demonstrate that E2F1 and SC35 proteins control pre-mRNA processing events to promote apoptosis.

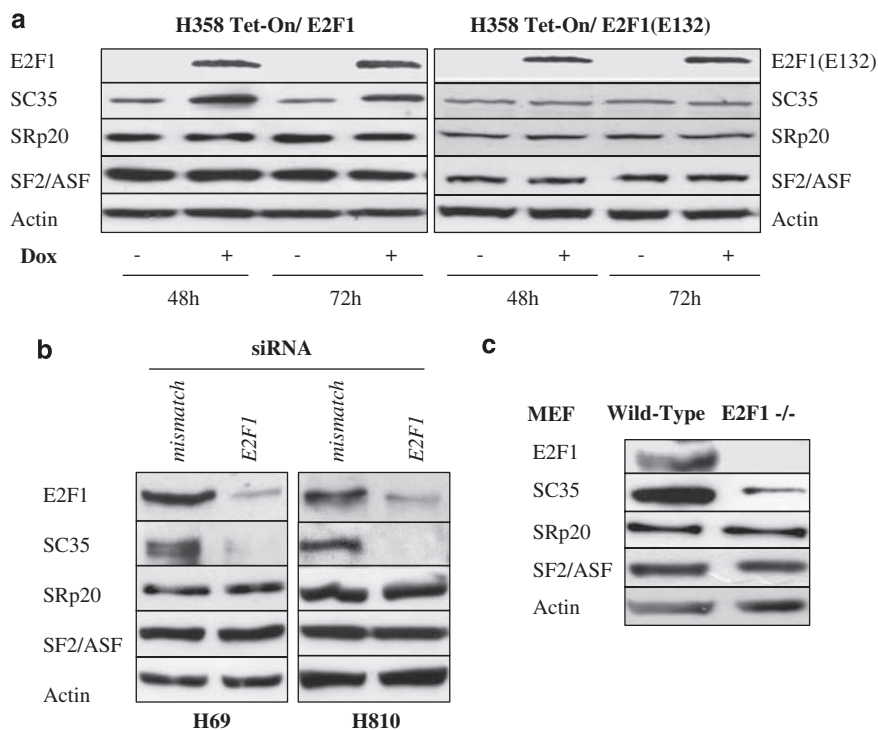
## Results

**E2F1 upregulates SC35 protein expression.** We previously established a model of stable E2F1-inducible clones in the H358 cell line derived from a human lung adenocarcinoma.<sup>11</sup> Here, we exploit this model to test whether E2F1 can control the expression pattern of three members of the SR protein family, one of the most important class of splicing regulators, namely SC35, SRp20 and SF2/ASF. Immunoblotting experiments demonstrated a 3 to 4-fold increased expression of SC35 in cells overexpressing E2F1, whereas the total level of SRp20 and SF2/ASF was not affected (Figure 1a, left panel). This effect required the DNA-binding activity of E2F1 as overexpression of an E2F1(E132) DNA-binding defective mutant did not affect SC35 protein level (Figure 1a, right panel).

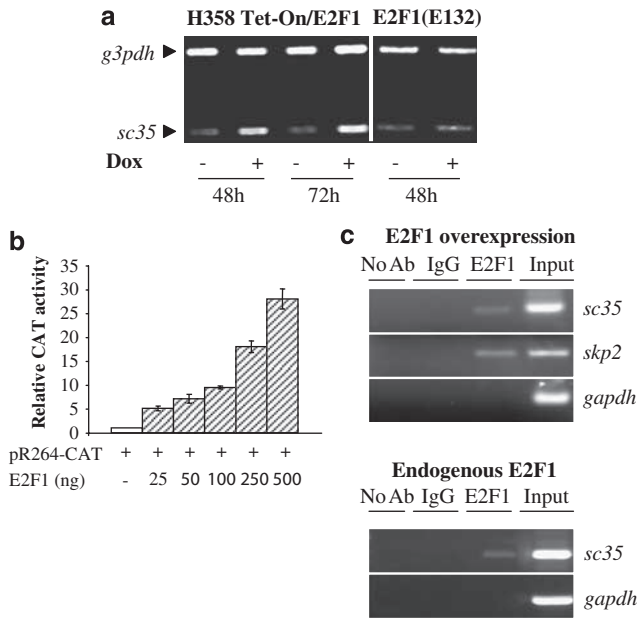
To confirm these data, we knocked down E2F1 expression by using small interfering RNAs (siRNAs) in the H69 and H810

neuroendocrine lung carcinoma cell lines that physiologically express high levels of E2F1, and analyzed SC35, SRp20 and SF2/ASF expression by western blotting. As shown in Figure 1b, the silencing of E2F1 was accompanied by marked downregulation of the endogenous SC35 protein in both cell lines as compared with cells transfected with *mismatch* siRNA. In contrast, the expression of SRp20 and SF2/ASF proteins was not affected. In addition, we observed that SC35 protein levels were strongly reduced in E2F1 knockout murine embryonic fibroblast (MEF) as compared with wild-type MEF, whereas those of SRp20 and SF2/ASF did not change (Figure 1c). Taken together, these data demonstrate that SC35 expression is positively regulated by E2F1.

**SC35 is a direct transcriptional target of E2F1.** To test whether E2F1 controls SC35 expression at the transcriptional level, we performed reverse transcription (RT)-PCR experiments using primers localized at the 5'-end of the *sc35* ORF. The data showed that expression of *sc35* mRNA was induced by E2F1 but not by the mutant E2F1(E132) (Figure 2a). To go further, we performed Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments using a pR264-CAT plasmid that contains the 1 kb human *sc35* promoter upstream of CAT cDNA.<sup>12</sup> Co-transfection of H1299 (Figure 2b) or SAOS2 (data not shown) cells with pR264-CAT vector and increasing amounts of an E2F1 expression vector resulted in a dose-dependent increase of CAT activity. These results indicated that E2F1 can transactivate the promoter of *sc35*.

