



HAL
open science

Dérégulations épigénétiques induites par la protéine fusion BRD4-NUT et caractérisation de la protéine NUT au cours de la spermatogenèse et dans les cancers

Nicolas Reynoird

► **To cite this version:**

Nicolas Reynoird. Dérégulations épigénétiques induites par la protéine fusion BRD4-NUT et caractérisation de la protéine NUT au cours de la spermatogenèse et dans les cancers. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00534655

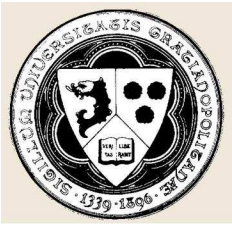
HAL Id: tel-00534655

<https://theses.hal.science/tel-00534655>

Submitted on 10 Nov 2010

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.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité Biologie Cellulaire

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

NICOLAS REYNOIRD

Le 2 Novembre 2010

**DEREGULATIONS EPIGENETIQUES INDUITES PAR LA
PROTEINE FUSION BRD4-NUT,
ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE NUT AU
COURS DE LA SPERMATOGENESE ET DANS LES
CANCERS**

Thèse dirigée par Dr. Saadi KHOCHBIN

COMPOSITION DU JURY :

Stefan NONCHEV

Didier TROUCHE

Pierre-Antoine DEFOSSEZ

Zdenko HERCEG

Saadi KHOCHBIN

Professeur à Grenoble

Docteur à Toulouse

Docteur à Paris

Docteur à Lyon

Docteur à Grenoble

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Thèse préparée au sein du laboratoire CRI Inserm/UJF U823, Institut Albert Bonniot,
dans l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

A ma famille,

A muriel.

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse, qui ont si gentiment accepté d'évaluer mes quatre années de travaux de doctorat. Merci donc aux Docteurs Pierre-Antoine Defossez et Didier Trouche pour leur regard critique de rapporteurs sur ces travaux. Je remercie également le Docteur Zdenko Herceg et le professeur Stefan Nonchev pour avoir accepté de juger mon doctorat et de participer à sa soutenance.

Je remercie bien évidemment le Docteur Saadi Khochbin pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ce fut un grand honneur de pouvoir travailler sous sa direction et apprendre la Science et le monde de la recherche à travers son expérience. Sa disponibilité et sa gentillesse à chaque instant m'ont permis de me rendre compte de la chance que j'ai eu de pouvoir travailler dans des conditions optimales de travail. Des discussions critiques, une diplomatie à toute épreuve et la liberté de travail sont la meilleure des formations. Merci Saadi.

Je remercie également la région Rhône-Alpes et la Fondation pour la Recherche Médicale pour leur soutien financier et la confiance qu'ils ont accordée à mes travaux. Le nerf de la guerre, même en Science.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe et de l'Institut qui n'ont pas rechigné à prendre de leur temps pour discuter et partager leurs expériences. Merci donc à Sophie, Karine, Cécile, Claire, André, Faycal et Olivier, entre beaucoup d'autres.

Merci aux personnes de l'Institut qui ont participé de près ou de loin à ce projet de thèse, ou qui m'ont tout simplement rendu service à un moment donné. Merci donc notamment à Sandrine pour sa gestion exemplaire des petites choses qui font survivre le labo, et à Aude pour sa patience envers mon ignorance rare face aux problèmes administratifs.

Il est impossible d'avancer seul, en Recherche comme ailleurs. Un grand merci donc à toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de cette période de ma vie. Vous rencontrer m'a permis de forger mon expérience et surpasser les petits tracés du quotidien, en plus d'agrandir

mon cercle d'amis. Merci donc aux « anciens » qui ont forgé mes débuts: Cyril (Savoie, main sur le coeur), Rico (geek et « in » à la fois), Charrette (et son chinois), Yannick (le frontalier), NJ (et ses mollets), Jérôme (le doubiste),... Keep in touch guys.

Merci à la nouvelle génération, plus forte que les beatniks, qui a su consolider les bases: Seb (the Dude), Johny (et son double), Faycal (Clooney), Sophie (CSBJ 4ever), Sevgi (saveyouroom), Aurelia (la censure), Leila (c'est bon les baklavas !), Edwige (et ses syncopes), Emeline (mortal kombat), Gaetan (ah, la saucisse de Toulouse...), Emilie (j'ai trouvé plus bordélique), the Aurore show, Néda (et toutes ses questions) et j'en oublie forcément. Les longues heures de boulot passent toujours plus vite en bonne compagnie.

Merci aux potos qui m'ont permis de sortir la tête de la science quand il le fallait, et de voir plus loin que le bout de mes cellules, que ce soit autour d'une bière ou en haut d'une montagne. San Francisco vous attend, n'hésitez pas.

Une petite pensée au chat de mes propriétaires, de par son support infailible, à venir squatter mes genoux lors de l'écriture de ce manuscrit.

Merci à ma famille, pour le soutien permanent et tout ce que vous m'avez apporté jusque là. Je mesure chaque jour la chance que j'ai de pouvoir compter sur vous quoi qu'il advienne. Vous vous en doutez, c'est réciproque.

Merci également à la belle-famille, pour son soutien et son aide pour la relecture indigeste de ce manuscrit.

Enfin, on garde toujours le meilleur pour la fin, comme on dit. Merci donc à toi Mu, pour ton amour, ta joie de vivre et celle que tu me procures. Tes passions, ton insatiable appétit d'aventure et ta force de caractère m'ont permis de découvrir de si belles choses, autant que de me découvrir moi-même. Tu m'as permis de m'investir dans mon travail et ton support m'a réconforté lorsque les résultats tardaient à venir. Merci pour ta patience et tes efforts après mes « trop » longues journées de travail, et plus que tout, merci de prolonger l'aventure à mes cotés jusqu'en Californie. Miaouh...

Sommaire

Sommaire	4
Résumé.....	10
Abstract.....	11
Abréviations.....	12
Liste des Figures	13
Introduction	14
I) Structure, dynamique et plasticité de la chromatine	15
IA) Définition et structure de la chromatine	15
IA1) Définition.....	15
IA2) Le nucléosome, unité de base de la chromatine.....	17
IA3) Les autres niveaux de structuration de la chromatine	21
IB) Dynamique et plasticité de la chromatine	24
IB1) Organisation structurale de la chromatine.....	24
IB2) Organisation spatiale de la chromatine.....	25
II) L'information épigénétique et ses acteurs	27
IIA) Présentation de l'épigénome	27
IIB) Les différentes informations épigénétiques et leurs acteurs.....	30
IIB1) La méthylation de l'ADN.....	30
IIB2) Les ARN non codants.....	36
IIB3) Les modifications des histones	38
IIB3a) Introduction	38
IIB3b) Phosphorylation.....	41
IIB3c) Méthylation.....	42
IIB3ci) Les histones méthyltransférases	42
IIB3cii) Les histones déméthylases	43
IIB3ciii) Conclusion méthylation	43
IIB3d) Acétylation.....	45

IIB3di) Les histones acétyltransférases	45
La famille GNAT	46
La famille MYST	47
La famille CBP/p300.....	48
IIB3dii) Les histones déacétylases	52
IIB3diii) Conclusion acétylation	54
IIB3e) Le code histone	59
IIB3f) Mobilisation des nucléosomes par les facteurs de remodelage	61
La famille SWI/SNF	62
La famille ISWI	62
La famille Mi2/NURD/CHD	63
IIB3g) Les variants d'histones.....	63
Les variants d'histones de liaison	63
Les variants d'histones de cœur.....	64
L'hypothèse du « code barre des histones »	66
IIC) Un exemple d'acteurs épigénétiques : la famille BET	67
IIC1) Introduction.....	67
IIC2) Association à la chromatine acétylée	67
IIC3) Un rôle vital pour la cellule.....	69
IIC4) Acteurs d'une mémoire épigénétique.....	70
IIC5) Régulateurs du cycle cellulaire	71
IIC6) Régulateurs majeurs de la transcription cellulaire	72
IIC7) Détournement par les Virus	74
IIC8) Un rôle dans la spermatogenèse ?	75
IIC9) Conclusion	76
IID) Un modèle d'étude de remaniements épigénétiques : la spermatogenèse.....	77
IID1) Introduction	77
IID2) Spermiogenèse.....	77
IID3) Information épigénétique lors de la spermiogenèse	79

III) Epigénétique et pathologies humaines	82
III A) Introduction	82
III B) Diverses pathologies à incidences épigénétiques	83
III B1) Epigénétique et vieillesse	84
III B2) Epigénétique et maladies développementales.	86
III B3) Epigénétique et maladies neurologiques	87
III B4) Epigénétique et virus.....	89
III C) Cancer et reprogrammation de l'épigénome.....	90
III C1) Introduction.....	90
III C2) Cancer et méthylation de l'ADN	91
III C3) Cancer et modifications d'histones	93
III C4) Cancer et miRNA.....	95
III C5) Cancer et transformation stable épigénétique	96
III C6) Cancer et remodelage de la chromatine	97
III C7) Le modèle des cellules souches cancéreuses.	98
III C8) Cancer et thérapie épigénétique.....	100
III C9) Cancer et facteurs testiculaires	103
III C9a) Rôle oncogène des facteurs testiculaires dans les cellules somatiques	104
III C9b) Les facteurs C/T, indicateurs des anomalies épigénétiques	106
III C9c) Les facteurs C/T, marqueurs de cancers et cibles de thérapies anticancéreuses	107
Résultats.....	110
Projet 1 : Conséquences de la protéine fusion BRD4-NUT dans les cancers.....	111
Présentation de l'article :	112
Supplementary Material and methods.....	125
Supplementary Figure Legends	128
Discussion et article en collaboration.....	135
Informations de l'article soumis à JCI	136
Figure	137
Projet 2 : Caractérisation de la protéine BRD3	138

I) Brd3 est exprimée au cours de la spermatogenèse.....	138
II) Production et validation d'un anticorps anti-BRD3	139
III) Spécificité d'association de BRD3 à la chromatine	140
Figures.....	142
Projet 3 : Conséquences de l'expression illégitime de NUT au sein de lignées cellulaires.....	145
I) Détection d'un doublet de protéines acétylées dans une lignée transformée de cellules musculaires lisses.....	145
II) Purification et identification du doublet acétylé.....	146
III) Confirmation de l'identification de la protéine NUT	147
IV) La localisation cytoplasmique de NUT est contrôlée par son acétylation, qui dépend elle-même de la prolifération des cellules.....	148
V) La protéine NUT possède un grand nombre de lysines acétylables.....	149
VI) La protéine NUT régule le cycle cellulaire des cellules A7R5	150
VII) NUT confère un avantage prolifératif dans différentes lignées humaines.....	151
Figures.....	153
Projet 4 : Rôle physiologique de NUT au cours de la spermatogenèse.....	162
I) NUT est une protéine spécifique des cellules germinales.....	162
II) NUT est exprimée au cours de stades tardifs de la spermatogenèse.....	162
III) NUT, acteur de la vague d'acétylation de la spermatogenèse ?	164
IV) NUT et ses partenaires	166
V) Génération d'une souris délétée pour NUT	167
Matériel et Méthode	168
Figures.....	170
Discussion	177
I) Remodelage épigénétique au cours de la spermatogenèse.....	178
IA) La spermatogenèse	178
IB) La spermiogenèse.....	180
IB1) Variants histones	180
IB2) Hyper acétylation et dialogue épigénétique	181

IB2a) Hétérochromatine péricentrique.....	183
IB2b) Régions soumises à l’empreinte	184
IB3) Fonctions de NUT au cours de la spermiogenèse.....	184
IB3a) NUT et la vague d’acétylation.....	184
IB3b) NUT et le remodelage de la chromatine.....	187
IB3c) Rôle cytoplasmique de NUT	189
II) Cancer et facteurs CT	190
IIA) Implication des gènes CT dans les cancers.....	190
IIB) La protéine NUT est un nouveau gène CT	194
IIC) NUT et CBP/p300.....	195
IID) NUT et autres partenaires.....	197
IIE) NUT et avantage cellulaire	198
III) Altérations épigénétiques et cancers NMC	201
IIIA) Cancer et méthylation de l’ADN.....	201
IIIB) Cancer et modifications post-traductionnelles des histones	202
IIIC) Epigénétique et progression tumorale.....	204
IIID) Dérégulation épigénétique de BRD4-NUT	205
IV) Conclusion	215
Annexes	216
Références Bibliographiques.....	235

Résumé

Il apparait de nos jours évident que les cancers ne peuvent se réduire uniquement à des aberrations génétiques, et qu'un nouveau paramètre est à prendre en considération, l'épigénétique.

Au cours de ma thèse je me suis efforcé de caractériser la protéine fusion BRD4-NUT. Cette protéine résulte d'une translocation t(15;19) observée dans les carcinomes de la ligne médiane (NMC), extrêmement agressifs et létaux. La protéine BRD4 possède un double bromodomaine capable de s'associer à la chromatine acétylée, et recrute divers facteurs sur la chromatine. NUT est une protéine de fonction inconnue exprimée exclusivement au cours de la spermatogenèse. J'ai pu démontrer que la protéine fusion BRD4-NUT était suffisante pour induire la tumorigenèse, par un mécanisme de séquestration de la protéine histone acétyltransférase (HAT) CBP/p300. NUT interagit avec CBP/p300 et suractive son activité d'acétylation, créant des foci hyperacétylés de chromatine. BRD4-NUT empêche ainsi CBP/p300 d'aller co-activer la transcription de nombreux gènes, et bloque notamment la réponse apoptotique p53-dépendante. Une inhibition de BRD4-NUT – par siRNA, mutation des bromodomains ou dérégulation de l'acétylation des foci par des inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) – réenclenche la voie d'apoptose et la mort de ces cellules tumorales. Cette étude est un exemple précis de l'impact qu'une dérégulation épigénétique peut avoir sur l'homéostasie cellulaire et son mécanisme d'induction de la tumorigenèse.

Je me suis également intéressé à caractériser la protéine NUT lors de son contexte physiologique, la spermatogenèse, ou lors de son expression illégitime dans des lignées tumorales sans fusion avec BRD4. La protéine NUT est exprimée au niveau des stades de maturation des cellules germinales spermatides, et pourrait participer au remodelage du génome et à l'établissement de l'épigénome final du spermatozoïde. Nut semble également conférer un avantage prolifératif lors de son expression anormale dans au moins trois lignées cellulaires, U2OS, A549 et A7R5.

Ainsi, la protéine NUT, seule ou fusionnée avec BRD4, est un facteur Cancer/Testiculaire capable d'influer négativement sur l'homéostasie des cellules somatiques dans lesquelles ses fonctions, normalement restreintes à la spermatogenèse, participent à la tumorigenèse.

Abstract

Nowadays, it is clear that cancer cannot be reduced only to genetic aberrations, and that a new parameter has to be considered, epigenetic.

During my thesis, I have characterized the fusion protein BRD4-NUT, which results of a t(15;19) translocation observed in NUT midline carcinoma (NMC), highly aggressive and lethal.

BRD4 contains a double bromodomain to interact with acetylated chromatin, thus recruiting different complexes on chromatin. NUT is a protein of unknown function, specifically expressed during spermatogenesis. I have observed that BRD4-NUT is sufficient to promote tumorigenesis, via a sequestering mechanism of the histone acetyltransferase (HAT) CBP/p300. NUT interacts with and stimulates CBP/p300 activity, creating highly acetylated foci in chromatin. BRD4-NUT inhibits CBP/p300 transcriptional co-activation, and among others, blocks p53-dependant apoptosis pathway. BRD4-NUT inhibition – by siRNA, bromodomain mutation or acetylation deregulation by histone deacetylase (HDAC) inhibitors – reactivates apoptosis of translocated cancer cells. This study is a precise example of epigenetic deregulation impacts on cell homeostasis and how it can promote tumorigenesis.

I have also characterized NUT protein on its physiological context (spermatogenesis), or during its illegitimate expression in cell lines without being fused with BRD4. NUT is expressed during late stages of spermatogenesis, in spermatids, and may participate to the chromatin remodeling occurring in these cells and to the formation of spermatozoa epigenome. NUT seems also to confer an advantage over proliferation when illegitimately expressed, as we have seen in three different cell lines, U2OS, A549 and A7R5.

Thus, NUT protein, alone or fused with BRD4, is a Cancer/Testis antigen capable of negatively regulating somatic cells homeostasis, in which NUT regular functions for spermatogenesis can lead to tumorigenesis.

Abréviations

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
A, T, G, C	Adénine, Thymine, Guanine, Cytosine
NLS	Séquence de Localisation Nucléaire
NES	Séquence d'Export Nucléaire
HAT	Histone AcétylTransférase
HDAC	Histone DéAcéTylase
KAT	Lysine-AcétylTransférase
HMT	Histone MéthylTransférase
KMT	Lysine-MéthylTransférase
RMT	Arginine-MéthylTransférase
HDM	Histone DéMéthylase
KDM	Lysine-DéMéthylase
DNMT	ADN MéthylTransférase
PHD	Plant-HoméoDomaine
NUT	protéine NUcléaire du Testicule
BET	Bromodomaine et domaine ET
BRD4	protéine BRomoDomaine 4
CBP/p300	protéine CREB-Binding/protéine de 300kD
ES	cellule Embryonnaire Souche
IPS	cellule Souche Pluripotente Induite
MEF	Fibroblaste Embryonnaire de souris
LOI	perte de l'empreinte parentale
C/T factor	facteur Cancer/Testiculaire

Liste des Figures

Partie Introduction

Figure A : Double hélice d'ADN	p16
Figure B : Paysage épigénétique	p18
Figure C : Structure de la chromatine	p19
Figure D : Structure du nucléosome	p20
Figure E : Conformation de la fibre de 30 nm	p23
Figure F : L'épigénome	p29
Figure G : Analyses de la méthylation de l'ADN	p37
Figure H : Modifications post-traductionnelles et domaines d'interaction	p40
Figure I : Nomenclature des KMTs	p55
Figure J : Nomenclature des KDMs	p56
Figure K : Nomenclature des KATs	p57
Figure L : Exemple de communication épigénétique	p61
Figure M : Famille BET	p68
Figure N : BRD4 et la transcription cellulaire	p74
Figure O : Spermiogenèse	p79

Partie Discussion

Figure A : La spermatogenèse chez l'homme	p179
Figure B : Similarités entre les cellules germinales et les cellules tumorales	p193
Figure C : Résumé des fonctions de NFI	p199
Figure D : Hypothèse de travail de l'expression illégitime de NUT dans les lignées	p200
Figure E : Modifications post-traductionnelles de p53 et H3	p205
Figure F : Conséquences de la translocation BRD4-NUT et perspectives thérapeutiques	p207

Introduction

I) Structure, dynamique et plasticité de la chromatine

IA) Définition et structure de la chromatine

IA1) Définition

La chromatine représente l'association entre la séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) et les protéines et acides ribonucléiques (ARNs) qui l'entourent et la structurent.

La chromatine fut nommée ainsi par Walther Flemming en 1882 en référence au terme grec *khroma* signifiant coloré, suite à la visualisation par microscopie d'une structure dense au sein du noyau. Il décrivit pour la première fois les étapes d'une mitose grâce à la visualisation de la forme la plus compacte de la chromatine, les chromosomes (Flemming, 1882; Paweletz, 2001). Cependant, la découverte de la chromatine peut être attribuée à Friedrich Miescher en 1869, lorsqu'il identifia la « nucléine », issue de pus de patients, composée d'une substance riche en phosphate, et présente dans toutes les cellules (Dahm, 2008; Miescher, 1871). L'allemand Richard Altmann déterminera en 1889 que la nucléine présente les propriétés d'un acide et proposera le terme d'« acide nucléique ». Cependant, la composante protéique basique également détectée au sein de la nucléine, ultérieurement nommée « histones », intéressera préférentiellement les scientifiques de l'époque.

En effet, au début du 20^e siècle, le dogme d'une information héréditaire portée par les protéines était couramment admis. Cette théorie favorisait l'idée d'une information portée par les protéines, composées d'une séquence établie parmi 20 unités de base (acides aminés), bien plus complexe en apparence que l'ADN avec ses seulement 4 unités de base que sont les nucléotides A, T, G et C (Figure A, p16). La fonction de l'ADN restera inconnue ou tout du moins âprement débattue jusqu'au milieu du vingtième siècle, où les travaux d'Alfred Hershey et Martha Chase sur le phage T2 puis l'établissement de la structure de l'ADN par Watson et Crick imposeront définitivement l'ADN comme support de l'hérédité (Hershey &

Chase, 1952; Watson & Crick, 1953). Il est de nos jours clairement admis que l'information génétique codée par l'ADN est à la fois responsable de la diversité du monde du vivant mais également des similitudes entre espèces. Ainsi, chaque organisme possède une séquence d'ADN plus ou moins équivalente en fonction de leur parenté au sein du règne des espèces vivantes. La théorie de l'évolution chère à Darwin, basée sur les comparaisons des caractères phénotypiques plus ou moins similaires entre espèces, peut être associée à l'évolution de l'information génétique codée par l'ADN. La phylogénie moléculaire permet ainsi de classer les organismes entre eux en fonction de la similarité de séquences particulières de leur ADN, nucléaire ou mitochondrial.

Cependant, la génétique reste trop restreinte pour expliquer les diversités au sein d'une même espèce, voire d'un même organisme, à un temps donné comme au cours de sa vie. En effet, toutes les cellules présentes au sein d'un même individu sont à priori strictement composées d'une séquence identique d'ADN.

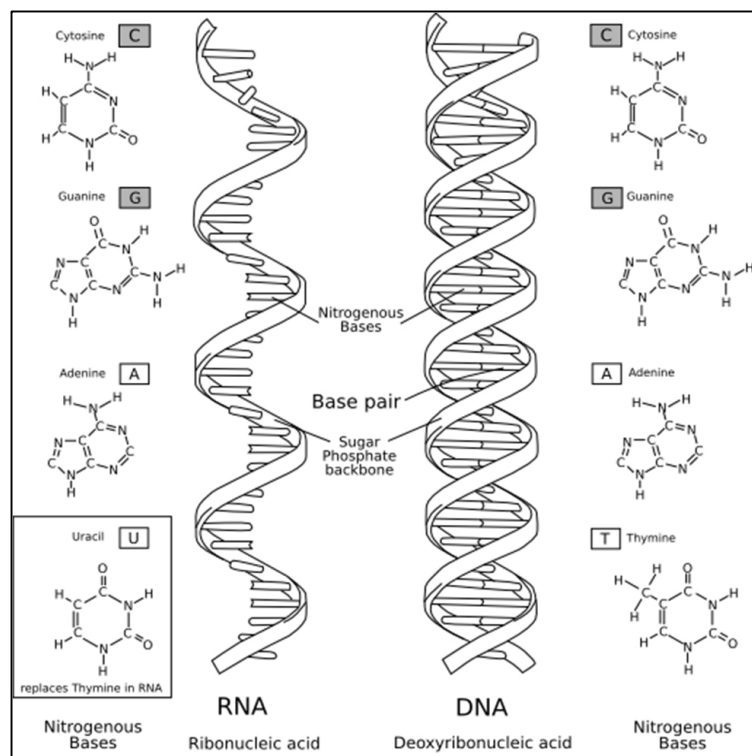


Figure A : Représentation schématique de la double hélice d'ADN et d'un brin d'ARN, et les différents nucléotides les composant. (issu du site wikipédia)

Il faut donc ajouter un second paramètre à l'information génétique codée par l'ADN, qui peut être assimilé à « l'épigénétique ».

Ce terme, dont la définition est attribuée à Conrad Waddington en 1942, servait jusqu'à récemment de « fourre-tout » aux phénomènes héréditaires inexplicables par la simple génétique (Goldberg *et al*, 2007; Holliday, 2006). Pour Waddington, à la fois généticien et biologiste du développement, l'épigénétique était « la branche de la Biologie qui étudiait les interactions entre les gènes et leurs produits qui transforment le phénotype en un être » (Figure B, p18). Il essayait ainsi de comprendre comment des modifications environnementales (températures ou drogues) pouvaient influencer sur le développement d'un organisme (Waddington, 1942).

De nos jours, une définition admise de l'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans la régulation de l'information codée par les gènes, transmis d'une génération (de cellules ou d'un organisme) à la suivante, et qui ne découlent pas de modifications de la séquence d'ADN nucléaire. Elle représente également l'étude des phénomènes impliqués dans le processus de développement d'un organisme. Ainsi, les protéines et ARNs qui composent la chromatine sont également vecteurs d'une information qui va permettre de réguler l'expression de gènes spécifiques et ainsi établir un programme d'expression génétique propre à chaque cellule. En effet, une cellule neuronale n'utilisera qu'une partie spécifique de l'information codée par l'ADN, propre et indispensable à sa fonction, et différente de celle d'une cellule du foie par exemple. De plus, une seule et même cellule pourra arborer un programme d'expression différent au cours de sa vie. La chromatine va ainsi permettre de sélectionner l'expression des gènes nécessaires ou réprimer ceux inutiles à la fonction de la cellule.

Quelle est la structure de la chromatine et comment est-elle modulable afin d'apporter une information supplémentaire à celle de l'ADN ?

IA2) Le nucléosome, unité de base de la chromatine

L'élément de base de cette compaction de la chromatine est le nucléosome. Son existence a été découverte dans les années 1970, suite à la digestion de l'ADN par des

nucléases et l'obtention de fragments résiduels d'environ 200 paires de bases et leurs multiples (Williamson, 1970). Une digestion plus fine permet d'isoler un complexe de poids moléculaire de 200kD, composé d'ADN et de protéines. Peu de temps après, l'enchaînement des nucléosomes en « collier de perles » a pu être visualisé grâce au progrès de la microscopie (Figure C, p19) (Olins & Olins, 1974; Oudet *et al*, 1975). La même année, Kornberg proposera l'existence d'une unité de base au sein du noyau, de deux cents paires de base d'ADN complexées avec 4 paires d'histones, ce que Pierre Chambon appellera en 1975 le nucléosome (Kornberg, 1974).

Les 4 histones majoritaires qui composent ce nucléosome furent identifiées dès 1965, nommées ensuite H2A, H2B, H3 et H4, ainsi qu'une cinquième histone abondante, H1 (Phillips & Johns, 1965). Ces histones sont des protéines de petites tailles (100 à 130 acides aminés), bien conservées au cours de l'évolution, et très basiques du fait de leur grande proportion en Arginine et Lysine.

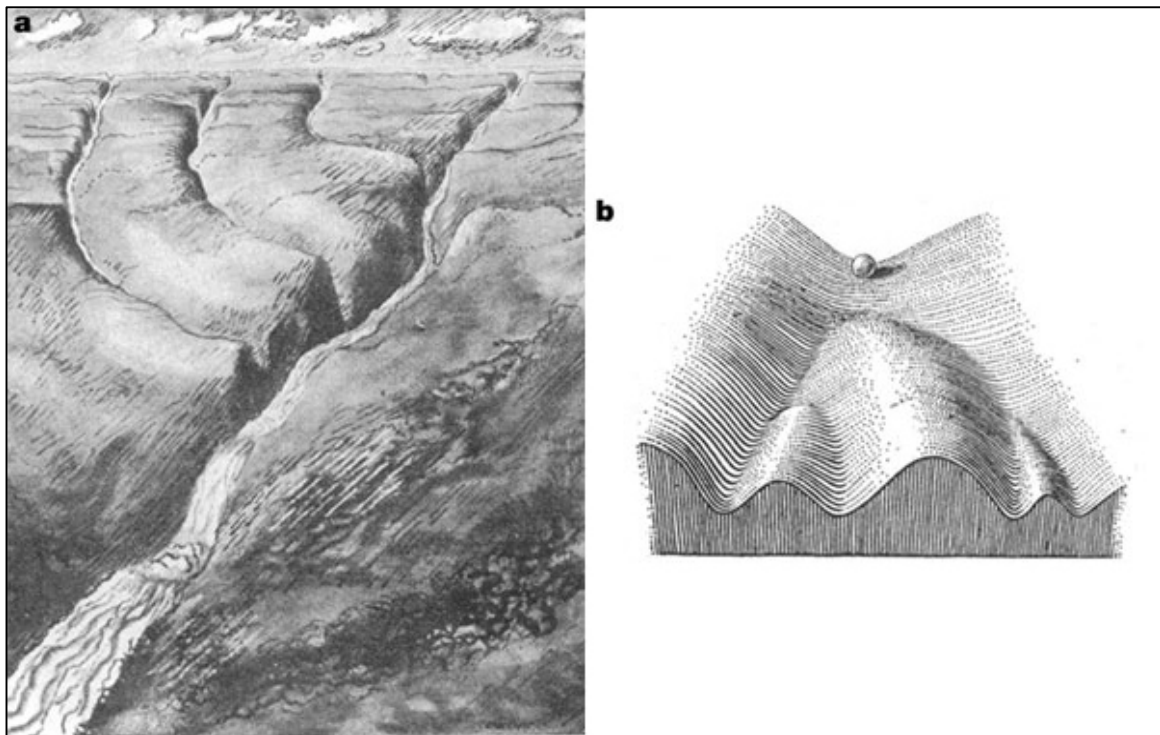


Figure B : le paysage épigénétique

Confrontation historique entre une vision déterminée d'un paysage à une seule issue (a) et d'un paysage à plusieurs issues (b). (D'après Weddington, image issue de *Nature Reviews Genetics* **3**, 889-895, 2002)

La structure du nucléosome a été définie en 1984 par Richmond et sa résolution à 7 Å a depuis été améliorée (Figure D, p20) (Richmond *et al*, 1984). Chaque histone possède un domaine globulaire central capable d'interagir et de former des hétérodimères entre H2A&H2B et H3&H4 par une interaction dite en « poignée de main ». Ces hétérodimères vont ensuite pouvoir s'associer entre eux et former ainsi des tétramères, puis le cœur du nucléosome en tant qu'octamère. L'histone H3 joue un rôle pivot dans la structuration générale du nucléosome, car un axe de symétrie traverse le nucléosome au niveau de l'interface entre les deux molécules d'H3 (Luger *et al*, 1997).

Les parties N terminales des histones, appelées queues N terminales, sortent du cylindre plat et compact formé par les domaines globulaires. Elles ne présentent aucun signe particulier de structuration, excepté le fait que les queues d'H3 et H2B sortent via le sillon mineur de l'ADN.

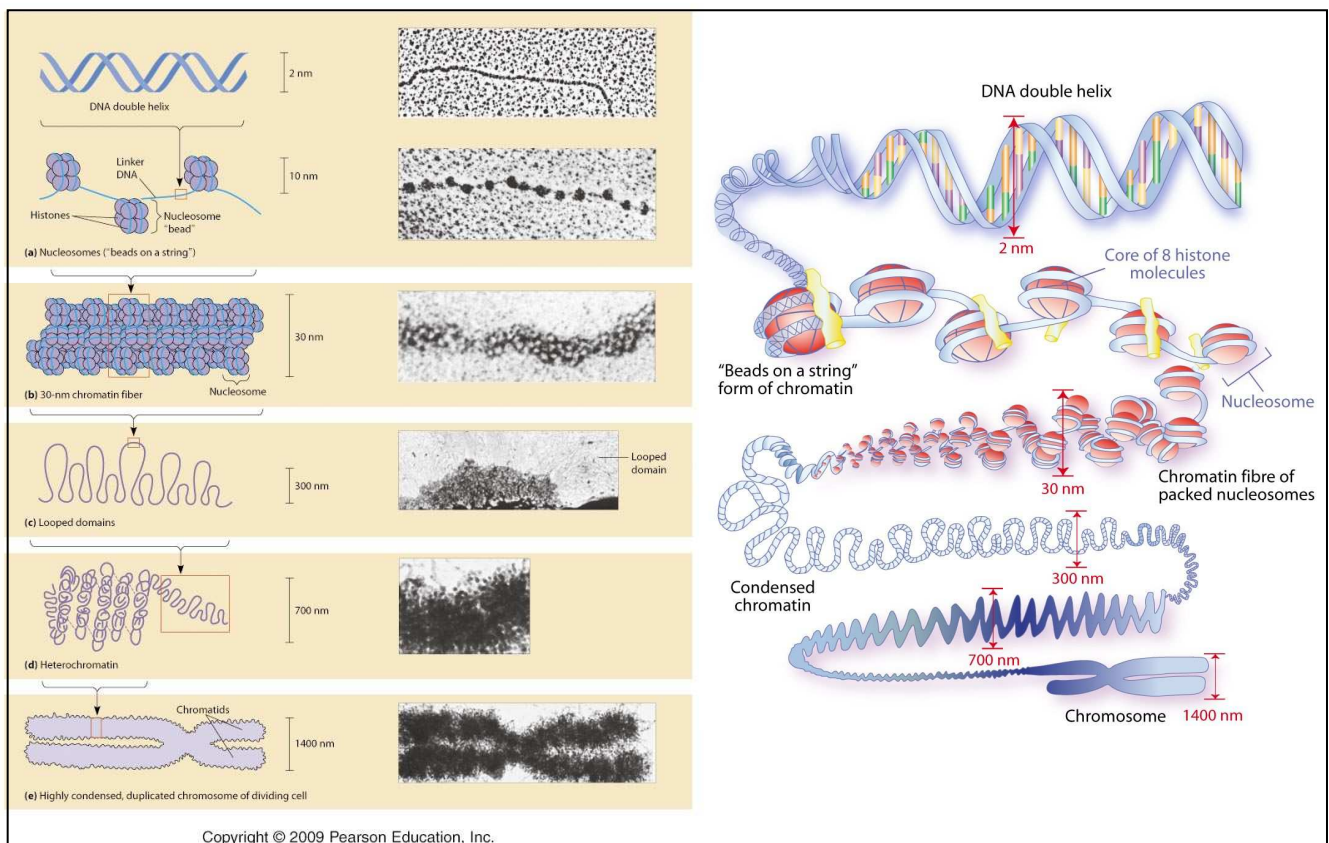


Figure C : Structure de la chromatine

Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine et visualisation en microscopie de leurs correspondances *in vivo*. (issu de *Pearson Education*)

Les queues N terminales sont clairement exposées à l'extérieur de la partie centrale, ce qui leur confère une grande accessibilité : ceci est à mettre en relation avec les nombreuses modifications post traductionnelles retrouvées sur leurs acides aminés, que nous détaillerons plus loin (Khorasanizadeh, 2004).

Le nucléosome est ainsi formé par l'enroulement de 146 paires de bases d'ADN autour des histones de cœur. L'ensemble est maintenu par un jeu d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes entre les groupements phosphate de l'ADN et les histones, et par des contacts non polaires avec le sucre désoxyribose de l'ADN et les histones (Khorasanizadeh, 2004). Comme aucun contact direct n'existe entre les bases azotées et les histones, le nucléosome ne présente aucune spécificité à la séquence d'ADN. Cependant, il a été observé que certaines séquences d'ADN semblent permettre le positionnement non aléatoire des nucléosomes le long de l'ADN. Ces séquences modifieraient la courbure de la double hélice d'ADN, en partenariat avec certaines modifications épigénétiques et l'activité de facteurs de remodelage de la chromatine que nous présenterons ultérieurement (Segal & Widom, 2009).

Une cinquième histone est l'histone de liaison, nommée H1, dont il existe de nombreuses isoformes (Khochbin, 2001). Les histones de liaison comportent trois parties : une courte zone N terminale riche en lysine, un domaine globulaire central, et une très longue queue C terminale non structurée.

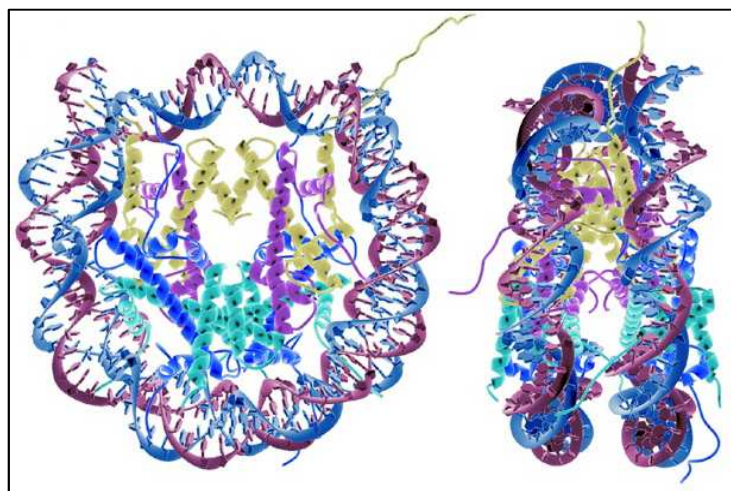


Figure D : Structure d'un nucléosome (issu de Lodish *et al.* , 2000)

Contrairement aux extrémités, le domaine globulaire est très conservé, et est structuré par un motif dit « wing-hélice ». Il serait positionné à l'endroit où l'ADN entre et sort du nucléosome et n'interagit pas avec les histones de cœur (Zhou *et al*, 1998). Les extrémités N et C terminales interviendraient dans l'organisation internucléosomale et la structuration de la chromatine à des niveaux supérieurs.

Contrairement aux histones de cœur, aucune histone de liaison n'est, à elle seule, essentielle à la survie cellulaire. L'invalidation de plusieurs gènes codant des histones de liaison a révélé une certaine redondance entre les différentes isoformes, ainsi qu'un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne (Khochbin, 2001; Robinson & Rhodes, 2006).

IA3) Les autres niveaux de structuration de la chromatine

Le nucléosome constitue un premier niveau de structuration de la chromatine. Leur alignement le long de l'ADN forme le collier de perle, appelé également fibre de 11 nm (nanomètres).

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine ont été visualisés dans différentes conditions salines (Thoma *et al*, 1979). A une force saline basse, la chromatine se structure en collier de perles. A une force saline plus élevée (100 mM NaCl), elle forme un cylindre irrégulier d'environ 30 nm de large, communément appelé fibre de 30 nm.

Il y a en fait plus de trente ans, Finch et Klug ont été les premiers à proposer que le nucléosome, en présence de l'histone de liaison H1 ou d'ions Mg^{2+} , est structuré en fibre de chromatine de 30 nm (Finch & Klug, 1976). Dans leur modèle dit de « solénoïde » les nucléosomes consécutifs se localisent les uns à proximité des autres dans la fibre, formant une hélice simple. Depuis, cette fibre de 30 nm a été observée par microscopie électronique par de nombreux groupes, mais sa structure intrinsèque est encore âprement débattue. Deux écoles principales co-existent, l'une en faveur de l'hélice simple solénoïde et la seconde en faveur d'une hélice à double brin. Dans ce second modèle, les nucléosomes sont arrangés en zigzag entre eux, de sorte à former une hélice double brin dont chaque nucléosome se retrouve à proximité du nucléosome $n+2$ et non $n+1$ (Figure E, p23).

Les travaux de Richmond et collaborateurs, à partir de modèles à douze nucléosomes, vont en faveur de la conformation en zigzag et double hélice (Dorigo *et al*, 2004). Ils ont de plus résolu la structure d'un tétra-nucléosome à 9 Å qui confirme leur modèle en zigzag (Schalch *et al*, 2005). Plus récemment cependant, l'observation en microscopie cryo-électronique du réassemblage *in vitro* d'une fibre de chromatine régulière, à partir de répétition de nucléosomes et de l'histone de liaison H5 d'érythrocytes de poulet, suggère une structure solénoïdale inter-digitalisée, où le nucléosome « n » interagit avec les nucléosomes « n+5 et n+6 » (Robinson *et al*, 2006; Robinson & Rhodes, 2006). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la présence des différentes histones de liaison existantes et par les variations de structure qu'elles peuvent générer. Il est aussi tout simplement possible que les deux formes de fibres de 30 nm coexistent au sein d'une même chromatine (Grigoryev *et al*, 2009).

Cependant certaines données *in vivo* remettent en question l'existence même de cette fibre de 30 nm, arguant qu'elle découlerait d'un artefact dû aux travaux *in vitro* réalisés avec de faibles quantités d'enchaînement de nucléosomes et sur fibre isolée. En effet, des observations par microscopie cryo-électronique sur coupes vitrifiées semblent infirmer l'existence de ces fibres figées de 30 nm, en faveur d'une structure dynamique « inter-fibres ». Ainsi, la forte concentration de nucléosome *in vivo* entraînerait les croisements des fibres de 11 nm entre elles en un mélange à priori hétérogène de polymères (Eltsov *et al*, 2008). Plusieurs articles confortent cette idée, notamment les travaux de Dekker qui, par une combinaison de la technique de capture de conformation de chromosome (3C) et d'assemblage de polymères, montre que la chromatine des domaines transcriptionnellement actifs de levure ne forme pas de fibre compacte de 30 nm, mais plutôt un arrangement relâché de nucléosomes. De plus, il montre que les régions avoisinantes plus compactes sont cependant de densité de masse encore inférieure à celle attendue pour la fibre de chromatine de 30 nm (Dekker, 2008).

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine sont encore moins connus, car moins accessibles par les méthodes actuelles d'investigation. On suppose que la fibre de 30 nm (ou celle de 11 nm) forme de grandes boucles, elles mêmes repliées en sous domaines chromosomiques, détectables en interphase (Figure C, p19). Ainsi des domaines sous-chromosomiques peuvent être distingués dans des cellules humaines (Cremer & Cremer, 2001; Taddei *et al*, 2004).

Enfin, le chromosome métaphasique observé en mitose représente le niveau de compaction maximal et est capable d'être à la fois résistant, maniable et compact pour assurer une bonne ségrégation du matériel génétique entre les deux cellules filles (animations : (Kyrk, 2010a; Kyrk, 2010b).