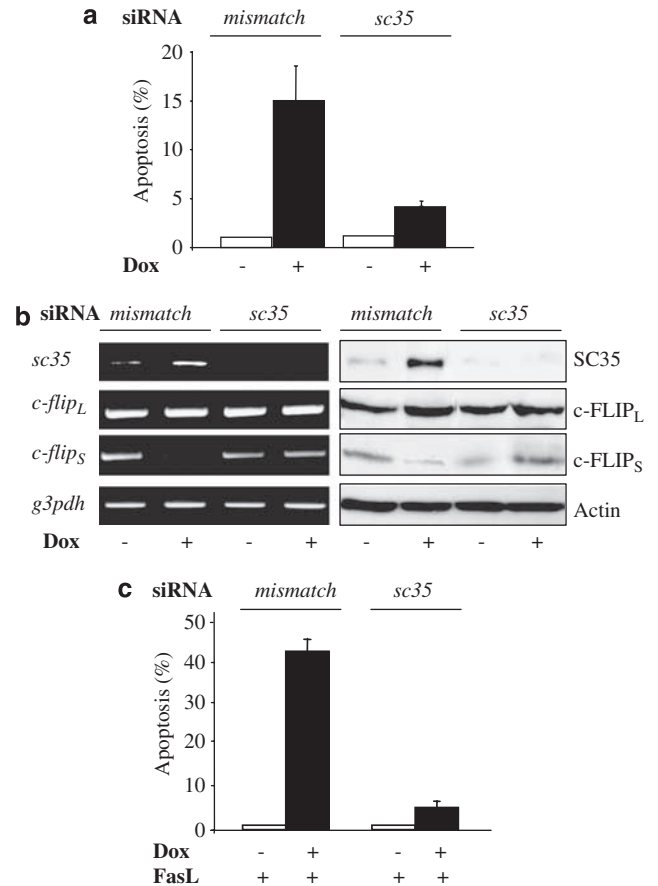


**Figure 1** SC35 is upregulated following E2F1 induction. (a) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were incubated for indicated times in the presence (+) or absence (–) of 1  $\mu$ g/ml doxycycline (Dox). Mutant E2F1(E132) is unable to bind DNA. Expression of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins was studied by western blotting. Actin was used as a loading control. (b) H69 and H810 neuroendocrine lung carcinoma cell lines were transfected for 72 h with *mismatch* or *e2f1* siRNAs as indicated and subjected to western blot analyses for the detection of E2F1, SC35, SRp20 and SF2/ASF proteins. Actin was used as a loading control. (c) Western blot analyses of E2F1, SC35, SRp20 and SF2 protein expression in E2F1-deficient (E2F1<sup>-/-</sup>) and wild-type control Murine Embryonic Fibroblasts (MEFs). Actin was used as a loading control



**Figure 2** SC35 is a direct transcriptional target of E2F1. (a) RT-PCR analysis of *sc35* mRNA. H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1 (E132) cells were incubated for 48 or 72 h in the presence (+) or absence (-) of 1  $\mu$ g/ml doxycyclin (Dox) as indicated. Total RNAs were extracted as described in the Material and Methods section. Amplified *g3pdh* was used as an internal control. (b) Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) experiments were performed in the H1299 cell line co-transfected for 48 h with 1  $\mu$ g pR264CAT plasmid, encoding CAT under the control of the *sc35* promoter, and increasing amounts of pCMV-E2F1 as indicated. The CAT activity obtained in cells transfected with pR264CAT alone was normalized to 1 and a relative CAT activity was then calculated for each condition. Representative data of at least three independent experiments performed in duplicate are shown. (c) Upper panel: H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin for 48 h were processed for ChIP analysis using C-20 antibody for E2F1. The coprecipitated chromatin DNA was analyzed by semiquantitative PCR using pair of primers that amplify the human *sc35*, *skp2* or *Gapdh* promoter respectively, as described in the Material and Methods section. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. Input lane corresponds to PCRs containing 1% of total amount of chromatin used in immunoprecipitation reactions. As compared to input amount, 0.13 and 0.3% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* and *skp2* promoters respectively. Lower panel: Similar ChIP analyses were performed in H1299 cells to detect the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter. The input control corresponds to 0.7% of the amount of chromatin used per immunoprecipitation. As compared to input amount, 0.035% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody

To confirm these data *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in the H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of doxycyclin (Figure 2c, upper panel). As a positive control of ChIP assays, we used the proximal human *Skp2* promoter that was recently reported as a target of E2F1.<sup>13</sup> In our conditions, binding of E2F1 to the proximal *Skp2* gene promoter was clearly detected whereas no binding was observed with the *Gapdh* promoter (Figure 2c, upper panel). Importantly, the *sc35* promoter fragment (-296/-79) that encompasses two putative E2F1-binding sites was precipitated by an anti-E2F1 antibody (Figure 2c, upper panel). To confirm that SC35 was a direct target of E2F1, endogenous E2F1 was immunoprecipitated from H1299 cells and ChIP experiments were performed. As shown (Figure 2c, lower panel),



**Figure 3** SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. H358 Tet-On/E2F1 cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of doxycyclin for 72 h. (a) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h either with *mismatch* or *sc35* siRNA. Apoptosis was evaluated using Hoechst staining. Results shown are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. (b) H358 Tet-On/E2F1 cells were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and subjected to RT-PCR (left panel) and western blot (right panel) analyses. (c) H358/Tet-On/E2F1 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA, cultured with (+) or without (-) doxycyclin as indicated, and treated or not with 25 ng/ml FasL for 20 additional hours. Apoptosis was evaluated as in (a)

endogenous E2F1 clearly bound to the *sc35* promoter in these cells. Taken together, these results identify *sc35* as a direct transcriptional target of E2F1.

**E2F1 promotes SC35-dependent apoptosis through modulation of FLIP<sub>long</sub>/FLIP<sub>short</sub> ratio.** As we previously demonstrated the ability of E2F1 to induce apoptosis through downregulation of the c-FLIP<sub>short</sub> protein isoform,<sup>11</sup> we next analyzed whether SC35 has a function in this setting. By the use of *sc35* siRNAs and Hoechst staining, we first observed that neutralization of SC35 strongly reduced the number of apoptotic cells in response to E2F1 (Figure 3a). Therefore, these results indicated that SC35 is required for E2F1-induced apoptosis. Importantly, RT-PCR (Figure 3b, left panel) and immunoblot analyses (Figure 3b, right panel) revealed that downregulation of both *flip<sub>short</sub>* mRNA and protein levels were also prevented in these conditions. A high level of both c-FLIP protein isoforms has been found in many

tumor cells and was correlated with resistance to FAS- and TRAIL-induced apoptosis, two death receptor ligands.<sup>14</sup> Consistently, we previously reported that the down-regulation of c-FLIP<sub>Short</sub> by E2F1 was sufficient to restore the sensitivity of tumor cells to these ligands.<sup>11</sup> In this study, we showed that neutralization of *sc35* expression overrode the ability of E2F1 to sensitize H358 cells to FasL (Figure 3c) as well as to TRAIL (data not shown) treatments. Collectively, our data demonstrate that E2F1 induces apoptosis through SC35-dependent modulation of the FLIP<sub>Long</sub>/FLIP<sub>Short</sub> ratio, at the expense of the FLIP<sub>Short</sub> protein isoform.