A l'intérieur même du noyau, la chromatine va pouvoir se présenter sous différentes conformations, afin de faciliter le fonctionnement de la machinerie cellulaire. Des régions vont être extrêmement compactées, alors que d'autres seront au contraire peu denses, permettant une association plus aisée à l'ADN, et ceci de manière modulable au cours de la vie cellulaire. Ainsi, la chromatine n'est pas une structure homogène et figée dans le temps.

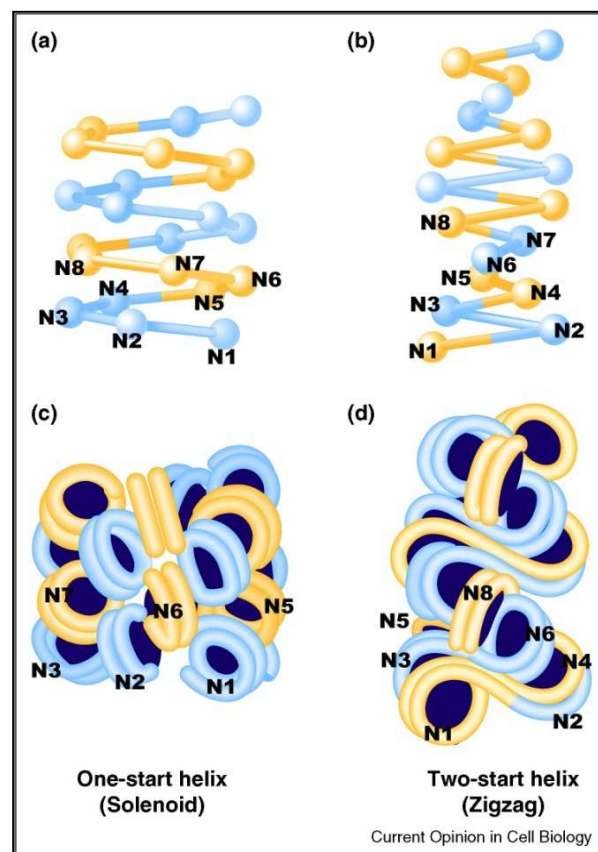


Figure E : Représentation de la fibre de 30 nm en solénoïde à un ou deux départs. (issu du journal *Current Opinion in Cell Biology*)

IB) Dynamique et plasticité de la chromatine

IB1) Organisation structurale de la chromatine

L'ADN contenu dans un noyau d'une cellule humaine est composé d'environ 30 000 gènes, repartis au sein de 23 paires de chromosomes pour un total de 6,4 milliards de paires de nucléotides. L'ADN est une macromolécule de taille conséquente, d'environ 2 mètres de long mis bout à bout, pour 2,5 nm de large, et tout le génie d'une cellule réside dans sa capacité à maintenir une si grande quantité d'ADN au sein de l'espace si restreint d'un noyau cellulaire, voire encore plus pour les spermatozoïdes. Une image couramment utilisée pour se représenter une échelle de taille est que si l'on compare le noyau d'une cellule à une orange, l'ADN replié à l'intérieur peut être assimilé à une pelote d'un long fil de pêche d'environ 20kms. La cellule doit donc structurer son ADN sans s'emmêler, tout en restant capable d'accéder à n'importe quel moment à l'information codée par un gène précis. Ceci réclame une étroite collaboration entre l'ADN et les protéines structurantes de la chromatine, afin de permettre l'accès en temps voulu à la machinerie cellulaire pour diverses activités telles que la réplication, la transcription, la réparation, etc...

Ainsi, la chromatine n'est pas organisée de manière chaotique au sein du noyau. En 1928, Heitz remarqua que certaines zones du noyau cellulaire sont plus denses que d'autres. Il a introduit le terme d'euchromatine, représentant la chromatine lâche, et d'hétérochromatine, représentant les zones denses et compactes. Par la suite, l'euchromatine a été décrite comme associée à une transcription active des gènes, alors que la transcription est majoritairement réprimée au sein de l'hétérochromatine. On distingue deux sous-catégories d'hétérochromatine, en fonction de leur stabilité : l'hétérochromatine constitutive ou l'hétérochromatine facultative.

Toutes les cellules d'une même espèce vont regrouper des régions similaires de l'ADN sous la forme d'une hétérochromatine constitutive. Par exemple pour l'Homme, les chromosomes 1, 9, 16 et Y contiennent de larges régions d'hétérochromatine constitutive, majoritairement réprimées. Cette hétérochromatine constitutive est généralement constituée de séquences répétées, et semble jouer un rôle préférentiel de structuration de régions telles

que les centromères et télomères. Elle peut également avoir un impact direct sur l'expression des gènes à proximité, en les réprimant plus ou moins en fonction de la propagation de l'hétérochromatine. L'exemple le plus connu de cet effet de position est celui du gène *white* chez la drosophile qui, suite à une inversion sur le chromosome X, se retrouve à proximité de l'hétérochromatine péricentrique et devient réprimé, entraînant un mosaïcisme blanc-rouge de couleur des yeux (Dorer & Henikoff, 1994; Schultz, 1936). Chez les mammifères, les centromères et régions péricentromériques s'associent généralement entre elles, formant des foyers appelés chromocentres (Taddei *et al*, 2004).

L'hétérochromatine facultative quant à elle n'est pas répétée, et peut structurer des régions d'ADN différentes au sein de cellules d'une même espèce. Bien qu'elle partage la même structure compactée que l'hétérochromatine constitutive, elle peut se décondenser sous certaines conditions et permettre ainsi la transcription de gènes normalement réprimés.

La formation de l'hétérochromatine est un moyen de réprimer spécifiquement certaines régions du génome, et participe ainsi à l'élaboration d'un programme génétique propre à chaque cellule. Cette organisation de la chromatine est donc extrêmement régulée et fait appel à de nombreux acteurs épigénétiques que nous détaillerons plus loin.

IB2) Organisation spatiale de la chromatine

Une façon de faciliter le contrôle des différents processus nucléaires est d'envisager une organisation spatiale de la chromatine au sein du noyau. Les foyers de transcription détectables en immunofluorescence par détection des ARNms ou de la RNA polymérase II laissent supposer l'existence « d'usines à transcription », où des gènes actifs issus de chromosomes différents peuvent se relocaliser afin de faciliter leur transcription. Grâce à la combinaison de la fluorescence par hybridation in situ en 3D et de la technique de capture conformationnelle de la chromatine (3C), l'équipe de P. Fraser a pu démontrer une colocalisation dynamique des gènes transcrits au sein de sites actifs de transcription (Osborne *et al*, 2004). De plus, plusieurs travaux suggèrent une corrélation entre la disposition spatiale de régions riche en gènes et leur transcription. Ces régions seraient le plus souvent exclues des « territoires chromatiniens » localisés au centre du noyau, et les régions préférentiellement

transcrites ont une tendance à se retrouver en périphérie nucléaire (Mahy *et al*, 2002). Enfin, L. Finlan et collègues ont montré en 2008 que la relocalisation forcée d'une région chromatinienne en extrême périphérie nucléaire semblait au contraire réprimer la transcription des gènes ciblés. Ils ont pour cela fusionné la protéine Lap2b de la membrane nucléaire avec la protéine de répression lac d'*Escherichia coli* (lacI), et ils ont intégré au sein de chromosomes des séquences de l'opéron LacO, auxquelles s'associent fortement la protéine lacI. Ils ont ainsi pu détecter une baisse de l'expression des gènes situés à +/- 5Mb de l'insertion LacO du chromosome relocalisé en périphérie nucléaire (Finlan *et al*, 2008).

Le nucléole constitue également un compartiment chromatinien particulier : la transcription des gènes ribosomiaux est regroupée en son centre, dit composant fibrillaire. La structuration des ARN ribosomiaux s'effectue à proximité, dans le compartiment fibrillaire dense, et la maturation finale des ribosomes a lieu dans la zone extérieure du nucléole, le compartiment granulaire (Raska, 2003; Shaw & Jordan, 1995).

Les télomères, situés aux extrémités des chromosomes, adoptent une structuration particulière qui protège l'ADN de la machinerie de réparation des cassures doubles brins. Chez la levure, les télomères se regroupent en quelques foyers présents à proximité de l'enveloppe nucléaire (Funabiki *et al*, 1993; Gotta *et al*, 1996). Chez les mammifères, les télomères seraient distribués de manière aléatoire au sein du noyau (Luderus *et al*, 1996). Cependant, des études basées sur de l'imagerie en temps réel ont montré une association transitoire de deux ou trois télomères dans des fibroblastes humains (Molenaar *et al*, 2003).

L'enveloppe nucléaire interagit avec la chromatine et est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. L'invalidation du gène codant un de ses principaux constituants, la lamine A, conduit à une désorganisation de l'hétérochromatine centromérique (Sullivan *et al*, 1999). Le corpuscule de Barr, résultant de la compaction du second chromosome X chez la femme, est quant à lui retrouvé systématiquement en périphérie du noyau.

Le phénomène de la mitose est également un processus nécessitant une réorganisation structurelle et spatiale de la chromatine. Après s'être condensés en une structure chromatinienne extrêmement compacte, les chromosomes s'alignent au niveau de la plaque équatoriale. Les chromatides sœurs qui composent le chromosome sont soudées au niveau de leurs centromères grâce à la cohésine et les kinétochores qui se forment au niveau des centromères vont pouvoir se connecter aux microtubules suite à la dissociation de l'enveloppe

nucléaire. Les chromatides sœurs vont alors pouvoir être séparées et déplacées aux deux pôles de la cellule et se décondenser une fois la mitose terminée pour permettre l'expression des gènes nécessaires aux deux cellules filles.

Enfin, les récents travaux de l'équipe d'A. Dernburg sur *C. elegans* démontrent que l'appariement des chromosomes méiotiques homologues permettant la formation des complexes synaptonémaux requérait une connexion avec le réseau intègre de microtubules. Ainsi, il semblerait que l'organisation spatiale de la chromatine puisse être contrôlée directement pas le cytosquelette depuis l'extérieur du noyau (Sato *et al*, 2009).

Cette plasticité de la chromatine, et la régulation de l'expression des gènes qui en découle, est directement corrélée à l'épigénome, vecteur d'une information épigénétique. Cette information épigénétique est véhiculée par différents types de marquages de la chromatine, capables d'être modifiés, décryptés et d'engranger différents processus cellulaires précis. Le chapitre suivant détaillera les différentes façons qu'utilise la machinerie épigénétique pour façonner une information additionnelle à celle du code génétique.

II) L'information épigénétique et ses acteurs

IIA) Présentation de l'épigénome

De nos jours, l'épigénétique fait référence à la fois aux changements héréditaires de l'activité et de l'expression de gènes de la descendance d'une cellule ou d'un individu, et aux changements stables sur le long terme du programme transcriptionnel d'une cellule, sans pour autant être nécessairement transmis aux cellules filles. Ainsi, l'épigénétique représente l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de faire face aux différents événements

de sa vie (différenciation, stress, etc...) en modulant son programme d'expression génétique (Bird, 2007). Un des champs de recherche particulièrement intéressant de ces dernières années est l'étude de l'importance de l'épigénétique dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches, et la façon dont on peut intervenir pour différencier ou dédifférencier des cellules diverses, avec tout l'espoir thérapeutique que cela implique (Surani, 2001). Une étude récente démontre également que malgré nos capacités actuelles à obtenir des cellules souches pluripotentes induites (« ips » ou *induced pluripotent stem cells*), ces cellules conservent encore une « mémoire épigénétique » de certaines marques les amenant plus naturellement à se différencier par la suite en cellules de lignée similaire à la cellule originale (Kim *et al*, 2010). C'est également elle qui rend incertain le devenir équivalent des vrais jumeaux, malgré un ADN identique (Qiu, 2006).

Les modifications de l'information épigénétique sont à la fois stables et modulables par un grand nombre de facteurs cellulaires, reflétant un état physiologique ou pathologique de la cellule ainsi qu'une adaptabilité à son environnement. En comparaison du génome qui représente l'ensemble des gènes transcrits d'une cellule, l'épigénome représente l'ensemble des marques et modifications épigénétiques d'une cellule. Cet épigénome est propre à chaque cellule à un instant t , et influe directement sur le génome et donc sur le programme génétique usité par la cellule. Il existe trois classes majeures d'information épigénétique : la méthylation de l'ADN, les ARN non codants et les modifications de la chromatine (Figure F, p29). Cette dernière classe comprend les variants d'histones, capables de conférer des spécificités aux nucléosomes où ils sont intégrés, et les modifications post traductionnelles des histones.

Il est également parfois admis que les prions soient une forme d'information épigénétique : ce sont des protéines capables d'induire le changement conformationnel d'une protéine identique, mais repliée différemment, de manière transmissible d'une cellule à une autre. Un exemple de prion est notamment la protéine Prp dont la conformation Prp-sp est à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme (Ross *et al*, 2005).

Il est important de noter qu'il existe une grande connectivité entre ces différentes informations épigénétiques : de nombreux travaux mettent en évidence une synergie et un enchaînement de modifications épigénétiques pour arriver *in fine* à la régulation spécifique de l'expression du génome. Ces différents mécanismes font appel à toute une batterie de facteurs et de complexes : les « écrivains » et les « effaceurs », capables de modifier les marques

épigénétiques ; les « lecteurs et recruteurs » capables de reconnaître une ou plusieurs marques épigénétiques et de cibler ainsi des régions spécifiques de la chromatine afin d'y recruter différents complexes protéiques ; les « effecteurs » capables de remanier la chromatine et/ou d'entraîner différents processus biologiques (Goldberg *et al*, 2007). La suite de ce chapitre s'efforcera de détailler ces différentes marques et informations épigénétiques.

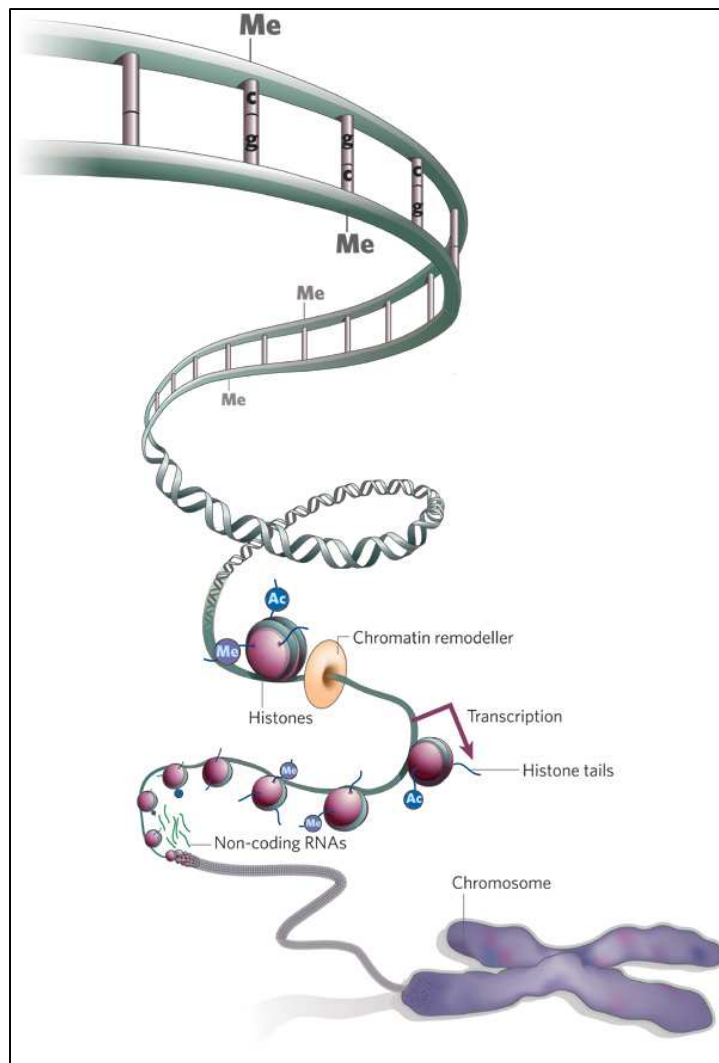


Figure F : L'épigénome, un second niveau d'information.

La chromatine rajoute une information à celle de l'ADN, sous la forme de méthylation de l'ADN, de modifications post-traductionnelles des histones et des ARN non codants. (issu de Nature **454**, 711-715, 7 August 2008)

IIB) Les différentes informations épigénétiques et leurs

acteurs

IIB1) La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est retrouvée dans le génome de tous les animaux, des plantes à fleurs, certains eumycètes, ainsi que chez les archées et dans de nombreuses souches bactériennes (Goll & Bestor, 2005). Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyle ($-CH_3$) à la place d'un atome d'hydrogène au niveau d'un azote ou d'un carbone de la molécule d'ADN. Bien que les quatre bases azotées de l'ADN puissent être méthylées, l'adénine est la plus fréquemment modifiée chez les procaryotes et la cytosine chez les eucaryotes. Chez les procaryotes, la méthylation est portée préférentiellement au niveau du sixième azote de l'adénine, alors que chez les eucaryotes cette modification covalente est ajoutée au niveau du cinquième carbone des cytosines.

Bien que la méthylation de l'ADN soit un mécanisme de régulation épigénétique largement répandu, les génomes sont méthylés de façons différentes chez les organismes. Chez les animaux, cette méthylation se fait principalement de façon symétrique sur les 2 brins complémentaires de l'ADN, sur les cytosines des dinucléotides CG. Entre 70 et 80% des CpGs sont méthylés chez les mammifères. Le reste des CpGs non méthylés ne se retrouve pas aléatoirement sur le génome et forme ce que l'on appelle les îlots CpG, principalement regroupés au niveau des régions 5' régulatrices des gènes. La méthylation de l'ADN chez les plantes peut se faire à la fois de façon symétrique sur les cytosines des CG ou CHG (H étant A, T ou C), ou de manière asymétrique dans un contexte CHH. Chez les plantes, les proportions de cytosines méthylées au sein des nucléotides CG, CHG et CHH sont respectivement de 24, 6,7 et 1,7% (Cokus *et al*, 2008).

La méthylation d'une cytosine est une réaction très peu favorable en solution (Chen *et al*, 1991). Cette modification est ajoutée à l'ADN par une famille de protéines très conservées, appelées DNA cytosine-5 methyltransferase (DNMT). Les DNMTs utilisent le S-adénosyl-L-méthionine pour déposer un groupement méthyl sur le carbone 5 d'une cytosine et déforment

localement l'ADN afin d'avoir accès à la cytosine ciblée. Le ciblage des DNMTs sur les cytosines à méthyler se fait de plusieurs façons. Chez les plantes, la méthylation de novo utilise un système de reconnaissance dirigée par ARN (Wassenegger *et al*, 1994). Chez les animaux, les cytosines, hormis celles au sein des îlots CpG, sont globalement toutes méthylées au cours de l'embryogenèse par DNMT3A et DNMT3B. De plus, suite à une déméthylation active au cours du développement des cellules germinales, la méthylation de novo des gènes soumis à l'empreinte est opérée par DNMT3A. Dans ce contexte, la protéine interagit avec DNMT3L, catalytiquement inactive mais capable de stimuler DNMT3A et d'interagir avec les histones H3 non méthylées sur leur Lysine 4 (H3K4). Les éléments transposables sont quant à eux méthylés via un système impliquant les piRNAs, bien que le mécanisme précis reste encore à déterminer (Aravin *et al*, 2008; Kuramochi-Miyagawa *et al*, 2008). De manière intéressante, les protéines de la famille Piwi peuvent être méthylées au niveau d'arginines, et interagir alors avec des protéines à domaine TUDOR, ceci semblant orienter leur spécificité envers certains piRNAs (Vagin *et al*, 2009).

La méthylation de l'ADN est une modification essentielle à la survie des cellules eucaryotes supérieures, car la suppression des DNMTs est létale (Li *et al*, 1992; Okano *et al*, 1999). Les cytosines méthylées peuvent spontanément se déaminer pour former une thymine. Les CpGs tendent donc à disparaître avec le temps pour former des TpGs, ce qui expliquerait la faible quantité réelle de CpG comparativement à celle attendue statistiquement (21%).

La méthylation de l'ADN a un rôle différent chez les organismes procaryotes et eucaryotes. Chez les bactéries, la méthylation de l'ADN est un véritable mécanisme de défense contre les infections de phages, permettant la discrimination entre l'ADN endogène et l'ADN de l'agent infectieux, grâce à un système de méthylases et d'enzymes de restriction méthyle-sensitives capable de dégrader tout ADN étranger non correctement méthylé (Goll & Bestor, 2005). La méthylation de l'ADN est également utilisée comme un moyen de contrôler la fidélité de la réplication. En effet, au cours de la réplication de l'ADN, le brin néosynthétisé n'est pas immédiatement méthylé et permet ainsi de discriminer le brin parental afin qu'il serve de référence à de possibles corrections d'erreurs de réplication par le système de réparation des mésappariements (Cooper *et al*, 1993).

Chez les organismes eucaryotes, la méthylation joue un rôle régulateur de l'expression des gènes et stabilise le génome en limitant l'activation des transposons. La majeure partie de

l'ADN méthylé eucaryote est formée de séquences répétées. Les transposons constituent 45% du génome humain (Smit & Riggs, 1996). Leur méthylation inactive l'expression des gènes nécessaires à leur propagation, limitant ainsi les risques de mutagenèse par insertion dans une zone codante (Goll & Bestor, 2005). En effet, l'inactivation de DNMTs chez *Arabidopsis thaliana* et chez la souris conduit à la réactivation des gènes codés dans les transposons (Bourc'his & Bestor, 2004; Lippman *et al*, 2004).

La méthylation de l'ADN est également un point clé de la régulation de l'expression des gènes. 76% des promoteurs des gènes humains contiennent des îlots CpG et leur méthylation est une marque forte de répression de la transcription (Davuluri *et al*, 2001). La méthylation d'un site peut réprimer directement la transcription en bloquant la fixation de facteur de transcription (Watt & Molloy, 1988). De nombreux sites de méthylation sont retrouvés à l'intérieur même des gènes, au niveau d'introns et d'exons (Klose & Bird, 2006). Cette méthylation perturberait l'étape d'allongement de l'ARN par l'ARN polymérase II car l'introduction d'un site de méthylation ectopique dans une zone transcrite baisse le taux de transcription du gène (Lorincz *et al*, 2004). Un autre mode de répression fait appel à une famille de protéines, appelée MBP (Methyl CpG Binding Protein), capable de reconnaître les îlots CpG méthylés. Historiquement la protéine fondatrice de cette famille est MeCP2, un répresseur fort de l'expression de certains gènes neuronaux. Une mutation de cette protéine est à l'origine du syndrome de Rett, maladie neurologique se traduisant par un comportement proche de celle de l'autisme et par des problèmes psychomoteurs. MeCP2 contrôle *in vivo* le taux de transcription de certains gènes exprimés dans le cerveau, via le complexe répresseur Sin3A (Nuber *et al*, 2005; Tudor *et al*, 2002). MBD1 réprime la transcription via une modification post traductionnelle d'histone, la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3. Lors de la réplication, MBD1 reconnaît l'ADN méthylé et recruterait l'enzyme SETDB1, qui méthyle H3K9 (Sarraf & Stancheva, 2004). MBD2 est impliquée dans la tumorigénèse (Sansom *et al*, 2003) et dans la différenciation des lymphocytes T helper lors de leur activation. MBD2 réprime la transcription de plusieurs gènes en se fixant sur une séquence méthylée de leurs promoteurs et en recrutant le complexe répresseur NURD (Hutchins *et al*, 2002). MBD4 quant à elle possède une activité ADN glycosylase et est impliquée dans la déméthylation active de l'ADN (Hendrich *et al*, 1999). Cette famille regroupe encore les protéines récemment caractérisées MBD5 et MBD6, qui ne semblent pas être capable de s'associer à l'ADN méthylée (Laget *et al*, 2010).

Deux autres classes de protéines sont capables de s'associer à l'ADN méthylé, la famille de UHRF1 et UHRF2 grâce à leur domaine SRA, et la famille de Kaiso, ZBTB4, et ZBTB38, grâce à trois domaines à doigt de zinc. UHRF1 interagit avec les DNMTs et participe ainsi à la méthylation de novo et de maintien de l'ADN (Meilinger *et al*, 2009; Sharif *et al*, 2007). Kaiso interagit avec le complexe N-CoR, et cible ainsi ce complexe répresseur au niveau des zones méthylées (Yoon *et al*, 2003). ZBTB4 et ZBTB38 sont associées à une répression de la transcription (Filion *et al*, 2006).

Globalement ces protéines, véritables « lecteurs » de la méthylation de l'ADN, vont agir ou recruter des facteurs afin d'apporter de nouvelles marques épigénétiques et/ou une activité de remodelage de la chromatine rendant inapte à la transcription la région génomique ciblée.

La méthylation de l'ADN est également impliquée dans les phénomènes dits d'empreinte parentale (Delaval & Feil, 2004). Elle est responsable d'une régulation différentielle de l'expression des deux allèles d'un petit nombre de gènes regroupés sur le génome (Morison *et al*, 2005). Ainsi, certaines zones sont dites soumises à empreinte maternelle, car seuls certains allèles maternels sont exprimés, et les allèles paternels correspondants sont réprimés. De la même manière, on parle d'empreinte paternelle lorsque les allèles d'origine paternelle sont exprimés alors que les allèles maternels sont réprimés (Delaval & Feil, 2004; Morison *et al*, 2005).

L'étude détaillée de certains loci fait ressortir que l'état de méthylation d'une région régulatrice, appelée ICR (Imprinting Control Region), est au sommet de la cascade de régulation. La méthylation de l'ICR d'un allèle empêcherait la fixation de facteurs de régulation, capable de se lier sur un ICR non méthylé. De plus, le niveau de méthylation de chaque ICR est corrélé aux modifications post traductionnelles des histones associées (Umlauf *et al*, 2004).

Une fois établi, le profil global de la méthylation de l'ADN doit être maintenu stablement pour assurer la répression des transposons et préserver l'identité de la cellule. Chez les mammifères, ce maintien est assuré par DNMT1.

Lors de la réplication, DNMT1 copie les marques de méthylation du brin matrice sur le brin néosynthétisé. En effet, DNMT1 interagit avec les composants de la machinerie de

réplication. Il copierait les marques de méthylation au cours de la propagation de la fourche de réplication (Rountree *et al*, 2000), et permettrait le maintien des marques de méthylation existantes dans les cellules filles. Il a été récemment mis en évidence une association indirecte de DNMT1 à la chromatine, critique à sa fonction, via l'interaction avec la protéine UHRF1, dont une mutation entraîne une baisse sévère de la méthylation de l'ADN (Bostick *et al*, 2007; Sharif *et al*, 2007). Le domaine SET-or-RING-associated (SRA) de cette protéine est capable d'interagir spécifiquement avec les dinucléotides CG hémiméthylés.

Chez les plantes, les homologues des différentes protéines animales existent, ce qui laisse supposer un mécanisme similaire. La méthylation asymétrique des nucléotides CHH, semble résulter d'une constante méthylation de novo par DRM2 et RdDM. CMT3 est quant à elle responsable du maintien de la méthylation des nucléotides CHG (Lindroth *et al*, 2001) et il existe une relation étroite entre la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), une marque d'hétérochromatine, et la méthylation de l'ADN. En effet, CMT3 possède un domaine de reconnaissance de H3K9 méthylée, et une des protéines méthyltransférases de H3K9, SUVH4, possède un domaine de reconnaissance des CHG méthylés (Johnson *et al*, 2007; Lindroth *et al*, 2004).

Bien que la méthylation de l'ADN soit une marque épigénétique stable, une baisse du taux de méthylation est détectée au cours du développement aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Par exemple, une baisse globale de la méthylation est observée dans les cellules germinales primordiales, ainsi qu'après la fertilisation au cours des étapes du développement préimplantatoire. Dans ces deux cas, cette baisse de répression semble corrélée à un regain de potentiel des cellules, comparable à une dédifférenciation. Cette nette baisse peut résulter d'un phénomène passif sans véritable maintenance de l'ADN après réplication, ou par le remplacement actif de la cytosine méthylée.

Chez les plantes, la déméthylation active se fait grâce à une activité ADN glycosylase, en partenariat avec le système de réparation par excision de base. Chez *A. thaliana*, la famille des ADN glycosylases comporte 4 membres, DME, ROS1, DML2 et DML3. Une mutation d'une de ces protéines entraîne une hausse de la méthylation globale et elles ont été montrées comme capables d'exciser une cytosine méthylée *in vitro* et *in vivo* (Morales-Ruiz *et al*, 2006). Ces enzymes sont capables de casser les ponts N-glycosidiques, excisant la base, puis l'ossature de l'ADN par une activité de lyse apyrimidique. Ce trou d'un nucléotide, va ensuite

être réparé par la voie de réparation par excision de base (Gehring *et al*, 2009). Chez les animaux, les homologues des ADN glycosylases n'ont pas été identifiés et les données actuelles prêtent à controverse. Cependant, les protéines AID et APOBEC1 sont exprimées dans les cellules subissant une forte déméthylation, et catalysent la déamination des cytosines méthylées, résultant en un mésappariement T/G. Il pourrait donc exister un mécanisme couplant la déamination des cytosines méthylées par AID et APOBEC1 avec l'activité thymine glycosylase de MBD4 (Morgan *et al*, 2004; Rai *et al*, 2008). Une étude montre que MBD4, une fois phosphorylée, est capable d'enlever seule une cytosine méthylée *in vivo* (Hendrich *et al*, 1999).

La méthylation de l'ADN est un des moyens d'apporter une information épigénétique à la cellule, et permet de réprimer spécifiquement certaines régions du génome. L'homéostasie cellulaire dépend donc de la bonne régulation de cette information, et de nombreuses pathologies impliquent un dérèglement du bon contrôle de la méthylation de l'ADN. Par exemple, les cancers présentent très souvent une hypométhylation globale, qui va de pair avec la réactivation de gènes normalement réprimés comme certains oncogènes. En même temps, les cancers possèdent une hyperméthylation localisée des îlots CpG, réprimant notamment certains suppresseurs de tumeur. Une analyse globale de la méthylation de l'ADN permet de cartographier les variations de cette marque au sein du génome d'une cellule, ou entre deux cellules. Ces analyses sont réalisées soit par utilisation d'enzymes de restrictions méthyl-sensitives permettant de discriminer les cytosines méthylées ou non, soit par traitement bisulfite transformant les cytosines non méthylées en uraciles puis thymines détectées par PCR, ou bien encore par immunoprécipitation des cytosines méthylées de la chromatine puis analyse par puce à ADN (mCIP-chip, Figure G, p37).

D'autres mécanismes d'information épigénétique existent, et l'un d'eux est l'activité d'ARNs ne codant pas pour des protéines malgré la transcription de leurs gènes respectifs.

IIB2) Les ARN non codants

Il existe 4 groupes principaux d'ARN non-codants : les ARNs interférant courts (siRNA), les microARNs (miRNA), les petits ARNs piwi-associés spécifiques des cellules germinales (piRNA) et enfin des longs ARNs non codants récemment identifiés et encore mal caractérisés (lncRNA).

Le mécanisme de répression de la transcription par ARN a été découvert il y a plus de 15 ans chez les plantes, et implique la transformation d'ARN double-brins aberrants en petits ARN simple brin de 21 à 26 nucléotides de long. La répression post-transcriptionnelle des gènes se fait principalement dans le cytoplasme par un procédé relativement bien conservé. La ribonucléase DICER est responsable de la création des ARN simples brins en coupant en petits fragments l'ARN double brins, puis les ARNs simples brins vont ensuite être reconnus par les protéines Argonaute et intégrés au sein du complexe RISC. Cet ARN simple brin va cibler un ARN messager spécifique par complémentarité exacte des séquences et entraîner sa dégradation avant qu'il puisse être traduit en protéine (Carthew & Sontheimer, 2009).

De manière assez similaire, les miRNAs sont capables de réguler des gènes importants au niveau post-transcriptionnel. Cependant, les miRNAs, regroupés par plusieurs sur le génome, vont être exprimés sous forme de transcrits polycistroniques (pre-miRNA), et chaque miRNA va ensuite être clivé par la ribonucléase Drosha dans le noyau, sous forme de structure en épingle. Les miRNAs vont ensuite être intégrés au système Dicer et RISC. La reconnaissance avec le brin complémentaire ne sera pas exacte à 100% de par sa forme en épingle, ce qui lui permet d'avoir un panel de cibles beaucoup plus important, et elle se fait sur la région 3'-UTR de l'ARN messager. Ainsi, les miRNA agissent principalement en inhibant la traduction plutôt qu'en entraînant le clivage de l'ARN messager (Carthew & Sontheimer, 2009).

Les ARN non-codants peuvent également agir dès le niveau transcriptionnel en bloquant la transcription des gènes. Les ARNs doubles brins peuvent par exemple cibler la machinerie de méthylation sur leurs séquences chromosomiques homologues (Mette *et al*, 2000; Wassenegger *et al*, 1994).

Récemment, le système d'interférence ARN a été impliqué dans la méthylation de l'ADN et de la marque répressive H3K9me3 dans les cellules humaines (Morris *et al*, 2004). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, la machinerie RNAi est essentielle pour la méthylation de H3K9 au niveau des séquences répétées des centromères et pour leurs fonctions (Hall *et al*, 2003). De plus, le système RNAi est nécessaire pour la répression des retrotransposons en permettant la formation d'hétérochromatine (Hall *et al*, 2002). Enfin, la preuve de l'importance des ARNs non codants a été démontrée par de nombreux mutants chez la levure, délétsés pour un des composants de cette machinerie, avec pour conséquence systématique une baisse des marques de méthylation de l'hétérochromatine et une hausse de la transcription de certains loci.

La régulation des gènes soumis à l'empreinte parentale implique également les ARNs non codants.

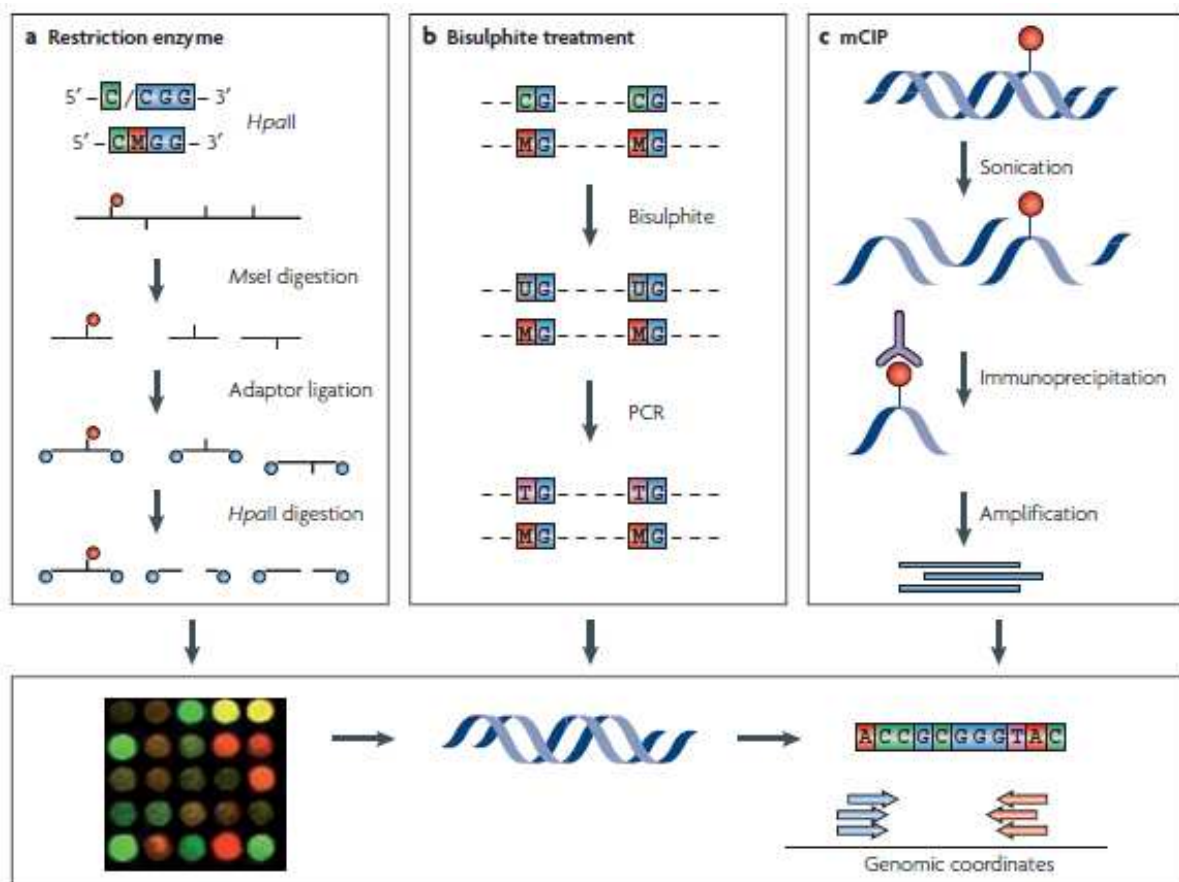


Figure G : Techniques d'analyses de la méthylation de l'ADN (issu de Schones & Zhao, 2008)

La méthylation de l'ADN d'un des deux allèles est corrélée avec la présence de ncRNAs ciblés sur la région. Une inhibition des transcrits des ncRNAs dans les régions d'empreinte parentale a un effet délétère et est impliquée dans certaines maladies (Sleutels *et al*, 2002).

Les piRNAs, long de 29 nucléotides, semblent importants pour le contrôle des transposons (Brennecke *et al*, 2007). Chez le zébrafish *Danio rerio*, les piRNAs ont été impliqués dans la maintenance des cellules germinales et beaucoup d'entre eux semblent ciblés sur les transposons, laissant suggérer un rôle de répression des éléments répétés chez les vertébrés (Houwing *et al*, 2007).

Enfin, un ARN de la famille des longs ARNs non codants a été bien caractérisé. Mesurant plus de 17kb de long, Xist est capable de s'associer physiquement et de former des complexes avec la chromatine qui entoure un des chromosomes X chez la femelle, participant à son inactivation. De plus, il a été montré que l'expression de l'ARN XIST fait preuve d'un contrôle par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN (Ng *et al*, 2007).

Outre la régulation de la méthylation de l'ADN ou la transcription d'ARNs non codants, une information épigénétique est portée par les histones constituant les nucléosomes.

IIB3) Les modifications des histones

IIB3a) Introduction

Les histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4 sont porteuses d'un grand nombre de modifications post traductionnelles, principalement au niveau de leurs résidus des queues N-terminales. Ces modifications peuvent être multiples, et sont répertoriées actuellement l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation et la biotinylation des lysines, la méthylation des arginines, la phosphorylation des sérines et thréonines, mais aussi l'ADP ribosylation des acides glutamiques, la déamination des arginines et l'isomérisation des prolines. (Figure H, p40) (Kouzarides, 2007). Il n'est pas exclu que d'autres types de modification puissent exister.

Plus de soixante acides aminés modifiés parmi les histones de cœur chez l'homme ont été détectés par reconnaissance d'anticorps spécifiques ou par spectrométrie de masse. Malgré tout, cela ne représente qu'une partie des nombreuses modifications existantes. Par exemple, la méthylation d'une arginine peut être simple ou double de manière symétrique ou asymétrique. Chaque lysine peut subir différentes modifications, et la lysine 12 de l'histone H4 peut notamment être détectée sous six états différents (non modifiée, acétylée, mono- di- ou tri- méthylée, ou biotinylée). Le nombre de combinaisons possibles au sein d'un seul nucléosome est évalué à plus d'un milliard de milliards de combinaisons. Cependant, toutes les modifications ne se retrouvent pas en même temps sur une histone et au sein d'un nucléosome. La spécificité d'une marque, et son environnement chromatinien avec d'autres, diffère en fonction de la région génomique ciblée et des conditions dans laquelle se trouve la cellule (Wang *et al*, 2009b).

La première nomenclature des modifications d'histones a été proposée par Bradbury en 1977, et une uniformisation et mise à jour en a été faite en 2005, couramment utilisée de nos jours (Bradbury, 1977; Turner, 2005). Cette nomenclature sera utilisée dans la suite de ce manuscrit.

Les modifications des histones semblent avoir un effet subtil sur la structure générale du nucléosome. Une structure de nucléosome reconstitué avec des histones porteuses de nombreuses modifications a été résolue et est quasi identique à celle obtenue avec des histones non modifiées (Harp *et al*, 1996). Ceci suggère que les modifications des histones n'agissent pas directement en restructurant le nucléosome, mais de manière plus subtile (Khorasanizadeh, 2004). Certaines modifications sont retrouvées sur la partie globulaire du nucléosome, au niveau des résidus qui interagissent avec l'ADN (Cosgrove *et al*, 2004). La position des résidus modifiés sur la surface latérale du nucléosome semble suivre le cheminement de l'ADN autour de l'octamère d'histones.

Certains complexes sont capables de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine et pourraient soulever l'ADN et rendre les résidus latéraux de la particule de cœur accessibles aux enzymes capables de les modifier. Ceci induirait une mobilité différentielle du nucléosome sur sa fibre de chromatine, qui peut faciliter ou nuire à l'expression d'un gène.

Certaines modifications d'histones sont reconnues par des domaines spécifiques, comme le bromodomaine capable de reconnaître une lysine acétylée, et le chromodomaine

une lysine méthylée. Les domaines de certaines protéines sont capables de différencier l'environnement de chaque résidu modifié. Par exemple, le chromodomaine d'HP1 reconnaît spécifiquement une di ou tri méthylation d'H3K9 (H3K9me₂₋₃, (Maison & Almouzni, 2004) et le chromodomaine de la protéine Polycomb (PC) lie spécifiquement H3K27me₂₋₃ (Cao *et al*, 2002; Wang *et al*, 2004a). Les modifications d'histones permettent la fixation de certains facteurs, mais empêchent également la liaison d'autres complexes. Ainsi, une modification sur un acide aminé adjacent peut éjecter un facteur lié via une autre modification. Par exemple Aurora B phosphoryle H3S10 lors de la mitose, et il a été montré que cela induit une éviction d'HP1, dont le site de liaison est situé sur la lysine adjacente H3K9 (Fischle *et al*, 2005; Hirota *et al*, 2005). Les différentes reconnaissances de ces modules et leurs conséquences sont résumés dans la figure H.

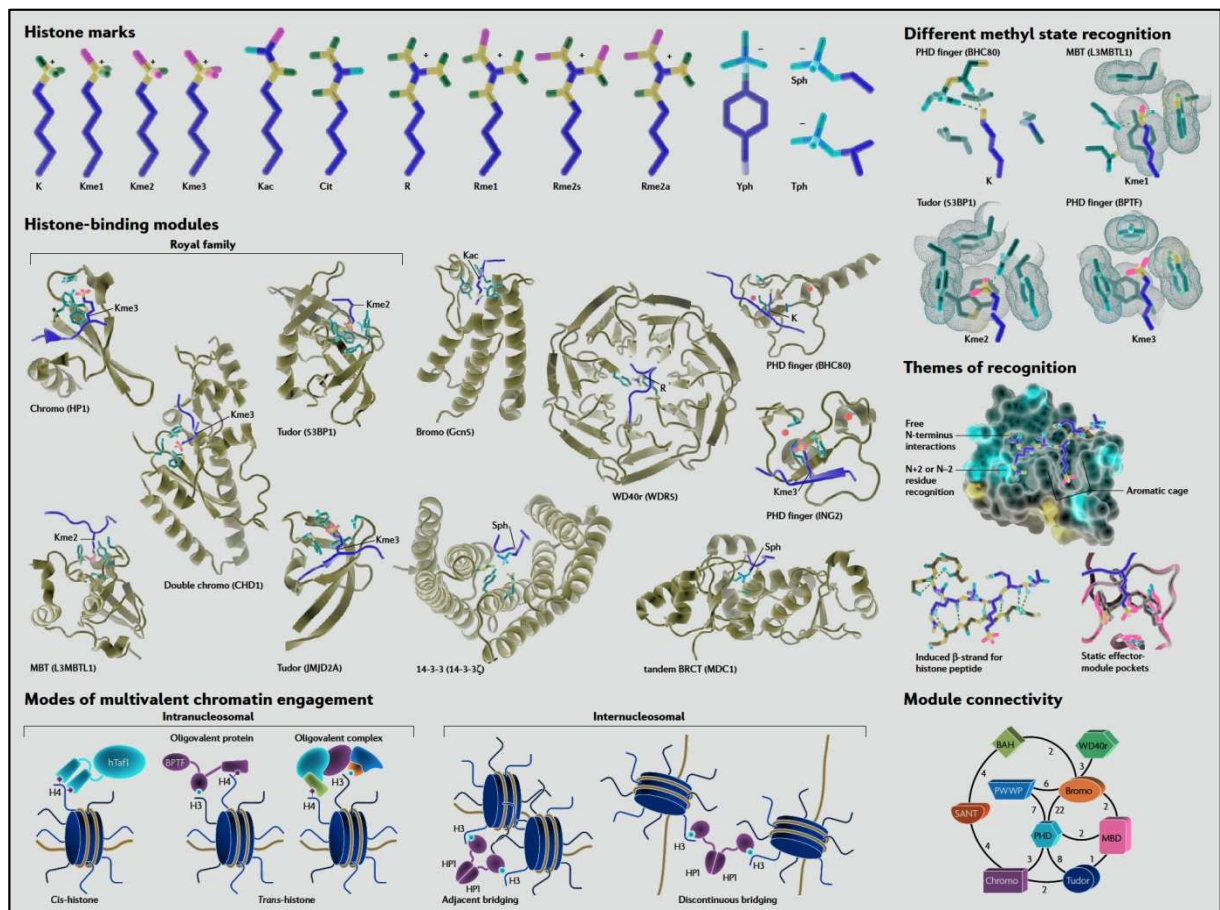


Figure H : Marques post-traductionnelles des histones et les domaines de reconnaissance. (issu de Abcam)

Il a été proposé que les combinaisons de modifications constituent un code, lu et interprété par une machinerie spécifique, capable elle-même d'agir sur les modifications. Cette hypothèse a été synthétisée et proposée par David Allis en 2000, qui l'a baptisé « le code des histones ».

L'activation de la transcription d'un gène implique un dialogue fin entre les modifications portées par les queues N terminales des histones et les facteurs capables de lire ces signaux, qui pourront alors être modifiés lors de leur interprétation. L'allongement des ARN messagers est également régulé par les modifications des histones. L'HMT Set2 est associée très fortement à l'ARN polymérase II, et méthyle H3K36 lors du passage d'un nucléosome (Mellor, 2006). Cette méthylation est fondamentale car elle permet le recrutement d'Eaf3, membre d'un complexe HDAC (Rpd3 chez la levure), qui efface les marques d'acétylation sur H3 et H4 après le passage de l'ARN polymérase. Ceci empêche un recrutement de protéines à bromodomains, qui pourrait conduire à une initiation ectopique de la transcription (Joshi & Struhl, 2005)

Parmi l'ensemble des modifications décrites, la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation, font l'objet des recherches les plus poussées.

IIB3b) Phosphorylation

Peu de choses sont connues sur la phosphorylation des histones comparativement à l'importance de cette marque dans les cascades de signalisation cellulaires des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Il a été montré que MSK1/2 et RSK2 chez les mammifères, et SNF1 chez la levure ont une activité de phosphorylation sur la sérine de l'histone H3 (H3S10). Cette marque est détectée lors de l'activation des gènes régulés par NF κ B, et semble impliquée dans l'induction de l'expression des gènes c-jun, c-fos et c-myc (Mahadevan *et al*, 1991). Un domaine protéique est capable de reconnaître cette marque, le domaine 14-3-3 (Macdonald *et al*, 2005). Curieusement, H3S10ph est retrouvée aussi bien fortement présente dans les régions condensées et inactives des chromosomes mitotiques que sur le chromosome X mâle chez la drosophile, dont la transcription est suractivée par le phénomène de dose-compensation (Johansen & Johansen, 2006). H3S10ph semble impliqué dans la compaction des chromosomes au cours de la méiose et de la mitose et apparaît dès les premières étapes de ces événements cellulaires, lors de la condensation du matériel génétique.

En réalité, la phosphorylation de l'histone H3 est une marque clairement présente chez les cellules en mitose, et 4 différents résidus phosphorylés ont été observés : Thr3ph, Ser10ph, Thr11ph et Ser28ph (Perez-Cadahia *et al*, 2009). Une autre marque de phosphorylation, H4S1ph est également observée au cours de la sporulation chez la levure. Cette marque est conservée chez la drosophile et la souris, où elle est détectée lors de la spermatogénèse jusqu'aux stades tardifs de maturation des cellules germinales males (Krishnamoorthy *et al*, 2006). La phosphorylation des histones semble donc impliquée dans deux processus biologiques, la condensation des chromosomes lors de la méiose et de la mitose, et la participation à la transcription lors de l'interphase du cycle cellulaire.

IIB3c) Méthylation

IIB3ci) Les histones méthyltransférases

La méthylation est une marque épigénétique relativement stable (Trojer & Reinberg, 2006). L'incorporation d'un groupement méthyl sur les histones est un phénomène complexe car les lysines peuvent être mono, di ou tri méthylées, et les arginines mono et diméthylées de manière symétrique ou asymétrique.

La méthylation des histones est réalisée par des Histone MethylTransferases (HMT) : les lysine methyltransferases (PKMTs) méthylent les lysines et les protein arginine methyltransferase (PRMTs) les arginines. Le domaine catalytique majeur de la méthylation est le domaine SET. La spécificité de l'action des PKMTs, ainsi que le nombre de méthyl ajouté dépend de la nature de chaque enzyme et de ses cofacteurs. Par exemple, la PKMT ESET diméthyle H3K9 lorsqu'elle est seule, mais son association avec MAM entraîne la triméthylation du même résidu (Su & Tarakhovsky, 2006).

Les PKMTs Ezh2 et PR-SET7, qui méthylent respectivement H3K27 et H4K20, sont considérés comme des régulateurs épigénétiques clés, car ces marques sont déposées sur de grandes régions chromosomiques et sont transmises de génération en génération (Trojer & Reinberg, 2006). Ceci s'oppose à l'action transitoire et localisée des PKMTs d'H3K4 et H3K36, associée à l'initiation et au maintien de la transcription d'un gène (Mellor, 2006).

Les facteurs méthylant les arginines, les PRMTs, jouent un rôle prépondérant dans la dynamique de l'expression des gènes. PRMT1 et CARM1 catalysent la diméthylation asymétrique des arginines, ce qui est lié à une activation de la transcription. Par contre PRMT5 diméthyle H4R3 de manière asymétrique dans un contexte de répression de la transcription (Wysocka *et al*, 2006a).

IIB3cii) Les histones déméthylases

La déméthylation des histones a été mise en évidence il y a plus de 20 ans (Paik & Kim, 1973), mais les enzymes possédant cette activité déméthylases sont décrites depuis peu.

PAD4 convertit les arginines méthylées en citrullines (Cuthbert *et al*, 2004; Wang *et al*, 2004b), ce qui est associé à une répression de la transcription. Cependant, l'action de PAD4 conduit à la modification de la séquence de l'histone, remplaçant les arginines par des citrullines. Une activité de déméthylation a été attribuée à LSD1 (Shi *et al*, 2004b), capable de déméthyle H3K4 ou H3K9 dans des contextes cellulaires différents. LSD1 fait notamment partie du complexe CoREST, et participe à son action répressive de la transcription. Cependant, LSD1 déméthyle H3K9 lors d'un traitement par des androgènes, jouant alors un rôle activateur de la transcription. Enfin, la famille des protéines contenant un domaine JmJC a récemment été décrite comme contenant une activité déméthylase. JHDM1, JHDM2A, JHDM3A et JMJD2A sont capables de déméthyle la lysine 9 et/ou 36 d'H3, sous une forme di ou triméthylée suivant l'enzyme considérée (Chen *et al*, 2006; Whetstine *et al*, 2006; Yamane *et al*, 2006). La découverte de cette famille de protéine élargit considérablement les voies de signalisation impliquant une activité déméthylase car soixante-neuf protéines contiennent un domaine JmJC chez l'homme.

IIB3ciii) Conclusion méthylation

Les effets cellulaires de la méthylation des histones sont de mieux en mieux caractérisés, et leur rôle semble être fondamental au cours du développement embryonnaire, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Par exemple, les marques H3K4me3 et H3K79me3 sur les promoteurs des gènes sont fortement corrélées à une transcription active de ceux-ci, tout comme H3K36me3 le long des régions codantes. Au contraire, la marque

H3K9me3 est associée à l'hétérochromatine répressive, tout comme les marques H3K27me3 et H4K20me3.

Ainsi la méthylation peut être à la fois une marque d'activation comme une marque de répression de la transcription. A l'inverse des HAT pour l'acétylation, détaillé dans le chapitre suivant, les PKMTs ont une activité très spécifique pour certains résidus, voire de certaines formes mono-di ou tri méthylées. Il existe également quatre domaines différents de reconnaissance de ces résidus méthylés : le chromodomaine, le domaine WD40 et le domaine PHD reconnaissent les lysines méthylées alors que le domaine TUDOR reconnaît à la fois les lysines et les arginines méthylées. Pour ajouter à la complexité d'interprétation de la méthylation des histones, une même marque peut être reconnue par plusieurs domaines et coder ainsi pour une information différente en fonction de la lecture qui en est faite, et un même domaine de reconnaissance peut lui aussi apporter deux informations contradictoires en fonction du complexe protéique où il se trouve (Berger, 2007). Ainsi, le domaine PHD de BPTF, un composant du complexe de remodelage de la chromatine NURF recrute l'activité ATPase de SNF2L au niveau des régions riches en H3K4me3, permettant notamment l'activation de la transcription du gène HOXC8 (Wysocka *et al*, 2006b). Le domaine PHD de la protéine ING2 quant à lui va recruter le complexe répressif mSin3a-HDAC1 au niveau des gènes spécifiques de la prolifération fortement transcrits après l'exposition à des agents endommageant l'ADN (Pena *et al*, 2006; Shi *et al*, 2006). D'autres protéines sont capables de reconnaître la marque H3K4me3. Ainsi, l'histone déméthylase JMJD2A grâce à son domaine TUDOR va s'associer à cette marque et pouvoir déméthyliser les histones avoisinantes, alors que la protéine CHD1 apporte au niveau de la chromatine une activité ATPase grâce à son chromodomaine (Huang *et al*, 2006; Pray-Grant *et al*, 2005).

De plus, certains de ces facteurs liant la méthylation interagissent avec les autres modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi, H3K27me3 recrute via le chromodomaine de PRC2 une activité ubiquitine-ligase spécifique pour H2A, et le chromodomaine de la protéine HP1 fixe H3K9me3 et est associée à une activité déacétylase et méthyltransférase.

Enfin, des travaux récents montrent la propagation des domaines actifs ou répressifs de la chromatine grâce à des facteurs de la méthylation des histones. Ainsi la protéine de l'hétérochromatine HP1 s'associe à H3K9me3 et permet la propagation de cette marque

répressive par son interaction directe avec la PKMT Su(var)3-9, qui est l'enzyme responsable de cette modification post-traductionnelle (Lachner *et al*, 2001). A l'inverse, le complexe MSL chez la drosophile, qui s'associe au chromosome X, utilise le chromodomaine de sa sous-unité MSL3 pour propager de manière bidirectionnelle la marque H3K36me3, générée lors de l'étape d'élongation de la transcription et requise pour la compensation de dosage des gènes du chromosome X chez le mâle (Sural *et al*, 2008).

IIB3d) Acétylation

IIB3di) Les histones acétyltransférases

L'acétylation des histones laisse imaginer deux conséquences majeures sur la chromatine. La première, basée sur une hypothèse purement physico-chimique, repose sur le fait que l'acétylation de la lysine annule la charge positive de cette dernière. Ainsi, les interactions basées sur une complémentarité de charge positive et négative, comme celle entre l'ADN chargée négativement et les histones chargées positivement au niveau des lysines, se retrouve inhibée. Au sein de la chromatine l'acétylation des histones auraient donc pour conséquence possible de déstabiliser les nucléosomes et l'ADN, permettant alors un accès plus aisé à la machinerie transcriptionnelle ou facilitant le remodelage de la chromatine (Shogren-Knaak *et al*, 2006).

La seconde hypothèse se base sur l'établissement d'un « code histone », et l'acétylation des histones serait une des marques nécessaires à l'écriture d'un tel code (Strahl & Allis, 2000). La reconnaissance des lysines acétylées, avec plus ou moins de spécificité par certaines protéines et leurs domaines, et le fait que l'acétylation des histones n'est pas forcément corrélée à un état actif de la chromatine, permettent de penser que cette hypothèse puisse marcher de pair avec un effet de déstabilisation de la chromatine.

La dynamique d'acétylation des lysines est très rapide, et naît de l'équilibre entre les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). Les HATs vont catalyser l'incorporation d'un groupement acétyle (CH₃-C=O) sur une lysine, à partir d'un Acétyl Coenzyme A. Malgré une certaine spécificité, les HATs acétylent un grand nombre de résidus en commun. Les HATs sont divisées en quatre familles principales, en fonction de leur domaine catalytique d'acétylation : la superfamille des GNAT (GCN5 related N

acetyltransferase), la superfamille MYST (« MOZ-Ybf2/Sas3-Sas2&Tip60 »-related HATs), la famille CBP/p300 et la famille SRC (Carrozza *et al*, 2003; Marmorstein & Roth, 2001). Les lysines acétylées peuvent être spécifiquement reconnues par des protéines lectrices de cette marque (dont certaines HATs), grâce à un bromodomaine. Le bromodomaine est un motif d'environ 110 acides aminés, capable d'interagir avec les différentes lysines acétylées via une poche hydrophobe créée par quatre hélices alpha (Owen *et al*, 2000). Il est maintenant clairement démontré que malgré sa caractérisation initiale de reconnaissance d'histones acétylées, le bromodomaine est capable de reconnaître des lysines acétylées sur des protéines non-histones, comme p53, cMyb et Myo-D par exemple (Yang, 2004). Récemment un second domaine de reconnaissance d'histones acétylées a été caractérisé, au sein du facteur épigénétique DPF3b. Le double domaine PHD (Plant HomeoDomain), en tandem, est un domaine normalement connu pour reconnaître les lysines méthylées. Lange et coll. ont montré une reconnaissance de l'histone H4 acétylée par chacun des domaines PHD isolés de DPF3b, et une reconnaissance de l'histone H3 acétylée uniquement dans la conformation en tandem des deux domaines PHD (Lange *et al*, 2008). La structure tridimensionnelle de DPF3b a confirmé l'association avec l'histone H3K14ac, et une méthylation au niveau de la lysine 4 (H3K4me) inhibe cette association (Zeng *et al*, 2010).

Les HATs sont principalement nucléaires (dites de type A) et interviennent dans la transcription (GCN5, PCAF), mais certaines sont cytoplasmiques (type B), et peuvent acétyler les histones néosynthétisées avant incorporation ou encore avoir d'autres substrats non histones (HAT1). Les HATs ont été décrites historiquement comme cofacteurs de la transcription, mais elles sont également impliquées dans les processus de répression de l'expression des gènes, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

Afin de clarifier les appellations des différents facteurs chromatinien, une nomenclature a été mise en place en 2007 (Allis *et al*, 2007). Comme les anciennes appellations des protéines sont encore couramment utilisées, un tableau regroupant l'ancienne et la nouvelle nomenclature permet d'y voir plus clair (Figures I p55, J p56, K p57). Je me focaliserais principalement dans ce paragraphe sur la protéine CBP/p300.

La famille GNAT

La superfamille des GNATs regroupe les HATs similaires à GCN5 et à PCAF (Vetting *et al*, 2005). La première HAT caractérisée, p55, a été isolée à partir de

Tetrahymena, et est un homologue de GCN5. Elle fut la première enzyme décrite à relier l'acétylation des histones et une activation transcriptionnelle (Brownell & Allis, 1996; Brownell *et al*, 1996).

GCN5 et PCAF acétylent préférentiellement H3 *in vitro*. GCN5 est capable d'acétyler les lysines K9, K14 et K18 de l'histone H3 ainsi que les lysines K8 et K16 de l'histone H4 (Kuo *et al*, 1996). PCAF est homologue à GCN5 (identique à 73%), et interagit avec CBP/p300 (Yang *et al*, 1996). La partie N-terminale de ces protéines contient le domaine d'homologie PCAF, et la partie C-terminale contient le domaine AT et un bromodomaine. Le domaine AT permet de lier l'acétyl-CoA et de catalyser le transfert du groupement acétyle sur la lysine. Ces deux HATs font partie intégrante d'au moins deux complexes multi-protéiques indispensables au fonctionnement de la cellule, le complexe de deux mégaDalton STAGA/TFTC et le complexe ATAC de sept cents kiloDalton (Nagy & Tora, 2007). Ces deux complexes sont associés à des fonctions co-activatrices des facteurs transcriptionnels, ainsi qu'à l'acétylation globale de la chromatine (Glozak *et al*, 2005; Vogelauer *et al*, 2000).

HAT1 et HAT2 font partie de la famille GNAT. Elles acétylent les histones néosynthétisées avant leur incorporation à la chromatine et semblent avoir un rôle dans la régulation des télomères (Mersfelder & Parthun, 2008; Verreault, 2000). Enfin, ELP3 est une HAT de la famille GNAT, découverte chez la levure et conservée au sein de l'évolution (Wittschieben *et al*, 1999). Cette HAT est associée à l'ARN polymérase II et jouerait un rôle dans l'élongation de la transcription.

La famille MYST

La superfamille MYST a été nommée avec les initiales de ses membres fondateurs MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60. Les HATs de cette famille sont impliquées dans des fonctions cellulaires très diverses. Tip60 est impliquée dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et dans l'activation de certains gènes (Sapountzi *et al*, 2006).

Ybf2/Sas3 et Sas2 interviennent dans la répression transcriptionnelle, notamment des loci HML chez la levure, et dans le maintien de la structure de l'hétérochromatine des télomères chez la levure (Carrozza *et al*, 2003).

HBO1, la HAT majeure de l'acétylation *in vivo* de l'histone H4, préférentiellement sur les lysines K5 et K12, est présente au sein d'un complexe capital pour la pré-initiation de la réplication. En effet son inactivation empêche l'association de MCM7 à la chromatine, et HBO1 coactive le facteur CTD1, tout en s'associant à MDM2 et ORC1, afin de s'assurer que l'ADN ne se réplique qu'une seule fois au cours du cycle cellulaire (Miotto & Struhl, 2008; Miotto & Struhl, 2010). De plus, il a été montré que le complexe HBO1, composé des sous-unités ING4/5, Eaf6 et Jade1/1L, cible son activité d'acétylation des nucléosomes grâce à ses nombreux domaines de reconnaissance de la chromatine, essentiellement des domaines PHD (Saksouk *et al*, 2009).

MOF est présente au sein du complexe MSL et acétyle spécifiquement H4K16 (Smith *et al*, 2000). MOF est notamment impliquée dans le phénomène dit de compensation de dose de la drosophile, qui implique un doublement de la transcription du chromosome X chez le mâle pour compenser l'absence du second présent chez les femelles (Kind *et al*, 2008).

MOZ et MORF sont deux autres HATs très similaires de cette famille, importantes pour différents programmes de développement, et sont impliquées dans des translocations et des processus de tumorigenèse (Yang & Ullah, 2007).

La famille CBP/p300

Les protéines CBP et p300 (respectivement KAT3a et KAT3b) ont été caractérisées pour la première fois au début des années 1990 par leur interaction avec le facteur de transcription CREB pour CBP, et l'oncoprotéine adénovirale E1A pour p300 (Chrivia *et al*, 1993; Eckner *et al*, 1994). Il s'est avéré par la suite que ces interactions respectives sont en fait partagées, et ces 2 protéines extrêmement similaires ont donc été classées au sein d'une même famille (Arany *et al*, 1994). Ces protéines ont depuis été fortement étudiées et sont impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques diverses et variées telles que la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la réponse aux dommages de l'ADN (Chan & La Thangue, 2001; Giordano & Avantaggiati, 1999; Goodman & Smolik, 2000). CBP et p300 sont deux protéines de taille conséquente (265kDa et 300kDa) et présentent de nombreux domaines caractéristiques. CBP et p300 arborent un bromodomaine et un domaine PHD qui leur confèrent la capacité de s'associer aux modifications d'histones. Il a été montré que ces deux domaines coopéraient pour l'association aux nucléosomes hyperacétylés (Ragvin *et al*, 2004). En plus du domaine

catalytique HAT, elles comportent un grand nombre de domaines d'interactions protéiques tels que les domaines CH1 (ou TAZ1), KIX, CH3 (ou TAZ2), et SID, ce qui leur permet d'interagir avec plusieurs centaines de partenaires différents.

CBP et p300 sont homologues à 63% et l'amalgame entre les deux est souvent faite dans la littérature. On fait ainsi souvent référence à une seule protéine CBP/p300. Cependant, et malgré le fait que ces deux protéines aient en effet de nombreux rôles en commun, il est évident qu'elles possèdent également des fonctions uniques. Les souris délétées (KO) pour CBP ou p300 meurent avant la naissance (E11.5), et présentent des défauts de formation du tube neural. En fait, les souris hétérozygotes pour CBP meurent également avant la naissance, comme une grande proportion des souris hétérozygotes pour p300, laissant suggérer que CBP et p300 ont des fonctions non redondantes au cours du développement et que la combinaison de leurs bons niveaux d'expression est critique pour l'embryogenèse (Yao *et al*, 1998).

Les homologues de CBP et p300 sont présents au sein des organismes multicellulaires tels que *D. melanogaster*, *C. elegans* et les plantes. Elles ne sont pas retrouvées chez la levure, mais une homologie structurale de leur domaine HAT a été démontré avec la protéine RTT109 (Tang *et al*, 2008).

La fonction première de CBP/p300 est d'agir en tant que cofacteur de la transcription pour un grand nombre de protéines nucléaires. En fait, la protéine CBP/p300 est essentielle pour l'activité d'au moins quarante facteurs différents de la transcription. CBP/p300 interagit avec les facteurs de transcription basale TBP et TFIIB et/ou forme un complexe avec l'ARN polymérase II (Cho *et al*, 1998; Yuan *et al*, 1996). Mais elle est également capable d'interagir avec des oncogènes connus (myb, jun, fos), des protéines virales de transformation (E1A, E6, Tax) et des protéines suppresseurs de tumeurs (p53, E2F, Rb, Smads, RUNX et BRCA1) (Bannister *et al*, 1995; Chan & La Thangue, 2001; Eckner *et al*, 1994). L'activité de coactivateur transcriptionnel de CBP/p300 est médiée par une fonction d'intermédiaire entre les facteurs de transcription liant l'ADN et la machinerie transcriptionnelle.

Il a été montré qu'il existe une classe de gènes où p300 et l'ARN polymérase II sont rapidement co-assemblées après une stimulation mitogène, et perdurent longtemps après sur leurs promoteurs cibles. Ces gènes sont en réalité les gènes dont l'expression est activée le plus rapidement suite au signal. L'ARN polymérase II et p300 seraient donc constitutivement localisées au niveau de ces gènes avec une initiation constante de la transcription. Le

recrutement de facteurs d'élongation (P-TEFb, BRD4) serait requis pour réellement déclencher la transcription des gènes ciblés, afin de permettre une transcription extrêmement rapide, en permettant le passage de l'étape d'initiation de la transcription à celle d'élongation (Byun *et al*, 2009).

Le second aspect important de la fonction de co-activateur de CBP/p300 est la capacité d'acétyler les histones des nucléosomes situés au niveau des promoteurs de gènes, permettant ainsi un accès plus facile à la machinerie transcriptionnelle et le recrutement de facteurs chromatinien. En 1996, deux groupes ont démontré une activité HAT de CBP/p300. (Bannister & Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al*, 1996). En réalité, l'activité HAT de CBP/p300 est primordiale car une inactivation hétérozygote de son seul domaine catalytique HAT induit une mort à l'état embryonnaire des souris (Shikama *et al*, 2003).

A l'inverse des autres HATs, qui possèdent une spécificité limitée de substrats, CBP/p300 est capable d'acétyler les quatre histones de cœur *in vitro*, et cela sur différents résidus par histone. Liu *et coll.* ont réalisé la structure du domaine HAT, et mise à part la région centrale pour l'interaction de l'acétyl-CoA, CBP/p300 diffère significativement des autres familles de HATs (Liu *et al*, 2008). Récemment, une homologie structurale avec la protéine de levure RTT109 a cependant été démontrée (Tang *et al*, 2008). RTT109 favorise la stabilité du génome et permet une résistance à des agents de dommages à l'ADN via son acétylation directe de la lysine K56 de l'histone H3 au cours de la phase S du cycle cellulaire. Comme attendu, il a été par la suite établi que CBP/p300 possédait également cette capacité d'acétyler H3K56, et que cette activité est corrélée à la stabilité du génome chez les mammifères (Das *et al*, 2009; Yuan *et al*, 2009). Cette marque d'acétylation, et celle de H3K18ac, semblent en réalité spécifiques à l'activité HAT de CBP/p300 (Ferrari *et al*, 2008).

En parallèle des histones, CBP/p300 est capable d'acétyler de nombreuses protéines. Parmi ces substrats on peut noter la protéine gardienne du génome p53, mais également c-Myb, MyoD, GATA-1, p73 et E2F1, entre autres (Boyes *et al*, 1998; Costanzo *et al*, 2002; Grossman, 2001; Martinez-Balbas *et al*, 2000; Polesskaya & Harel-Bellan, 2001; Tomita *et al*, 2000). Ceci laisse supposer que l'acétylation des protéines non-histones est une modification pos-traductionnelle importante, similaire à la phosphorylation (Kouzarides, 2000). Tout comme la phosphorylation, l'acétylation des protéines peut affecter un nombre important de voies de signalisation. L'acétylation des protéines nucléaires telles que p53, p73

Rb et E2F sur les résidus lysines adjacents à leur domaine d'association à l'ADN séquence-spécifique régule leur affinité, permettant une augmentation de leur activité transcriptionnelle. Par exemple, p53 est acétylée par CB/p300 sur de nombreux sites (lysine en position 370, 372, 373, 381 et 382) et cela augmente son association à l'ADN *in vivo* (Luo *et al*, 2004). Au contraire, l'acétylation des lysines de HMG(I)Y au sein de son domaine d'association à l'ADN réduit son activité transcriptionnelle (Munshi *et al*, 1998). L'acétylation peut aussi affecter les interactions protéine-protéine comme dans l'exemple de Rb et MDM2.

De manière intéressante, CBP/p300 est capable d'accroître la cinétique d'ubiquitylation de p53 médiée par MDM2 (Grossman *et al*, 2003). Ainsi, CBP/p300 est un régulateur multifonctionnel de p53, et ses fonctions *a priori* contradictoires sur p53 s'expliquent par le fait que l'activité ubiquitine ligase semble cytoplasmique et déstabilise ainsi p53 dans une cellule sans stress, alors que l'acétylation de p53 se déroule uniquement dans les noyaux de cellules en stress (Shi *et al*, 2009).

L'importance des fonctions d'acétylation de CBP/p300 et les événements biologiques fondamentaux impliqués laissent supposer que cette activité est sujette à régulation. Les interactions de CBP/p300 avec certains partenaires peuvent ainsi influencer sur son activité. Il a été montré qu'APC5 et APC7 interagissent directement avec p300, tout comme C/EBPa, NF-E2, HNF1 et MAML1, stimulant alors l'activité acétyltransférase et la transcription dépendante de CBP/p300 (Hansson *et al*, 2009; Turnell *et al*, 2005). Cette activité HAT est également potentialisée par la phosphorylation de la MAP kinase p42/p44, Cdk2 et la protéine kinase A. Au contraire, la phosphorylation de la sérine 89 de p300 par la protéine kinase Cd réduit son activité HAT (Yuan *et al*, 2002), et l'interaction directe du facteur de transcription PU.1 avec CBP/p300 également. Une question laissée en suspens est de savoir comment deux protéines différentes, PU.1 et HNF-1a, qui interagissent avec la même région (CH3), peuvent affecter de façon opposée l'activité HAT de CBP/p300.

Il a été montré que CBP/p300, dans le contexte de l'intégration du virus HTLV-1 dans le génome hôte, était capable de promouvoir l'éviction des histones hyperacétylées, désassemblant ainsi les nucléosomes à proximité du promoteur du virus. En effet, la protéine virale Tax, responsable de transformation maligne, avec l'aide de CREB, recrute CBP/p300 sur le promoteur viral, et active sa transcription en déstabilisant localement les nucléosomes avec l'aide de la protéine chaperon NAP1 (Sharma & Nyborg, 2008).

CBP/p300 intervient également dans la régulation du cycle cellulaire via son interaction avec le complexe CyclineE/Cdk2, tout comme son interaction avec des protéines de la réplication et la réparation de l'ADN lui confère un rôle dans ces autres processus cellulaires.

Enfin, il existe des cas où CBP/p300 est impliquée dans la répression transcriptionnelle, notamment celle du gène c-Myc, suite à la coopération avec l'histone déacétylase 3 (Sankar *et al*, 2008).

De par son rôle capital pour de nombreuses fonctions cellulaires, une dérégulation de CBP/p300 peut être la cause de nombreuses maladies humaines. Le syndrome de Rubinstein–Taybi (RTS) est une maladie développementale causée par une mutation hétérozygote de CBP dans la lignée germinale (Petrij *et al*, 2000). CBP/p300 est impliquée dans de nombreux cancers, suite à des translocations chromosomiques du gène CBP par exemple, ou par l'utilisation abusive et détournée de sa fonction par la protéine virale oncogénique E1A (Frisch & Mymryk, 2002). En effet, il a été montré que la séquestration de CBP/p300 par E1A a pour conséquence la répression transcriptionnelle des facteurs utilisant normalement la protéine comme co-activateur (Gallimore & Turnell, 2001). Enfin, certaines maladies formant des agrégats polyQ, comme la maladie de Huntington ou la maladie de Kennedy, séquestrent la protéine CBP/p300 de par sa séquence C-terminale riche en glutamine, ce qui tend à réprimer la transcription globale de la cellule (McC Campbell *et al*, 2000).

IIB3dii) Les histones déacétylases

Un groupe de protéines est capable d'enlever le groupement acétyle d'une lysine, ce sont les HDACs (Histone deacetylase). Des analyses phylogénétiques ont subdivisé les HDACs en trois classes. La classe I regroupe les protéines homologues à Rpd3 (levure), et correspond aux HDAC1, 2, 3 et 8 humaines, qui sont uniquement nucléaires. La classe II contient les protéines homologues à Hda1 (levure), ce qui correspond aux HDAC4, 5, 6, 9 et 10 humaines, certaines étant nucléaires, d'autres cytoplasmiques. Les protéines homologues à Sir2 (levure) sont regroupées au sein de la classe III (Sirtuines 1 à 7 chez l'homme). Enfin HDAC11 est classée à part, car elle possède à la fois des caractéristiques des classes I et II (Gregoretta *et al*, 2004; Holbert & Marmorstein, 2005).

Les HDACs de classe I présentent un domaine catalytique très conservé qui couvre deux tiers de la protéine (Khochbin *et al*, 2001). HDAC1 et HDAC2 font partie de plusieurs complexes répresseurs de la transcription, dont Sin3, NuRD et CoREST (Knoepfler & Eisenman, 1999; You *et al*, 2001). Bien que les domaines catalytiques de ces deux enzymes soient très proches (similaires à 82%), elles semblent avoir des fonctions cellulaires indépendantes car l'invalidation de chaque gène ne conduit pas au même phénotype (Takami *et al*, 1999). HDAC3 n'est pas retrouvée au sein des complexes impliquant HDAC1 et 2, mais fait partie du cœur des complexes SMRT et N-CoR (Khochbin *et al*, 2001). Malgré l'appartenance à des complexes répresseurs différents, les trois HDACs de classe I sont surexprimées dans des cancers. Une inhibition des HDACs permet d'hyperacétyler la chromatine, et donc d'activer un grand nombre de gènes. Bien que les gènes ciblés et les conséquences exactes des différents inhibiteurs restent mal connus, de nombreux médicaments anticancéreux inhibant les HDACs de classe I sont en développement ou déjà utilisés, tel que le SAHA (Kelly *et al*, 2005). Dans les cellules tumorales, il est en effet assez fréquent que des gènes codant pour des suppresseurs de tumeurs soient anormalement réprimés, et hyperacétyler la chromatine permet de réactiver leur expression.

Les HDACs de classe II sont caractérisées par une taille nettement supérieure à celles de classe I. Les HDAC4, 5, 7 et 9 constituent la sous classe IIa. Elles font parties des complexes de répression qui modulent l'effet de facteurs de transcription tels que MEF2, NF-AT3c, BCoR et Runx3 (Khochbin *et al*, 2001; Yang & Gregoire, 2005). La classe IIb contient HDAC6 et HDAC10. HDAC6 est très particulière car elle contient deux domaines déacétylases et un domaine Znf-UBP capable de lier l'ubiquitine, et couple donc la déacétylation à la dégradation des protéines (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Verdel & Khochbin, 1999). HDAC6 est majoritairement cytoplasmique mais effectue une navette constante entre le noyau et le cytoplasme (Verdel *et al*, 2000). Cependant le substrat majoritaire de HDAC6 est la tubuline (Hubbert *et al*, 2002; Matsuyama *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003), soulignant l'importance fonctionnelle des HDACs sur des substrats non histones.

Les HDAC de classe III, appelées Sirtuines, utilisent le NAD comme cofacteur de leur activité déacétylase. La déacétylation d'une lysine par une Sirtuine utilise donc une molécule de NAD, et produit du nicotinamide et un O-acétyl-ADP ribose (Avalos *et al*, 2005). Les Sirtuines sont impliquées dans l'établissement et le maintien de la structure répressive présente au niveau des télomères. De plus, la protéine fondatrice de cette classe, Sir2, est

impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome et dans la voie de réparation de l'ADN, et influe sur la répression de la chromatine ainsi que sur la durée de vie chez la levure (Imai *et al*, 2000). Chez les souris, une délétion de SIRT6 entraîne également un raccourcissement de la durée de vie et un phénotype précoce de vieillesse. Il a enfin été montré que SIRT6 possède une activité de déacétylation spécifique de H3K9ac au niveau des télomères et de H3K56ac au cours du cycle cellulaire (Michishita *et al*, 2008; Michishita *et al*, 2009; Mostoslavsky *et al*, 2006).

IIB3diii) Conclusion acétylation

La plupart des HATs agissent au sein de complexes protéiques, qui potentialisent et régulent l'activité HAT de l'enzyme (Sterner & Berger, 2000). Pas moins de treize complexes HATs ont été purifiés à ce jour, avec de nombreux croisements entre complexes dus à la présence de sous unités communes (Carrozza *et al*, 2003). Par exemple le complexe SAGA de levure contient GCN5 et participe à l'activation de la transcription, tout comme le complexe NuA4, contenant la HAT Esa1 (famille MYST).

Il est généralement admis qu'une chromatine acétylée correspond à un état transcriptionnel actif (MacDonald & Howe, 2009). La déstabilisation de l'interaction histones/ADN des nucléosomes, et le fait que de nombreuses HATs soient également des co-activateurs transcriptionnels corroborent cette hypothèse. Les nombreux complexes dans lesquels des HATs forment des sous-unités ont également le plus souvent une action positive sur la transcription. De manière fort intéressante, bien que les complexes HAT aient de grandes redondances dans leur activité d'acétylation des histones, leurs fonctions diffèrent. Un exemple est celui de la levure et des complexes HATs SAGA, NuA3 et le complexe Elongateur. SAGA modifie préférentiellement H3K9, et plus faiblement H3K14, alors que NuA3 privilégie H3K14. Le complexe Elongateur possède les mêmes substrats que SAGA, mais agit dans les régions codantes des gènes au cours de la transcription alors que SAGA agit au niveau des promoteurs des gènes. Chez la levure, au moins 3 complexes différents existent avec la sous unité catalytique GCN5. Ainsi le contexte d'interaction dans lequel se situe une HAT va définir sa spécificité de substrat, ses régions de chromatine préférentielles, et les fonctions inhérentes à son activité (Lee & Workman, 2007).