**E2F1 and SC35 co-regulate the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants.** As the expression of numerous apoptotic genes is regulated by pre-mRNA alternative splicing,<sup>5</sup> we undertook a series of experiments to test whether E2F1 and SC35 can also affect the ratio of other apoptotic splice variants. Various *caspases* are subjected to alternative splicing. Alternative splicing of *casp-2* proceeds through selective insertion or removal of exon 9 giving rise to anti-apoptotic caspase-2S and pro-apoptotic caspase-2L isoforms respectively.<sup>7</sup> The use of a distant splice donor site at the 3'-end of exon 8 of human *caspase-8* pre-mRNA leads to the synthesis of an alternative splice variant, *caspase-8L*, a competitive inhibitor of caspase-8.<sup>15–16</sup> The inclusion or exclusion of an exon cassette in *caspase-9* causes the expression of two splice variants, namely the pro-apoptotic *caspase-9a* and anti-apoptotic *caspase-9b*.<sup>17–18</sup> To assess whether E2F1 induces changes in the alternative splicing profile of these *caspases* pre-mRNAs, RNAs recovered from non-induced or induced H358/Tet-On/E2F1 cells were analyzed by RT-PCR using primers specific for each caspase splice variant (Figure 4a). The results showed that E2F1 increased the expression of pro-apoptotic *caspases-2L*, *-8a* and *-9a* mRNA levels and decreased those of anti-apoptotic *caspases-8L* and *-9b* (Figure 4b). In contrast, these effects were not observed with mutant E2F1(E132). Interestingly, we were unable to detect the *caspase-2S* transcript in our cells. Altogether, these data indicate that E2F1 can switch the splicing pattern of *caspases-8* and *-9* in favor of pro-apoptotic isoforms. Therefore, besides its ability to transactivate *caspases-8* and *-9* genes,<sup>19</sup> E2F1 also controls their alternative splicing.

*Bcl-x* is a member of the *bcl-2* gene family that also has a key function in apoptosis. Several splice isoforms of *Bcl-x* have been reported. The use of a 5' proximal site generates the Bcl-x<sub>L</sub> long isoform, which protects cells against apoptosis. In contrast, the use of a 5' distal site results in the synthesis of a short pro-apoptotic Bcl-x<sub>S</sub> isoform.<sup>20</sup> To analyze whether E2F1 regulates the splicing pattern of Bcl-x, we performed RT-PCR analysis with specific primers in H358/Tet-On/E2F1 cells (Figure 4a). The results showed that expression of E2F1 induced a concomitant decrease of Bcl-x<sub>L</sub> and increase of Bcl-x<sub>S</sub> mRNA levels (Figure 4c, upper panel). As was observed for *caspase* regulation, the mutant E2F1(E132) had no effect on *bcl-x* splicing. Western blotting with Bcl-x antibodies specific for each isoform confirmed the RT-PCR results (Figure 4c, lower panel). Therefore, these

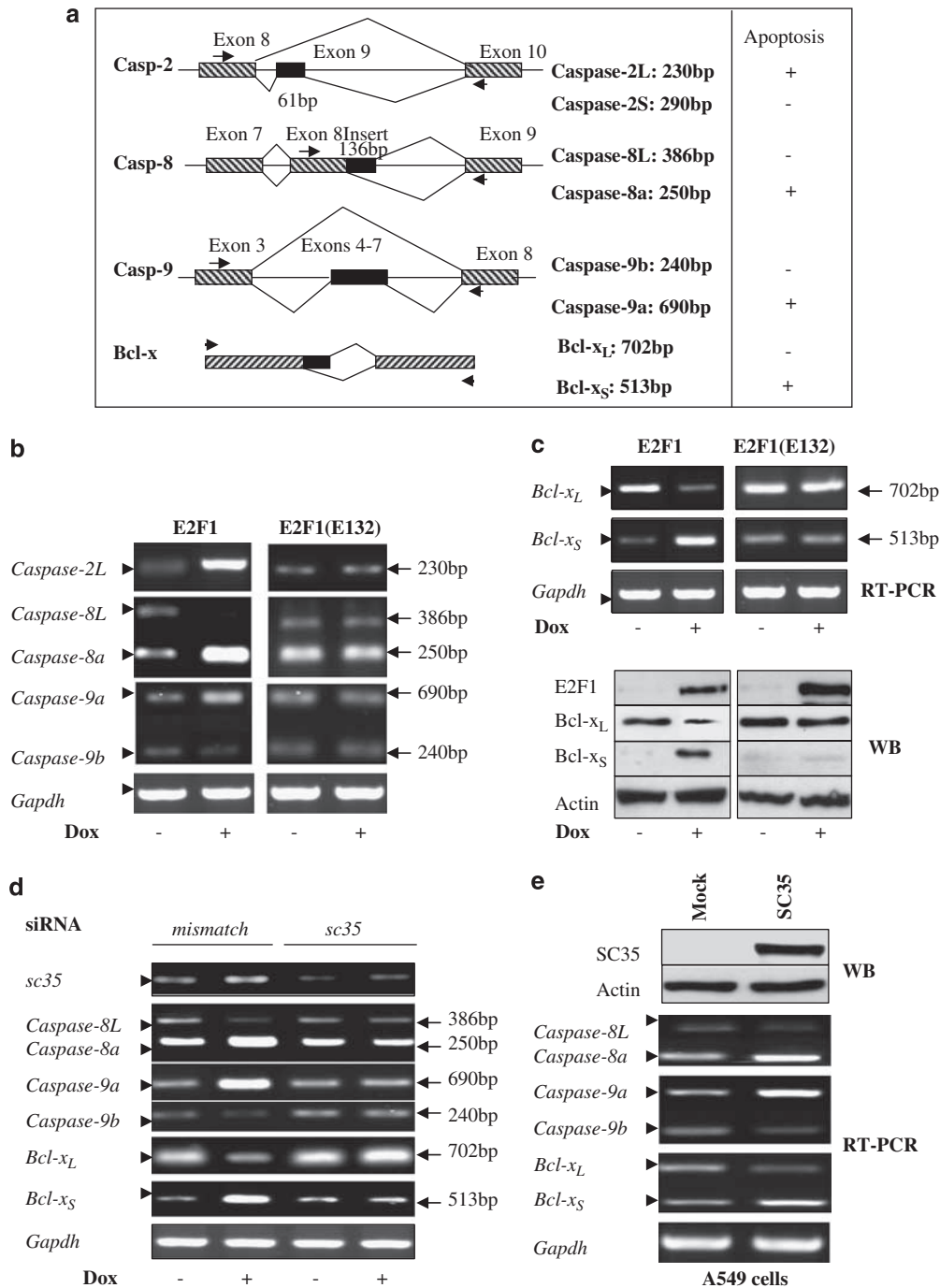
data demonstrate that E2F1 also controls the alternative splicing of Bcl-x.