New name	Human	D melanogaster	S. cerevisiae	S. pombe	Substrate specificity	Function
KMT1		Su(Var)3-9		Clr4	H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1A	SUV39H1				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1B	SUV39H2				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1C	G9a				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1D	EuHMTase/GLP				H3K9	Heterochromatin formation/silencing
KMT1E	ESET/SETDB1				H3K9	Transcription repression
KMT1F	CLL8					
KMT2			Set1	Set1	H3K4	Transcription activation
KMT2A	MLL1	Trx			H3K4	Transcription activation
KMT2B	MLL2	Trx			H3K4	Transcription activation
KMT2C	MLL3	Trr			H3K4	Transcription activation
KMT2D	MLL4	Trr			H3K4	Transcription activation
KMT2E	MLL5				H3K4	Transcription activation
KMT2F	hSET1A				H3K4	Transcription activation
KMT2G	hSET1B				H3K4	Transcription activation
KMT2H	ASH1	Ash1			H3K4	Transcription activation
KMT3			Set2	Set2	H3K36	Transcription activation
KMT3A	SET2				H3K36	Transcription activation
KMT3B	NSD1				H3K36	
KMT3C	SYMD2				H3K36 (p53)	Transcription activation
KMT4	DOT1L		Dot1		H3K79	Transcription activation
KMT5				Set9	H4K20	DNA-damage response
KMT5A	Pr-SET7/8	PR-set7			H4K20	Transcription repression
KMT5B	SUV4-20H1	Suv4-20			H4K20	DNA-damage response
KMT5C	SUV4-20H2					
KMT6	EZH2	E(Z)			H3K27	Polycomb silencing
KMT7	SET7/9				H3K4 (p53 and TAF10)	
KMT8	RIZ1				H3K9	Transcription repression

Figure I : nomenclature et caractérisation des histones méthyltransférases. (d'après Allis *et al.* , 2007)

New name	Human	D melanogaster	S. cerevisiae	S. pombe	Substrate specificity	Function
KDM1	LSD1/BHC110	Su(var)3-3		SpLsd1/Swm1/Saf110	H3K4me1/2, H3K9me1/2	Transcription activation and repression, heterochromatin formation
KDM2			Jhd1		H3K36me1/2	Transcription elongation
KDM2A	JHDM1a/FBXL11				H3K36me1/2	
KDM2B	JHDM1b/FBXL10				H3K36me1/2	
KDM3A	JHDM2a				H3K9me1/2	Androgen receptor gene activation, spermatogenesis
KDM3B	JHDM2b				H3K9me	
KDM4			Rph1		H3K9/K36me2/3	Transcription elongation
KDM4A	JMJD2A/JHDM3A				H3K9/K36me2/3	Transcription repression, genome integrity
KDM4B	JMJD2B				H3K9/H3K36me2/3	Heterochromatin formation
KDM4C	JMJD2C/GASC1				H3K9/K36me2/3	Putative oncogene
KDM4D	JMJD2D				H3K9me2/3	
KDM5		Lid	Jhd2	Jmj2	H3K4me2/3	
KDM5A	JARID1A/RBP2				H3K4me2/3	Retinoblastoma-interacting protein
KDM5B	JARID1B/PLU-1				H3K4me1/2/3	Transcription repression
KDM5C	JARID1C/SMCX				H3K4me2/3	X-linked mental retardation
KDM5D	JARID1D/SMCY				H3K4me2/3	Male-specific antigen
KDM6A	UTX				H3K27me2/3	Transcription activation
KDM6B	JMJD3					

Figure J : nomenclature et caractérisation des histones déméthyltransférases. (d'après Allis *et al.*, 2007)

New name	Human	D melanogaster	S. cerevisiae	S. pombe	Substrate specificity	Function
KAT1	HAT1	CG2051	Hat1	Hat1/Hag603	H4 (5, 12)	Histone deposition, DNA repair
KAT2		dGCN5/PCAF	Gcn5	Gcn5	H3 (9, 14, 18, 23, 36)/H2B; yHtz1 (14)	Transcription activation, DNA repair
KAT2A	hGCN5				H3 (9, 14, 18)/H2B	Transcription activation
KAT2B	PCAF				H3 (9, 14, 18)/H2B	Transcription activation
KAT3		dCBP/NEJ			H4 (5, 8); H3 (14, 18)	Transcription activation, DNA repair
KAT3A	CBP				H2A (5); H2B (12, 15)	Transcription activation
KAT3B	P300				H2A (5); H2B (12, 15)	Transcription activation
KAT4	TAF1	dTAF1	Taf1	Taf1	H3 > H4	Transcription activation
KAT5	TIP60/PLIP	dTIP60	Esa1	Mst1	H4 (5, 8, 12, 16); H2A (yeast 4, 7; chicken 5, 9, 13, 15); dH2Av/yHtz1 (14)	Transcription activation, DNA repair
KAT6		(CG1894)	Sas3	(Mst2)	H3 (14, 23)	Transcription activation and elongation, DNA replication
KAT6A	MOZ/MYST3	ENOK			H3 (14)	Transcription activation
KAT6B	MORF/MYST4				H3 (14)	Transcription activation
KAT7	HBO1/MYST2	CHM		(Mst2)	H4 (5, 8, 12) > H3	Transcription, DNA replication
KAT8	HMOF/MYST1	dMOF (CG1894)	Sas2	(Mst2)	H4 (16)	Chromatin boundaries, dosage compensation, DNA repair
KAT9	ELP3	dELP3/CG15433	Elp3	Elp3	H3	
KAT10			Hap2		H3 (14); H4	
KAT11			Rtt109		H3 (56)	Genome stability, transcription elongation
KAT12	TFIIIC90				H3 (9, 14, 18)	Pol III transcription
KAT13A	SRC1				H3/H4	Transcription activation
KAT13B	ACTR				H3/H4	Transcription activation
KAT13C	P160				H3/H4	Transcription activation
KAT13D	CLOCK				H3/H4	

Figure K : nomenclature et caractérisation des histones acétyltransférases. (d'après Allis *et al.*, 2007)

Ces variations s'expliquent par les différents domaines d'association à la chromatine présents au sein de ces complexes, et confirment la grande interaction des différentes marques épigénétiques pour créer un « code histone » capable d'être décrypté par la machinerie cellulaire. Par exemple CBP/p300, faisant partie d'un complexe avec l'ARN polymérase II non phosphorylée, participerait ainsi préférentiellement à l'étape d'initiation de la transcription, alors que PCAF est associé à l'ARN polymérase II lorsqu'elle est phosphorylée et donc active. Ceci suggère un rôle de PCAF dans l'étape d'élongation de la transcription (Cho *et al*, 1998). Il est intéressant de noter que la protéine BRD4, que nous détaillerons plus tard, est capable de s'associer à la chromatine acétylée notamment par CBP/p300 au niveau des promoteurs, et permet de recruter le complexe P-TEFb responsable de la phosphorylation de l'ARN polymérase II (Yang *et al*, 2005).

Il est facile de faire un raccourci selon lequel les HATs sont associables à une transcription active et les HDACs à une répression. Cependant une étude à l'échelle du génome des sites de fixations des HATs et des HDACs montrent que ces deux facteurs contradictoires peuvent se retrouver tous deux associés au niveau de gènes activés par l'ARN polymérase II. L'hypothèse la plus probable est que les HDACs vont alors pouvoir réprimer le gène rapidement après qu'il soit transcrit. Sur certaines régions, il semble au contraire y avoir un dynamisme perpétuel de la chromatine acétylée/déacétylée, ce qui pourrait permettre de garder les gènes réprimés mais rapidement activables par la machinerie transcriptionnelle si besoin (Wang *et al*, 2009c).

Les marques d'acétylation des histones ne sont pas aussi clairement réparties le long du génome et corrélées à une fonction précise comme peuvent l'être les marques de méthylation des histones. Mais certaines spécificités existent cependant. Le profil à l'échelle du génome des différentes marques d'acétylation a été révélé lors des travaux de l'équipe de K. Zhao sur les cellules humaines T CD4+. Leurs observations suggèrent que H3K9ac, retrouvée préférentiellement au niveau des promoteurs, puisse jouer un rôle dans l'étape d'initiation de la transcription, alors que des marques comme H3K14ac, H3K23ac et H4K12ac, détectées dans les régions transcrites des gènes, soient importantes pour l'étape d'élongation de la transcription (Wang *et al*, 2008). Il existe également quelques exemples de signalisation relativement bien décrits, comme celle induite par la marque H4K16ac. De manière générale, une baisse globale de H4K16ac équivaut à une baisse globale de la transcription. Bien que plusieurs HATs puissent acétyler ce résidu, le complexe SAS chez la

levure et MSL chez la drosophile le font pour des fonctions bien précises. Au niveau des télomères, le complexe SAS est responsable spécifiquement de H4K16ac et empêche la propagation de l'hétérochromatine par la HDAC Sir2. En effet, une délétion de SAS entraîne une diminution de H4K16ac et une dérégulation des télomères (Shia *et al*, 2006). Chez la drosophile, la surexpression du chromosome X chez les mâles (système de compensation de dose par rapport au double X chez les femelles) est corrélée avec la marque H4K16ac spécifiquement acétylée par MOF au sein du complexe MSL (Gelbart *et al*, 2009). Pour ajouter à cette complexité, il faut savoir que la version humaine du complexe MSL est associée à une acétylation globale de H4K16ac, alors que le complexe chez la drosophile est relativement spécifique au chromosome X. Une fois encore, cette différence semble s'expliquer par les partenaires de MOF au sein de ce complexe. Chez l'homme, MOF est également associée à d'autres complexes, notamment MLL, ce qui peut lui conférer une fonction plus générale sur la chromatine, alors que chez la drosophile, le complexe MSL est associé aux composants ARN rox qui le cible sur le chromosome X. (Lee & Workman, 2007).

Enfin, la caractérisation en 2009 de l' « acétylome » a permis de déterminer plus de 3600 lysines acétylables réparties sur plus de 1750 protéines (Choudhary *et al*, 2009). Ainsi, le système de régulation de cette marque d'acétylation est vaste et fait de cette marque post-traductionnelle une voie de signalisation aussi importante que peuvent l'être la méthylation et la phosphorylation, touchant à la fois aux histones et composants de la chromatine qu'à de nombreuses autres protéines.

IIB3e) Le code histone

Ces différentes marques pourraient servir de balises de reconnaissance à une information épigénétique, et en 2000, la notion d'un « code histone » a été proposée (Strahl & Allis, 2000). La combinaison de toutes ces marques pourrait donc être lue et analysée par la machinerie cellulaire afin d'entraîner une cascade d'événements spécifiques.

Le processus d'inactivation du chromosome X chez les mammifères est un exemple caractéristique de dialogue épigénétique conduisant à l'inactivation d'une région de 160 mégabases. Cette inactivation débute par une perte des marques d'euchromatine (H4ac, H3K9ac, H3K4me2-3) (Chaumeil *et al*, 2002; Keohane *et al*, 1996). Des nouvelles modifications épigénétiques sont alors rapidement détectées : H3K27me3, H3K9me2,

H4K20me1 et H2AUb1 (de Napoles *et al*, 2004). Le variant d'histone macroH2A serait alors incorporé, aidant à réprimer la transcription (Angelov *et al*, 2003; Chakravarthy *et al*, 2005; Doyen *et al*, 2006). Enfin, l'ADN est méthylé au niveau des promoteurs des gènes réprimés par un mécanisme encore mal connu (Heard, 2005).

Une récente étude publiée confirme également l'inter-connectivité entre les marques post-traductionnelles des histones et les facteurs chromatiniens capables de déchiffrer ce code et de réguler alors directement la machinerie transcriptionnelle. En effet, une connexion entre la phosphorylation de H3S10 et l'acétylation de H4K16 a été observée. Une stimulation des cellules par sérum induit la kinase PIM1 à phosphoryler H3S10 sur les histones H3 préalablement acétylées sur la lysine 9 (H3K9ac), au niveau des séquences stimulatrices du gène FOSL1. La protéine adaptatrice 14-3-3 s'associe alors avec cette serine phosphorylée et recrute l'histone acétyltransférase MOF. L'enzyme MOF va alors acétyler la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac), créant un environnement H3K9ac/H3S10ph/H4K16 propice au recrutement de la protéine à double bromodomaine BRD4. La protéine BRD4 va alors à son tour recruter le facteur P-TEFb, qui va phosphoryler le domaine CTD de l'ARN polymérase II, qui était jusqu'alors bloquée en étape d'initiation de la transcription au niveau du promoteur du gène FOSL1. Cette activation de la polymérase lui permet de débiter l'étape d'élongation de la transcription et augmente sa processivité (Figure L p61) (Zippo *et al*, 2009).

De plus, la cartographie globale des différentes marques d'histones sur le génome est en train d'être réalisée sur différents types de cellule par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à différents systèmes d'analyse, comme les puces à ADN, l'analyse en série d'expression génique ou le séquençage parallèle massif (ChIP-chip, ChIP-SAGE et ChIP-seq respectivement (Schones & Zhao, 2008)). Ces données permettent d'établir un épigénome spécifique pour chaque type de cellules, et de mieux comprendre les pathologies découlant de dérégulations épigénétiques.

L'association des nucléosomes eux-mêmes le long de la double hélice d'ADN, et leur localisation au niveau de séquences spéciale de l'ADN vont également réguler la machinerie cellulaire. La capacité de déplacer les nucléosomes, et de faciliter ainsi l'accès à l'information génétique, peut être assimilée à une régulation épigénétique.

IIB3f) Mobilisation des nucléosomes par les facteurs de remodelage

Les nucléosomes sont des entités très stables dont la mobilité est réduite. Les chaperons d'histones favorisent la formation des nucléosomes *in vitro* et *in vivo*, mais les répartissent de manière aléatoire le long de la fibre de chromatine. L'action de facteurs de remodelage permet d'établir un espacement constant des nucléosomes, car ils mobilisent les nucléosomes le long de la fibre de chromatine (Almouzni & Mechali, 1988). Lors de l'activation de la transcription, d'autres facteurs de remodelage désorganisent l'espacement des nucléosomes, exposant ainsi les séquences régulatrices aux protéines effectrices.

Cinq familles de facteurs de remodelage sont distinguées chez les organismes eucaryotes : Swi/Snf, Iswi, NURD/Mi2/CHD, Ino80 et SWR1. Tous les facteurs de remodelage possèdent une sous unité ATPase, qui constitue le moteur du complexe et la base de leur classification. Historiquement, les facteurs de remodelage ont été décrits comme capables de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine, mais leurs activités ont été étendues récemment à l'éviction d'histones de la fibre de chromatine, et au dépôt de variants d'histone.

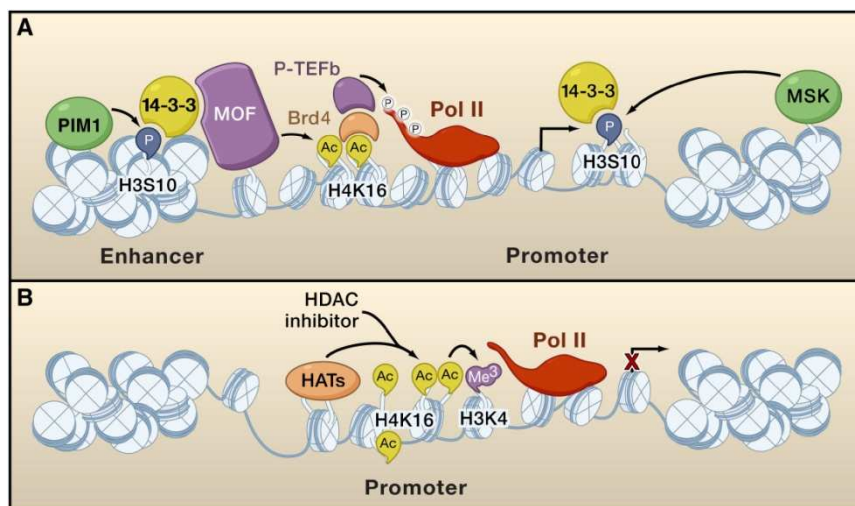


Figure L : Connexion entre différentes marques et acteurs d'une information épigénétique afin de réguler la transcription cellulaire. (lee et al, 2010)

La famille SWI/SNF

Les facteurs de la famille Swi/Snf désorganisent l'espace régulier des nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes (Boeger *et al*, 2003; Martens & Winston, 2003; Reinke & Horz, 2003). Les séquences d'ADN régulatrices sont ainsi accessibles aux facteurs d'initiation de la transcription. Après acétylation des histones du promoteur par les complexes HATs NuA4 et/ou SAGA, le complexe Swi/Snf est recruté par le bromodomaine de sa sous unité ATPase (Hassan *et al*, 2002). Certaines sous unités des complexes Swi/Snf contiennent plusieurs bromodomains et reconnaissent spécifiquement certains résidus acétylés (Kasten *et al*, 2004).

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer comment l'action de SWI/SNF rend l'ADN accessible. Le glissement d'un nucléosome implique la rupture simultanée de quatorze liaisons ADN-histones. Le modèle actuel propose qu'un surplus d'ADN soit poussé à l'entrée du nucléosome. Ce bourrelet d'ADN serait glissé le long du nucléosome, de la même manière que l'on chasse un pli sur un vêtement. Ainsi la majorité des liaisons ADN-histones n'est pas rompue simultanément car le glissement de l'ADN le long du nucléosome implique la cassure transitoire d'un petit nombre de liaisons hydrogènes (Zofall *et al*, 2006).

La famille ISWI

La famille Iswi est définie par la sous unité ATPase du complexe ACF/CHARC (Loyola & Almouzni, 2004). Le complexe homologue chez l'homme, appelé RSF (Remodeling and Spacing factor), cumulerait les fonctions de chaperon d'histones et de facteur de remodelage, puisqu'il est capable à lui seul d'incorporer des nucléosomes de manière régulière lors de l'assemblage de la chromatine (Loyola *et al*, 2001). Le mécanisme d'action des complexes ISWI est globalement identique à celui de la famille SWI/SNF.

La sous unité ATPase du complexe Iswi contient également deux domaines de reconnaissance des histones, un domaine SANT et un domaine SLIDE, qui fixeraient respectivement les queues N terminales des histones et l'ADN qui sort du nucléosome (Grune *et al*, 2003).

La famille Mi2/NURD/CHD

Le complexe NURD induit une répression forte de la transcription, médiée notamment par l'action des HDACs présentes au sein du complexe. La sous unité ATPase du complexe NURD contient également un chromodomaine, ce qui participerait à son ciblage vers les zones à réprimer. De plus, MBD3 a été identifiée comme membre des complexes NURD/Mi2 par plusieurs groupes, ce qui suggère un ciblage vers les régions méthylées. La protéine MBD2 pourrait également être intégrée à certains de ces complexes (Bowen *et al*, 2004).

Les complexes Ino80 et SWR1

Le complexe Ino80, que certains classent dans la superfamille Swi/Snf, est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins (Morrison *et al*, 2004; van Attikum *et al*, 2004). Nhp10 reconnaît le variant d'histone H2A.X, et cible l'action du complexe au niveau de la cassure. Ino80 désassemblerait alors la chromatine afin de faciliter l'accès à l'extrémité de l'ADN lésé. (Li *et al*, 2005).

Le complexe SWR1 permet la déposition du variant H2A.Z, et régule ainsi l'initiation de la transcription. Il pourrait également jouer un rôle dans la réparation des cassures doubles brins, en remplaçant γ H2A.X par une version non phosphorylée (Cairns, 2004). Il serait également impliqué dans le remodelage général de la chromatine, associé à la réparation des cassures doubles brins (Downs *et al*, 2004).

Enfin, outre les modifications portées par les histones de cœur, les nucléosomes peuvent être composés de protéines histones alternatives, appelées variants d'histones, capables d'apporter une véritable information spécifique sur leur lieu d'incorporation.

IIB3g) Les variants d'histones

Les variants d'histones de liaison

Dix isoformes d'histones de liaison ont été décrites à ce jour. La majeure partie des variations est présente dans les zones N et C terminales, et la région globulaire centrale est la plus conservée (Khochbin, 2001). Les gènes codants ces isoformes auraient évolué de manière à lier l'expression de ces variants aux signaux contrôlant la prolifération cellulaire.

Ainsi des isoformes différentes des variants d'histone de liaison sont détectées à différents stades de différenciation. Chez le xénope, le variant B4 est présent au début du développement dans des cellules à division rapide. Par contre, les cellules en phase de différenciation finale sont enrichies en variant H1°, mais cet enrichissement est perdu en cas de dédifférenciation, par exemple lors de la régénération du foie après ablation chirurgicale (Gjerset *et al*, 1982).

Ainsi, on peut différencier les variants exprimés dans un contexte embryonnaire, de réplication ou de différenciation. Pourtant, aucun rôle fonctionnel distinct ne semble se dégager pour chaque isoforme : des expériences d'inactivation de gènes indiquent que les grandes fonctions cellulaires, telle que la transcription, ne sont pas modifiées en l'absence de variants d'histone, mais laissent supposer un rôle épigénétique encore mal compris, agissant probablement au niveau de l'organisation et de la structuration globale de la chromatine (Khochbin, 2001).

Les variants d'histones de cœur

Il existe de nombreux variants d'histones de cœur, dont certains ont une fonction encore obscure. Seul les principaux variants et leurs conséquences seront détaillés dans ce chapitre.

H2A.Z facilite l'initiation de la transcription et les variants homologues à H2A.Z ont été conservés au cours de l'évolution. La distribution d'Htz1, son homologue chez la levure, a été évaluée à l'échelle d'un génome entier chez *Saccharomyces cerevisiae*. Htz1 est enrichie dans les promoteurs de gènes, et est peu présente dans les régions réprimées tels que les domaines subtélomériques (Guillemette *et al*, 2005; Raisner *et al*, 2005). Ainsi, H2A.Z favoriserait une activation de la transcription. La déposition d'H2A.Z est dirigée par un signal codé par l'ADN et l'acétylation de la queue N terminale des histones (Raisner *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005a). Le complexe d'assemblage d'Htz1 a été purifié chez la levure, et sa sous unité catalytique est Swr1 (Mizuguchi *et al*, 2004). La sous unité Swc2 lie également H2A.Z et est essentielle à son dépôt dans la chromatine (Wu *et al*, 2005). La protéine à double bromodomaines Bdf1 est présente au sein du complexe : elle ciblerait l'insertion d'H2A.Z en reconnaissant une acétylation d'H3 et/ou d'H4.

H2A.X intervient dans la réparation des cassures double brins de l'ADN. Le variant H2A.X est présent au sein de l'ensemble du règne animal. C'est la seule histone H2A présente chez la levure et chez certains champignons (Malik & Henikoff, 2003). Une phosphorylation massive d'H2A.X sur sa sérine 139 a lieu lors de la réparation d'une cassure double brins de l'ADN. La forme phosphorylée d'H2A.X, appelée gamma-H2A.X est détectée dans tous les contextes cellulaires mettant en jeu des cassures double brins : agression par des agents extérieurs, apoptose, réplication, recombinaison des zones V(D)J lors de la maturation des lymphocytes et recombinaison homologue lors de la méiose. Trois kinases de la famille des PI3 kinases peuvent phosphoryler H2A.X : ATM, DNA-PK et ATR (Stiff *et al*, 2004). H2A.X n'est pas impliquée dans le recrutement initial des facteurs essentiels à la réparation des cassures doubles brins, mais dans leur accumulation (Celeste *et al*, 2003). Il est reconnu par Arp4, sous unité commune des complexes de remodelage NuA4, Ino80 et Swr1 (Downs *et al*, 2004). Ces complexes permettraient alors de modifier la structure de la chromatine, de telle sorte que la réparation de l'ADN puisse avoir lieu.

MacroH2A (mH2A) réprime la transcription, et est un variant d'H2A contenant une région carboxy-terminale de très grande taille (20 kD) (Pehrson & Fried, 1992). Le variant mH2A est associé à une répression forte de la transcription, et serait notamment enrichi au sein du chromosome X inactif (Costanzi & Pehrson, 1998; Costanzi & Pehrson, 2001). De plus, l'histone mH2A est détectée dans des foyers d'hétérochromatines apparaissant dans les cellules quiescentes ou sénescents (Grigoryev *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2005b). MacroH2A a un effet répresseur de la transcription à deux niveaux. In vitro, il a été montré qu'elle bloque l'action de la HAT p300, interférant ainsi dans la cascade de modifications post traductionnelles des histones nécessaires à l'initiation de la transcription (Doyen *et al*, 2006). Cet effet a été confirmé in vivo, car les nucléosomes contenant mH2A sont moins acétylés que ceux contenant H2A (Chakravarthy *et al*, 2005), et l'interaction de mH2A avec HDAC1 et HDAC2 minimise l'acétylation des histones voisines. De plus, mH2A bloque l'action de complexes de remodelage de la chromatine, nécessaire à la mobilisation des nucléosomes lors de la transcription (Doyen *et al*, 2006).

Cinq isoformes distinctes d'H3 sont présentes chez les mammifères, H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A.

Les variants d'H3 spécifiques des centromères (CENP-A et homologues, cenH3) sont un des piliers de la construction des centromères, car indispensables à la formation des kinétochores, eux-mêmes responsables de l'attachement des microtubules et de la ségrégation chromosomique lors de la mitose et de la méiose (Blower & Karpen, 2001). En outre, les centromères ne sont pas définis par une séquence d'ADN spécifique mais par la présence des cenH3, ce qui a servi historiquement à leur cartographie chez les plantes et les animaux (Henikoff & Ahmad, 2005). L'incorporation des cenH3 se produirait de manière indépendante de la réplication (Amor *et al*, 2004) et des approches biochimiques récentes ont permis de purifier un complexe d'incorporation (Foltz *et al*, 2006; Okada *et al*, 2006). Récemment, le chaperon de CENP-A a été découvert. Avant d'être incorporé au sein des nucléosomes centromériques, CENP-A est complexée avec H4, la nucléophosmine 1 et HJURP. Cette dernière s'associe à CENP-A via son domaine de ciblage aux centromères, CATD, et est indispensable pour l'incorporation du variant d'histone (Foltz *et al*, 2009).

Le variant d'histone H3.3 est enrichi dans les zones de transcription active. H3.3 est chaperonné par une protéine spécifique, HIRA, qui le différencie des autres H3 et favorise son incorporation dans les régions transcriptionnellement actives (Tagami *et al*, 2004). Ce variant est enrichi en marques de transcription active, à savoir une hyperacétylation et une diméthylation d'H3K36 et H3K79 (Hake *et al*, 2006).

L'hypothèse du « code barre des histones »

Des protéines très similaires dévoilent ainsi des modifications post traductionnelles très différentes. Les cenH3 sont spécifiques des centromères. H3.3 est associée à une transcription active, tandis qu'H3.1 et H3.2 auraient des rôles différents encore mal compris (Hake & Allis, 2006). David Allis et coll. ont étendu récemment la portée du code histone, en introduisant la notion de « code barre » des histones (Hake & Allis, 2006). Ils supposent que chaque variant d'H3 a un rôle spécifique et porte une information épigénétique particulière. La répartition des variants d'histone au sein de la chromatine indexerait l'information épigénétique. Cette hypothèse peut naturellement être étendue à tous les variants d'histone, mais suppose des mécanismes d'assemblage et de régulation encore mal connus.

Nous avons ainsi pu apercevoir les capacités phénoménales de plasticité que l'épigénétique apporte à l'information génétique figée. Après avoir détaillé certains des mécanismes, certaines des voies de signalisations, et les acteurs potentiels capables de moduler cette information épigénétique, deux exemples seront présentés ci-après : les connaissances actuelles sur un groupe de protéines capable de lire et interpréter l'information épigénétique afin de réguler les événements cellulaires, la famille BET, et un modèle concret de remodelage de l'information épigénétique au niveau cellulaire, la spermatogenèse.

IIC) Un exemple d'acteurs épigénétiques : la famille BET

IIC1) Introduction

Les protéines BET forment une famille extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. On les retrouve aussi bien chez les plantes que chez le xénope ou l'homme. Il existe deux membres chez la levure (Bdf1 et Bdf2), deux chez la drosophile (fshS et fshL) et chez les mammifères on dénombre quatre membres dont trois ubiquistes, BRD2, BRD3, BRD4 et un spécifique du tissu testiculaire, BRDT. La particularité de cette famille est que ses membres possèdent un double bromodomaine leur permettant une association forte à la chromatine acétylée, sur différents résidus lysines acétylés. Elles possèdent également un second domaine caractérisé qui leur est propre, le domaine Extra-Terminal, permettant des interactions protéine-protéine (Figure M, p68) (Florence & Faller, 2001).

IIC2) Association à la chromatine acétylée

Les bromodomains de la famille BET présentent des affinités différentes au sein d'un environnement chromatinien acétylé. Par exemple, BRD2 s'associe à l'histone H4 acétylée plutôt que H3ac, et ceci s'explique par le fait que le premier bromodomaine de BRD2 se lie à

H4K12ac, alors que le second bromodomaine peut se lier à H4K5ac ou H4K12ac (Umehara *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que le premier bromodomaine de BRDT est capable de reconnaître deux modifications post-traductionnelles à lui seul, H4K5ac et H4K8ac, alors que le second s'associe à H3K18ac, laissant donc imaginer une association de la protéine aux nucléosomes via deux histones à la fois (Moriniere *et al.*, 2009). Les bromodomains de BRD4 quant à eux sont capables de reconnaître H3K14ac, H4K5ac et H4K12ac (Dey *et al.*, 2003). Ces trois protéines présentent donc des affinités différentes pour la chromatine, ce qui pourrait les cibler sur des régions spécifiques du génome. Enfin il est intéressant de noter que BRD4 est capable d'interagir avec la sous-unité RelA du facteur NF-KappaB acétylée sur la lysine 301, ce qui laisse supposer que les histones ne sont pas les seuls partenaires acétylés reconnus par les bromodomains (Huang *et al.*, 2009).

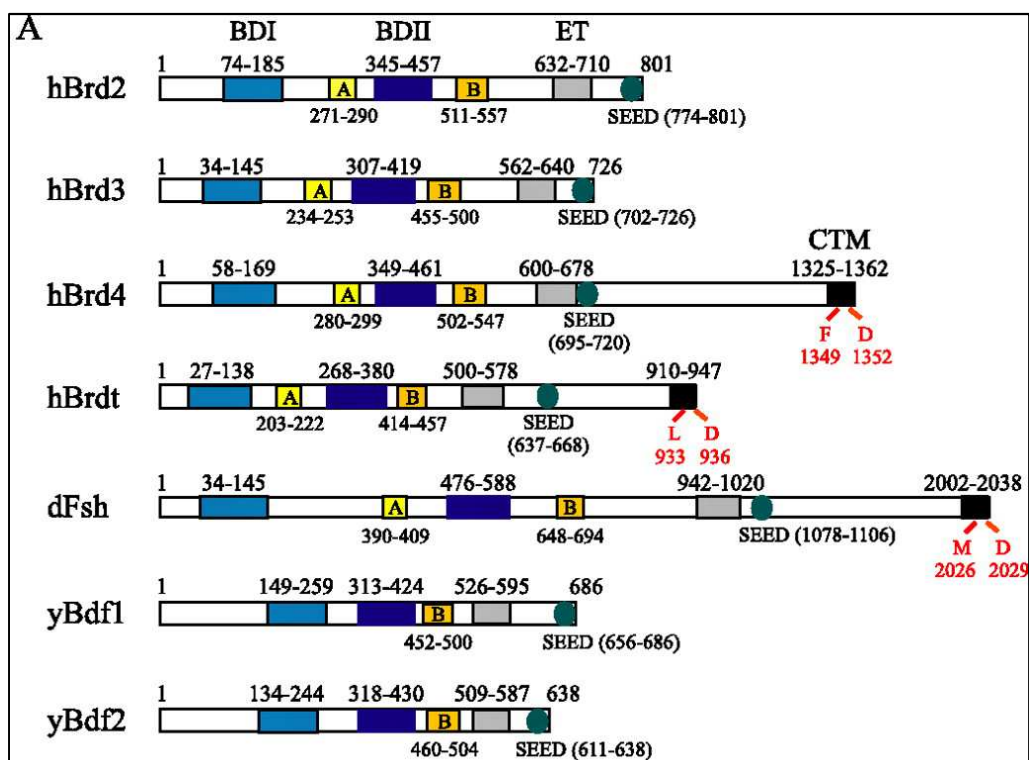


Figure M : Famille BET

Présentation des membres de la famille BET chez l'homme, la drosophile et la levure. (issu de Florence & Faller, 2001)

IIC3) Un rôle vital pour la cellule

Les protéines BET sont indispensables chez les différents organismes de par leur potentiel rôle central d'intermédiaire entre la chromatine et les facteurs nucléaires. Ainsi, les levures déficientes en Bdf1 présentent de graves troubles méiotiques et les doubles mutants Bdf1/Bdf2 ne sont pas viables (Chua & Roeder, 1995). La mutation nulle du gène FSH de la drosophile est également létale, notamment parce qu'elle induit une répression de l'homéogène Ubx. De plus, une surexpression de Fsh-S induit une expression ectopique de Ubx (Chang *et al*, 2007b; Digan *et al*, 1986).

Ces protéines semblent également indispensables au développement embryonnaire chez la souris. Les souris KO pour BRD2 sont létales à l'état embryonnaire (E 11.5), avec de sévères défauts de formation du tube neural ainsi qu'un retard de croissance, et les fibroblastes déficients pour BRD2 ont une prolifération ralentie (Gyuris *et al*, 2009; Shang *et al*, 2009). De façon similaire, le KO de BRD4 est léthal, et les souris hétérozygotes BRD4^{+/-} présentent de graves défauts pré et post-natal de croissance, avec réduction de la prolifération cellulaire (malformation craniale, absence de graisse sous-cutanée, cataractes). De plus, la moitié de ces souris meurt dans les 2 semaines après la naissance (Houzelstein *et al*, 2002). La délétion du premier bromodomaine de BRDT, spécifique des cellules germinales, est associée à une infertilité des souris mâles homozygotes ^{-/-}, avec des altérations dans les stades tardifs de la spermatogenèse (Shang *et al*, 2007). Enfin, une dérégulation de l'activité de ces protéines semble responsable de nombreuses maladies. Par exemple, la perturbation de l'expression de BRD2 est corrélée à une sévère obésité chez la souris, sans induire de diabète de type 2 (Wang *et al*, 2010) et un polymorphisme du gène BRD2 est impliqué dans des troubles épileptiques (Pal *et al*, 2003). Des translocations chromosomiques impliquant les gènes BRD4 ou BRD3 sont impliquées dans des cancers extrêmement agressifs (French *et al*, 2008). BRD2 est surexprimée dans des lymphomes et lignées leucémiques et BRDT dans des cancers du poumon. Enfin, ces facteurs épigénétiques sont couramment détournés de leur fonction principale par les virus (Ottinger *et al*, 2006; Schweiger *et al*, 2006).

IIC4) Acteurs d'une mémoire épigénétique

Contrairement aux autres facteurs d'organisation de la chromatine, en particuliers les autres protéines à bromodomaine, les protéines BET sont capables de rester fixées aux chromosomes durant la division mitotique. Ceci laisse supposer qu'elles puissent jouer un rôle important au cours de la mitose et qu'elles participent au maintien d'une mémoire épigénétique à travers les divisions cellulaires. En effet l'état de différenciation d'une cellule et le déterminisme de sa lignée *in vivo* est généralement stable sur une longue période pendant laquelle la cellule subira de nombreux cycles de division, ce qui requiert le transfert d'une information épigénétique de la cellule mère à sa fille. Au cours de l'embryogenèse du zebrafish, BRD4 reste associée aux chromosomes mitotiques (Toyama *et al*, 2008). Chez *C.elegans*, la protéine BET-1 est indispensable pour le maintien de la spécificité de différents types cellulaires, et sa fonction semble importante à la fois lors de la période de l'établissement du stade de différenciation, et à la fois dans la période de maintien de cet état différencié (Shibata *et al*, 2010).

L'action des protéines BET au cours des divisions cellulaires pourrait se faire à plusieurs niveaux. Premièrement, elle pourrait protéger et ainsi empêcher la perte de marques acétylées de la chromatine qui a normalement lieu lors de la mitose. En effet, BRD4 semble nécessaire pour la maintenance de l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 et de la lysine 12 de l'histone H4 durant la mitose (Nishiyama *et al*, 2006). Deuxièmement, elles pourraient participer au bon déroulement de la mitose. L'utilisation d'une drogue anti-mitotique réversible (nocodazole) montre en effet que l'arrêt en mitose entraîne une dissociation de BRD4 des chromosomes mitotiques et que le redéclenchement de la mitose entraîne sa réassociation (Nishiyama *et al*, 2006). De plus, les cellules BRD4^{+/-} présentent des troubles de la mitose avec une mauvaise ségrégation des chromosomes, une tétraploïdie et de l'apoptose (Nishiyama *et al*, 2006). De plus, la suppression de BRD4 dans des lignées tumorales humaines par siRNA induit la perte de l'expression de la protéine Aurora B indispensable à la mitose (You *et al*, 2009).

Enfin, les protéines BET pourraient participer à la transmission d'un programme transcriptionnel spécifique à travers les divisions cellulaires. Ainsi, il a été observé que BRD4 reste préférentiellement associé lors de la mitose au niveau des gènes qui vont être réactivés aussitôt après la fin du cycle, ciblant alors la machinerie transcriptionnelle sur ces gènes et

permettant leur transcription rapide (Dey *et al*, 2009). Il est intéressant de noter cependant que BRD4 ne semble pas associée aux chromosomes lors de la méiose des ovocytes de la souris (Nagashima *et al*, 2007). Cette capacité à rester associée aux chromosomes mitotiques est d'ailleurs utilisée par certains virus, qui grâce à des protéines virales interagissant avec les protéines BET, vont coupler leur génome à celui de la cellule hôte, permettant alors une ségrégation du virus au sein des deux cellules filles (McBride *et al*, 2004).

IIC5) Régulateurs du cycle cellulaire

L'action des protéines BET sur le cycle cellulaire ne se retirent cependant pas à la mitose. Par exemple, BRD3 peut être associée à la prolifération cellulaire car son expression est réprimée durant l'entrée en différenciation des cellules endothéliales (Ishii *et al*, 2005). La protéine BRD2 quant à elle est retrouvée cytoplasmique dans des cultures de cellules quiescentes différenciées en phase Go, et devient exclusivement nucléaire après induction de la prolifération cellulaire par des agents mitogènes (Guo *et al*, 2000). De plus une surexpression de BRD2 augmente la prolifération cellulaire et accélère le cycle cellulaire en activant la transcription de la Cycline A (Sinha *et al*, 2005). Un rôle de BRD2 dans l'activation transcriptionnelle de gènes par E2F a ainsi été mis en évidence. La dissociation des activateurs E2F1 et E2F2 du complexe inhibiteur de Rb en fin de période G1 induit l'expression par la voie Ras de nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire. Or, il a été observé que BRD2 est présent sur le promoteur de la Cycline A au cours du cycle cellulaire et qu'elle interagit avec le facteur E2F. En s'associant aux facteurs de transcription E2F1 ou E2F2, BRD2 co-stimule donc avec Ras l'expression spécifique de la Cycline A par ces facteurs (Denis *et al*, 2000). Durant le reste du cycle cellulaire, BRD2 perd son association avec E2F2, pour être remplacé par E2F4, qui est quant à lui un répresseur transcriptionnel.

BRD2 et BRD3 ont également été retrouvé associés au niveau de la séquence codante du gène de la Cycline D1. L'inhibition par siRNA de BRD3 entraîne une mort cellulaire mais l'inhibition de BRD2 entraîne une baisse spécifique de l'expression de la Cycline D1 (LeRoy *et al*, 2008). Enfin, l'expression de BRD4 est positivement régulée par l'induction de la prolifération cellulaire, et réprimée dans le cas contraire (Dey *et al*, 2000). L'inhibition par

siRNA de BRD4 entraîne une baisse de la transcription des gènes clés de la phase G1 et associés à la croissance cellulaire, avec un arrêt du cycle et une entrée en apoptose (Mochizuki *et al*, 2008; Yang *et al*, 2008).

IIC6) Régulateurs majeurs de la transcription cellulaire

De nombreux travaux ont élargi le rôle des protéines BET à la régulation globale de la transcription. Crowley T et coll. observent une interaction de BRD2 avec le complexe Médiateur TRAP (via TRAP220), qui lui-même interagit avec l'ARN polymérase II, responsable de la transcription des gènes de classe II (Crowley *et al*, 2004). La protéine BRD2 pourrait ainsi participer à la transcription non seulement en recrutant des facteurs de transcription au niveau de promoteurs spécifiques, mais également en recrutant indirectement, via TRAP, l'ARN polymérase II elle-même. De plus, il a été montré par co-immunoprécipitation que BRD2 s'associe à un complexe protéique contenant une HAT et des membres du complexe de remodelage de la chromatine, SWI/SNF (Denis *et al*, 2006). Un autre rôle de BRD2 pourrait donc être de recruter une activité enzymatique d'acétylation au niveau des histones, et participer alors à la propagation du marquage d'acétylation de la chromatine. De plus, le recrutement possible de facteurs de remodelage modifierait la conformation de la chromatine, régulant par là-même l'expression des gènes.

Un rôle supplémentaire a été attribué à BRD2. Comme BRD3, BRD2 est associée sur la totalité de la région codante des gènes, riche en H4K5ac, H4K12ac et H3K14ac. LeRoy et coll. démontrent que BRD2 et BRD3 facilitent l'élongation de la polymérase au passage des nucléosomes et soumettent l'idée que BRD2 puisse avoir une activité de chaperon d'histone (LeRoy *et al*, 2008).

Parallèlement, deux études ont mis en évidence l'implication de BRD4 dans la régulation transcriptionnelle. Elles montrent que BRD4 interagit avec le complexe P-TEFb, au niveau d'une de ses deux sous-unités, la Cycline T1 (Jang *et al*, 2005; Yang *et al*, 2005). Ce complexe permet la transition entre la phase d'initiation et la phase d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II, en stimulant la processivité de celle-ci par phosphorylation d'une de ses sous-unités. Le complexe P-TEFb est retrouvé sous deux formes

dans la cellule. Quand il est couplé à la sous-unité inhibitrice 7SK small nuclear RNA (7SK snRNA), P-TEFb est inactif. La forme active de ce complexe résulte de sa dissociation de 7SK snRNA et de son association avec BRD4. BRD4 et P-TEFb semblent en réalité être les acteurs principaux d'une transcription spécifique. Byun et coll. ont montré que les protéines CBP/p300 et l'ARN polymérase II sont généralement constitutivement associées à la partie promotrice des gènes, et que le recrutement de P-TEFb par association de BRD4 à la chromatine au niveau de ces promoteurs est le facteur déclenchant de la transcription (Byun *et al*, 2009). De plus, comme BRD2, BRD4 est associée au Complexe Médiateur TRAP. Ainsi, BRD4 pourrait activer la transcription en stimulant à la fois le recrutement de l'ARN polymérase II via TRAP et l'activation de cette polymérase par P-TEFb (Figure N, p74).

Enfin, la protéine BRD4 est capable d'induire la transcription dépendante de NF-kappaB, non pas via son association à la chromatine acétylée, mais en interagissant directement par ses bromodomains avec la protéine RelA acétylée. (Huang *et al*, 2009)

Chez la levure, une des fonctions caractérisée de Bdf1 est sa capacité à fixer le facteur général de transcription TFIID, nécessaire à l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription (Matangkasombut & Buratowski, 2003). Les fonctions semblent donc relativement similaires à celles des protéines humaines BRD2 et BRD4. Il est intéressant de noter également que BDF1 fixe la chromatine à proximité des télomères et empêche la fixation de SIR2, une protéine HDAC responsable de la répression des régions télomériques. Une mutation de Bdf1 entraîne la propagation des protéines SIR en dehors des régions hétérochromatiques. Bdf1 agirait donc comme barrière hétérochromatique, empêchant ainsi la répression transcriptionnelle des régions d'euchromatine proche des télomères (Ladurner *et al*, 2003). Les protéines BET semblent donc servir de plate-forme fonctionnelle et semblent aussi recruter des activateurs transcriptionnels comme le complexe Médiateur pour la phase d'initiation de la transcription, puis le complexe P-TEFb pour la phase d'élongation de l'ARN polymérase II.