Finally, we investigated whether SC35 was involved in these effects. siRNAs targeting *sc35* were transfected in H358/Tet-On/E2F1 cells, and expression of *caspases* and *Bcl-x* splice variants was analyzed by RT-PCR. In the absence of E2F1 induction, the knockdown of *sc35* using two independent siRNAs (Figure 4d and Supplementary Figure 1) did not significantly alter the level of *caspases-8L*, *-8a*, *-9a* or *-9b* mRNAs, nor that of Bcl-x<sub>L</sub> or Bcl-x<sub>S</sub>. Importantly, the induction of E2F1 expression in these cells deprived of SC35 did not affect the splicing pattern of these genes (Figure 4d and Supplementary Figure 1). Furthermore, when we performed RT-PCR analyses in A549 cells transiently transfected with a vector encoding SC35, we found that overexpression of SC35 affected the splicing profile of *caspase-8*, *-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs in a similar way than did E2F1 (compare Figure 4e to b and c) and induced apoptosis (data not shown). Altogether, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to regulate the pre-mRNA alternative splicing of apoptotic genes.

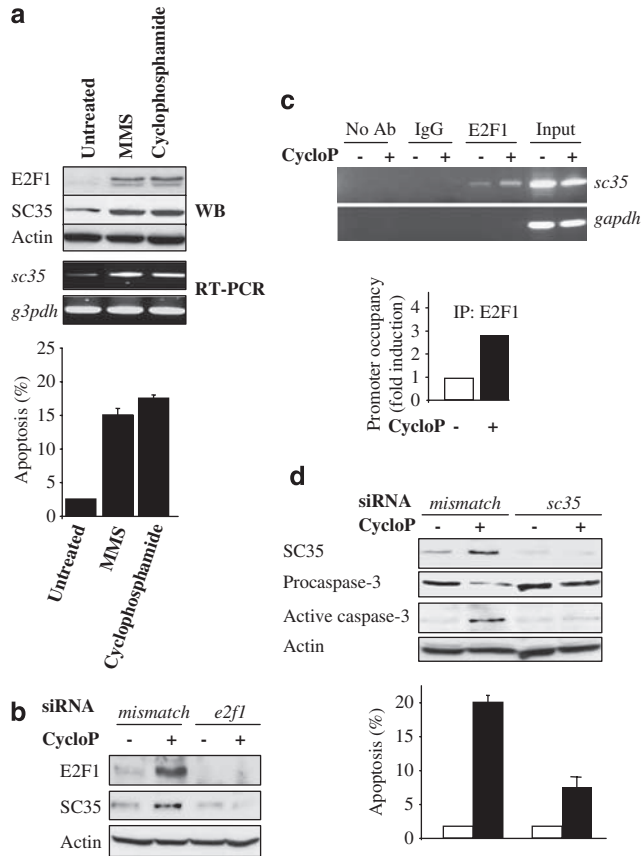
**E2F1 and SC35 proteins are upregulated and required for apoptosis in response to genotoxic stresses.** So far, our results demonstrate the ability of overexpressed E2F1 and SC35 to modify the splicing pattern of various apoptotic genes. Thus, we next attempted to identify in which physiological context both proteins could cooperate to induce apoptosis. It is now well-known that DNA-damaging agents stabilize E2F1 and induce its transcriptional activity towards apoptotic genes thereby causing apoptosis.<sup>21–22</sup> In agreement with previous reports, treatment of H358 cells with either methylmethanesulfonate or cyclophosphamide, two alkylating agents that create inter-strand DNA cross-links, significantly increased E2F1 expression as detected by immunoblotting (Figure 5a, upper panel). In these conditions, upregulation of E2F1 was accompanied by an increase of SC35 protein and mRNA expression (Figure 5a, upper panels), as well as by the induction of apoptosis (Figure 5a, lower panel). In cyclophosphamide-treated cells, the neutralization of E2F1 using siRNAs prevented the accumulation of SC35 (Figure 5b), indicating that E2F1 was involved in SC35 induction. In addition, as detected by ChIP experiments, the binding of endogenous E2F1 to the *sc35* promoter was increased following drug treatment, indicating that SC35 is a direct target of E2F1 in response to DNA-damaging agents (Figure 5c). Furthermore, inhibiting SC35 expression strongly repressed apoptosis following cyclophosphamide treatment, as detected by immunoblotting of pro- or cleaved caspase-3 and Hoechst 33342 staining (Figure 5d). Taken together, these results demonstrate that E2F1 requires SC35 to induce apoptosis in response to genotoxic stresses.

Finally, we analyzed whether E2F1 and SC35 acted through regulation of the alternative splicing of apoptotic genes and studied the expression pattern of *caspases-2*, *-8* and *-9* as well as *Bcl-x* splice variants by RT-PCR following cyclophosphamide treatment. As shown in Figure 6a (left panel), an increase of pro-apoptotic *caspase-9a* and Bcl-x<sub>S</sub> mRNA levels was observed in cyclophosphamide-treated