IIC7) Détournement par les Virus

Les virus ont bien cerné le rôle majeur des protéines à bromodomains et ont mis en place différents systèmes de contournement des fonctions des protéines BET.

BRD4 est ainsi utilisée par la protéine E2 du papillomavirus pour permettre la bonne ségrégation du génome viral entre les deux cellules hôtes filles (McBride *et al*, 2004). BRD4 est également utilisée pour la régulation transcriptionnelle médiée par la protéine virale E2 des différents papillomavirus. Ainsi, un mutant de BRD4 incapable d'interagir avec E2 agit comme dominant négatif sur l'activation de la transcription médiée par E2 (McPhillips *et al*, 2006).

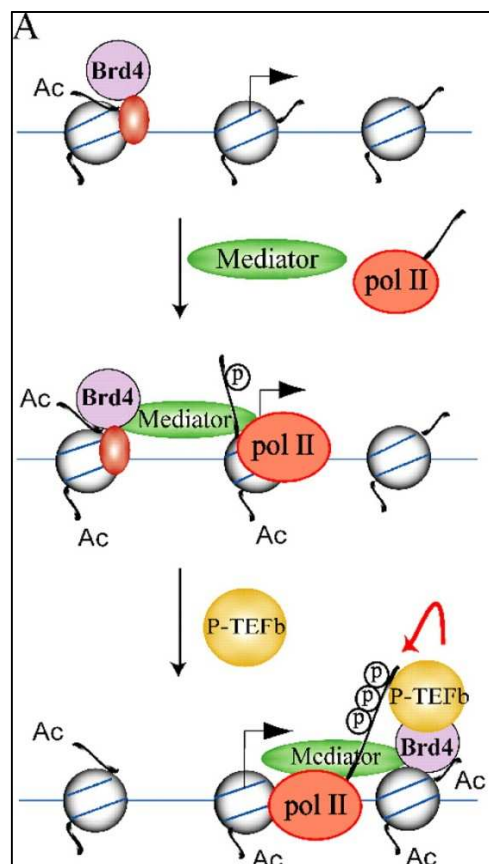


Figure N : Rôle de BRD4 au cours de la transcription

La protéine BRD4 est capable de s'associer à la fois au complexe Mediateur/ARNpolIII et à P-TEFb, et régule ainsi l'initiation et l'élongation de la transcription. (issu de Wu & Chiang, 2007)

A l'inverse, BRD4 est également nécessaire pour la répression transcriptionnelle ponctuelle des papillomavirus humains latents : le complexe répressif médié par la protéine E2, qui inhibe l'expression de l'oncoprotéine virale E6, est composé de BRD4. E2-BRD4 empêche le recrutement de TFIID et de la polymérase II sur le promoteur de E6, qui est malgré tout fortement acétylé, mais réprimé (Wu *et al*, 2006).

Enfin, de manière similaire, la protéine LANA-1 du virus KSHV (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) semble jouer le rôle de passerelle entre le génome viral et le génome de la cellule hôte à l'aide cette fois-ci de BRD2 (Viejo-Borbolla *et al*, 2005).

Il est intéressant de noter que LANA-1 régule également l'expression de gènes cellulaires, afin de moduler l'entrée en phase S de la cellule hôte via une voie E2F-dépendante. D'après la découverte de l'association de BRD2 avec E2F, le virus KSHV pourrait utiliser également BRD2 pour son rôle dans la régulation transcriptionnelle.

IIC8) Un rôle dans la spermatogenèse ?

Certaines protéines BET humaines ou certaines de leurs isoformes sont retrouvées majoritairement testiculaires et leurs profils d'expression sont extrêmement variés au cours de la spermatogenèse (Shang *et al*, 2004).

BRD4 et BRD2 sont exprimées majoritairement dans les spermatogonies et le début des spermatocytes, et pourraient y jouer une fonction de régulation transcriptionnelle comme dans les autres tissus, participant ainsi à la prolifération active qui caractérise ces cellules. Enfin, BRD1 et BRD3 sont présents dans les stades post-méiotiques, lors de la maturation des cellules haploïdes, les spermatides. Or, au niveau chromatinien, cette maturation (ou spermiogenèse), se caractérise par un arrêt quasi complet de la transcription, suivi d'une réorganisation globale du génome puisque la quasi-totalité des histones sont enlevées et remplacées in fine par des protamines. Les mécanismes moléculaires de cette réorganisation sont encore inconnus, mais on sait qu'une hyperacétylation des histones précède leur enlèvement (Rousseaux *et al*, 2008). Ceci pourrait très vraisemblablement être un signal de recrutement d'une machinerie cellulaire appropriée, impliquée dans ces remodelages drastiques de la chromatine. Par ailleurs, il a été montré qu'une expression ectopique de

BRDT dans des cellules somatiques en culture, après hyperacétylation des histones induite par un inhibiteur des histones déacétylases, la trichostatine A (TSA), entraîne une compaction drastique de la chromatine. La capacité de BRDT à très fortement compacter la chromatine hyperacétylée pourrait en faire un acteur majeur de la condensation que subit le noyau des spermatozoïdes au cours de leur maturation en spermatozoïdes (Pivot-Pajot *et al*, 2003).

Enfin, il serait particulièrement intéressant de savoir si ces protéines restent fixées aux histones restantes du spermatozoïde (10 à 15% chez l'homme), laissant supposer une possible mémoire épigénétique paternelle apportée au zygote.

IIC9) Conclusion

La famille BET regroupe donc des protéines multifonctionnelles conservées au sein de nombreux organismes. Leurs bromodomains permettent une association spécifique à certaines histones et les données de la littérature tendent à leur conférer une fonction importante dans le contrôle de la prolifération au sens large : régulation du cycle cellulaire, de la transcription et participation aux événements de divisions mitotiques et méiotiques. Elles semblent servir de « plate-forme fonctionnelle » et recruter des facteurs de transcription, voire les polymérase elles-mêmes, au niveau de régions d'euchromatine, permettant ainsi l'expression spécifique de gènes. Elles pourraient également participer à l'hérédité d'une mémoire épigénétique entre les cellules et jouer un rôle dans la maturation des cellules germinales.

Ainsi, cette famille de protéine est au carrefour de l'homéostasie cellulaire et des informations épigénétiques permettant la mise en place d'un programme génétique spécifique à la fonction d'une cellule.

IID) Un modèle d'étude de remaniements épigénétiques : la spermatogenèse

IID1) Introduction

La gamétogenèse est l'un des seuls événements de la vie cellulaire caractérisé par une reprogrammation intégrale de l'épigénome : le programme épigénétique des cellules germinales est complètement effacé et remplacé par un programme capable de créer tous les types cellulaires nécessaires à la construction d'un organisme.

Différenciés à outrance, les spermatozoïdes ne contiennent presque plus de cytoplasme, et sont réduits à un noyau très compact, un flagelle et une zone riche en mitochondries destinées à fournir l'énergie nécessaire à leur déplacement. Leur différenciation, appelée spermatogenèse, est caractérisée par une restructuration totale de la chromatine, conduisant à la structure nucléaire unique des spermatozoïdes.

La spermatogenèse se déroule en trois phases majeures. La phase pré-méiotique est caractérisée par la maturation des cellules germinales souches. La méiose permet le brassage du patrimoine génétique et sa répartition en quatre cellules haploïdes. Enfin, la différenciation terminale des spermatozoïdes a lieu lors de la spermiogenèse. Seule cette dernière étape sera présentée lors de cette introduction.

IID2) Spermiogenèse

La spermiogenèse est caractérisée par trois transformations majeures :

- L'appareil de Golgi se différencie en granules dont la fonction est semblable à celle des lysosomes. Ces granules fusionnent à côté du noyau et donnent naissance à l'acrosome. Le système acrosomal contiendra notamment l'ensemble des enzymes hydrolytiques

nécessaires pour digérer la membrane cellulaire de l'ovule. Cela permettra une ouverture et donc le passage du bagage nucléaire du spermatozoïde dans l'ovule.

- Un flagelle se développe. Sa région proximale, appelée manchette, contient un grand nombre de mitochondries qui produiront l'énergie nécessaire à la mobilisation du flagelle et au déplacement des spermatozoïdes. La maturation du flagelle est accompagnée d'une élimination de l'excès de cytoplasme, évacué sous forme de corps résiduels.

- Le noyau des spermatides s'allonge, et la chromatine se condense en une structure très compacte qui sera détaillée ultérieurement. On définit de par leur morphologie les différentes spermatides au cours de la spermiogenèse : la spermatide ronde issue de la méiose, la spermatide en élongation, qui entame le remodelage de la chromatine, et la spermatide condensée, en fin de spermiogenèse, avant l'obtention d'un spermatozoïde.

Les cellules germinales subissent une réorganisation de l'intégralité de leur chromatine durant la spermiogenèse, aboutissant à un noyau dont le volume représente 5% du volume moyen d'un noyau somatique (Wyrobek *et al*, 1976). Plus de 95% des histones sont extraites chez la souris (85% chez l'homme) et remplacées par des protéines de transition, elles-mêmes remplacées par les protamines, qui constituent le composant majoritaire de la chromatine dans les spermatozoïdes (Figure O, p79, Caron *et al*, 2005).

Chez les mammifères deux principales protéines de transition existent, TP1 et TP2. Les souris homozygotes invalidées pour TP1 ou TP2 sont fertiles, et n'ont pas révélé de phénotype radical lors de l'étude histologique de leur testicule (Adham *et al*, 2001; Yu *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2001). Les deux TP semblent donc redondantes mais des lignées de souris doublement invalidées pour TP1 et TP2 sont infertiles, avec des spermatozoïdes qui ne sont pas féconds in vitro (Shirley *et al*, 2004; Zhao *et al*, 2004).

Les protamines sont de petites protéines basiques. La plupart des mammifères possède une seule protamine de cinquante acides aminés, appelée Prm1, mais la souris et l'homme ont une seconde protamine Prm2. Ces deux protamines sont essentielles car l'inactivation de Prm1 ou Prm2 rend les souris hétérozygotes stériles, et empêche également la transmission de l'allèle sauvage (Cho *et al*, 2001).

Enfin, de nombreux variants d'histone sont exprimés spécifiquement lors de la spermatogenèse, dont les différentes fonctions restent encore obscures. Cependant, il est estimé que chez l'homme, 10 à 15% des histones et variants d'histones perdurent au sein du noyau compacté du spermatozoïde, ce qui pourraient suggérer un rôle de marquage de régions paternelles spécifiques et importantes lors de la mise en commun des génomes maternel et paternel après fécondation.

IID3) Information épigénétique lors de la spermiogenèse

L'information épigénétique joue un rôle dominant dans le contrôle de l'expression programmée des gènes à travers des générations de cellules, et du fait d'un lien direct et continu avec divers systèmes de signalisation, elle est dynamique et modulable.

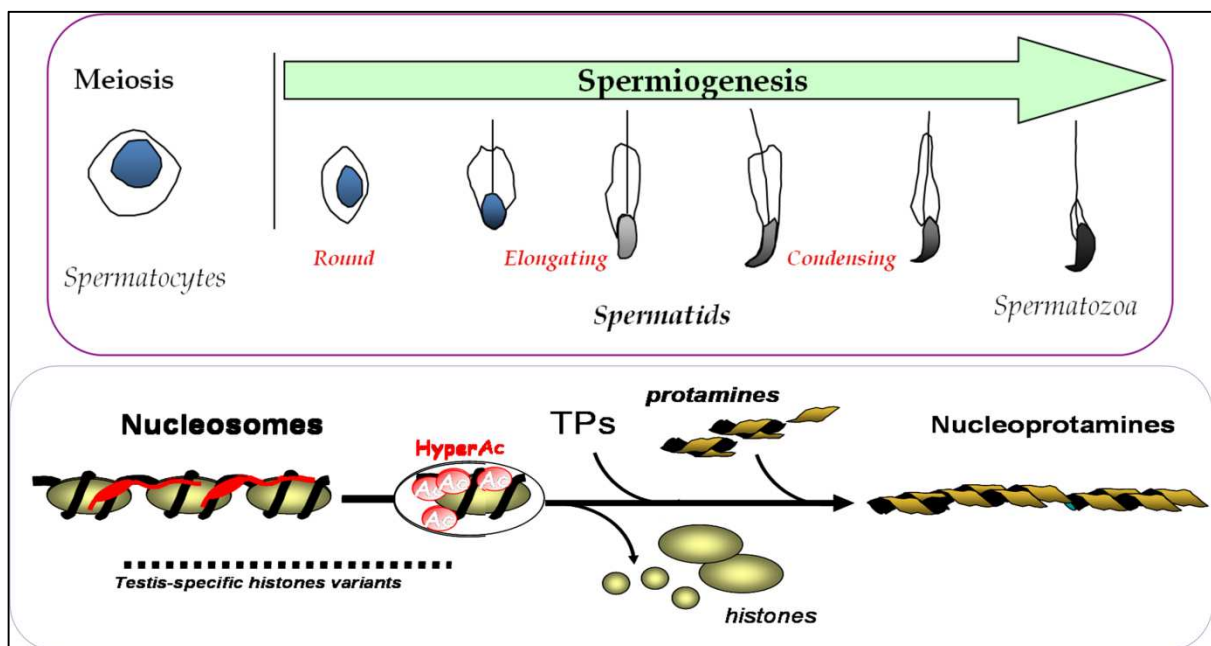


Figure O : Spermiogenèse

Les différents types de cellules et les modifications de la chromatine au cours de la spermiogenèse

Les expérimentations de transferts de pronoyaux dans des zygotes ont montré pour la première fois que, bien que la contribution génétique de deux génomes parentaux soit équivalente, leur contribution épigénétique ne l'est pas. En effet, des zygotes présentant deux génomes haploïdes ovocytaires ou deux génomes haploïdes spermatiques ne peuvent pas se développer (McGrath & Solter, 1984). Cette observation a conduit à l'identification d'un certain nombre de gènes dits « soumis à l'empreinte parentale », dont seul l'allèle maternel ou seul l'allèle paternel est exprimé (Cattanach & Kirk, 1985). On sait maintenant que ces différences d'expression correspondent à un profil de méthylation spécifique des îlots CpG, impliqués dans la régulation des gènes soumis à l'empreinte, qui déterminera leur activité ou au contraire leur répression dans les cellules somatiques du futur individu (Kierszenbaum, 2002; Mann, 2001). La méthylation de l'ADN a pendant longtemps été la seule marque épigénétique clairement identifiée dans les cellules germinales. On sait maintenant qu'à l'instar de ce qui est observé dans les cellules somatiques, l'ensemble de la structure spécifique d'empaquetage du noyau spermatique joue un rôle important comme support moléculaire d'une information qui sera épigénétiquement transmise à l'embryon.

Avant le relargage de la majorité des histones et la compaction progressive du génome par les TP puis les protamines, un phénomène épigénétique unique a lieu : l'augmentation importante et globale du niveau d'acétylation des histones de cœur du nucléosome. De manière contradictoire avec ce qui est couramment admis, cette hyperacétylation de la chromatine ne correspond pas à un état actif de la chromatine, car après méiose, une chute de la transcription globale est observée. Cette vague d'acétylation des histones est maintenant bien décrite au cours de la spermatogenèse murine (Hazzouri *et al*, 2000a) et chez l'homme (Faure *et al*, 2003). Cette hyperacétylation de la chromatine des spermatides semble être le facteur déclenchant de l'ultra compaction du génome, mais sa cause et ses conséquences sont encore méconnues. Elle pourrait être due à une HAT spécifique de la spermatogenèse ou à une inhibition des HDACs, et pourrait favoriser le relargage des histones en déstabilisant les nucléosomes. Cependant, des données laissent suggérer qu'elle puisse également avoir une fonction importante d'information épigénétique pour les étapes suivantes de la spermiogenèse, voire les étapes précoces du développement embryonnaire.

Chez la souris, on ne détecte qu'un faible niveau d'acétylation des histones dans les spermatides rondes immédiatement issues de la méiose. Une augmentation brutale et globale

de l'acétylation des extrémités N terminales des histones H2A et H4 survient dès le début de l'élongation (spermatides en élongation, stades 8 et 9), puis les histones acétylées sont enlevées progressivement. Cependant, une portion non négligeable d'histones persiste dans un sous-domaine nucléaire dense au DAPI à des stades plus tardifs (spermatides en condensation stades 10 et 11, (Hazzouri *et al*, 2000a)). Ce sous-domaine qui contient encore des histones acétylées correspond aux régions péricentromériques des chromosomes contenant les séquences satellites majeures murines, ce qui suggère un rôle particulier de ces séquences lors de la restructuration du génome germlinal mâle (Govin *et al*, 2007). Ces mêmes régions sont ensuite enrichies en structures nucléosomales ou « nucléosome-like » et associées à des variants des histones tels que H2AL1/2 et tH2B qui sont exprimés spécifiquement et très tardivement au cours de la spermiogenèse (Govin *et al*, 2007). Ces variants d'histones sont conservés au sein de la chromatine paternelle et ne sont relargués et dégradés du pronucléus mâle qu'une fois après fertilisation de l'œuf (Wu *et al*, 2008). L'ensemble de ces données met en évidence une reprogrammation différentielle des régions péricentriques et la mise en place d'une différenciation régionale du génome post-méiotique (Boussouar *et al*, 2008). Cette hétérogénéité au sein du noyau pourrait être impliquée dans la mise en place de marques épigénétiques importantes pour le développement embryonnaire. En effet, au cours de la spermatogenèse, des combinaisons de modifications d'histones spécifiques affectent les régions du génome contrôlant l'empreinte paternelle (Delaval *et al*, 2007). De plus, les récents travaux de Hammoud et coll. confortent cette idée. Ils observent que les nucléosomes qui perdurent au sein du spermatozoïde sont enrichis au niveau des loci importants pour le développement. Ces loci contiennent les gènes soumis à l'empreinte parentale, des regroupements de miRNAs, les regroupements de gènes HOX et les promoteurs de gènes de facteurs nécessaires à la transcription et aux voies de signalisation au cours du développement. Ils montrent également que les histones restantes sont porteuses de modification, notamment H3K4me2-3 et H3K27me3, qui pourraient permettre l'expression rapide des gènes ciblés dès les premières étapes de développement du zygote (Hammoud *et al*, 2009).

Enfin, il est maintenant admis que le spermatozoïde puisse apporter des ARNs malgré son cytoplasme restreint. Le phénomène de paramutation des souris homozygotes saines issues de parents hétérozygotes serait imputable à une régulation par un miRNA (Rassoulzadegan *et al*, 2006). L'épigénome paternel pourrait donc apporter des miRNAs ou

piRNAs au zygote et participer de cette manière à la régulation de la transcription de la cellule œuf.

Ainsi, la chromatine des spermatozoïdes serait capable de transmettre une information épigénétique, mais sa nature, son mode de transmission et son effet sur le développement embryonnaire reste encore très peu connu.

Au cours de ces deux parties d'introduction, nous avons pu nous rendre compte de l'importance qu'une information épigénétique malléable et spécifique à chaque cellule peut apporter quant à la lecture de l'information figée de l'ADN. Les mécanismes épigénétiques mis en place par une cellule sont donc primordiaux à son homéostasie, et une altération du paysage épigénétique peut avoir des conséquences dévastatrices. Ainsi, des aberrations épigénétiques peuvent être une source de nombreuses pathologies chez les organismes vivants.

III) Epigénétique et pathologies humaines

IIIA) Introduction

La recherche et la médecine moderne s'attellent à interpréter et à comprendre les causes possibles des maladies humaines. Jusqu'à récemment, les progrès en génétique et l'étude de ses altérations représentaient l'eldorado aux questions que soulevaient ces maladies. Cependant, il s'est rapidement avéré que les mutations génétiques ne pouvaient à elles seules expliquer l'ensemble des pathologies humaines. Le domaine de recherche de l'épigénétique, qui servit dans un premier temps de fourre-tout aux phénomènes irrationnels ne pouvant s'expliquer par la génétique, représente à l'heure actuelle les nouveaux espoirs de

la médecine. En effet, les perturbations des signalisations épigénétiques semblent être la cause de nombreuses maladies, qui comme les mutations génétiques, peuvent être acquises de façon héréditaire ou apparaître spontanément au sein de cellules somatiques. Cependant, à la différence majeure de la génétique, l'épigénétique présente l'intérêt énorme d'être une information potentiellement réversible. Il est donc en théorie possible de modifier l'épigénome d'une cellule et de la faire revenir vers un état propre et normal à sa lignée et sa fonction. Il est de ce fait facilement compréhensible que la recherche se soit particulièrement focalisée ces dernières années à caractériser les signalisations épigénétiques et à déterminer leurs altérations au sein de maladies diverses.

IIIB) Diverses pathologies à incidences épigénétiques

Alors que des mutations génétiques peuvent toucher les acteurs de l'information épigénétique, il est fort intéressant de remarquer qu'à l'inverse certaines aberrations épigénétiques conduisent à des altérations chromosomiques. Par exemple, les mutations touchant le gène *ATRX*, un facteur de remodelage de la chromatine interagissant avec *MeCP2*, induisent un changement du profil de méthylation de l'ADN ribosomal, des séquences répétées spécifiques du chromosome Y et des régions répétées subtélomériques (Gibbons *et al*, 2000). Le syndrome de fragilité du chromosome X survient quand une répétition anormale du codon CGG apparaît dans la région 5' et se méthyle alors de novo, provoquant une répression du gène et un site de fragilité visible sur le chromosome X sous certaines conditions (Knight *et al*, 1993). De façon similaire, le syndrome ICF est provoqué par une mutation du gène *DNMT3B*, ce qui conduit à une instabilité des régions centromériques des chromosomes (Hansen *et al*, 1999). Le fait que ces maladies présentent des anomalies chromosomiques suggère un rôle central des mécanismes épigénétiques dans l'architecture du chromosome.

Certaines pathologies héréditaires sont causées par des défauts de l'empreinte parentale dus à un défaut d'activité des DNMTs. Dans ces pathologies, telles que le syndrome d'Angelman (trouble du développement neurologique), de Prader-Willi (trouble comportemental) ou de Beckwith Wiedemann (BWS), le phénotype dépend d'une absence de

l’empreinte parentale sur une des deux copies du gène. Par exemple, le syndrome de BWS, qui se caractérise par une surcroissance des organes et des tumeurs embryonnaires, est provoqué par la perte de méthylation de gènes soumis à l’empreinte de la région chromosomique 11p15, avec soit une expression bi-allélique anormale (IGF2), soit une répression (CDKN1C) de ce groupe de gènes (Matsuoka *et al*, 1996; Schneid *et al*, 1993). Le syndrome de Rett, responsable de la forme de retard mental la plus commune chez les jeunes filles, est provoqué par une mutation de MeCP2 dans les cellules germinales (Amir *et al*, 1999). Cette protéine lie l’ADN méthylé et permet de réprimer en temps normal l’expression de gènes (Klose & Bird, 2003). Chez un patient atteint de thalassémie, une forme d’anémie héréditaire, la transcription d’un ARN antisens induit la méthylation et la répression d’un gène non muté d’alpha-globuline (Tufarelli *et al*, 2003).

IIIB1) Epigénétique et vieillesse

Il est séduisant de penser qu’un des composants de la vieillesse puisse être la mémoire d’une information épigénétique accumulée au cours de la vie d’une cellule et à plus grande échelle, d’un organisme. Les premières évidences d’un tel mécanisme datent de plus de quarante ans, et concernent la diminution de la méthylation globale de l’ADN au cours de la vie du saumon (Berdyshev *et al*, 1967). Des observations similaires ont été faites chez les cellules de cerveau et de cœur de rat (Vanyushin *et al*, 1973), ainsi que dans différents tissus de souris et de cellules épithéliales bronchiques humaines (Wilson *et al*, 1987). Enfin, une étude récente achève de confirmer cette corrélation, observant sur une période de dix ans une baisse globale de 10% de la méthylation de l’ADN sur plus de cent individus (Bjornsson *et al*, 2008). A l’échelle cellulaire, il a été montré que des fibroblastes en culture subissent une baisse de la méthylation de l’ADN à chaque passage de culture, à l’inverse de la stabilité de la méthylation retrouvée dans des lignées de cellules immortalisées (Wilson & Jones, 1983).

A cette hypométhylation progressive s’ajoute une hyperméthylation de loci spécifiques. En effet, des données suggèrent une augmentation de la méthylation de l’ADN ribosomique dans le foie et les lignées germinales de rat (Oakes *et al*, 2003). De plus, de nombreux gènes se retrouvent réprimés avec l’âge par méthylation des îlots CpG de leur

promoteur, comme le récepteur à l'œstrogène ER, le facteur de croissance IGF2, RUNX3, c-fos, etc... (Fraga & Esteller, 2007).

Les modifications d'histones sont également perturbées avec le temps. La sénescence *in vitro* a été associée à une diminution du taux de H3K27me3 et d'EZH2, alors qu'à l'inverse une hausse de H4K20me3 est observée. Il a de plus été montré qu'une accumulation de H4K20me3 et de H3K9me3 ainsi que le recrutement de protéines de l'hétérochromatine et de Rb au niveau des gènes cibles d'E2F1, participent à la formation de nouvelles structures chromatiniennes appelées « foci d'hétérochromatine associés à la sénescence » (Narita *et al*, 2003).

Les HDACs, et principalement la famille des Sirtuines font également preuve d'une grande attention. En effet, la délétion de Sir2 chez la levure diminue la durée de vie, alors qu'une copie supplémentaire du gène l'augmente (Kaeberlein *et al*, 1999). Chez les mammifères, SIRT1, impliquée dans la déacétylation de H4K16ac, de H3K9ac mais également de protéines non histones acétylées telles que p53, CBP/p300 et E2F1, est retrouvée sous-exprimée dans les cellules en sénescence et avec l'âge (Sasaki *et al*, 2006; Sommer *et al*, 2006). SIRT6 quant à elle, est impliquée dans la régulation de la voie NF-kappaB en déacétylant H3K9ac au niveau de ces gènes cibles. Elle permet ainsi de moduler la réponse au stress et une déficience de SIRT6 chez les souris conduit à un phénotype de vieillesse prématurée (Michishita *et al*, 2008).

Enfin, la régulation complexe, impliquant notamment SIRT6, de la longueur des télomères et son lien avec la sénescence est un autre exemple des causes épigénétiques sur l'âge (McCord & Broccoli, 2008).

L'ensemble de ces mécanismes épigénétiques laisse imaginer que la cellule possède une mémoire épigénétique témoin de l'âge de sa lignée. Le clonage cellulaire avec transplantation de noyau pointe en faveur de cette hypothèse, avec les phénotypes de vieillesse prématurée des animaux clonés à partir d'un noyau de cellule somatique porteur d'une information épigénétique (Shiels *et al*, 1999).

Ainsi, alors que les régulations épigénétiques de sénescence semblent être mises en place dans un but de préservation à court terme de l'intégrité des cellules d'un organisme, il

est fort possible que sur le long terme l'accumulation de ces informations épigénétiques puisse être un facteur important de l'incidence croissante des pathologies liées à l'âge.

IIIB2) Epigénétique et maladies développementales.

L'épigénétique est primordiale au cours du développement. Elle va ainsi permettre l'affectation de programmes génétiques spécifiques aux différentes lignées cellulaires de l'embryon. Ceci se traduit par une perte progressive du potentiel des cellules embryonnaires, les cellules passant d'un état totipotent, pluripotent, multipotent, puis hautement différencié et spécialisé. Cette différenciation est associée à un remaniement du programme génétique des cellules, avec la répression de gènes du développement et l'activation de gènes hautement spécialisés pour la future fonction cellulaire. Ainsi l'ARN non-codant Xist assure la répression du second chromosome X chez les femmes, la méthylation de l'ADN assure la mise en place de l'empreinte parentale, les complexes Polycomb méthylant les histones H3K27 et H3K9 régulent l'expression des gènes développementaux (Fox, BMPs, Wnts entre autres), le complexe Trithorax régule l'expression des gènes HOX en remodelant le positionnement des nucléosomes, etc... (Kiefer, 2007).

L'importance néfaste de certains facteurs environnementaux au cours de l'embryogenèse tient donc dans leurs capacités à déréguler la signalisation épigénétique. Des études ont ainsi montré que des régimes alimentaires riches en suppléments méthyl lors de la grossesse de souris augmentent la méthylation de l'ADN et perturbe ainsi la régulation de gènes. L'activité des HDACs peut aussi être modulée par un régime alimentaire. Ainsi, le resveratrol produit par un grand nombre de plantes, inhibe SIRT1, augmentant la durée de vie et la santé en général des souris soumises à un régime hypercalorique.

Les altérations épigénétiques survenant au cours du développement ont pour la plupart un phénotype drastique conduisant à la mort de l'embryon. Cependant, plusieurs études révèlent que de nombreuses pathologies chez l'adulte puissent avoir pour origine des défauts épigénétiques au cours du développement embryonnaire. Ainsi, de nombreux syndromes de troubles de développement neurologique peuvent être assimilés à des altérations épigénétiques, et le diabète de type 2 chez l'adulte aurait pour cause une dérégulation des

gènes clés pour le développement des cellules beta des îlots de Langerhans dans le foie (Pinney & Simmons, 2010; Urduingio *et al*, 2009).

Le syndrome de Rett implique une mutation ou une duplication du gène codant pour la protéine MeCP2 associée à l'ADN méthylé. Ainsi, aussi bien une répression qu'une surexpression de la protéine engendre cette pathologie liée au chromosome X touchant le développement du cerveau chez une fille sur 10000 naissances (Esteller, 2007). Le syndrome de Rubinstein-Taybi, présentant un retard mental et des anomalies physiques, est lié à une mutation dans 55% des cas de CBP et 3% de p300, deux HATs (Roelfsema *et al*, 2005). Le syndrome de Coffin-lowry, entraînant un retard mental sévère, est provoqué par une mutation du gène RSK2. La protéine RSK2 est activée par la voie des MAP Kinases et va ensuite phosphoryler l'histone H3, ce qui permet de faciliter l'activité d'acétylation de CBP/p300. Plus directement, RSK2 est également capable de phosphoryler CBP/p300 et d'agir ainsi sur son activité (Field *et al*, 2006; Merienne *et al*, 2001). Le syndrome ATRX touche quant à lui à la fonction de la protéine ATRX, encore mal caractérisée, mais qui est associée avec les domaines d'hétérochromatine et participe à leur formation, probablement via ses interactions avec HP1, MECP2 ou encore EZH2 (Cardoso *et al*, 1998; Gibbons *et al*, 2000; Nan *et al*, 2007).

IIIB3) Epigénétique et maladies neurologiques

La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones semblent également impliquées dans la progression des maladies neurodégénératives.

La maladie d'Alzheimer est supposée être liée à une agrégation de l'amyloïde beta dans les cellules. Des données suggèrent que le gène codant pour la Neprilysine, responsable de la dégradation de l'amyloïde beta, est hyperméthylé ou hypoacétylé dans les régions du cerveau touchées par la maladie (Yasojima *et al*, 2001). Enfin, le clivage de la protéine APP qui génère le peptide amyloïde beta produit également un second peptide, AICD. Ce peptide est capable d'interagir avec Tip60 et sa surexpression dans les neurones corticaux primaires de rats augmente l'acétylation de H3K14 et H4K5 (Baek *et al*, 2002).

La maladie de Parkinson résulte d'une perte progressive des neurones dopaminergiques. Plusieurs mutations semblent impliquées, et deux d'entre elles pourraient perturber l'épigénome de ces neurones. En effet, l'alpha-Synucleine mutée dans cette maladie est capable de s'associer aux histones et d'inhiber leur acétylation par un mécanisme impliquant SIRT2. De plus, une baisse de dopamine est associée à une réduction de H3K4me3 (Outeiro *et al*, 2007). Enfin, le traitement le plus employé actuellement pour lutter contre cette maladie est le MPTP, qui entraîne une acétylation de l'histone H3.

La maladie de Huntington qui affecte le cortex cérébral et le striatum est causée par une mutation dominante qui étend le nombre de codons de la glutamine dans une séquence polyQ répétée dans le gène de la Huntingtine (HTT). La protéine mutante HTT interagit avec CBP/p300 et réprime son activité de co-activateur transcriptionnelle en séquestrant la HAT dans des agrégats cytoplasmiques et nucléaires dans le noyau caudé et le cortex des patients malades (Steffan *et al*, 2000).

Enfin, il existe de nombreuses autres pathologies neurologiques liées à l'épigénétique, comme l'épilepsie et la sclérose en plaque par exemple. L'épilepsie, qui existe sous plus de cinquante formes différentes et touche environ 1% de la population, résulte d'une dérégulation synaptique due aux canaux membranaires défectueux des cellules. Des études montrent que les crises d'épilepsie corrént avec une modification de l'acétylation et de la phosphorylation des histones (Reid *et al*, 2009). De plus, un polymorphisme du gène BRD2 codant pour une protéine à double bromodomaine liant la chromatine acétylée est un facteur de risque de l'épilepsie juvénile (Pal *et al*, 2003). Enfin, l'acide valproïque utilisé comme anti-convulsant est capable d'inhiber les HDACs à faible concentration.

La sclérose en plaque est une maladie touchant une personne occidentale sur mille, et a comme conséquence la perte progressive des gaines de myéline des neurones et une neurodégénérescence. Les patients présentent une diminution globale d'un tiers de la méthylation des îlots CpG de la substance blanche de leurs cerveaux comparativement à des témoins sains (Mastronardi *et al*, 2007). Enfin des traitements par inhibition des HDACs par la TSA chez des souris modèles conduisent à une diminution de l'inflammation de la moelle épinière et de la démyélinisation.

IIIB4) Epigénétique et virus

Les virus provoquent différentes maladies et leur mode d'action varie en fonction de l'espèce du virus et des organes ou hôtes ciblés. Une infection virale peut aboutir à des effets asymptomatiques, des maladies communes passagères ou chroniques, des troubles neurologiques et l'induction de cancers. De nombreuses protéines virales sont capables d'interférer avec la machinerie épigénétique de la cellule hôte, et la tourner à son avantage.

Ainsi la plupart des génomes des virus à ADN, une fois dans le noyau de la cellule, vont adopter une conformation chromatinienne avec formation de nucléosome. La protéine VP16 du virus de l'herpes est capable de recruter des co-activateurs du remodelage de la chromatine et de la transcription pour induire l'expression du génome viral (Herrera & Triezenberg, 2004). Les régions transcrites du génome présentent ainsi les marques actives de l'euchromatine H3K4me3, et dépendent de l'activité de SET1. CBP/p300 et le complexe SWI/SNF sont également recrutés sur le génome viral.

Certains virus latents, tel le VIH, insèrent leur génome préférentiellement au niveau de régions d'euchromatine et induisent la formation d'hétérochromatine pour réprimer ponctuellement leurs gènes. Le LTR du VIH est ainsi capable de recruter une machinerie d'hétérochromatine composé de HP1, SUV39H1 ou encore HDAC1 (du Chene *et al*, 2007). De plus, un miRNA viral semble impliqué dans la formation d'hétérochromatine du virus HSV latent (Wang *et al*, 2005).

Les virus qui ne s'insèrent pas dans le génome hôte doivent organiser leur ségrégation lors des mitoses cellulaires provoquées ou non par le virus. La protéine E2 du virus HSV interagit avec la protéine à double bromodomaine BRD4, cela dans le but à la fois de réguler la transcription cellulaire durant l'interphase et de permettre une association du génome viral aux chromosomes mitotiques lors de la division cellulaire (Wu *et al*, 2006; You *et al*, 2004). De plus, la protéine LANA du virus KSHV est quant à elle capable d'interagir à la fois aux protéines à bromodomains BRD2 et BRD4, aux histones H2A/B et H1, et à la protéine d'hétérochromatine HP1.

Enfin, certains virus dit oncogéniques ont la capacité d'induire une prolifération anarchique des cellules dans le but de se répliquer eux-mêmes, et certains des mécanismes

impliquent une réappropriation de l'épigénome de la cellule hôte. Un article récent de R. Ferrari relate la reprogrammation épigénétique par la protéine adénovirale E1a. Le virus induit les cellules quiescentes à se diviser, et ce phénomène implique la stimulation des gènes nécessaires à la réplication cellulaire, tout en inhibant les réponses antivirales et la différenciation de la cellule infectée. La protéine E1a stimule l'expression des gènes du cycle cellulaire en enrichissant leur promoteur en CBP/p300, PCAF et en marques H3K18ac, tout en diminuant la présence de Rb. A l'inverse, E1a réprime les gènes de la réponse antivirale en relocalisant sur leur promoteur les protéines Rb, p130 et la marque H4K16ac, ainsi qu'en induisant une augmentation de la densité de nucléosomes (Ferrari *et al.*, 2008).

Les altérations épigénétiques liés aux facteurs environnementaux peuvent ainsi donner naissance à de nombreuses maladies humaines, dont nous avons détaillé ici quelques exemples. Cependant, l'une des conséquences de dérégulation épigénétique la plus étudiée à l'heure actuelle reste la participation majeure de ces mécanismes dans la tumorigenèse.

IIIC) Cancer et reprogrammation de l'épigénome.

IIIC1) Introduction

Le paysage épigénétique, précisément délimité et propre à chaque cellule, se trouve complètement altéré au sein de cellules tumorales (Jones & Baylin, 2007). Aux nombreuses mutations et aberrations chromosomiques que subit le génome de ces cellules vient donc s'ajouter une dérégulation épigénétique. Ces anomalies épigénétiques interviennent aussi bien dans les phases d'initiation du cancer que lors de sa progression (Jones & Baylin, 2002). L'épigénome des cellules tumorales se caractérise par un changement radical de la méthylation de l'ADN, des modifications d'histones et de l'activité des acteurs de l'épigénétique. L'ensemble de ces événements entraîne une complète reprogrammation de

l'expression des gènes responsables des différents stades de la tumorigenèse (Egger *et al*, 2004).

Ainsi, en partenariat avec les mutations génétiques, les « épimutations » peuvent entraîner la répression des gènes suppresseurs de tumeur, ou au contraire activer des oncogènes. Les évènements conduisant à ces défauts épigénétiques ne sont encore pas complètement caractérisés, à savoir s'ils découlent d'une mutation génétique spontanée dérégulant un acteur de l'information épigénétique, ou au contraire si c'est un événement épigénétique initiateur qui favoriserait ensuite une mutation génétique, par exemple en fragilisant certaines régions de la chromatine.

Enfin, tout comme les mutations génétiques, les altérations épigénétiques sont transmissibles par mitose et sont donc rapidement sélectionnées au sein d'une population de cellule, conférant un avantage de prolifération et de transformation par rapport aux cellules normales.

IIIC2) Cancer et méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN fut la première des modifications épigénétiques détectées au sein des cancers (Feinberg & Vogelstein, 1983; Riggs & Jones, 1983). Un épigénome de cellule tumorale est globalement hypométhylé avec des îlots CpG spécifiquement hyperméthylés au niveau des promoteurs de gènes clés pour la transformation cellulaire (Jones & Baylin, 2002). Cette altération semble être un évènement précoce de la tumorigenèse et pourrait ainsi contribuer à l'initiation des cancers (Feinberg *et al*, 2006).

L'hypométhylation globale touche des séquences génomiques variées souvent pauvres en gènes et riches en retrotransposons et séquences répétées (Rodriguez *et al*, 2006). Ceci peut avoir comme conséquence la réactivation des transposons qui peuvent alors s'insérer aléatoirement dans le génome et provoquer une instabilité génomique, ou fragiliser les régions de séquences répétées induisant des réarrangements chromosomiques (Eden *et al*, 2003; Howard *et al*, 2008; Jones & Baylin, 2002). De plus, une hypométhylation peut permettre l'activation d'oncogènes régulant la prolifération cellulaire, tels que R-RAS et MAPSIN dans le cancer gastrique, S-100 dans le cancer du colon et MAGE dans les mélanomes (Wilson *et*

al, 2007). Enfin, l'hypométhylation peut également entraîner une perte de l'empreinte parentale dans certaines tumeurs (Rainier *et al*, 1993), notamment en activant l'expression bi-allelique du facteur de croissance IGF2 (Cui *et al*, 2003; Ogawa *et al*, 1993).

Contrastant avec cette baisse globale de la méthylation de l'ADN, l'hyperméthylation des îlots CpG participe également à la tumorigenèse. Un grand nombre de gènes suppresseurs de tumeur se retrouve ainsi réprimé, et on dénombre notamment parmi cette liste de gènes p16, MHL1, BRCA1 et Rb (Baylin, 2005; Greger *et al*, 1989; Jones & Baylin, 2002; Jones & Baylin, 2007). La répression transcriptionnelle touche ainsi des gènes des mécanismes de la réparation de l'ADN, du cycle cellulaire, de l'adhérence cellulaire, de l'apoptose et de l'angiogenèse, tous impliqués dans le processus de développement des cancers. De plus, si les gènes réprimés sont des facteurs transcriptionnels, il est évident que les conséquences de leur répression seront énormes sur le programme génétique cellulaire. RUNX3, GATA-4 et GATA-5 sont des exemples de ce cas de figure retrouvé au sein des cancers gastriques, colorectaux et de l'œsophage (Akiyama *et al*, 2003; Long *et al*, 2007). De même, si cette répression touche des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, comme MHL1 et BRCA1 par exemple, les cellules vont accumuler des aberrations génétiques pouvant favoriser la progression du cancer.