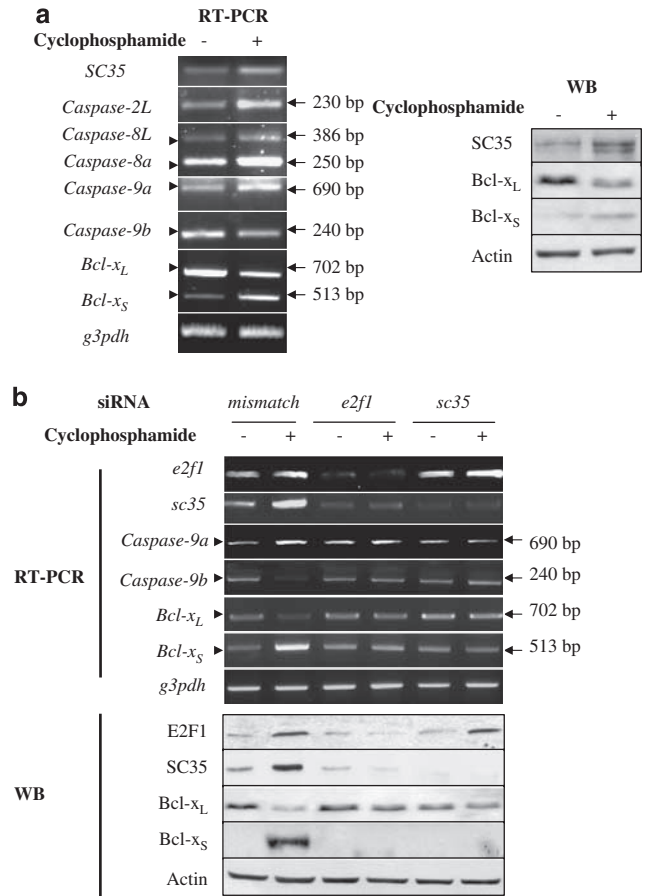


**Figure 4** E2F1 and SC35 cooperate to affect the alternative splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9* and *Bcl-x* pre-mRNAs. (a) Alternative splicing patterns of *caspases-2*, *-8*, *-9* and *Bcl-x* primary transcripts. Coding and alternative exons are indicated by ▨ and ■, respectively. The position of primers, the expected sizes (in nucleotides) and the names of the RT-PCR products corresponding to the different mRNA isoforms are indicated. The ability of each transcript to encode pro-apoptotic (+) or anti-apoptotic (-) protein isoform is depicted on the right. (b, c) H358/Tet-On/E2F1 or H358/Tet-On/E2F1(E132) cells were cultured for 48 h in the presence (+) or absence (-) of doxycyclin, as indicated. Total RNAs were extracted and subjected to RT-PCR analyses using the specific primers depicted in (a). Representative agarose gels of RT-PCR products corresponding to *casp-2*, *casp-8*, *casp-9* and *Bcl-x* splice variants are presented. The position of splice variants (in bp) is shown on the right, and the various splicing isoforms are named on the left of each panel. *g3pdh* was used as an internal control. (c) Lower panel: western blot analysis was performed using specific anti-E2F1, anti-Bcl-x<sub>L</sub> and anti-Bcl-x<sub>S</sub> antibodies. Actin was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments. (d) H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence (+) or absence (-) of 1 μg/ml doxycyclin were transfected for 72 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and processed as in (b). (e) A549 human lung adenocarcinoma cells were transiently transfected for 48 h with 10 μg pcDNA3.1/SC35 or control (Mock) vector and processed as in (b). Upper panel: immunoblot demonstrating the accumulation of SC35 in cells transfected with pcDNA3.1/SC35 as compared with mock transfected cells. Actin was used as a loading control



**Figure 5** E2F1 and SC35 proteins are upregulated in cells undergoing apoptosis in response to DNA damaging agents. **(a)** H358 cells were treated or not for 24 h with the indicated cytotoxic agents (50  $\mu$ M, each) and analyzed for E2F1 and SC35 protein levels by western blotting (upper panel). *sc35* mRNA level was studied by RT-PCR in the same conditions (lower panel). Actin and *g3pdh* were used as internal controls for immunoblotting and RT-PCR experiments, respectively. Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining. Results shown are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* siRNA and treated (+) or not (-) for additional 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Western blot analyses were performed for E2F1 and SC35 detection. **(c)** Upper panel: H358 cells were treated or not for 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M) and ChIP analyses were performed using C-20 antibody for E2F1 and primers specific for the human *sc35* or *Gapdh* promoter respectively. IgG was used as an irrelevant antibody. No Ab means that no antibody was used in this case. The input reaction represents 0.5% of the total chromatin immunoprecipitated for each sample. As compared with input amount, 0.04 and 0.12% of chromatin was immunoprecipitated by E2F1 antibody at the *sc35* promoter level in untreated and treated cells respectively. Lower panel: Bands obtained with E2F1 ChIP DNA samples were quantified and normalized relative to the corresponding input DNA sample. *Sc35* promoter occupancy in non-treated cells was arbitrarily set at 1. **(d)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 staining and immunoblotting with anti-caspase-3 or cleaved caspase-3 antibody. Results are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments

cells together with a decrease of anti-apoptotic *caspase-9b* and *Bcl-x<sub>L</sub>* splice variants. Again, immunoblotting experiments confirmed the downregulation and upregulation of *Bcl-x<sub>L</sub>* and *Bcl-x<sub>S</sub>* proteins, respectively (Figure 6a, right panel). In contrast, accumulation of *caspase-2L* and of both anti- and pro-apoptotic *caspase-8L* and *-8a* transcripts was detected in cyclophosphamide-treated cells (Figure 6a, left



**Figure 6** E2F1 and SC35 regulate the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in response to cyclophosphamide treatment. **(a)** H358 cells were treated (+) or not (-) for 24 h with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). Left panel: RT-PCR analysis for detection of *caspases -2, -8, -9* and *Bcl-x* splice variants were performed as described earlier in Figure 4b and c. Right panel: western blot analysis was performed using specific anti-SC35, anti-*Bcl-x<sub>L</sub>* and anti-*Bcl-x<sub>S</sub>* antibodies. Actin was used as a loading control. **(b)** H358 cells were transfected for 48 h with either *mismatch* or *e2f1* or *sc35* siRNA and treated (+) or not (-) for 24 additional hours with cyclophosphamide (50  $\mu$ M). RT-PCR (upper panel) and western blot (lower panel) analyses of *Bcl-x* or *caspase-9* splice variants were performed as previously described. *g3pdh* and actin were used as internal controls for RT-PCR and immunoblotting experiments, respectively

panel). Therefore, these results demonstrate that cyclophosphamide modifies the alternative splicing pattern of *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs in favor of pro-apoptotic splice variants. Importantly, the neutralization of either *e2f1* or *sc35* before cyclophosphamide cell treatment prevented these modifications, as detected by RT-PCR (Figure 6b, upper panel) and western blotting (Figure 6b, lower panel). Overall, these data strongly suggest that E2F1 and SC35 proteins act together during apoptosis of DNA-damaged cells by controlling *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing.

## Discussion

E2F1 is a transcription factor that has a critical function in cell cycle progression by favoring entry into S phase. Besides its

function in cell cycle control, E2F1 is also widely accepted as an inducer of apoptosis. It has been well-demonstrated that E2F1 promotes apoptosis through both transcription-dependent and -independent mechanisms. So far, numerous apoptotic genes whose transcription is enhanced by E2F1 have been identified.<sup>10</sup> In this study, we show that E2F1 switches the alternative splicing pattern of key apoptotic genes in favor of their pro-apoptotic splice variants, and identify the SC35 protein, a member of the SR family of splicing regulators, as a key direct target of E2F1. Interestingly, two high throughput studies using ChIP on Chip analysis<sup>23</sup> or DNA microarrays<sup>24</sup> previously suggested that SC35 is an E2F1-regulated gene. In this study, we provide the first evidence of a direct functional link between E2F1 and SC35 proteins to regulate cellular apoptosis. Therefore, besides its ability to transactivate pro-apoptotic target genes, E2F1 is also able to control pre-mRNA processing events to induce apoptosis.