La description et les conséquences de cette hyperméthylation sont relativement bien établies mais les causes et le ciblage des îlots CpG des gènes touchés restent encore très mal compris. Une des possibilités est la sélection des cellules grâce à l'avantage de prolifération qu'engendre ces répressions de gènes cibles détectées dans les cancers. Il pourrait également y avoir un système de ciblage des DNMTs par leur association avec des facteurs de transcriptions oncogéniques. Un tel mécanisme a été observé dans certaines leucémies où une protéine fusion, PML-RAR, induit la répression des gènes spécifiques en ciblant une hyperméthylation de l'ADN (Di Croce *et al*, 2002). Il existe également des cas de méthylation aberrante sur de grandes régions chromosomiques à la fois, dans lesquelles les îlots CpG peuvent induire la répression de gènes (Frigola *et al*, 2006).

Enfin, il semble y avoir une interaction possible entre la méthylation de novo ciblées et des modifications d'histones. Il est intéressant de constater que les régions hyperméthylées dans les cancers sont similaires à celles retrouvées porteuses de la marque H3K27me3 dans les cellules ES (Ohm *et al*, 2007; Schlesinger *et al*, 2007; Widschwendter *et al*, 2007). Ces

observations suggèrent un lien entre la tumorigenèse et la régulation du développement, dont le complexe répressif Polycombe, responsable de la marque H3K27me3, pourrait être l'un des acteurs. Le fait que les nombreux îlots CpG hyperméthylés de façon coordonnée dans les tumeurs soient localisés au niveau de loci connus pour être des cibles du complexe Polycombe conforte cette hypothèse (Ohm *et al*, 2007; Schlesinger *et al*, 2007; Weisenberger *et al*, 2006).

III C3) Cancer et modifications d'histones

Une altération des HATs est observée dans de nombreux cancers. Une translocation dans les leucémies myéloïdes aiguës fusionne deux HATs ensemble, CBP et MOZ, induisant une expression aberrante des gènes (Kitabayashi *et al*, 2001). Des mutations de p300 dans son domaine catalytique sont retrouvées dans des carcinomes gastriques et colorectaux (Muraoka *et al*, 1996), et des délétions de la protéine existent dans de nombreuses tumeurs solides (Gayther *et al*, 2000). Il est intéressant de remarquer qu'une activité HAT intègre de CBP /p300 est également nécessaire pour activer et stabiliser p53, et promouvoir ainsi la voie d'apoptose (Grossman, 2001). Enfin, la surexpression de AIB1/SRC-3 conduit à la dérégulation du contrôle des signalisations cellulaires de la protéine, comme celle du récepteur à l'œstrogène par exemple (Gojis *et al*, 2010).

Les avancées technologiques du séquençage à grande échelle ont permis la cartographie des profils de modifications post-traductionnelles des histones dans les cancers. Des études révèlent une baisse globale de l'acétylation H4K16ac, ce qui entraîne une répression des gènes (Fraga *et al*, 2005). Cette baisse est spécifique de la mono-acétylation de H4K16, une marque retrouvée normalement chez 50 à 60% des histones H4, car les mono-acétylations de H4K5, K8 et K12 ne semblent pas modifiées dans les cancers. Cette baisse peut s'expliquer soit par la perte de recrutement des HATs spécifiques de cette marque dans les cancers (MORF, MOZ, Tip60 et HBO1) ou une action de la HDAC spécifique SIRT1.

Les HDACs sont en réalité fréquemment surexprimées dans les cancers (Halkidou *et al*, 2004; Song *et al*, 2005) et sont donc devenues des cibles privilégiées des thérapies épigénétiques dans le traitement du cancer. En effet, les HDACs vont notamment conduire à un état hypoacétylé des gènes suppresseurs de tumeurs, favorisant une répression de la transcription de gènes clés du contrôle de l'homéostasie cellulaire. Par exemple, la

surexpression de HDAC2 intervient en concomitance avec l'action des oncogènes c-Myc et n-Myc pour réprimer la Cycline G2, et cette répression est levée par l'utilisation d'inhibiteurs de HDACs (Marshall *et al*). De plus chez *C.elegans*, HDA1 est impliquée dans le contrôle de l'expression des gènes tissu-spécifiques et de ceux liés à la matrice extracellulaire. Leur dérégulation par altération de HDA1 joue un rôle dans la progression tumorale (Whetstine *et al*, 2005).

Ces aberrations des profils de modifications des histones concernent également la méthylation (Chi *et al*, 2010). Ainsi, H4K20me3 est souvent sous-représentée dans les cancers (Fraga *et al*, 2005). Des altérations de H3K9 et H3K27 méthylées, des marques préférentielles de l'hétérochromatine, sont souvent surexprimées et impliquées dans la répression de gène dans de nombreux cancers (Nguyen *et al*, 2002; Valk-Lingbeek *et al*, 2004). Une fois encore, les enzymes impliquées dans la signalisation de ces marques ont des dérèglements de leur activité. Une augmentation de la quantité de G9a, la méthyltransférase de H3K9, est observée dans le cancer du foie et impliquée dans le maintien des tumeurs malignes en modifiant la structure de la chromatine (Kondo *et al*, 2008; Kondo *et al*, 2007b). EZH2, la méthyltransférase de H3K27, est quant à elle surexprimée dans les tumeurs solides comme le cancer du sein, du poumon, du colon, de la peau et de la prostate (Valk-Lingbeek *et al*, 2004). Cette surexpression d'EZH2 serait capable de réprimer les suppresseurs de tumeurs INK4B-ARF-INK4KA, E-cadherin, p57, p27 et BRCA1 (Chi *et al*, 2010). MLL, une des HMTs de H3K4, une marque d'activation de la transcription, est perturbée dans des translocations chromosomiques, conduisant à l'expression des gènes homéotiques HOX impliqués dans la progression tumorale des leucémies. Les translocations impliquant MLL sont retrouvées chez 80% des leucémies d'enfants (Hess, 2004; Krivtsov & Armstrong, 2007). Dans les leucémies, une lecture aberrante de H3K4me3 est également impliquée, et de nombreuses translocations des domaines PHD (JARID1A et PHF23) sont observées. La conséquence majeure est l'incapacité d'enlever la marque H3K4me3 afin de la remplacer par H3K27me3 grâce à EZH2, et d'ainsi réprimer des gènes cruciaux pour le développement (Wang *et al*, 2009a). De plus, de nombreuses mutations des domaines PHD de la famille des ING sont détectées dans les cancers (Chi *et al*, 2010).

Les histones déméthylases sont également altérées dans les cancers, participant au remaniement du profil de ces marques dans l'épigénome tumoral (Cloos *et al*, 2008). Par exemple, l'activité de LSD1, la HDM capable d'enlever à la fois les marques de répression

H3K9 et d'activation H3K4 en fonction de ces partenaires, est altérée dans les cancers (Metzger *et al*, 2005; Shi *et al*, 2004a). Les protéines de la famille Jumonji, JHDM1A&B et JARID1A&B1C, impliquées dans la régulation de la marque active H3K4me3, sont elles aussi altérées dans les cancers (Shi, 2007). Enfin, des mutations de UTX et une répression de JMJD3, des HDMs spécifiques pour la marque répressive H3K27me2-3, ont été observées dans des carcinomes de l'œsophage et du rein, de multiple myélomes et des cancers du foie et du poumon (Barradas *et al*, 2009; van Haften *et al*, 2009). Comme les HDACs, ces HDMs peuvent donc être des cibles thérapeutiques intéressantes, mais la bivalence de leur activité de répression ou d'activation du génome implique une meilleure caractérisation de leur fonction physiologiques et de leurs dérégulations dans les cancers. Une étude démontre cependant qu'une inhibition de LSD1 dans les neuroblastomes entraîne une baisse de la prolifération des cellules *in vitro* et le ralentissement de la croissance de xénogreffes chez la souris (Schulte *et al*, 2009).

III C4) Cancer et miRNA

Les études comparatives d'expression des miRNAs dans les cancers et les tissus normaux montrent un changement global dans leur profil d'expression au cours de la tumorigenèse (Lu *et al*, 2005). Les miRNAs peuvent être soit des suppresseurs de tumeurs, soit des oncogènes. En effet, une altération de leur activité conduit invariablement à des perturbations pouvant promouvoir la tumorigenèse, car les miRNAs régulent l'expression de gènes impliqués dans la transcription, la prolifération et l'apoptose. Par exemple, miR-15 et miR-16, qui ciblent le gène anti-apoptotique BCL2, sont sous-exprimés dans les leucémies chroniques lymphocytaires, et let-7, qui cible l'oncogène RAS, est sous-exprimé dans les cancers du poumon (Ventura & Jacks, 2009; Zhang *et al*, 2007). De plus, une diminution de miR-127, qui cible BCL6, est observée dans les cancers de la prostate et de la vessie (Saito *et al*, 2006). Ceci est également le cas pour miR-101, qui cible la protéine EZH2 du complexe Polycombe, dans les carcinomes de la vessie (Friedman *et al*, 2009). L'ARN miR-34 intervient dans la signalisation de p53 médiant l'apoptose, et son taux d'expression est faible dans un grand nombre de lignées tumorales mutantes pour p53. La réexpression de miR-34 dans les cellules mutées pour p53 déclenche l'apoptose de ces cellules tumorales (Chang *et al*, 2007a; He *et al*, 2007).

A l'inverse, les miRNAs qui inhibent la croissance cellulaire sont souvent surexprimés dans les cancers. C'est notamment le cas de miR-2 qui cible PTEN, dans les glioblastomes (Chan *et al*, 2005). Bien que miR-155 ne soit pas encore clairement caractérisé, il est surexprimé dans les cancers du sein, du poumon et de lignée hématopoïétiques (Kluiver *et al*, 2006). Mir-155 pourrait jouer un rôle dans la déamination de la cytidine, suggérant un rôle dans les événements de recombinaison, fréquents dans les cancers (Dorsett *et al*, 2008). Le groupe oncogénique mir17-92, qui cible les gènes E2F1, BIM et PTFN, est surexprimé dans les cancers du sein, du colon, de l'estomac et du pancréas, ainsi que dans les lymphomes (Mendell, 2008). miR-19, présent au sein de ce groupe, est capable de réprimer l'apoptose et d'induire des lymphomes chez les souris, en activant la voie Akt-mTOR et en inhibant ainsi PTEN afin d'induire la survie cellulaire (Olive *et al*, 2009).

Les variations d'expression des miRNAs peuvent résulter de différents mécanismes comme des aberrations chromosomiques, des altérations épigénétiques ou de dérégulations des facteurs de transcription (Deng *et al*, 2008). Le suppresseur de tumeur miR-127 est par exemple réprimé par la méthylation de l'ADN de par sa localisation au sein d'îlots CpG (Lujambio *et al*, 2008).

La régulation épigénétique de l'expression de ces miRNAs est vectrice d'espoirs thérapeutiques contre les cancers, et la réactivation de miR-127 dans la lignée cellulaire T24 a été observée suite à un traitement de drogues agissant sur la chromatine, comme des inhibiteurs des HDACs et de la méthylation de l'ADN (Saito *et al*, 2006).

IIIC5) Cancer et transformation stable épigénétique

La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones participent ensemble à l'altération de l'expression des gènes dans la tumorigenèse. Ces changements épigénétiques perturbés conduisent à une plasticité cellulaire réduite en formant une chromatine répressive figée. Il a ainsi été observé une méthylation de novo de l'ADN plus stable au niveau des gènes ciblés par le complexe Polycombe (Ohm *et al*, 2007; Schlesinger *et al*, 2007; Widschwendter *et al*, 2007). En effet, dans les cellules embryonnaires souches (ES), les gènes importants au développement sont réprimés de manière réversible par l'établissement de la

marque H3K27me3 par le complexe Polycombe. Après différenciation, la répression est maintenue par l'activité de EZH2 sur les promoteurs non méthylés. Dans les cancers, ces marques spécifiques du complexe Polycombe sont remplacées par de la méthylation de novo de l'ADN, plus stable, vraisemblablement par le recrutement de DNMTs via le complexe Polycombe lui-même (Vire *et al*, 2006). Ainsi, les gènes impliqués dans le maintien d'une homéostasie cellulaire ne sont plus activables en temps voulu du fait de leur répression stable (Gal-Yam *et al*, 2008).

III C6) Cancer et remodelage de la chromatine

Les modifications épigénétiques de la chromatine sont relativement bien caractérisées au sein des cancers. Par contre, très peu de données existent sur les conséquences de modifications structurales de la chromatine que peuvent impliquer les altérations au sein de cellules tumorales. Or, la méthylation de l'ADN et les marques d'histones influent sur le positionnement des nucléosomes. En effet, la répression induite par la méthylation de l'ADN entraîne un repositionnement d'un nucléosome au niveau du site de départ de la transcription d'un gène, et la réactivation de ce gène par les inhibiteurs des DNMTs s'accompagne d'une perte des nucléosomes au niveau de son promoteur (Lin *et al*, 2007).

Dans un même ordre d'idée, le repositionnement des nucléosomes peut amener des marques épigénétiques portées par certains nucléosomes au niveau des promoteurs de gènes, impliquant entre autre leur répression. Un exemple de cette capacité est le complexe NuRD couplé à l'oncogène PML-RARa, qui possède à la fois une activité de remodelage de la chromatine et une activité HDAC, lui conférant un rôle central de corépresseur transcriptionnel dans les leucémies. Le complexe NuRD facilite le recrutement du complexe répresseur Polycomb 2 et de DNMT3A au niveau des gènes cibles de l'oncogène PML-RARa, induisant leur inactivation transcriptionnelle permanente par des marques répressives modifiant l'état de la chromatine (Morey *et al*, 2008). Le complexe NuRD peut également être recruté sur les promoteurs méthylés par son interaction avec MBP2 (Feng & Zhang, 2001), et repositionner les nucléosomes au niveau des promoteurs de gènes. Le complexe SWI-SNF, un facteur de remodelage de la chromatine ATP-dépendant, a lui aussi été observé altéré au cours de développement de cancers (Reisman *et al*, 2009). La perte de fonction de ce

complexe par des altérations au niveau de ses sous-unités peut engendrer une transformation maligne. La sous-unité BAF47 (hSNF5) du complexe SWI-SNF est un suppresseur de tumeur et son inhibition entraîne l'inactivation des voies de signalisation de p21 et p16 (Chai *et al*, 2005). De plus, BRG1 et BRM, les sous-unités catalytiques de SWI-SNF, sont réprimés dans 15 à 20% des cancers du poumon non à petites cellules (Reisman *et al*, 2003). Un rôle contradictoire de BRG1 a cependant été observé lors des travaux de Naidu et coll. : BRG1 contribuerait au développement de cancers en inhibant l'activité de p53 par déstabilisation de la protéine (Naidu *et al*, 2009). Cette sous-unité du complexe SWI-SNF semble donc avoir deux rôles opposés sur le maintien de l'homéostasie cellulaire : elle résume donc bien la complexité et notre manque de connaissance actuelle sur la fonction des facteurs de remodelage de la chromatine.

Enfin, les variants d'histones peuvent également être impliqués dans la tumorigenèse. La surexpression de H2A.Z dans plusieurs types de cancer semble conférer un avantage au niveau de la progression du cycle cellulaire (Svotelis *et al*, 2009). A l'inverse, une perte de H2A.Z a également été observée lors de progression tumorale, où son absence pourrait impliquer une déstabilisation des frontières chromosomiques eu/hétérochromatine, permettant alors la propagation des domaines répressifs sur la chromatine avoisinante (Witcher & Emerson, 2009).

IIIC7) Le modèle des cellules souches cancéreuses.

Les changements globaux de l'épigénome d'un cancer entraînent la dérégulation de centaines de gènes au cours de la tumorigenèse. Une telle collection d'épimutations, est, au même titre que l'accumulation des mutations génétiques, difficilement compréhensible. Il est peu probable que la progression tumorale découle d'événements aléatoires conférant des avantages successifs accumulés au sein d'une tumeur par sélection clonale. Il est plus facile d'imaginer que cette accumulation découle en réalité d'altérations initiales majeures apparaissant lors de premières étapes de l'évolution néoplasique, au niveau des fonctions centrales de la machinerie de contrôle épigénétique. Ces événements initiateurs pourraient alors prédisposer les cellules à l'apparition successive d'épimutations au cours de la

tumorigenèse en influant sur les cascades de signalisation épigénétique, de façon similaire aux accumulations de mutations génétiques après défaut de la machinerie de réparation de l'ADN.

Le modèle des cellules souches cancéreuses suggère que des modifications épigénétiques, apparaissant dans les cellules souches somatiques et progénitrices, sont les évènements initiateurs de la formation de cancer (Feinberg *et al*, 2006). Cette hypothèse intéressante se base sur le fait que les tissus sains de patients cancéreux contiennent des cellules progénitrices altérées, et que les aberrations épigénétiques font partie des évènements précoces dans de nombreux cancers (Cui *et al*, 2003; Matsubayashi *et al*, 2003; Peters *et al*, 2007). Ce modèle est conforté par le fait que les tumeurs possèdent une population hétérogène de cellules avec des propriétés de transformation diverses (Al-Hajj *et al*, 2003). En effet, seule une petite fraction de cellules épithéliales tumorales a la capacité de former des colonies in vitro ou une nouvelle tumeur in vivo après injection dans un organisme modèle.

Les cellules souches somatiques sont des cellules indifférenciées retrouvées au niveau des différents organes du corps. Ces cellules présentent la capacité de se diviser et de remplacer les cellules mortes ou les tissus endommagés d'un organe spécifique. Elles ne sont donc pas pluripotentes mais plutôt multipotentes avec une restriction de spécificité de lignée. La maintenance de l'identité des cellules souches dépend largement de mécanismes épigénétiques (Mikkelsen *et al*, 2007; Surani *et al*, 2007). Une dérégulation de ces mécanismes pourrait donc raisonnablement donner naissance à une population cellulaire progénitrice à risques, qui peut tendre à se transformer à la suite de quelques mutations génétiques de facteurs clefs pour la tumorigenèse. Ces cellules souches vectrices d'altérations épigénétiques et conservant leur état indifférencié pourraient alors rapidement former une population néoplasique (Jones & Baylin, 2007).

Plusieurs observations corroborent cette hypothèse. Les souris avec une perte de l'empreinte (LOI) au niveau du locus IGF2, combinée à une mutation du gène *Apc*, possèdent une population croissante de cellules progénitrices dans leur épithélium intestinal, celui-ci tendant vers un état moins différencié et induisant in fine un risque accru de développer des tumeurs intestinales (Sakatani *et al*, 2005). Les hommes avec une LOI du gène IGF2 présentent également un risque de cancer colorectal avec une dédifférenciation des cellules de la muqueuse du colon (Cui *et al*, 2003). La répression illégitime par la méthylation de l'ADN des gènes impliqués dans la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches tels que *p16*,

APC et SFRPs est également détectée dans les stades précoces du cancer du colon notamment (Jones & Baylin, 2007). Une répression aberrante des « gardiens de l'épigénome » en condition de stress chronique comme l'inflammation, permettrait ainsi aux cellules souches d'acquiescer une capacité infinie d'auto-renouvellement, c'est à dire une immortalisation. Ces cellules pourraient ensuite amasser d'autres aberrations génétiques et donner alors naissance à des tumeurs malignes (Baylin & Ohm, 2006; Jones & Baylin, 2007). Il a également été observé que certaines lignées de cellules souches embryonnaires humaines possèdent des caractéristiques similaires à celles des cellules cancéreuses, comme des fréquences élevées de formation de tératomes, de capacité d'auto-renouvellement, de marqueurs de pluripotentialité, ainsi qu'une indépendance aux facteurs de croissance, etc... (Werbowski-Ogilvie *et al*, 2009).

Enfin, les protéines du complexe Polycombe, qui régulent l'expression de régulateurs développementaux dans les cellules souches embryonnaires, sont souvent surexprimées dans les cancers (Valk-Lingbeek *et al*, 2004). De plus, les gènes marqués par H3K27me3 dans les cellules souches par le complexe Polycomb sont fréquemment méthylés dans les cancers, ce qui suggère un réseau de régulation commun entre les cellules tumorales et les cellules ES (Ohm *et al*, 2007; Widschwendter *et al*, 2007).

Ces données vont donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'épigénétique joue un rôle central dans la néoplasie précoce. Les cellules souches cancéreuses pourraient servir de cellules vectrices à ces altérations épigénétiques et conduire à la formation de cancer (Schlesinger *et al*, 2007; Widschwendter *et al*, 2007).

III C8) Cancer et thérapie épigénétique

De par la réversibilité des modifications épigénétiques, Il semble possible d'interagir sur les altérations retrouvées au sein des cellules. Le but de la thérapie régulant l'épigénétique est de permettre un retour des cellules tumorales vers un épigénome normal, en les amenant ainsi à retourner vers un état stable ou différencié.

De nombreuses molécules capables d'interférer avec la méthylation de l'ADN ou les modifications aberrantes des histones ont été découvertes (Yoo & Jones, 2006). Les

inhibiteurs de la méthylation de l'ADN furent les premiers à être testés en tant que traitements anticancéreux. Dès 1977, il a été observé que les agents cytotoxiques 5-azacytidine (5-aza-CR, azacitidine) et 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR, decitabine) sont capables de faire se différencier des cellules en culture (Constantinides *et al*, 1977). Peu de temps après, il a été découvert que ces nucléosides analogues sont incorporés dans l'ADN des cellules qui se divisent rapidement durant la réplication et inhibent la méthylation de l'ADN en piégeant les DNMTs sur l'ADN, provoquant leur appauvrissement dans le reste de la cellule (Egger *et al*, 2004; Santi *et al*, 1984). Ceci a pour conséquence de réactiver l'expression de gènes illégitimement réprimés dans les cellules tumorales, notamment les gènes suppresseurs de tumeur (Yoo & Jones, 2006). L'azacitidine et la decitabine sont maintenant approuvées pour le traitement des syndromes de myelodysplasie et des résultats encourageants ont été observés pour le traitement de leucémies myéloïdes aigües et chroniques (Plimack *et al*, 2007). Enfin, la zébularine est actuellement en essai et présente l'avantage d'être administrable par voie orale (Cheng *et al*, 2004).

Cependant, le fait que ces drogues s'incorporent à l'ADN peut avoir un effet toxique sur les cellules normales, bien que les cellules avec une faible capacité de division cellulaire soient moins à même d'être perturbées. Des travaux de 2003 minimisent ce risque car les traitements à long terme avec les inhibiteurs de DNMT semblent avoir peu d'effets-secondaires. (Yang *et al*, 2003). Malgré tout, des approches alternatives utilisant des composés non nucléosides ciblant l'activité des DNMTs sans être incorporés à l'ADN sont actuellement en cours. SGI-1027, RG108 et MG98 agissent en bloquant l'activité catalytique ou l'interaction des co-facteurs des DNMTs, ou en ciblant la dégradation de leur ARN messagers (Cortez & Jones, 2008; Datta *et al*, 2009).

La baisse d'acétylation des histones est également un système récurrent des cancers pour réprimer l'expression de certains gènes, dont les suppresseurs de tumeurs (Carew *et al*, 2008). Le rétablissement d'un profil d'acétylation normal, par l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs, possède des effets antitumoraux comme l'arrêt de la prolifération, l'induction de l'apoptose et de la différenciation. Le SAHA est maintenant approuvé pour une utilisation clinique des traitements des lymphomes cutanés des cellules T, et plusieurs autres inhibiteurs des HDACs sont en phase d'essai (depsipeptide, phenylbutyrate, etc...). Cependant, le traitement des cellules réprimées pour le gène BRM par des inhibiteurs des HDACs restaure son expression, mais provoque également l'acétylation de la protéine BRM elle-même,

inactivant ses fonctions (Reisman *et al*, 2009). Ainsi, le développement d'inhibiteurs spécifiques des HDACs nécessite une compréhension plus approfondie de leur conséquence sur l'acétylome. Enfin, ces drogues inhibitrices des HDACs provoquent de nombreux effets secondaires, en touchant également les cellules non tumorales.

L'interaction entre les différents acteurs de la machinerie épigénétique a conduit à l'exploration de stratégies de combinaison de traitements impliquant à la fois l'inhibition des DNMTs et des HDACs. De manière logique, ces combinaisons de traitements semblent plus efficaces. Par exemple, la réactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs n'est observée que lorsque la 5-Aza-CdR et la trichostatine A sont combinées (Cameron *et al*, 1999). L'effet antitumoral du depsipeptide est augmenté dans les cellules leucémiques simultanément traitées avec la 5-Aza-CdR (Klisovic *et al*, 2003). Enfin, des modèles de souris de cancer du poumon montrent une grande résorption des tumeurs lors de la combinaison du phénylbutyrate avec la 5-Aza-CdR (Belinsky *et al*, 2003).

L'utilisation d'inhibiteurs des HMTs est également un champ d'action récemment exploré. Le composé DZnep, qui cible PRC2 généralement surexprimé dans les cancers, est capable d'induire une apoptose (Tan *et al*, 2007).

Les miRNAs sont également à l'étude. La réactivation de miR-127 suite à un traitement combiné de la 5-Aza-CdR et du phénylbutyrate est capable de réprimer l'oncogène BCL6 (Saito *et al*, 2006). Il est intéressant d'imaginer que l'introduction de miRNAs synthétiques mimant l'activité de miRNAs suppresseurs de tumeur puisse permettre la répression sélective d'oncogènes particuliers dans les tumeurs. En effet miR-101, qui cible EZH2, pourrait être utilisé pour réguler les aberrations de la machinerie épigénétique des cellules cancéreuses, afin de restaurer un épigénome normal. Cependant, le problème majeur de ces thérapies porte sur la capacité de cibler correctement les cellules à traiter et nécessite des progrès dans la recherche de méthodes de livraison de ces composés.

Enfin, il existe de plus en plus de données prouvant que l'environnement et le régime de vie d'un individu peuvent influencer sur les risques de cancer. Ces facteurs externes semblent en partie pouvoir agir sur les signalisations épigénétiques. Il pourrait donc être possible d'imaginer des régimes alimentaires préventifs ou agissants en parallèle avec les thérapies actuelles. En effet, il a été montré que des régimes pauvres en composé méthyl (folate, choline et méthionine) chez des animaux modèles altèrent le profil de méthylation de l'ADN

et induisent des cancers du foie en absence de carcinogènes (Poirier, 1994). Des expériences chez le rat ont également montré qu'un régime riche en sélénium entraîne une hypométhylation et il a été découvert que ce composé inhibe l'activité de DNMT1 (Davis *et al*, 2000). De façon intéressante, les régimes riches en polyphénols de certaines populations et une faible incidence de cancer semblent être corrélés. Les polyphénols les plus étudiés sont entre autres l'EGCG (thé vert), le curcumin (curry) et le resveratrol (raisin). La plupart montre des capacités d'inhibition des DNMTs. Par exemple, EGCG permet la réactivation des suppresseurs de tumeurs p16, RAR, MGMT et MHL1 en réinversant à l'état d'origine l'hyperméthylation de leur promoteur (Fang *et al*, 2003). Curieusement, l'EGCG et d'autres composés tels le curcumin présentent la capacité contradictoire d'inhiber les DNMTs tout en bloquant également l'activité de certaines HATs, comme CBP/p300 par exemple. Ils semblent de plus capables de réguler l'expression de certains miRNAs. La caractérisation de ces molécules végétales représente donc un intérêt majeur dans l'aide à la lutte contre le cancer et autres maladies épigénétiques.

III C9) Cancer et facteurs testiculaires

La dérégulation primaire ou secondaire de gènes normalement exprimés dans les cellules spermatogéniques pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'organisation génomique des cellules somatiques les exprimant de manière illégitime. En effet, l'une des réorganisations les plus spectaculaires du génome se produit lors de la spermatogenèse, associée à la méiose et plus particulièrement aux étapes post-méiotiques. Ainsi, en plus des recombinaisons et des réorganisations génomiques associées ayant lieu dans les cellules méiotiques, une réorganisation massive du génome se déroule dans les cellules post-méiotiques, au cours de laquelle les histones sont enlevées et remplacées par des protéines basiques, spécifiques des spermatides et des spermatozoïdes. De ce fait, les cellules spermatogéniques expriment de manière spécifique un ensemble de régulateurs épigénétiques très puissants. Il est donc raisonnable de penser que leur expression illégitime pourrait grandement contribuer au bouleversement du paysage épigénétique des cellules somatiques et donc à la transformation cellulaire

IIIC9a) Rôle oncogène des facteurs testiculaires dans les cellules somatiques

L'activation illégitime dans les cellules somatiques de facteurs spécifiques du testicule, notamment de ceux qui sont impliqués dans la modulation de l'épigénome, peut avoir un effet amplificateur, aboutissant à des perturbations épigénétiques secondaires et déterminantes dans la transformation cellulaire.

C'est le cas d'un paralogue du facteur CTCF (CCCTC-binding factor), nommé BORIS, spécifiquement exprimé dans les cellules germinales mâles. CTCF est un facteur épigénétique (protéine à doigts de zinc) ayant un rôle déterminant dans la régulation spécifique d'allèle de gènes soumis à l'empreinte parentale (Gabory & Dandolo, 2005). Il possède entre autres une fonction de barrière transcriptionnelle ainsi qu'un rôle dans la régulation de l'expression des gènes en général (Wallace & Felsenfeld, 2007). Dans les cellules germinales, BORIS est exprimée, alors que CTCF ne l'est pas (Loukinov *et al*, 2002). Bien que l'on ne connaisse pas précisément le rôle de BORIS au cours de la spermatogenèse, il est probable qu'il soit impliqué dans la régulation de l'expression d'autres gènes spécifique du testicule. Ces gènes peuvent être impliqués dans les voies de signalisation propres à la spermatogenèse, et sont aussi normalement réprimés dans les cellules somatiques. L'expression illégitime de BORIS a été détectée dans un nombre significatif de cancers (D'Arcy *et al*, 2006; D'Arcy *et al*, 2008; Kholmanskikh *et al*, 2008; Risinger *et al*, 2007; Vatolin *et al*, 2005). De manière intéressante, l'activation de BORIS dans les cellules somatiques induit l'expression d'autres facteurs C/T (pour cancer/testis), plus particulièrement celle des gènes MAGE-A (Vatolin *et al*, 2005) et de CTAG1/NY-ESO1 (Hong *et al*, 2005). Dans ce dernier cas, BORIS recrute le facteur de transcription SP1 au promoteur de CTAG1 pour déréguler sa transcription (Kang *et al*, 2007). Néanmoins, BORIS ne semble pas être la seule protéine à agir pour induire l'activation secondaire des facteurs C/T (Kholmanskikh *et al*, 2008). D'autres facteurs, comme par exemple le FGF (fibroblast growth factor) (Kondo *et al*, 2007a) et le récepteur à activité tyrosine kinase KIT (Yang *et al*, 2007b), contribuent grandement à favoriser l'expression illégitime de ces gènes.

Parmi les différents gènes C/T, la dérégulation primaire des membres de la famille MAGE peut mettre les cellules dans une configuration favorisant leur transformation maligne. En effet, il a été montré que la suppression de l'expression des MAGE de classe I, membres exprimés normalement uniquement dans les cellules germinales, induit l'apoptose des lignées

cellulaires issues de mélanomes l'exprimant illégitimement. Des études supplémentaires ont montré que cette résistance à l'apoptose était associée à une action neutralisante des MAGE sur p53 (Yang *et al*, 2007a). En accord avec ces données, une autre étude a montré que MAGE-A2, un membre de la même famille, recrute l'histone-déacétylase 3 (HDAC3) et cible p53, s'opposant ainsi à l'acétylation et à l'activation de p53 à la suite d'un traitement génotoxique (Monte *et al*, 2006). De plus, MAGE-A1 recrute l'histone déacétylase HDAC1 et transforme ainsi le régulateur transcriptionnel SKIP en un répresseur de transcription (Laduron *et al*, 2004).

Un autre exemple concerne la protéine à double bromodomaine BRDT qui est également un facteur C/T. Cette protéine interagit fortement avec la chromatine acétylée et joue probablement un rôle déterminant dans le contrôle des événements dépendants de l'acétylation lors de la maturation des spermatides. En effet, l'expression d'une protéine mutée dans son premier bromodomaine bloque la spermatogenèse aux stades qui suivent l'acétylation massive des histones (Shang *et al*, 2007). Bien que le gène BRDT soit exclusivement exprimé dans le testicule, la présence de l'ARN codant BRDT a été rapportée dans 12 cas (sur 47 étudiés) de cancers du poumon non à petites cellules, et dans un cas de carcinome à cellules squameuses (Scanlan *et al*, 2000). L'expression illégitime de BRDT dans les cancers broncho-pulmonaires, ainsi que sa capacité extraordinaire à remodeler et à condenser la chromatine acétylée, suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans la genèse et/ou l'évolution de ces cancers. Les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant à être élucidés.

Les cellules germinales possèdent un système spécifique de méthylation permettant l'établissement de novo de méthylation indispensable à la programmation de leur génome. La protéine DNMT3L, qui ne possède pas d'activité enzymatique propre, interagit avec et régule l'activité de deux méthyltransférases de l'ADN, DNMT3a et DNMT3b. La protéine DNMT3L est exprimée au cours de l'embryogenèse précoce et dans les cellules germinales, et elle est normalement réprimée dans les cellules somatiques. Une déméthylation de la région promotrice du gène DNMT3L est clairement détectée dans les cellules cancéreuses et associée à une expression aberrante du gène (Gokul *et al*, 2007). Du fait du rôle régulateur important de DNMT3L dans la régulation de méthylation de novo (Ooi *et al*, 2007), il est facilement envisageable qu'une activation illégitime de DNMT3L puisse avoir un impact non

négligeable sur l'épigénome, ce qui induirait une méthylation erronée du génome, favorisant ainsi la transformation maligne des cellules affectées.

Parmi les facteurs C/T, il y a également la protéine SPO11, qui induit des coupures double brins d'ADN lors des recombinaisons méiotiques (Baudat & de Massy, 2004). Il est très probable que l'expression inappropriée de SPO11 dans les cellules somatiques favorise des translocations chromosomiques.

Récemment les fonctions d'un orthologue chez la levure de deux C/T, CTAG1/NY-ESO1 et CTAG2/NY-ESO2, ont pu être définies. Cette protéine, PCC1, code pour un facteur de transcription capable de réguler l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la croissance polarisée chez la levure. Chez les mammifères, ces gènes sont uniquement exprimés dans les cellules germinales et leur dérégulation aberrante pourrait affecter également des réseaux de gènes codant, comme chez la levure, pour des régulateurs cellulaires critiques (Kisseleva-Romanova *et al*, 2006).

De manière intéressante, une kinase normalement exprimée dans les cellules germinales, PBK/TOPK, a été trouvée fréquemment dérégulée dans les cancers du sein. Les études fonctionnelles montrent que, dans les cellules somatiques, elle peut relayer la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, et donc avoir un rôle important dans les balisages erronés de cette marque épigénétique dans les cellules cancéreuses (Park *et al*, 2006).

Ces exemples sont donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle des dérégulations épigénétiques importantes peuvent surgir dans les cellules somatiques, à la suite d'une expression illégitime de gènes spécifiques de la gamétogenèse. Il apparaît également que des anomalies épigénétiques primaires dans les cellules précancéreuses, dues à l'action « illégitime » des régulateurs du génome des gamètes, peuvent rapidement évoluer et aboutir à la transformation maligne.

IIIC9b) Les facteurs C/T, indicateurs des anomalies épigénétiques

La perte, dans les cellules somatiques, de la répression des gènes spécifiquement exprimés dans les testicules peut être utilisée comme un bon détecteur des anomalies épigénétiques se produisant dans ces cellules. En effet, de nombreuses études ont montré que

l'expression illégitime de plusieurs C/T est associée à une altération de la méthylation de leurs gènes. Par conséquent, lorsqu'une expression aberrante de ces gènes est détectée dans les cellules, elle peut être considérée comme le reflet direct de l'occurrence d'une méthylation anormale, et ainsi permettre de faire le diagnostic de cette anomalie épigénétique.

De plus, de nouvelles données nous permettent d'entreprendre des analyses plus fines et de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques responsables du maintien sous silence de ces gènes dans les cellules saines, afin d'identifier les perturbations épigénétiques se produisant dans les cancers. Par exemple, il a été montré que l'inactivation du gène G9a, ou du gène Glp/Eu-HMTase1, codant pour des méthyltransférases de la lysine 9 de l'histone H3, aboutit à une expression ectopique des gènes Mage (Dodge *et al*, 2004; Tachibana *et al*, 2005). Une analyse plus fine a permis de montrer qu'une mono-méthylation de K9, induite par l'expression d'un mutant de G9a dans les cellules G9a^{-/-} est suffisante pour réprimer l'expression du gène Mage-A (Collins *et al*, 2005). De plus, une acétylation des histones induite par le traitement des cellules par un inhibiteur des HDAC, la trichostatine A (TSA), et la transcription qui en résulte, permettent une déméthylation du gène C/T GAGE et son expression stable dans les cellules somatiques (D'Alessio *et al*, 2007). D'autres données suggèrent en revanche que la déméthylation ciblée des C/T se produit en premier lieu, et peut être stabilisée par l'activité de ces promoteurs, les protégeant ainsi contre une re-méthylation et le rétablissement de la répression (De Smet *et al*, 2004; Lorient *et al*, 2006). En effet, il a été montré que la déméthylation des régions promotrices de ces gènes et leur activation transcriptionnelle (due au ciblage des méthyltransférases de l'ADN, DNMT1/3b par des siRNA), sont associées à une modification du code histone sur ces gènes en faveur d'un gain de marques actives, une augmentation de l'acétylation de K9 et de la méthylation de K4 de l'histone H3 (James *et al*, 2006).

IIIC9c) Les facteurs C/T, marqueurs de cancers et cibles de thérapies

anticancéreuses

À l'heure actuelle, on recense un peu plus d'une quarantaine de familles de gènes C/T, comprenant environ une centaine de gènes au total, dont l'expression anormale a été directement identifiée dans des cancers somatiques.

Les gènes C/T, dont l'expression est normalement restreinte aux cellules de la spermatogenèse méiotique ou post-méiotique, cellules protégées du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire, ont un statut immunitaire tout à fait particulier. En effet, dans des conditions physiologiques normales, en l'absence de cancer somatique ou d'effraction de la barrière hémato-testiculaire, les produits de ces gènes restent inconnus du système immunitaire autologue. En revanche, lorsqu'ils sont exprimés de manière aberrante dans les cancers somatiques, ils peuvent être reconnus par le système immunitaire qui les considère comme des antigènes étrangers, induisant une réaction cellulaire et/ou humorale contre les cellules tumorales.

Ainsi, du fait de leur expression tissulaire restreinte et de leur caractère très immunogène, les gènes C/T et leurs produits constituent non seulement des marqueurs potentiels de choix pour le diagnostic des cancers, mais aussi des cibles idéales pour une immunothérapie anticancéreuse.

En effet, les premiers antigènes C/T, de la famille MAGE-A, puis BAGE et GAGE, ont été découverts chez une patiente porteuse d'un mélanome dont l'évolution était anormalement favorable, du fait de la présence de lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant les cellules tumorales autologues (van der Bruggen *et al*, 1991), révélant déjà la nature fortement antigénique de ces facteurs. Dans les années qui suivirent, l'approche SEREX (Sahin *et al*, 1995) a mis à profit la réponse immunitaire humorale des patients cancéreux dirigée contre des protéines tumorales, pour identifier d'autres antigènes tumoraux, parmi lesquels une majorité de C/T (incluant les facteurs SSX, SCP1, NY-ESO-1). Enfin, un certain nombre d'antigènes C/T ont été identifiés sur la base de leur profil d'expression (Axelsen *et al*, 2007; Scanlan *et al*, 2002). L'expression anormale d'un ou plusieurs C/T est détectée dans de nombreux cancers somatiques, tumeurs solides (Costa *et al*, 2007; Kalejs & Erenpreisa, 2005; Scanlan *et al*, 2004; Simpson *et al*, 2005) ou hémopathies (Condomines *et al*, 2007; Meklat *et al*, 2007). Cela peut être exploité pour le développement de marqueurs indiquant la présence et/ou l'évolution d'un processus tumoral, basés sur la détection soit des transcrits correspondants (Axelsen *et al*, 2007), soit des protéines, ou encore même des anticorps circulants dirigés contre ces C/T (Chen *et al*, 1997). À l'heure actuelle, on ne sait pas détecter des C/T dans tous les cancers somatiques (par exemple les C/T connus sont rarement exprimés dans les cancers colorectaux). Il est cependant possible que la découverte de nouveaux C/T permette de diagnostiquer de plus en plus de tumeurs.

Plusieurs équipes ont exploité les propriétés immunogènes des C/T pour développer des stratégies vaccinales anticancéreuses. Les C/T MAGEA1 et NY-ESO-1 ont servi à faire des vaccins destinés à stimuler les réponses des cellules T, CD4+ et/ou CD8+, et un effet bénéfique a été démontré chez certains des patients traités (Odunsi *et al*, 2007). Afin d'assurer une efficacité optimale de ce type d'immunothérapie, des recherches en cours visent à optimiser la présentation de l'antigène aux cellules T, notamment en associant l'épitope à un adjuvant (Susumu *et al*, 2008). De plus, certaines études récentes suggèrent d'associer à cette approche vaccinale un traitement épigénétique visant à induire ou augmenter l'expression de gènes C/T par les cellules tumorales, comme par exemple un agent déméthylant l'ADN ou inhibant les histones déacétylases (Meklat *et al*, 2007).

Outre leur grand intérêt pour les applications médicales, l'étude des C/T représente une voie de recherche novatrice et puissante pour la compréhension des mécanismes fondamentaux régulant la programmation du génome au cours de la différenciation cellulaire. Les C/T permettent également de mieux appréhender certaines anomalies épigénétiques associées à la transformation cellulaire et au développement des cancers. En effet, l'expression des gènes C/T dans les cancers somatiques est le reflet d'une dérégulation épigénétique globale dans la cellule cancéreuse dont les mécanismes moléculaires restent à élucider.

Il est également très important de souligner que, du fait du statut immunitaire tout à fait particulier des produits de ces gènes et de leur caractère hautement immunogène, les C/T sont une source de marqueurs de grande valeur pour la détection des cancers, ainsi que des cibles potentielles très intéressantes pour une thérapie vaccinale, comme le démontrent des études pilotes. Ainsi l'identification de C/T supplémentaires pourrait ouvrir la voie à une approche globale pour la détection d'une pathologie cancéreuse ainsi que pour une thérapie vaccinale.

Résultats

Projet 1 : Conséquences de la protéine fusion BRD4-

NUT dans les cancers

La fonction de NUT dans les cellules germinales et somatiques et son action éventuelle sur la chromatine acétylée et l'épigénome en général sont des questions cruciales auxquelles je me suis attaché à répondre lors de mon doctorat.

Mon projet de thèse a porté notamment sur un cas particulier d'expression hors contexte du gène *NUT*, dans un cancer résultant d'une translocation chromosomique.

Les travaux menés ont donné lieu à une publication dans le Journal International EMBO J., qui après un bref résumé en français, vous sera présenté dans son intégralité dans la partie suivante.

Présentation de l'article :

Oncogenèse par séquestration de CBP/p300 au sein de domaines de chromatine inactive et hyperacétylée

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressé à la translocation chromosomique t(15 ;19), responsable de cancers extrêmement agressifs affectant aussi bien des enfants, des adolescents et des adultes. Cette translocation aboutit à la création d'un gène fusionnant deux protéines : BRD4 et NUT (French *et al*, 2003; French *et al*, 2008). Ce groupe de cancer, dénommé NMC pour *NUT-Midline Carcinoma*, est extrêmement agressif, sans passif historique familial et conduit invariablement à la mort du patient quelques mois après le diagnostic.

La protéine BRD4 est une protéine à double bromodomaine, capable d'interagir directement avec les histones acétylées et permettant alors le recrutement de différents facteurs cellulaires (voir Introduction partie IB2d et (Wu & Chiang, 2007). NUT (*Nuclear protein in testis*) est une protéine de fonction inconnue, montrant une expression exclusive dans les cellules germinales mâles (analyse banque ESTs).

Cette translocation fusionne le gène *NUT* dans le cadre exact de lecture du gène *BRD4*. La protéine fusion est donc sous le contrôle du promoteur ubiquiste de *BRD4*, et *NUT* se retrouve illégitimement exprimé dans des cellules somatiques. Dans toutes les translocations caractérisées, le gène *BRD4* subit une délétion d'environ un tiers de sa région 3' et seuls quelques nucléotides de la région 5' du gène *NUT* manquent. La protéine BRD4-NUT comporte donc le double bromodomaine de BRD4 et son domaine d'interaction ET, ainsi que l'intégralité des domaines de fonctions inconnues de la protéine NUT.

Un autre cas de translocation impliquant le gène *NUT* a été observé dans certains cancers, où la protéine NUT se retrouve fusionnée avec BRD3, un homologue de BRD4. Ainsi, l'expression illégitime de la protéine testiculaire NUT et son association à des bromodomains semblent être des facteurs clés pour la formation de ces cancers extrêmement agressifs et métastatiques.

BRD4-NUT induit la formation de foci hyperacétylés

Alors que la localisation de BRD4 et NUT exprimées de manière ectopique est diffuse dans le noyau, nous avons observé une localisation particulière de la protéine fusion sous forme de foci. Ces régions se sont révélées être hyperacétylées, mais non transcrites. Nous avons par la suite pu confirmer que cette formation de foci hyperacétylés au niveau de la chromatine était retrouvée chez une lignée directement issu d'un patient, HCC2429. De plus, ces foci contiennent la quasi-totalité des différentes acétylations de lysine possibles, mais aucune concentration remarquable en marques méthylées.

La protéine fusion BRD4-NUT recrute CBP/p300

Nous avons alors cherché à déterminer la cause de cette hyperacétylation induite par BRD4-NUT et nous avons pu observer une interaction franche avec la protéine histone acétyltransférase CBP/p300. Nous avons détaillé cette interaction et montré que le domaine TAZ2 de p300 interagit à la région centrale de NUT. CBP/p300 est donc recrutée dans les cellules transloquées et participerait à la formation de ces foci hyperacétylés.

L'interaction de p300 avec NUT accroît son activité HAT

Nous avons ensuite montré que l'interaction de NUT avec p300 potentialise son activité d'acétylation. Le mécanisme clair d'action de NUT est encore inconnu, mais de façon remarquable il rend possible l'acétylation spécifique de p300 de la lysine k56 de l'histone H3 (H3K56ac), qui nécessite normalement l'aide du chaperon ASF1. Nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Daniel Panne de l'EMBL de Grenoble, afin de profiter de la protéine recombinante purifiée p300 pour nos essais.

Un mécanisme de propagation de l'acétylation

Nos données mettent en évidence un phénomène de propagation de l'acétylation induit par la protéine oncogénique BRD4-NUT. Celle-ci s'associe à la chromatine acétylée grâce à ses bromodomains puis recrute CBP/p300 tout en la sur-activant, entraînant l'acétylation des régions avoisinantes. Ceci permet alors le recrutement de nouvelles protéines fusion, et nous avons observé que les HDACs restreignent cette propagation au niveau des foci. Nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Philippe Cole de l'Université de Baltimore, afin de profiter d'un nouvel inhibiteur spécifique de l'activité HAT de CBP/p300 pour nos essais.

Inactivation de la signalisation de p53

En plus de créer une hyperacétylation localisée, BRD4-NUT séquestre CBP/p300. Ceci a pour conséquence de la rendre absente dans le reste du génome, où elle joue normalement également un rôle d'activateur transcriptionnel. Nous avons montré que la voie de signalisation d'apoptose de p53 est altérée dans ces cellules. CBP/p300 participe à la stabilisation de p53 en l'acétylant, mais p53Kac se retrouve également séquestrée dans les foci. Une répression de BRD4-NUT dans ces cellules, soit par siRNA, soit par mutation des bromodomains, soit par inhibition des HDACs, entraîne le relargage de p53 et de CBP/p300 qui vont alors de nouveau pouvoir agir en synergie sur la transcription de gènes clés de l'apoptose ou de régulation du cycle cellulaire, tels que p21, PUMA et GADD45.

Nous avons pu démontrer lors de cette étude les conséquences d'une expression illégitime d'un facteur testiculaire, et son impact sur l'altération de l'épigénome et de la voie d'apoptose. Ainsi NUT, en fusion avec BRD4 ou BRD3 – les cellules BRD3-NUT présentant également des foci – crée un système apte à promouvoir la tumorigenèse.

Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains

Nicolas Reynoird¹, Brian E Schwartz²,
Manuela Delvecchio³, Karin Sadoul¹,
David Meyers^{4,5}, Chandrani Mukherjee^{4,5},
Cécile Caron¹, Hiroshi Kimura⁶,
Sophie Rousseaux¹, Philip A Cole^{4,5},
Daniel Panne³, Christopher A French²
and Saadi Khochbin^{1,*}

¹INSERM, U823, Université Joseph Fourier—Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France, ²Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA, ³EMBL Grenoble, Grenoble, France, ⁴Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA, ⁵Department of Oncology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA and ⁶Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

In a subset of poorly differentiated and highly aggressive carcinoma, a chromosomal translocation, t(15;19)(q13;p13), results in an in-frame fusion of the double bromodomain protein, BRD4, with a testis-specific protein of unknown function, NUT (nuclear protein in testis). In this study, we show that, after binding to acetylated chromatin through BRD4 bromodomains, the NUT moiety of the fusion protein strongly interacts with and recruits p300, stimulates its catalytic activity, initiating cycles of BRD4–NUT/p300 recruitment and creating transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. Using a patient-derived cell line, we show that p300 sequestration into the BRD4–NUT foci is the principal oncogenic mechanism leading to p53 inactivation. Knockdown of BRD4–NUT released p300 and restored p53-dependent regulatory mechanisms leading to cell differentiation and apoptosis. This study demonstrates how the off-context activity of a testis-specific factor could markedly alter vital cellular functions and significantly contribute to malignant cell transformation.

The EMBO Journal advance online publication, 30 July 2010; doi:10.1038/emboj.2010.176

Subject Categories: chromatin & transcription; molecular biology of disease

Keywords: Brdt; cancer testis factor; feed forward; H3K56; oncogene

Introduction

Malignant cell transformation is associated with a global disruption of genetic and epigenetic mechanisms leading to

*Corresponding author. INSERM, U823, Université Joseph Fourier—Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F 38700, France. Tel.: +33 4 76 54 95 83; Fax: +33 4 76 54 95 95; E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

Received: 15 February 2010; accepted: 6 July 2010

both aberrant gene activation and silencing. Although oncogenic gene silencing and activation and/or amplification of oncogenes are well documented, the impact of aberrant activation of normally silenced tissue-specific genes, that is, testis-specific genes, which is known to occur in many somatic cancers, is much less studied (Rousseaux and Khochbin, 2009).

The NUT midline carcinoma (NMC) refers to a group of malignant and highly lethal cancers, occurring in children and adults, which arise from chromosomal translocations systematically involving the *NUT* (NUclear protein in Testis) gene on chromosome 15q14. The function of *NUT* gene is unknown and it is normally expressed in testis (French, 2008). In the majority of NMC cases (two-third), the chromosomal translocation fuses *NUT* to the *BRD4* gene on chromosome 19 (French *et al*, 2003). A detailed analysis of the fusion transcript showed that *BRD4* exon 10b, normally used in a splice variant encoding a large BRD4 isoform, is fused to *NUT* exon 2 (French *et al*, 2008). The *BRD4* gene encodes a double bromodomain-containing protein belonging to a specific family of transcription/chromatin regulators known as BET (Bromodomain and Extra Terminal; Florence and Faller, 2001). In contrast with *NUT*, *BRD4* is ubiquitously expressed in somatic cells (French *et al*, 2003; Wu and Chiang, 2007).

Interestingly, in an additional subset of NMCs, which has recently been characterized, the chromosomal translocation fuses *NUT* to the *BRD3* gene on chromosome 9 (French *et al*, 2008). The *BRD3* gene is a paralogue of *BRD4* and also a member of the BET family function of which is less studied but, similar to *BRD4*, it preferentially associates with acetylated histones (LeRoy *et al*, 2008). This important finding points to the fusion of *NUT* with a double bromodomain-containing member of the BET family as an important determinant in the oncogenic activity of the fusion protein. Although the molecular basis of the oncogenic activity of *BRD–NUT* fusions remains largely unknown, it is clearly established that their downregulation in NMC cell lines induces squamous differentiation and arrested growth (French *et al*, 2008).

The data presented here explain why and how the fusion of *NUT* with genes encoding double bromodomain-containing factors of the BET family creates a new functional fusion protein, and shed light on a new oncogenic mechanism based on the off-context activity of a testis-specific factor.

Results

The BRD4–NUT fusion protein induces the formation of hyperacetylated chromatin domains

On its ectopic expression, BRD4–NUT forms discrete nuclear foci, which perfectly co-localize with hyperacetylated histone H3 and H4 chromatin domains (Figure 1A; Supplementary

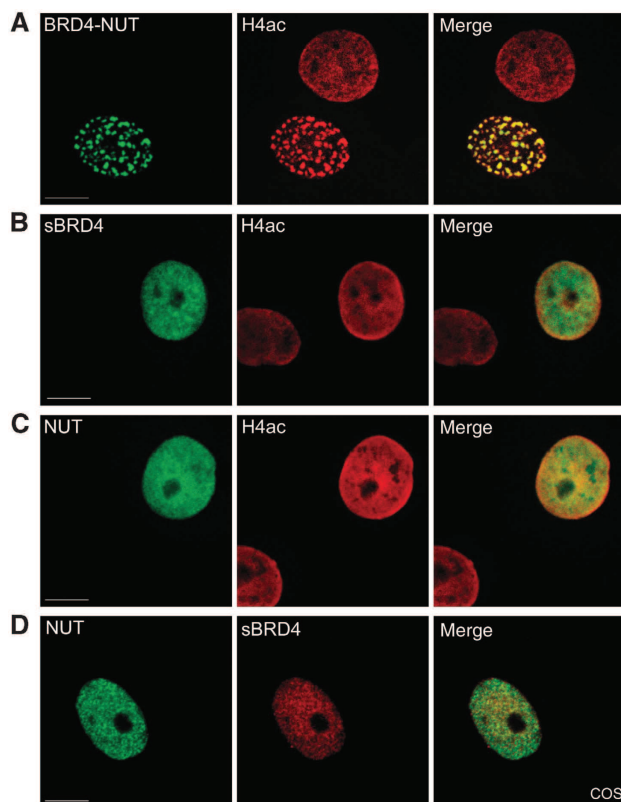


Figure 1 The BRD4–NUT fusion protein forms nuclear foci containing hyperacetylated chromatin domains. Cos7 cells were transfected with the indicated expression vectors, (A) GFP–BRD4–NUT, (B) HA–sBRD4, (C) HA–NUT and (D) HA–sBRD4 together with GFP–NUT. Ectopically expressed proteins were visualized by GFP or indirect fluorescence after anti-HA detection (A–D) and co-detected with an anti-pan acetylated histone H4 antibody (A–C). Bar: 10 μ m.

Figure S1A and S2A). This particular pattern of nuclear localization is specific to the fusion protein because the expression of BRD4 alone (the short isoform of BRD4, approximately corresponding to the BRD4 part of the fusion protein, named here sBRD4) or that of NUT alone, or the co-expression of both (sBRD4 + NUT), does not induce the formation of hyperacetylated chromatin domains (Figure 1B–D, respectively). Moreover, the expression of the longer BRD4 (fBRD4) isoform with NUT did not allow the formation of distinct nuclear foci containing the two proteins or hyperacetylated chromatin (Supplementary Figure S1B and C).

It has previously been shown that BRD4 bromodomains interact with histone H4 acetylated at different positions and histone H3 acetylated on its lysine 14 (Dey *et al*, 2003; Lee and Chiang, 2009). As expected, these marks and other H4 and H3 acetylated forms were enriched in BRD4–NUT foci (Supplementary Figure S2A; data not shown). The absence of RNA polymerase II, or of its phosphorylated forms, suggests that these BRD4–NUT hyperacetylated foci are not associated with active gene transcription (Supplementary Figure S2B; also see Figure 2G). Consistent with this observation, no accumulation of H3K4me3 was observed in the BRD4–NUT foci (Supplementary Figure S2C, H3K4me3 panel). The absence of H3K9me3 in the foci shows that, despite the absence of RNA pol II, and in agreement with the presence of

hyperacetylated histones, the BRD4–NUT foci are not of a heterochromatic nature (Supplementary Figure S2C, H3K9me3 panel).

The NUT moiety of BRD4–NUT specifically recruits CBP/p300

On the basis of these data, we hypothesized that BRD4–NUT could recruit cellular histone acetyltransferases (HATs), initiating cycles of BRD4–NUT/HAT recruitment and chromatin acetylation, leading to the formation of foci. Antibodies against several known HATs were used to detect their presence in the BRD4–NUT foci on its ectopic expression in Cos7 cells. Among the antibodies tested (P/CAF, Tip60, p300, CBP, HBO1 and HAT1), only anti-p300 and anti-CBP antibodies resulted in a clear accumulation of the endogenous protein in the BRD4–NUT foci (Figure 2A; Supplementary Figure S3; data not shown).

As no HAT had been reported to co-purify with BRD4 complexes (Jang *et al*, 2005; Yang *et al*, 2005), we assumed that NUT could be directing this efficient recruitment of cellular CBP/p300. This hypothesis was confirmed after immunoprecipitation of HA-tagged NUT, BRD4 and BRD4–NUT expressed in Cos7 cells. Endogenous p300 was observed to be associated only with NUT or BRD4–NUT (Figure 2B, lanes 2 and 4). In addition, we observed that NUT alone immunoprecipitates a strong associated HAT activity comparable with that of Gcn5 used as a control (Figure 2C, lanes 2 and 3).

To confirm the relevance of these observations based on the ectopic expression of our proteins of interest, we analysed the intranuclear localization of BRD4–NUT in a cell line derived from an aggressive, metastatic lung cancer arising in a young, non-smoking woman, HCC2429 (Haruki *et al*, 2005). Interestingly, the endogenous BRD4–NUT expressed in these cells (Figure 2D) also formed distinct nuclear foci very similar to the pattern observed after ectopic expression of BRD4–NUT (Figure 2E). In these cells, p300 and CBP were also observed to form foci, which perfectly localized with the BRD4–NUT nuclear domains (Figure 2E; data not shown).

Furthermore, we investigated the signature of p300 activity in the p300-containing foci in these cells. Histone H3K56 was very recently shown *in vivo* to be specifically acetylated by p300 (Das *et al*, 2009). Using a rabbit antibody specific for H3K56ac and a mouse monoclonal antibody against p300, we were able to clearly show a perfect co-localization of H3K56ac with p300 (Figure 2F). Another *in vivo* p300 mark is the acetylation of H3K18 (Ferrari *et al*, 2008; Horwitz *et al*, 2008). This modification also perfectly co-localized with p300 foci that co-localized with the BRD4–NUT foci (Figure 2F). Moreover, to definitely show the occurrence of hyperacetylated chromatin in the BRD4–NUT foci, several acetylated H4 and H3 sites, including H4K8ac, H3K14ac and H3K27ac, against which mouse monoclonal antibodies were available, were co-detected along with BRD4–NUT in the HCC2429 cells (Figure 2F; Supplementary Figure S2D).

Finally, to confirm that the endogenous BRD4–NUT foci are not active transcription sites, nascent RNAs labelled by BrU were detected both in HCC2429 and in a non-BRD4–NUT-expressing lung cancer cell line (A549). As shown in Figure 2G, none of the active transcription foci co-localize with the BRD4–NUT-containing domains, supporting the conclusion that the BRD4–NUT foci are transcriptionally silent chromatin domains.

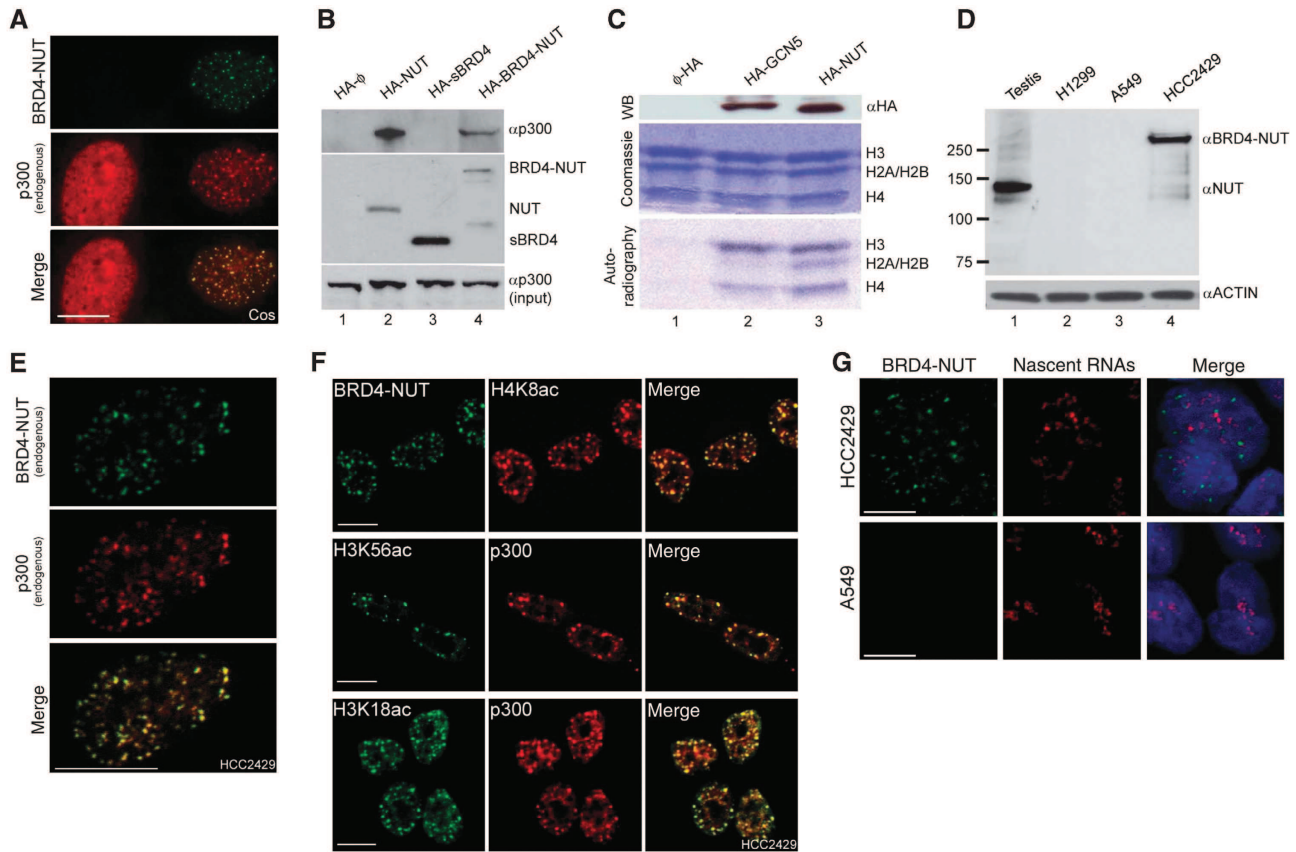


Figure 2 Specific recruitment of cellular p300 by the NUT moiety of BRD4-NUT to the nuclear foci. (A) Cos7 cells were transfected with GFP-BRD4-NUT and the endogenous cellular p300 was detected by immunofluorescence using an anti-p300 antibody. Both GFP and p300-related fluorescence were recorded and shown individually or together (merge panel). (B) Cos7 cells were transfected with the indicated HA-tagged vectors and, after anti-HA immunoprecipitation, HA-tagged proteins and associated endogenous p300 were visualized using the corresponding antibodies. The 'input' panel shows the amount of cellular p300 in each extract. (C) Cos7 cells were transfected with vectors expressing HA-tagged GCN5 or NUT and the corresponding empty vector (ϕ) and extracts were used to immunoprecipitate HA-tagged proteins. A fraction of immunoprecipitated materials was used to visualize proteins by an anti-HA western blot (anti-HA panel). Another fraction was used to monitor the HAT activity present in the immunoprecipitates using purified histones (lower panel, showing the corresponding autoradiography), which were visualized on a Coomassie-stained gel (middle panel). (D) Detection of endogenous BRD4-NUT with anti-NUT antibody in the HCC2429 cells compared with two other lung cancer cell lines (indicated). As a control, NUT was also detected in a rat total testis extract (lane testis). (E) Endogenous BRD4-NUT foci and p300 were detected in HCC2429 cells using the corresponding antibodies. (F) BRD4-NUT was co-detected with histone H4K8ac. The specific *in vivo* signatures of p300 activity, histones H3K56ac and H3K18ac, were also co-detected with endogenous p300 in HCC2429 cells (indicated). (G) BrU incorporation in nascent RNAs and BRD4-NUT foci were visualized in HCC2429 and A549 cells after a pulse labelling with BrUTP. Bar, 10 μ m.

Domains involved in the direct interaction between NUT and p300

We next explored whether NUT and p300 interact directly and determined which domains are involved. First, a p300 fragment lacking the 870 N-terminal amino acids was observed to interact with NUT as efficiently as the full-length p300 (data not shown). This deletion mutant of p300 (Δ 870) was used to further map the p300-interacting domains in NUT. An advantage of this p300 deletion mutant is that the interaction of both transfected p300 (Δ 870) and endogenous p300 with NUT can be monitored. Figure 3A shows different fragments of both proteins used in these experiments. Co-immunoprecipitation experiments showed that full-length NUT, as well as a NUT deletion mutant containing only the N-terminal half of NUT (F1, see Figure 3A), interacted with both transfected Δ 870 and endogenous p300 (Figure 3B, lanes 2 and 4). No interaction with p300 was observed when fragments of the C-terminal half of NUT were used (Figure 3B, lanes 6 and 8). We then tried to map the p300-interacting domain within the N-terminal half of NUT more precisely. Three fragments

covering the N-terminal 593 amino acids of NUT were cloned (named F1a, b and c, respectively; Figure 3A) and tested as above. Only a limited region of NUT spanning amino acids 346-593 (F1c) interacted specifically with endogenous p300 (Figure 3C, lane 4). An analysis of the amino-acid sequence of NUT from different mammalian species showed that this region is highly conserved (data not shown), indicating its importance for the function of NUT. We further confirmed the interaction between the F1c domain of NUT and p300 by using a GST pull-down assay. GST alone or fused to the F1c fragment was incubated with Cos7 nuclear extracts. Figure 3D shows that the F1c fragment efficiently pulled down endogenous p300 (anti-p300 panel), and that this fraction contained *in vitro* HAT activity (autoradiography panel).

To map the NUT-interacting domain of p300, Cos7 cell extracts expressing different fragments of p300 were used in a pull-down assay with GST alone or the GST-NUT F1c fragment as described above. Figure 3E shows that the CH3 fragment of p300 encompasses the major binding site for

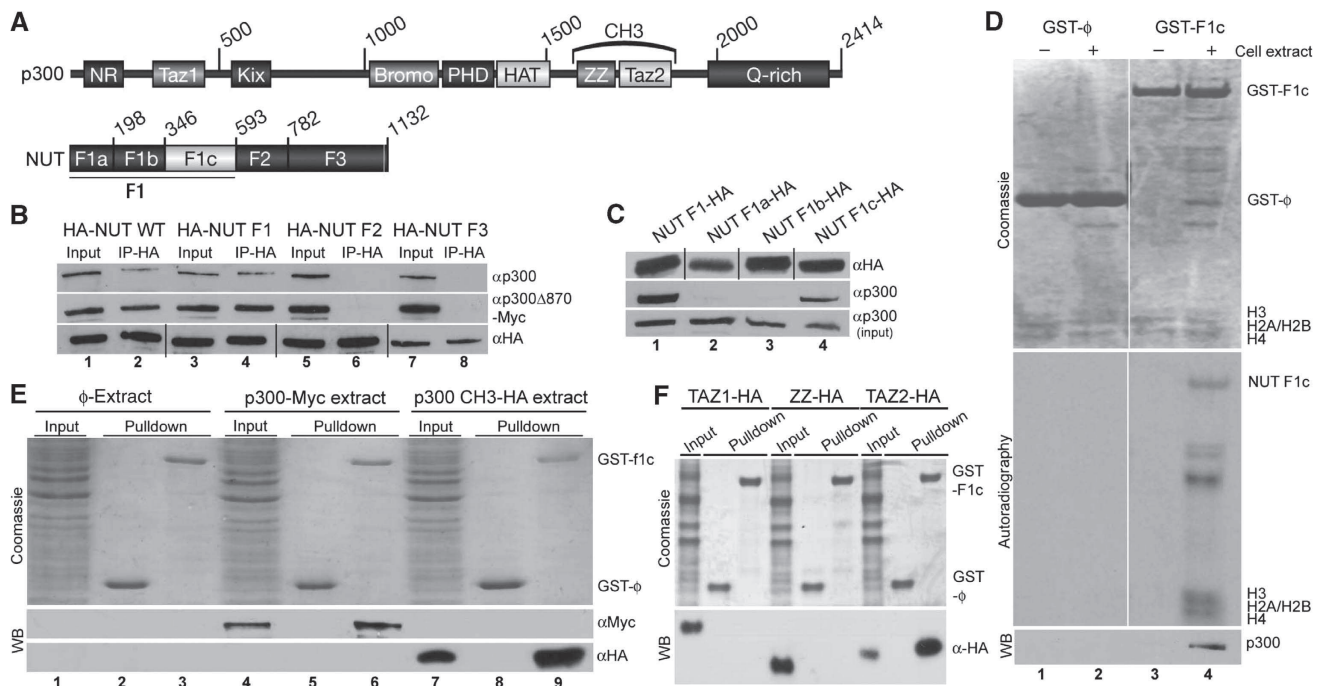


Figure 3 Mapping of domains in NUT and p300 involved in a direct interaction between the two proteins. (A) Schematic representation of domains and fragments used in both p300 and NUT. (B) Cos7 cells were transfected with Myc-tagged $\Delta 870$ p300 and the indicated fragments of HA-tagged NUT-expressing vectors and, after anti-HA immunoprecipitation, the immunoprecipitated proteins were visualized using the indicated antibodies. (C) The indicated HA-tagged NUT fragments were expressed in Cos7 cells and, after anti-HA immunoprecipitation (anti-HA panel), the association of the endogenous p300 was visualized (anti-p300 panel). The input panel indicates the presence of p300 in the different extracts. (D) Glutathione-bound GST or the GST-F1c fragment of NUT were incubated in a nuclear extract from Cos7 cells. Fractions of the bound proteins were either used to detect the presence of endogenous p300 (bottom panel) or to run a HAT assay using purified histones, as described previously. The Coomassie-stained gel (upper panel) shows GST and GST-F1c NUT before and after the pull down. The gel was then dried and used to visualize acetylated proteins after autoradiography (middle panel). (E) GST or GST-F1c were used to pull down either Myc-tagged p300 WT or the HA-tagged CH3 domain of p300. Extracts and proteins used in the pull down are shown after the Coomassie staining of the gel (upper panel). The proteins pulled down were visualized using the indicated antibodies. (F) In an experiment similar to (E), the interaction of GST or GST-F1c with the indicated fragments of p300 was monitored. Please note that as the HA-tagged proteins were of different sizes (B, C), only the corresponding areas of the films are shown and separated by lines. A full-colour version of this figure is available at *The EMBO Journal Online*.

NUT (lane 9). Two sub-domains have been identified in the CH3 domain and are known as ZZ and TAZ2. Pull-down experiments using extracts from cells expressing HA-tagged ZZ, TAZ2 and the p300 TAZ1 domain, showed that binding of NUT was specific to the TAZ2 domain (Figure 3F).

We next wanted to determine whether the interaction between p300 and NUT is direct. Bacterially expressed GST-NUT F1c fragment and two versions of p300 (called p300L for amino acids 324–2094 and p300S for 1045–1666 fragment, respectively with or without the CH3 domain) were purified after expression in a baculovirus system, and their interaction was tested in a GST pull-down assay. Purified p300 directly binds to NUT F1c (Figure 4A, lane 4), whereas no interaction was observed under the same conditions in the absence of the p300 CH3 domain (lane 3).

NUT strongly enhances p300 HAT activity

To investigate whether the NUT–p300 interaction could account for the hyperacetylation phenotype, we tested the effect of NUT on p300 HAT activity. Myc-tagged p300 with or without HA-NUT was transfected into Cos7 cells. Figure 4B shows that for the same amount of immunoprecipitated Myc–p300 (lanes 2 and 4, anti-Myc panel), the HAT activity was much stronger when p300 was co-expressed with NUT (autoradiography panel). We have also immunoprecipitated

NUT using an anti-HA antibody. Figure 4B (anti-HA panel) shows that NUT efficiently co-immunoprecipitates p300 and that, here again, the p300 HAT activity is highly enhanced (compare lane 2, immunoprecipitated p300 without NUT, with lane 8, showing the same amount of p300 with NUT). Quantification of the labelled histones from several independent experiments by PhosphorImager and ImageQuant analysis showed that the presence of NUT increased p300 activity by about 8–10 times (data not shown).

We then took advantage of our purified system to directly test the stimulatory effect of NUT on p300 HAT activity. Increasing amounts of purified GST-NUT F1c fragment were incubated with the purified 324–2094 p300L fragment in an *in vitro* HAT assay. Histone H3 is a preferred target of p300 *in vivo* and was therefore used as a substrate in these assays. Figure 4C shows that purified F1c fragment clearly stimulates H3 acetylation by purified p300 in a dose-dependent manner. Using several modification-specific antibodies, we tested the stimulatory effect of the NUT F1c fragment on the specificity of p300 HAT activity. We observed that p300 alone acetylated all H3 acetyl-acceptor lysines except K56. Addition of GST-F1c enhanced the acetylation of H3K9, K14, K18 and K27 in a dose-dependent manner. Interestingly, in the presence of NUT F1c, p300 was able to acetylate H3K56, indicating that NUT might also specifically stimulate H3K56

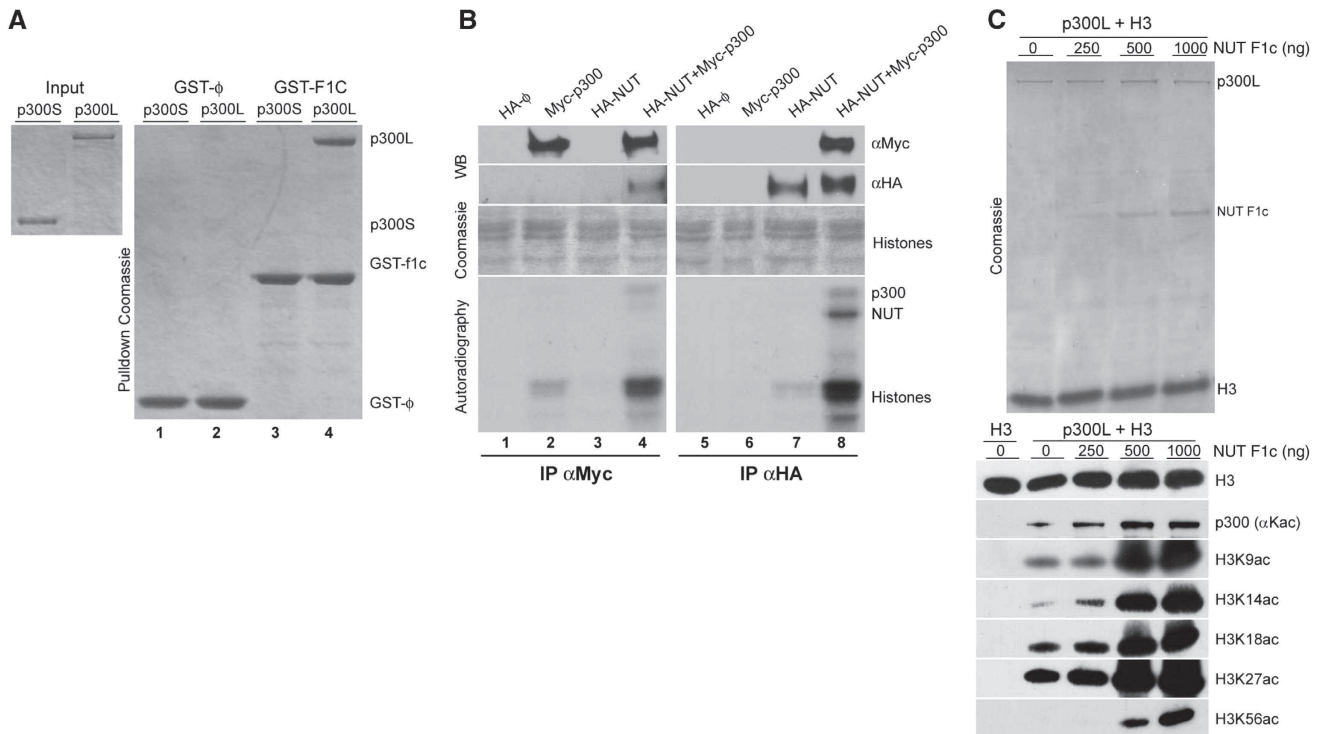


Figure 4 Direct enhancement of p300 HAT activity by NUT. **(A)** p300L (amino acids 324–2094 fragment) or p300S, a deletion mutant lacking its CH3 domain (amino acid 1045–1666 fragment) were expressed using a baculovirus system and purified. In parallel, GST and GST-F1c were expressed in bacteria and purified and used in a pull-down assay. The gel shows proteins present in the input (left panel) and after the pull down (right panel). **(B)** Cos7 cells were transfected with vectors expressing the indicated tagged proteins alone or together. After an immunoprecipitation using anti-Myc (p300) and anti-HA (NUT) antibodies, a fraction was used to monitor protein immunoprecipitations (upper panels). Another fraction was used for an *in vitro* HAT assay as described in Figure 2C. Coomassie-stained histones and the corresponding autoradiography are shown (middle and lower panels, respectively). **(C)** Purified p300 was incubated with histone H3 in the absence (0) or presence of increasing amounts of purified GST-F1c fragment of NUT (Coomassie panel). Aliquots corresponding to each incubation conditions were used to monitor site-specific histone H3 acetylation using antibodies recognizing the indicated acetylated sites. Anti-acetylated lysine and anti-H3 antibodies were used to show p300 autoacetylation and H3 loading, respectively. A full-colour version of this figure is available at *The EMBO Journal* Online.

acetylation. The same *in vitro* experiment was repeated using another fragment of NUT, F1b, incapable of interacting with p300 (Figure 3C). In contrast to F1c, this p300 non-interacting region of NUT had no effect on p300 HAT activity (Supplementary Figure S4).

BRD4–NUT mediates histone acetylation propagation through a feed-forward mechanism

The data obtained thus far suggested that the BRD4–NUT fusion could create a unique factor, binding acetylated chromatin through its bromodomains, and providing a platform for the recruitment of p300 and the stimulation of its HAT activity through NUT. An original feed-forward mechanism could then be initiated, through cycles of p300-mediated acetylation of adjacent nucleosomes and additional BRD4–NUT recruitments, leading to the formation of the observed foci. To test this hypothesis, we evaluated several of its testable aspects. First, BRD4–NUT foci formation and the corresponding chromatin acetylation should be abrogated by inactivating BRD4 bromodomains. Figure 5A shows that indeed, BRD4–NUT bearing inactivating mutations in its first bromodomain is unable to form foci and sustain local histone acetylation. Second, we reasoned that ectopic expression of p300 should stimulate the propagation of BRD4–NUT and hence lead to a decrease in the number of small BRD4–NUT foci in favour of the formation of larger foci. Figure 5B

shows an example of two cells expressing BRD4–NUT, one of which also ectopically expresses p300. As predicted, fewer but larger BRD4–NUT foci are observed in the Myc–p300-expressing cells. Although p300 is known to form nuclear foci when expressed in cells (Eckner *et al*, 1994), p300 present in the BRD4–NUT foci, however, seemed to be of a different nature (Figure 5B, compare p300 in the BRD4–NUT foci with p300 alone shown in the inset). To quantify the effect of the ectopic expression of p300, the foci number and the area occupied by these foci were determined and compared with those of cells expressing only BRD4–NUT. This quantitative analysis shows that the ectopic expression of p300 leads to an approximately four-fold enlargement of BRD4–NUT foci mean area per cell, as well as a decrease in the total number of foci (Figure 5B, histograms).

We then used the HCC2429 carcinoma cell line and observed that the overexpression of p300-interacting region of NUT, F1c, or the NUT interaction region of p300, CH3, leads to the dispersion of p300 in the nucleus (Figure 5C). Notably, anti-NUT antibody recognizes the transfected F1c fragment, leading to a more intense NUT labelling in F1c-transfected cells.