It has now emerged from the literature that splicing not only depends on the interaction of splicing factors with their target pre-mRNAs, but is also coupled to transcription.<sup>25</sup> Indeed, variations of pol II promoter structure can lead to differences in alternative splicing of the transcript<sup>26–27</sup> and components of the spliceosome such as the p54nrb (p54 nuclear RNA-binding protein) and PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) RNA-binding proteins are involved in both transcription and splicing processes.<sup>28</sup> (for review). In addition, transcriptional coregulators of the nuclear receptor family recruited at the promoter level not only enhances the transcriptional activity of this promoter, but also affects the nature of the splice variants produced.<sup>28–30</sup> Moreover, some transcription factors have been reported to bind to proteins of the spliceosome and/or display dual functions in splicing and transcription.<sup>31–32</sup> Taken together, these results indicate a function for proteins controlling transcription in splicing regulation. In this study, we demonstrate that the transcription factor E2F1 transactivates the expression of *sc35*, a component of the spliceosome and that both proteins regulate pre-mRNA processing events. Altogether, these results strengthen the connection between the transcriptional and splicing machineries. We show that E2F1 alters the splicing pattern of some of its transcriptional targets such as *c-flip* (Figure 3b), *caspases-8* and *-9* (Figures 4b and d). As an increased level of *caspases-8* and *-9* transcripts was also detected in this context, it is possible that the transactivating functions of E2F1 cooperate with SC35 accumulation to regulate pre-mRNA processing events. Interestingly, the expression of *c-flip* mRNA was apparently not affected by E2F1 in the same conditions (Figure 3a). It was recently shown that the Spi-1/PU.1 transcription factor could modify alternative splicing of a transcriptional target gene, without modulation of its mRNA transcription.<sup>32</sup> Therefore, another but not exclusive possibility is that E2F1 acts as a scaffold protein to drive SC35 to the nascent transcribed RNA of some of its target genes, according to the cell-specific promoter occupation model.<sup>25</sup>

Apoptosis is one of the cellular processes in which alternative splicing has important regulatory functions.<sup>5</sup> Several components of the splicing machinery have already been implicated in apoptotic processes. For example, deple-

tion of SF2/ASF<sup>8</sup> induces apoptosis. In addition, overexpression of SC35 alters the splicing of *caspase-2* mRNA, in favor of the pro-apoptotic isoform accumulation.<sup>7</sup> Furthermore, phosphorylation of SR proteins, which is known to control their sub-cellular localization as well as their activities, has been reported during apoptosis.<sup>6–33</sup> However, the upstream signaling molecules that regulate the expression and/or activity of SR proteins during apoptosis, as well as the endogenous targets of SR proteins in this context remain largely unknown. In this study, we provide evidence that E2F1 triggers apoptosis through SC35 accumulation and we demonstrate that both proteins cooperate to affect the splicing pattern of *caspase-8*, *caspase-9*, *flip* and *bcl-x* genes, in favor of pro-apoptotic splice variants. Taken together, our data identify SC35 as a new mediator of E2F1-induced apoptosis and identify some of its endogenous targets in this setting.

Alteration of alternative splicing is believed to contribute to the resistance of tumor cells to chemotherapy, notably through overexpression of anti-apoptotic splice variants.<sup>34,35</sup> However, the molecular mechanisms involved in such processes remain largely unknown. Importantly, and consistent with a function of SR proteins during the response to DNA damage, it has been previously shown that SC35 accumulates following  $\gamma$ -irradiation.<sup>36</sup> In addition, it was recently reported that the expression of SRp55, another member of the SR protein family, is upregulated and required for apoptosis of p53-deficient cells after mitomycin C treatment.<sup>37</sup> In this study, we demonstrate that SC35 is upregulated by an E2F1-dependent pathway in response to methylmethanesulfonate or cyclophosphamide treatment. Furthermore, we show that the E2F1 and SC35 proteins are required for apoptosis of DNA-damaged cells and control *Bcl-x* and *caspase-9* pre-mRNAs alternative splicing at the expense of anti-apoptotic splice variants. Therefore, our data strongly suggest that E2F1 and SC35 are key determinants of the cellular response to chemotherapeutic agents.

To conclude, we highlight the first functional connection between the transcription factor E2F1 and a component of the splicing machinery, SC35, in the control of cellular apoptosis. It is well-known that abnormalities in E2F-signaling pathways contribute to tumorigenesis.<sup>38</sup> Accordingly, we previously described a differential pattern of E2F1 protein expression in human lung tumors.<sup>39</sup> Interestingly, some SR proteins are overexpressed in ovarian cancer<sup>40</sup> and SF2/ASF was recently assessed as a proto-oncogene in human tumors.<sup>41</sup> Therefore, it remains to be determined whether alterations of both E2F1 and SC35 proteins could cooperate to promote carcinogenesis.

## Materials and Methods

**Cell lines, treatment, apoptotic assay, plasmids and transfection.** A549, H358, H1299 and H69 human lung carcinoma cell lines were cultured as described earlier.<sup>42</sup> The H810 large cell neuroendocrine lung carcinoma cell line was cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 5% (v/v) FCS, 0.005 mg/ml insulin, 0.01 mg/ml transferrin, 30 nM sodium selenite, 10 nM hydrocortisone, 10 nM  $\beta$ -estradiol and 10 mM HEPES. MEFs wild-type and E2F1<sup>-/-</sup> were cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS. The human lung adenocarcinoma H358/Tet-On/E2F1 and Tet-On/E2F1 (E132) inducible clones were obtained as previously described.<sup>11</sup> Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic cells on 500 cells after Hoechst 33342 staining. Transient transfections were carried out using Fugene 6

**Table 1** Sequences of forward and reverse primers as well as PCR conditions used in this study

Primer sequences	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
sc35	CCACTCAGAGCTATGAGCTACG 94 °C for 30 s; 57 °C for 45 s; 72 °C for 1 min; 30 cycles	ACTCCTTGGTGTAGCGATCC
FLIP <sub>short</sub>	CGAGGCAAGATAAGCAAGGA 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	CACATGGAACAATTTCCAAGAA
FLIP <sub>long</sub>	CTTGGCCAATTTGCCTGTAT 94 °C for 30 s; 58 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGCAGAACTCTGCTGTTCC
Caspase-2	TTACCTGCACACCGAGTCAC 94 °C for 30 s; 64 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 28 cycles	TGGTTCCTTCCATCTTGTGGTC
Caspase-8	GGGATACTGTCTGATCATCAAC 94 °C for 30 s; 55 °C for 30 s; 72 °C for 1 min; 32 cycles	GGAGAGGATACAGCAGATGAA
Caspase-9	AGACCAGTGGACATTGGTTC 94 °C for 30 s; 59 °C for 1 min; 72 °C for 2 min; 30 cycles	GGTCCCTCCAGGAAACAAA
Bcl-x	ATGTCTCAGAGCAACCGGA 94 °C for 1 min; 54 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	TCACTTCGACTGAAGAGTG
e2f1	TCTCCCCAGAACCGCTGTTT 94 °C for 30 s; 60 °C for 1 min; 72 °C for 1 min; 25 cycles	CGAAGTGGTAGTCGAGGGC

(Roche Diagnostic). Plasmids used in transient transfections were pcDNA3, pCMV-E2F1, pcDNA3-HA-SC35 and pR264-CAT. Recombinant soluble human FLAG-tagged FasL was purchased from Alexis (San Diego, CA, USA). Methanesulfonic acid methyl ester and cyclophosphamide monohydrate were all purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

**Antibodies.** The anti-E2F1 (C-20), anti-SC35 (H-55) and anti-Bcl-x<sub>L</sub> (H5) antibodies were purchased from Santa Cruz, the anti-Bcl-x<sub>S</sub> (Ab-1) from Oncogene Research, the anti-E2F1 (KH95) and anti-procaspase-3 from Pharmingen, the anti-FLIP (NF6) from Alexis, the anti-actin (20–33) from Sigma, the anti-SC35 (4F-11) from Euromedex and the anti-SRp20 (7B4) and anti-SF2/ASF from Zymed. Cleaved caspase-3 (Asp175) was from Cell Signaling.

**CAT assays.** For CAT assay measurements,  $2 \times 10^5$  cells per well were seeded in duplicate in 6-well plates, and transfected with the pR264CAT plasmid in the presence or absence of increasing amounts of pCMV-E2F1 vector. pR364CAT vector contains the 1 kb human sc35 promoter<sup>12</sup> and encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 (TTTGCCCG) and –236 (TTTCGCGG) bp upstream of the transcription start site. Transfection was performed using Fugene 6 according to the manufacturer's instructions, and CAT activity was measured 24–48 h after transfection using CAT ELISA (Roche Diagnostic). CAT activity was then normalized in each sample according to the protein amount.

**Chromatin immunoprecipitation experiments.** Chromatin immunoprecipitation experiments were performed in H358 cells, H1299 cells or H358/Tet-On/E2F1 cells cultured in the presence of 1 μg/ml doxycyclin for 24 h. An equal amount of chromatin (25 μg) was precleared and immunoprecipitated with a polyclonal antibody specific for E2F1 (C-20, Santa Cruz) or unrelated rabbit IgG or no antibody, overnight at +4 °C. Co-immunoprecipitated chromatin was analyzed for the presence of sc35 promoter DNA between –296 and –79 bp, upstream of the sc35 transcription start site, by semiquantitative PCR. This fragment encompasses two putative E2F1-binding sites at –170 and –236 bp upstream of the transcription start site. The primers used were as follow: forward 5'-GAGCACCTCTCTTCTCTCTG-3' and reverse 5'-CCGAAATGAAACCTTCTGA-3'. PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. For Skp2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter analysis, the specific primers used were SKP2-95 5'-CTCCCGCTACCCCGTGG-3', SKP2- +135 5'-CAGACCCGCTAAGCCTAGCAACG-3', GAPDH forward 5'-AGCTCAGGCTCAAGACCTT-3' and GAPDH reverse 5'-AAGAGATGCGGCTGACTGT-3' as previously described.<sup>13</sup> PCR conditions were 94 °C for 3 min, (94 °C 30 s, 57 °C for GAPDH or 63 °C for Skp2 30 s, 72 °C 30 s) for 36 cycles, and 72 °C for 10 min. Signals obtained on ethidium bromide-stained gels were quantified using ImageJ software and each ChIP DNA sample was normalized according to the corresponding input DNA sample.

**Transfection of siRNA oligonucleotides.** The sequences designed to specifically target human sc35 and e2f1 RNAs were as follows: sc35(1): 5'-GCG

UCUUCGAGAAGUACGGTT-3'; sc35(2): 5'-UCGUUCGCUUUCACGACAATT-3'; e2f1(1): 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCATT-3'; e2f1(2): 5'-ACAAGGCCCGAUCGAUGUUTT-3'. The second siRNA targeting sc35 was from Invitrogen (Stealth Select RNAi, SFRS2, Invitrogen). The scrambled siRNA oligonucleotides used as control for all RNA interference experiments were as follows: 5'-UCGGCUCUUA CGCAUUC AATT-3' and 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides duplex using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). Doxycyclin (1 μg/ml) was added or not in the culture medium 4 h after transfection. The cells were analyzed 48 or 72 h post-transfection. For experiments with cyclophosphamide, cells were transfected for 48 h with *mismatch*, *sc35* or *e2f1* siRNAs, then cyclophosphamide (50 μM) was added in the culture medium for 24 additional hours.

**RT-PCR analyses of alternative splice transcripts.** Total cellular RNAs were isolated using Trizol reagent (Invitrogen). In all conditions, 1 μg of total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primer and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The different primer sequences used in this study as well as the PCR conditions are recapitulated in Table 1. Amplification of a cDNA fragment of G3PDH (Invitrogen) was performed in the same PCR as an internal control. PCR products were run on a 1–2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

**Immunoblotting and immunoprecipitation experiments.** Immunoblotting experiments were performed as described earlier.<sup>11</sup>

**Acknowledgements.** We thank Patricia Betton, Pascal Perron and Celine Lampreia for technical assistance. We thank Johann Soret (IGM, Montpellier) for the pECE-SC35HA and Alain Sureau (CGM, Gif sur Yvette) for pR264-CAT plasmids. We thank Didier Aubeouf, Martin Dutertre, Saadi Khochbin, Johann Soret and Jamal Tazi for encouraging discussions and critical reading of this paper. We thank Mary Callanan (INSERM U823) for help with editing. This work was supported by grants from the region Rhône Alpes (Thématique Prioritaire Cancer and Canceropole 2003: Oncocell, Epimed and INACancer), by the Ligue contre le Cancer (Comité de Savoie), by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée), by INCA (PNES, Programme National d'Excellence Spécialisé 2005) and by the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Arnaud van den Broeck was supported by a fellowship from the French Research Ministry. Galina Merdzhanova was supported by fellowships from the French Research Ministry and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Valerie Edmond was supported by a grant from the Conseil Scientifique National d'AGIR à dom. Sandrine De Seranno was supported by a grant from INCA.

- Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 381–388.
- Sanford JR, Ellis J, Caceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 443–446.

3. Spector DL, Fu XD, Maniatis T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 1991; **10**: 3467–3481.
4. Sanford JR, Longman D, Caceres JF. Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; **31**: 33–58.
5. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; **19**: 1–13.
6. Utz PJ, Hottel M, van Venrooij WJ, Anderson P. Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. *J Exp Med* 1998; **187**: 547–560.
7. Jiang ZH, Zhang WJ, Rao Y, Wu JY. Regulation of lch-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9155–9160.
8. Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005; **19**: 2705–2714.
9. Wang J, Takagaki Y, Manley JL. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev* 1996; **10**: 2588–2599.
10. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 739–748.
11. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006; **13**: 260–272.
12. Sureau A, Soret J, Vellard M, Crochet J, Perbal B. The PR264/c-myc connection: expression of a splicing factor modulated by a nuclear protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **89**: 11683–11687.
13. Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 4149–4156.
14. Tschopp J, Irmiler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 552–558.
15. Eckhart L, Henry M, Santos-Beneit AM, Schmitz I, Krueger A, Fischer H et al. Alternative splicing of caspase-8 mRNA during differentiation of human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 777–781.
16. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 2002; **99**: 4070–4078.
17. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B et al. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12587–12595.
18. Massiello A, Chalfant CE. SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res* 2006; **47**: 892–897.
19. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M et al. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 859–864.
20. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA et al. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597–608.
21. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 401–409.
22. Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1025–1031.
23. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 2002; **16**: 245–256.
24. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 267–285.
25. Kornbliht AR. Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 262–268.
26. Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornbliht AR. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11456–11460.
27. Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE et al. Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* 1999; **4**: 251–258.
28. Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW. A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5307–5316.
29. Auboeuf D, Dowhan DH, Kang YK, Larkin K, Lee JW, Berget SM et al. Differential recruitment of nuclear receptor coactivators may determine alternative RNA splice site choice in target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2270–2274.
30. Auboeuf D, Dowhan DH, Li X, Larkin K, Ko L, Berget SM et al. CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 442–453.
31. Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. Oncogenic TLS/ERG and EWS/Flt-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 2001; **61**: 3586–3590.
32. Guillouf C, Gallais I, Moreau-Gachelin F. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *J Biol Chem* 2006; **281**: 19145–19155.
33. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med* 2002; **196**: 1213–1225.
34. Mercatante D, Kole R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2000; **85**: 237–243.
35. Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2006; **66**: 3819–3827.
36. Cardoso RS, Espanhol AR, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parg enzyme. *Mutat Res* 2002; **508**: 33–40.
37. Filippov V, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res* 2007; **67**: 7621–7630.
38. Johnson DG, Degregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 731–738.
39. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001; **20**: 1678–1687.
40. Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; **11**: 1085–1090.
41. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 185–193.
42. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* 2007; **26**: 6927–6936.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

## **ASPECTS EPIGENETIQUES DES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES – IMPLICATION DE L’HISTONE ACÉTYLTRANSFERASE Tip60**

L'épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes qui ne s'accompagnent pas de changement de la séquence nucléotidique. Il est actuellement clairement établi que les modifications épigénétiques, telle que la méthylation de l'ADN, contribuent au développement des cancers.

La protéine Tip60 est un co-régulateur transcriptionnel possédant une activité histone acétyltransférase (HAT). Tip60 est aussi un élément clé de la réponse aux dommages de l'ADN et joue un rôle critique dans le contrôle de la stabilité du génome via sa capacité à acétyler les protéines. Nous avons récemment identifié Tip60 comme un élément clé de l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN induits par les carcinogènes du tabac, et avons émis l'hypothèse qu'une modification du profil d'acétylation des protéines histones et/ou non-histones pourrait constituer une nouvelle « signature épigénétique » de ces cancers.

Nous mettons en évidence pour la première fois dans les cancers du poumon une altération globale du « paysage épigénétique » de l'histone H4, cible majeure de Tip60, et montrons que certaines de ces modifications épigénétiques (H4K20me3) pourraient être des biomarqueurs candidats pour le dépistage précoce et la définition de protocoles thérapeutiques de ces cancers. Nous identifions par ailleurs Tip60 comme un nouveau régulateur de l'expression et des fonctions biologiques du facteur de transcription E2F1, et montrons que ces deux protéines jouent un rôle coordonné dans la réponse aux dommages de l'ADN induits par le cisplatine, en intervenant dans les voies de réparation de ces dommages. Nous montrons enfin la fréquente perte d'expression de la protéine Tip60 dans les cancers bronchiques, suggérant que cette protéine pourrait constituer un biomarqueur candidat de la réponse au traitement par les sels de platine.

**Mots clés :** Cancer du poumon, épigénétique, histone, Tip60, E2F1, dommage de l'ADN.

## **EPIGENETIC ASPECTS OF LUNG CANCER – INVOLVEMENT OF THE Tip60 HISTONE ACETYLTRANSFERASE**

Epigenetic defines reversible and inheritable modifications of gene expression without change in nucleotide sequence. It is now well-known that epigenetic modifications such as DNA methylation contribute to the development of cancer.

Tip60 protein is a transcriptional co-regulator which possesses an histone acetyltransferase (HAT) activity. Tip60 is also a key component of the DNA damage response (DDR) and plays a crucial role in the control of genome stability through its ability to acetylate proteins. We have previously shown that Tip60 is a key component of DDR pathways activation induced by tobacco carcinogens and have hypothesized that a modification of histone and/or non histone proteins acetylation pattern could constitute a new epigenetic hallmark of lung cancer.

We have shown for the first time in lung cancer a global alteration of the “epigenetic landscape” of histone H4, which is the main Tip60 target. Our results show that some epigenetic modifications (H4K20me3) might be candidate biomarkers for early detection and therapeutic approaches of lung cancer. Furthermore, we identify Tip60 as a new regulator of expression and biological properties of the E2F1 transcription factor. We also demonstrate that both proteins play a coordinated role in the DDR induced by cisplatine, by working on DNA repair pathways. Finally, we observe the frequent loss of Tip60 protein expression in these cancers, suggesting that Tip60 might be a candidate biomarker for the response to treatment with platinum based chemotherapies.

**Key words:** Lung cancer, epigenetic, histone, Tip60, E2F1, DNA damage.