We also anticipated that a continuous p300 activity should be required to keep BRD4–NUT concentrated at the foci and, consequently, that the inhibition of p300 catalytic activity should lead to the dispersion of BRD4–NUT foci. Accordingly,

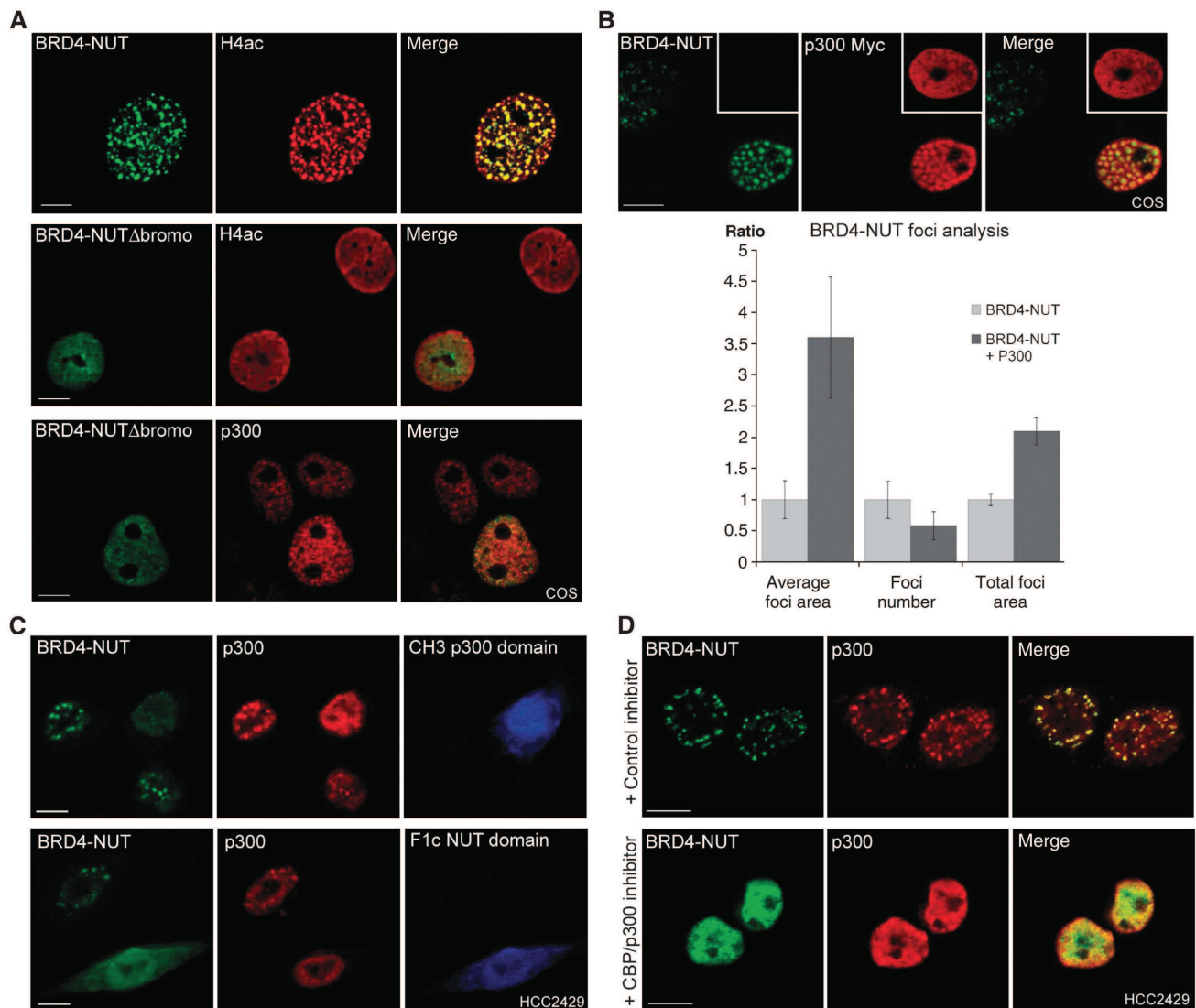


Figure 5 Propagation of chromatin acetylation through a feed-forward mechanism induced by BRD4–NUT. (A) The first BRD4 bromodomain was inactivated by site-directed mutagenesis (BRD4–NUT Δ br1) and the capacity of this mutant to form nuclear foci and acetylated chromatin domains enriched in p300 was analysed after the transfection of Cos7 cells. (B) Co-transfection of p300 together with GFP–BRD4–NUT leads to the enlargement of BRD4–NUT foci. The inset shows a cell expressing Myc–p300 alone. The histogram shows the results of quantitative evaluations (ratios of the values observed in p300-transfected cells to those observed in non-transfected cells) of the mean foci area (left), mean foci number (middle) and mean total foci area per cell (right), obtained as described in Materials and methods section. (C) HCC2429 were transfected either with the NUT interaction domain of p300, CH3 (upper panel), or the p300-interacting domain of NUT, F1c (lower panel), and the formation of foci by the endogenous p300 was monitored. NUT–F1c and p300–CH3 were detected with an anti-HA antibody, endogenous p300 with an anti-p300 antibody and BRD4–NUT with an anti-NUT antibody. Please note that the anti-NUT antibody also recognizes the NUT–F1c fragment. The images are representative of nearly 100% of the cells expressing either fragments. (D) HCC2429 cells were treated with the small p300 inhibitor, C646 (+ p300 inhibitor) or its inactive analogue (+ control inhibitor) and BRD4–NUT and p300 were visualized with the corresponding antibodies. The images are representative of nearly 100% of the cells. Bar: 10 μ m.

a newly developed small molecule inhibitor of CBP/p300, C646 and its inactive analogue (Bowers *et al*, 2010), were used to test this hypothesis. Figure 5D shows that the treatment of cells with the specific CBP/p300 inhibitor, but not with its inactive analogue, leads to a clear dispersion of the BRD4–NUT and p300 foci.

Finally, our model predicts that the activity of cellular HDACs should oppose the p300-dependent propagation of BRD4–NUT foci. Accordingly, the inhibition of cellular HDACs by increasing the genome-wide histone acetylation should also lead to the propagation of BRD4–NUT and the dispersion of the foci. This was indeed the case because the

treatment of HCC2429 with an HDAC inhibitor, TSA, induced complete dispersion of the foci (Supplementary Figure S5A). Besides, monitoring the amounts of BRD4–NUT after TSA treatment, we also noticed that this treatment induces a significant downregulation of BRD4–NUT at the time when an accumulation of the cell cycle regulator p21 was observed (Supplementary Figure S5B). As TSA treatment did not change the amount of BRD4–NUT encoding mRNA in HCC2429 cells (Supplementary Figure S5C), the BRD4–NUT downregulation probably occurred through a post-translational mechanism. This downregulation of BRD4–NUT was also observed after the treatment of cells with other unrelated

class I/II HDAC inhibitors, SAHA (vorinostat) and butyrate, but not with the class III HDAC inhibitor, nicotinamide, nor after a genotoxic treatment by etoposide (Supplementary Figure S5D).

Altogether these data are consistent with a mechanism in which the bromodomains and the NUT moiety of BRD4–NUT act synergistically as a potent histone hyperacetylase, action of which is counteracted by cellular HDACs, leading to the formation of hyperacetylated chromatin foci.

Inactivation of p53 regulatory circuits by BRD4–NUT

Our data show that BRD4–NUT foci titrate out cellular p300 into a limited number of transcriptionally silent hyperacetylated chromatin domains. Accordingly, we predicted that important p300-dependent cellular functions should also be altered in BRD4–NUT-expressing HCC2429 cells. CBP/p300 has an important role in mediating p53-dependent cellular responses by acetylating p53 (for review, see Grossman (2001)). We therefore hypothesized that p53 regulatory activity could be disrupted in the HCC2429 cells. Using an antibody specifically recognizing p53 acetylated by CBP/p300 (K373ac and K382ac), we observed that in HCC2429 cells acetylated p53 is also present in distinct nuclear foci, which disappear after the knockdown of BRD4–NUT (by two independent anti-NUT siRNAs), strongly suggesting that acetylated p53 remains bound to the BRD4–NUT/p300 foci (Supplementary Figure S6A). As both anti-acetylated p53 and anti-NUT antibodies were generated in rabbit, the co-detection of acetylated p53 and BRD4–NUT was not possible in HCC2429 cells; however, in a transfection-based assay using GFP–BRD4–NUT, acetylated p53 indeed accumulated in the BRD4–NUT foci, whereas total p53 was observed all over the nucleus (Supplementary Figure S7A).

On the basis of these observations, we predicted that p53 should be inactive in HCC2429 cells and therefore unable to ensure known p53-dependent cellular responses, such as *p21* induction after a genotoxic assault. To test the activity of p53 in HCC2429 cells, A549 cells expressing wild-type p53, used as a control, and HCC2429 cells, also expressing wild-type p53 (verified by sequencing; data not shown) were treated with etoposide and the activation of one p53 target gene, *p21* was monitored. Although an etoposide treatment efficiently induced *p21* accumulation in A549 cells, it was not associated with a *p21* gene response in HCC2429 cells (Figure 6A), supporting the hypothesis that BRD4–NUT is capable of interfering with p53 functions in these cells. To confirm the inactivating role of BRD4–NUT on p53, we then transiently expressed BRD4–NUT in A549 cells and showed that it severely hindered *p21* activation, normally occurring in these cells after an etoposide treatment (Figure 6B). In addition, we made use of a *p21* promoter reporter system to monitor the p53 transactivator capacity in the absence or presence of increasing amounts of BRD4–NUT. After co-transfection of BRD4–NUT and p53, as expected, acetylated p53 was sequestered in BRD4–NUT foci (Supplementary Figure S7A) and increasing amounts of BRD4–NUT significantly reduced its activator function on the *p21* promoter (Supplementary Figure S7B).

Finally, to show the direct involvement of BRD4–NUT in p53 inactivation, we knocked down BRD4–NUT using two independent anti-NUT siRNAs and showed an efficient restoration of *p21* gene expression (Figure 6C) corresponding

to the dispersion of acetylated p53 in the whole nucleus (Supplementary Figure S6A, siRNA BRD4–NUT panels). We could also demonstrate that the restoration of p53 activity was associated with a spontaneous HCC2429 cell apoptosis as judged by the accumulation of active caspase 3 (Figure 6C; Supplementary Figure S6B), as well as cell differentiation, as judged by the accumulation of epithelial differentiation marker E-cadherin (Figure 6C). Moreover, the release of p300 and acetylated p53 after BRD4–NUT knockdown in HCC2429 cells correlated with an enhanced apoptotic cell response after a genotoxic assault (Supplementary Figure S6B).

As some of the cellular events described here may occur in a p53-independent manner, we focussed our attention on p21 and showed that p21 accumulation induced by BRD4–NUT knockdown, was abolished if p53 was also knocked down (Figure 6D). Finally, to extend this study to other p53 target genes, in addition to *p21*, we also considered the expression of *PUMA* and *GADD45* (Harris and Levine, 2005). Figure 6E shows that BRD4–NUT downregulation after the treatment of cells with two independent anti-NUT siRNAs leads to a significant accumulation of mRNA encoded by the three p53 target genes. Interestingly, the treatment of cells with a CBP/p300 inhibitor severely interfered with the induction of these genes, showing that CBP/p300 activity is required to activate p53 target genes after BRD4–NUT knockdown. Accordingly, a ChIP approach showed that the knockdown of BRD4–NUT leads to the recruitment of acetylated p53 and p300 on *p21* promoter concomitant with *p21* gene activation (Figure 6F).

Altogether, these data clearly show a role for BRD4–NUT in the extinction of critical CBP/p300 functions through the sequestration of these enzymes in HCC2429 cells.

Discussion

The testis-specific factor, NUT, is central to the oncogenic activity of the fusion protein in NMCs because it is invariably involved in the resulting oncogenic chromosomal translocations (French, 2008). In addition, the fusion with a double bromodomain protein of the BET family, either BRD4 or BRD3, seems to constitute the second critical element in the pathological activity of the fusion protein (French *et al*, 2008). Here, the functional dissection of the BRD4–NUT protein reveals unique properties for this fusion protein and explains why selection operates towards the fusion of *NUT* with members of the BET family.

The fact that the fusion of NUT with BRD4 or BRD3, probably with distinct cellular functions (Wu and Chiang, 2007; LeRoy *et al*, 2008; Chiang, 2009), results in the same phenotype strongly suggests that their important functional contribution is related to the presence of their bromodomains that show similar acetylated histone-binding activities *in vivo* (Dey *et al*, 2003; LeRoy *et al*, 2008).

The protein, NUT, is a testis-specific protein of totally unknown function. On the basis of the data presented in this study, it can be speculated that the physiological role of NUT is related to its association with, and stimulation of p300 and/or other yet unknown HATs. This activity of NUT could contribute to the wave of genome-wide post-meiotic histone hyperacetylation that occurs in elongating spermatids just before their replacement by transition proteins (Boussouar

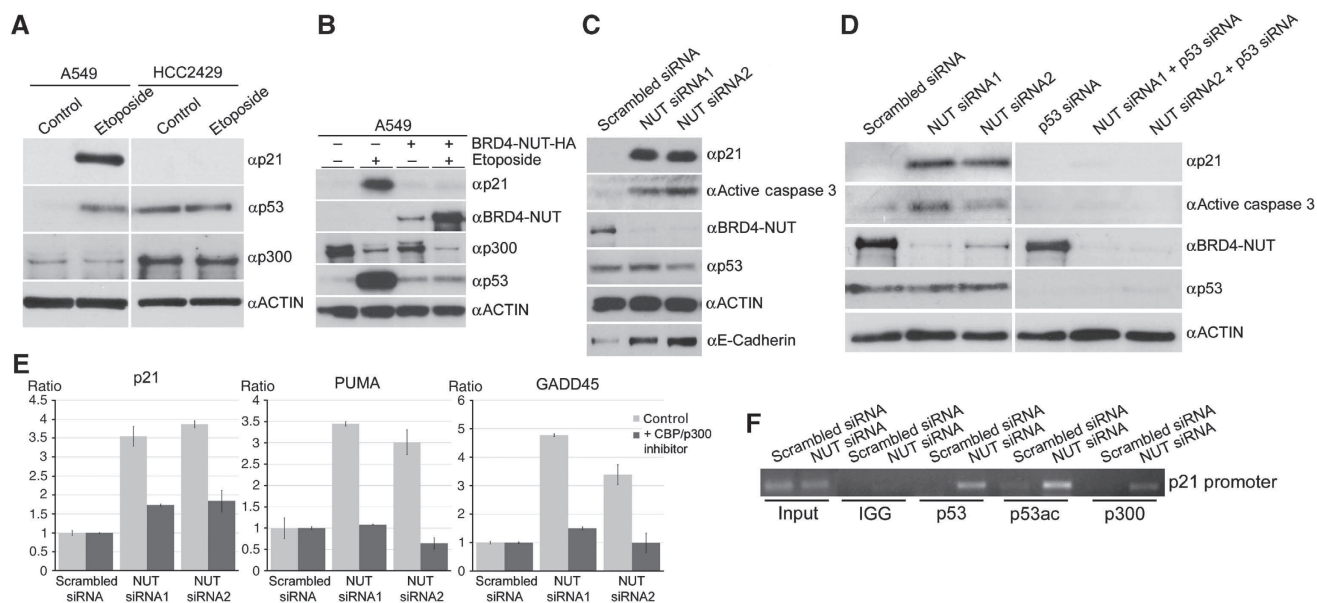


Figure 6 p53 inactivation in BRD4–NUT-expressing cells. (A) HCC2429 and A549 cells were treated with 20 μ M etoposide for 15 h and p21, p53 and p300 were visualized as indicated. (B) A546 cells were transfected with an empty vector (–) or with a BRD4–NUT-expressing vector (+) and treated or not with etoposide as above (+ and –, respectively) and the indicated proteins were detected with the corresponding antibodies. (C) HCC2429 cells were treated with scrambled siRNAs or two specific anti-BRD4–NUT siRNAs and the indicated proteins were visualized as above. (D) HCC2429 cells were treated with the anti-BRD4–NUT siRNAs indicated above as well as with an anti-p53 siRNA and the indicated proteins were visualized using the corresponding antibodies. (E) The expression of *p21*, *PUMA* and *GADD45* were monitored after the knockdown of BRD4–NUT with the two above-mentioned siRNAs in the presence (dark grey histograms) or absence (light grey histograms) of p300 inhibitor. Data represent the mean \pm s.d. values of at least three independent experiments. (F) The association to *p21* promoter of p53, acetylated p53 (p53ac) and p300 was monitored in HCC2429 cells before and after the knockdown of BRD4–NUT by siRNA as above. The PCR amplification shown here is representative of three independent ChIPs.

et al, 2008; Rousseaux *et al*, 2008) in which both NUT and p300 are expressed (data not shown).

Interestingly, the BRD4–NUT-dependent histone hyperacetylation evidenced here is not associated with transcription. This situation is similar to that observed in maturing post-meiotic male germ cells in which, despite histone hyperacetylation, there is a major turn-off in transcriptional activity associated with chromatin compaction. In BRD4–NUT-expressing cells, the absence of transcription, despite p300 recruitment and histone hyperacetylation, could also be associated with an acetylation-dependent compaction of chromatin in the foci. Indeed, an acetylation-dependent chromatin compaction was previously reported under the action of the testis-specific member of the BET family, Brdt (Pivot-Pajot *et al*, 2003; Govin *et al*, 2006; Moriniere *et al*, 2009). It is therefore possible that BRD4–NUT locally mimics a ‘Brdt-like’ activity in compacting acetylated chromatin domains, which would hinder the access of RNA Pol II to genes.

The dissection of the mechanisms underlying the formation of acetylated BRD4–NUT chromatin foci revealed a unique mechanism leading to the creation of large acetylated chromatin domains. Indeed, a BRD4–NUT mutant with an inactive bromodomain is incapable of forming BRD4–NUT acetylated chromatin domains, suggesting that the initial targeting of acetylated chromatin by the fusion protein is necessary to initiate the process. Once BRD4–NUT is in place, the recruitment of p300 and the stimulation of its HAT activity would allow the propagation step. As shown also for MAML1–p300 interaction, engagement of the CH3 domain by various protein ligands may be a general mechanism for

enhancing the catalytic activity of p300 (Hansson *et al*, 2009). The extent of this propagation is limited by HDAC activity, which, by opposing histone acetylation, could slow down and eventually stop the propagation, thereby creating discrete foci. The presence and activity of p300 are critical for the maintenance of BRD4–NUT foci. Indeed, the overexpression of the p300-interacting domain of NUT, F1c, leads to the displacement of p300 and the dispersion of the BRD4–NUT foci. This experiment also reveals an important role for the CH3 domain of p300 in the maintenance of these foci. Interestingly, this domain of p300 is critical for the ‘physiological’ p300 foci formation because, according to early investigations, the CH3-interacting viral protein E1A also disrupts these foci (Lill *et al*, 1997). In addition, we show in this study that the continuous activity of p300 is also required for the stability of the BRD4–NUT foci, as its inhibition with a specific small molecule inhibitor disrupts the foci probably due to a dominant HDAC activity. Indeed, in patient-derived HCC2429 cells, the genome-wide histone hyperacetylation induced by TSA and the subsequent downregulation of BRD4–NUT leads to the dispersion of BRD4–NUT foci.

In the absence of TSA treatment, the high affinity binding of p300 to the NUT moiety of the fusion protein leads to the accumulation of the majority of cellular p300 into these transcriptionally inactive BRD4–NUT foci. On the basis of these findings, we also predicted that in BRD4–NUT-expressing cells important cellular functions depending on p300 should be altered. One of the functions of p300 is the control of p53 regulatory activity (Grossman, 2001). Indeed, we show in this study that the release of p300 after BRD4–NUT

downregulation in HCC2429 cells leads to the activation of p53 target genes in a CBP/p300-dependent manner. These studies allowed us to clearly demonstrate one of the oncogenic activities of the BRD4–NUT fusion protein. However, as CBP/p300 and BRD4 are involved in various critical cellular processes, the sequestration of these proteins in limited numbers of nuclear domains certainly affects other cellular functions hindering apoptotic cell response and cell differentiation. For instance, a deficiency of BRD4, which has important roles in polII transcription (Wu and Chiang, 2007), in BRD4–NUT-expressing cells could also be oncogenic. Indeed, it has been shown that *Brd4*^{+/-} cells present increased chromosomal missegregation (Nishiyama *et al*, 2006).

The most important aspect of this study, however, is that it uncovers a new concept in oncogenesis. Indeed, we show in this study how the off-context activity of a testis-specific factor in a somatic cell becomes oncogenic. As the aberrant expression of testis-specific genes has been reported in many cancer cells, we propose that, at least in some cases, that is NUT, the product of these genes can be major contributors to malignant cell transformation (Rousseaux and Khochbin, 2009). This concept opens a new area of research in cancer biology.

Materials and methods

Plasmids

The BRD4–NUT GFP construction was kindly provided by Dr Dang, and then sub-cloned in a pcDNA 3.1 HA vector. p300 WT and ΔN870 Myc plasmids were generous gifts from Dr H Stunnenberg. The sBRD4 and NUT constructions were obtained after PCR amplification of their corresponding coding sequences from a human testis cDNA bank (Clontech) and cloned in pcDNA 3.1 HA and pEGFP-C vectors. Different NUT fragments (f1, f1a, f1b, f1c, f2 and f3) were amplified using the appropriate sets of primers and cloned in pcDNA 3.1 HA and in pGEX5 GST vectors. p300 CH3, TAZ1, ZZ and TAZ2 fragments were amplified from the p300WT plasmid and cloned into the pcDNA 3.1 HA vector. BRD4–NUT ΔBromo1 construct was obtained by deleting six critical amino acids of bromodomain 1 (81-PFQQPV-88) directly in BRD4–NUT pcDNA HA plasmid, using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Mutations were then confirmed by DNA sequencing.

p53 Flag and p21 promoter luciferase plasmids were purchased from Addgene Organisation (www.addgene.org).

Cell culture, treatments, transfection assays, antibodies and gene reporter assay

Cos7 cells were maintained in DMEM medium, whereas H1299, A549 and HCC2429 cells were maintained in RPMI medium complemented with 10% SVF, 2% glutamine and 1% P/S. When needed, cells were treated with TSA 100 ng/ml (Sigma) for different times or with etoposide 20 μg/ml (Sigma).

p300 inhibitor, C646, or its inactive analogue (Bowers *et al*, 2010) was added to the culture medium from 1 h to complete siRNA incubation time (24–48 h), at 20 μg/ml.

Cells were seeded and grown to 60–70% confluence on the day of transfection. Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), using a ratio of 1 μl of Lipofectamine for 1 μg total quantity of vectors. The BRD4–NUT siRNA1 (forward: 5'-gcuaaagugaagacca-3'), BRD4–NUT siRNA2 (forward: 5'-gggaaugcaga aaggacaa-3') and scrambled siRNA were purchased from Eurogentec, whereas p53 siRNA was obtained from Qiagen (SI02655170, Hs_TP53_9). Cells were transfected with Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) using the company instructions and cells were collected 24–48 h before analysis.

The primary antibodies used were: anti-NUT (Cell Signaling Technology), anti-p300 rabbit (N-15, Santa Cruz Biotechnology), anti-p300 mouse (05–257, Millipore), anti-BrdU (A21300, Invitrogen), anti-HA rat (for IP and IF, Roche), anti-HA mouse (for WB,

Covance), anti-FlagM2 (F3165, Sigma), anti-Myc rabbit (ab9106, Abcam), anti-β-Actin (A5441 Sigma), anti-Histone H4 pan rabbit (05–858, Millipore), anti-H3 rabbit (05–928, Millipore), anti-H3K9ac rabbit (07–352, Millipore), anti-H3K14ac rabbit (07–353, Millipore), anti-H3K18ac rabbit (Millipore), anti-H3K56ac rabbit (2134–1, Epitomics), anti-RNA pol II (8WG16, H5, H14, Covance), anti p53 (DO7, Dako), anti-p53 K373ac-K382ac (06–758, Millipore), anti-p21/WAF1 (ab-10P64, Calbiochem), anti-PARP (Boehringer), anti-cleaved-caspase 3 (9661S, Cell Signaling Technology), anti-E-cadherin (18–0223, Zymed Laboratories) and mouse anti-acetylated histones from H Kimura.

Gene reporter assay was carried out as detailed in the Supplementary data.

Immunofluorescence, BrUTP incorporation, immunoprecipitation, HAT assay, GST pull down, qRT-PCR and ChIP

Cells were grown on two- or four-well glass Lab-Tek (Nunc), transfected with 1 μg plasmid of interest, fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min at room temperature and then permeabilized in 4% paraformaldehyde–0.1% Triton X-100 for 1 min at room temperature. Fixed and permeabilized cells were incubated in blocking buffer (PBS containing 5% skim milk) for 30 min at room temperature, then in primary antibody (except for GFP-tagged proteins) for 1 h at 37°C, then washed with PBS and incubated in the secondary antibody for 30 min at 37°C. After three washes in PBS, the cells were counterstained with Hoechst (250 ng/ml) and examined under a confocal microscope.

In situ transcription was monitored by BrUTP (Sigma) incorporation as described previously (Roussel *et al*, 1996) in conditions set up to reveal RNA pol I and RNA pol II transcription (Moore and Ringertz, 1973). Briefly, cells were grown on two- or four-well glass Lab-Tek (Nunc) and slightly fixed and permeabilized for 5 min at 4°C, then incubated for 30 min at 37°C with transcription buffer (100 mM Tris, 4 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% B-mercaptoethanol, 150 mM sucrose, 0.6 mM ATP, GTP and CTP and 0.12 mM BrUTP). Incorporated BrU was then detected with 1/100 anti-BrdU antibody (Invitrogen) incubated for 1 h at 37°C.

For qRT-PCR, RNA was extracted from treated or non-treated cells using TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA with SuperScript III First-Strand Synthesis mix (Invitrogen). Human p21 (F: 5-CCTGTCACTGTCTGTACCT-3, R: 5-TTAGCAG CGGAACAAGGAGT-3), PUMA (F: 5-GACCTCAACGCACAGTACGA-3, R: 5-GAGATTGTACAGACCCTCCA-3), GADD45a (F: 5-TTTGCAATA TGACTTTGGAGGA-3 R: 5-CATCCCCACCTTATCCAT-3) and BRD4–NUT (F: 5-AGGCTGTCATTCACCTCAA-3, R: 5-CTCTTCCAAGGCCA TGAGTC-3) expressions were then monitored using Brilliant SYBR Green Master mix and MX3005P (Stratagene) and normalized by ACTIN or GAPDH expression.

ChIP experiment was carried out on the basis of X-ChIP protocol from Abcam with modifications. Briefly, 10⁷ cells after siRNA treatment were cross-linked for 10 min at RT with 1% formaldehyde on a shaking platform and final 125 mM glycine was added to stop the reaction. Cells were then collected, washed twice with cold PBS and incubated for 10 min with cell lysis buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 85 mM KCl and 0.5% NP40). Nuclei were re-suspended in Nuclei lysis buffer (50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 1% SDS) and then sonicated to obtain 500-bp fragments of DNA. After centrifugation, the supernatant was diluted five times in ChIP buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1.1 mM EDTA, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100 and 167 mM NaCl) and incubated overnight at 4°C with appropriate antibodies, and then for 1 h with protein A dynabeads (Invitrogen). After intensive washes, twice in low-salt buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and 150 mM NaCl), twice in high-salt buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and 500 mM NaCl), once in LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP40, 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA and 1% deoxycholate) and finally in TE buffer (10 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA), the DNA was eluted by incubating the beads for 30 min at RT with the elution buffer (1% SDS and 100 mM NaHCO₃). The DNA was then purified by phenol:chloroform and qRT-PCR was performed using primers for the p53-binding site on p21 promoter (F: 5-GCTTGGGCAGCAG GCTG-3, R: 5-AGCCCTGTGCGAAGGATCC-3).

Detailed protocols for immunoprecipitation, HAT assay and GST pull down, as well as for insect cell culture, baculovirus cultivation and protein purifications are provided in the Supplementary data.

Quantitative analysis of BRD4–NUT Foci

Confocal microscopy images from different nuclei along the z-axis were analysed using the Metamorph software. The number of foci was counted in 50 nuclei and normalized with respect to the total nucleus area obtained using Metamorph software functions. The mean foci area was obtained by dividing the total number of BRD4–NUT foci areas in a given nucleus obtained by the Metamorph software as above, by the number of foci counted within the same nucleus.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We thank Martin Sos (Thomas Laboratory), Max-Planck Institute for Neurological Research and Cancer Genomics for providing

us with the HCC2429 cell line. SK team also acknowledges the precious help of Sandrine Curtet in cell culture. The work in SK laboratory was supported by INCa-DHOS, ANR blanche 'EpiSperm' and 'Empreinte' and ARC research programmes. The work in CAF laboratory was supported by a Dana Farber/Harvard Cancer Center Nodal Award 5P30CA06516-44, US National Institutes of Health grant 1R01CA124633 and funds from the National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics (Contract No. N01-CO-12400). DM, CM and PAC thank the NIGMS (GM62437) and FAMRI foundation for support. NR is a recipient of Rhone-Alpes region Ph D programme and of 'Fondation pour la Recherche Medicale'.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* **7**: 3499–3502
- Bowers E, Yan G, Mukherjee C, Orry A, Wang L, Holbert M, Crump N, Hazzalin C, Liszczak G, Yuan H, Larocca C, Saldanha S, Abagyan R, Sun Y, Meyers D, Marmorstein R, Mahadevan L, Alani R, Cole P (2010) Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem Biol* **17**: 471–482
- Chiang CM (2009) Brd4 engagement from chromatin targeting to transcriptional regulation: selective contact with acetylated histone H3 and H4. *F1000 Biol Rep* **1**, pii 98
- Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK (2009) CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**: 113–117
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8758–8763
- Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* **8**: 869–884
- Ferrari R, Pellegrini M, Horwitz GA, Xie W, Berk AJ, Kurdistani SK (2008) Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science* **321**: 1086–1088
- Florence B, Faller DV (2001) You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* **6**: D1008–D1018
- French CA (2008) Molecular pathology of NUT midline carcinomas. *J Clin Pathol* **63**: 492–496
- French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA (2003) BRD4–NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res* **63**: 304–307
- French CA, Ramirez CL, Kolmakova J, Hickman TT, Cameron MJ, Thyne ME, Kutok JL, Toretsky JA, Tadavarthy AK, Kees UR, Fletcher JA, Aster JC (2008) BRD–NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene* **27**: 2237–2242
- Govin J, Lestrat C, Caron C, Pivot-Pajot C, Rousseaux S, Khochbin S (2006) Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop* **57**: 155–172
- Grossman SR (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* **268**: 2773–2778
- Hansson ML, Popko-Scibor AE, Saint Just Ribeiro M, Dancy BM, Lindberg MJ, Cole PA, Wallberg AE (2009) The transcriptional coactivator MAML1 regulates p300 autoacetylation and HAT activity. *Nucleic Acids Res* **37**: 2996–3006
- Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**: 2899–2908
- Haruki N, Kawaguchi KS, Eichenberger S, Massion PP, Gonzalez A, Gazdar AF, Minna JD, Carbone DP, Dang TP (2005) Cloned fusion product from a rare t(15;19)(q13.2;p13.1) inhibit S phase *in vitro*. *J Med Genet* **42**: 558–564
- Horwitz GA, Zhang K, McBrien MA, Grunstein M, Kurdistani SK, Berk AJ (2008) Adenovirus small e1a alters global patterns of histone modification. *Science* **321**: 1084–1085
- Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN, Ozato K (2005) The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**: 523–534
- Lee AY, Chiang CM (2009) Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability. *J Biol Chem* **284**: 2778–2786
- LeRoy G, Rickards B, Flint SJ (2008) The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* **30**: 51–60
- Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823–827
- Moore GP, Ringertz NR (1973) Localization of DNA-dependent RNA polymerase activities in fixed human fibroblasts by autoradiography. *Exp Cell Res* **76**: 223–228
- Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, Krijgsveld J, Khochbin S, Muller CW, Petosa C (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**: 664–668
- Nishiyama A, Dey A, Miyazaki J, Ozato K (2006) Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell* **17**: 814–823
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**: 5354–5365
- Rousseaux S, Khochbin S (2009) New hypothesis for large-scale epigenome alterations in somatic cancer cells: a role for male germ-cell specific regulators. *Epigenomics* **1**: 153–161
- Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S (2008) Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* **16**: 492–503
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**: 235–246
- Wu SY, Chiang CM (2007) The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* **282**: 13141–13145
- Yang Z, Yik JH, Chen R, He N, Jang MK, Ozato K, Zhou Q (2005) Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* **19**: 535–545

Supplementary Material and methods

Gene reporter assays and FACS analysis

Cos7 cells were co-transfected for 36 hours with β -Galactosidase reporter plasmid and *p21*- promoter luciferase reporter plasmid either alone or with p53-Flag and increasing amounts of BRD4-NUT-HA plasmid. The total amount of transfected plasmid was equilibrated with pcDNA-HA plasmid between the different conditions. Cells were then washed and incubated 15 min at RT with Luciferase lysis buffer (1% Triton X-100, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 7.8). Luciferase activity was measured directly after mixing 10 μ L of cellular extract with 50 μ L of Luciferase substrate (Luciferase assay kit, Stratagene). Normalization was made by measuring the β -Gal activity after 1hour incubation of 7.5 μ L of cellular extract with 50 μ L of β -Gal substrate (β -Gal detection kit II, Clontech). For apoptosis FACS analysis, HCC2429 cells were treated with scrambled or BRD4-NUT siRNA for 24h, with or without 20 μ M etoposide for 16h. Cells were then collected, permeabilized and fixed for one hour on ice in methanol, washed and incubated with PE-A conjugated active Caspase 3 antibody (PE-active caspase 3 apoptosis kit, BD Biosciences). Cells were then analyzed using a BD Biosciences LSRII cytometer.

Immunoprecipitation, HAT assay, GST pull down, insect cell culture, baculovirus cultivation and protein purifications

COS7 cells were transfected and, 36 hours post-transfection, a cell extract was prepared in LSDB 200 or 500mM KCL (Glycerol 20%, MgCl₂ 3mM, Hepes pH7.9 50mM, KCL 200 or 500mM, DTT 0,5mM, PMSF 0,5mM, NP40 0,1%, Complete EDTA-free 1x, TSA 0,05 μ g/mL). The cell extract was incubated with anti-HA rat (Roche) for 2 hours at 4°C, then incubated with protein G sepharose beads for 2 hours at 4°C with rotation. After intensive wash with LSDB buffer, beads were used either for HAT assays or directly eluted with Laemmli buffer for immunoblotting.

NUT-GST fragments were produced in IPTG-induced BL21 transformed with Pet28 plasmids. Bacteria lysates were incubated over night at 4°C with Glutathione sepharose beads (GE Healthcare). Beads were intensively washed and then incubated with extracts from COS cells expressing proteins of interest or with purified p300 proteins. After intensive washes, the beads were used for HAT assays or directly eluted with Laemmli buffer.

For HAT assays, after immunoprecipitation, beads were incubated 2h at 30°C with 25µL of HAT buffer (Glycerol 10%, Tris HCL pH8 25mM, NaCl 100mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, PMSF 0,2mM, Complete EDTA-free 1x, TSA 0,05µg/mL, Acetyl Coenzyme A 14C 1µL at 20nCurie/µL (MPbio)) and 1µg purified free histones or purified histone H3. After electrophoresis, coomassie coloration and incubation in “Amplify” solution (Amersham), the gels were dried and radioactivity was detected using a PhosphoImager (Molecular Dynamics).

Purified NUT F1c was obtained by eluting Glutathione sepharose beads-bound GST fusion proteins with Glutathione 25mM, 50mM Tris pH8 (Sigma). Glutathione was then removed and NUT F1C concentrated by using Amicon Ultra 10,000 NMWL (Millipore).

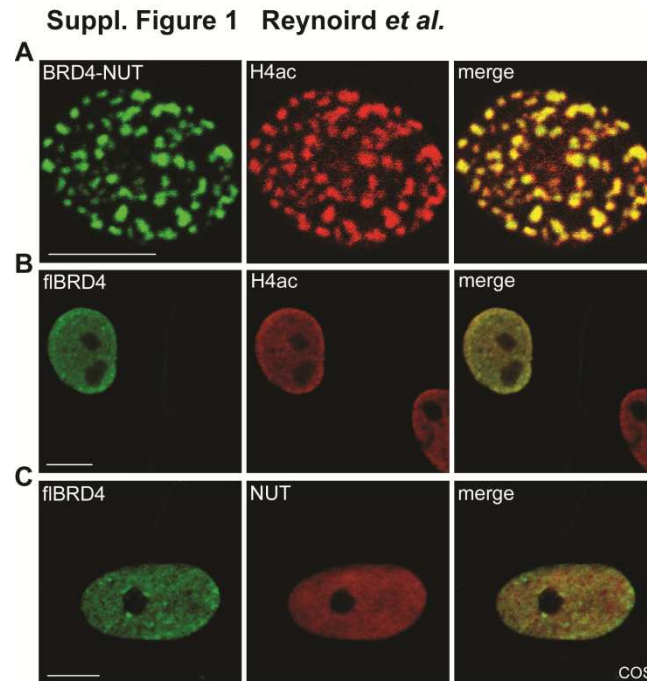
Purified histone H3 was obtained by a production in IPTG-induced BL21 and by histone extraction (acid extraction protocol from Abcam). p300L (324-2094) was cloned in the vector pFASTBAC1 (Invitrogen). The recombinant baculoviruses were propagated in Sf21 insect cells with SF900-II SFM insect cell medium (Invitrogen). For production of recombinant p300L, Hi5 insect cells were infected with recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of 5.0, maintained in shake flasks at 28 °C, and harvested by centrifugation at 72 h postinfection.

For purification of p300L, -recombinant baculovirus-infected cell pellets were lysed by freezing and then thawed in equilibration buffer containing 20 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl and Complete Protease Inhibitors EDTA-free (Roche Applied Science). The cells were homogenized by sonication and the lysate clarified by centrifugation at 180,000 x g for 40min. The clarified insect cell lysate was incubated with pre-equilibrated Anti-FLAG M2-agarose affinity gel (Sigma) for 1 h and then applied to a 50-ml Econo column (Bio-Rad). The resin was washed with 200 ml of equilibration buffer, and then the bound protein was eluted using 0.1 mg/ml triple FLAG peptide (sequence, MDYKDHDADYKDHDIDYKDDDDK) dissolved in equilibration buffer.

Fractions were concentrated using an Amicon-ultra 30 unit (Amicon, Inc.) and further purified on a Hi-Load 16/60 Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT). The final protein was concentrated to 10 mg/ml; aliquots were flash-frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. For p300S (aa 1045-1666), the construct was cloned in pET Duet with a STREP tag and expressed in *E.coli* BL21 (DE3) using autoinducing media ZYP-5052 (Studier, 2005). Cell

pellets were resuspended in lysis buffer (20mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1mM DTT, 25 μ M ZnCl₂ and Complete Protease Inhibitors EDTA-free (Roche Applied Science) and lysed by sonication. The protein was purified from crude extract by STREP-affinity chromatography followed by Gel Filtration on a Hi-Load 16/60 Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 25 μ M ZnCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT). The final protein was concentrated to 1 mg/ml.

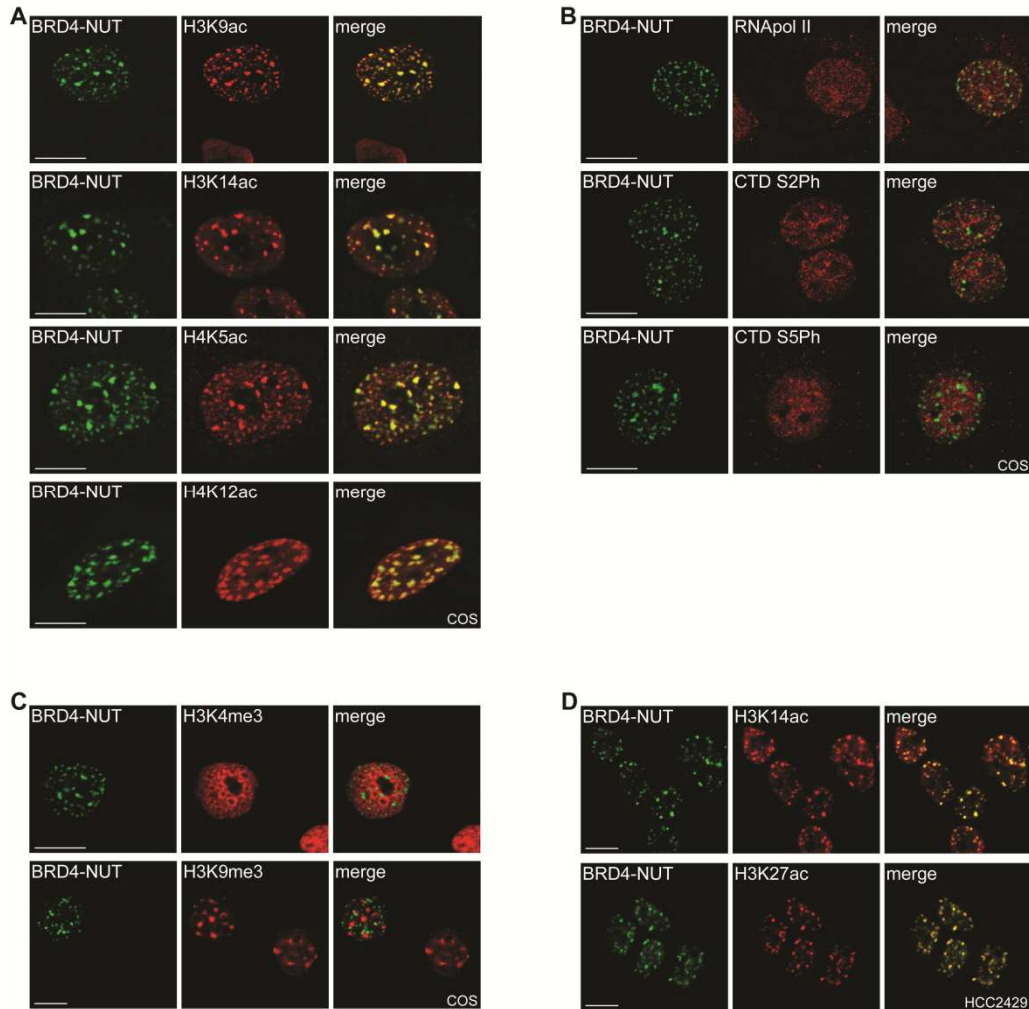
Supplementary Figure Legends



Supplementary Figure S1: Colocalization of hyperacetylated histone H4 with the BRD4-NUT foci

COS7 cells were transfected and processed as described in Figure 1, but a higher magnification of the BRD4-NUT foci shown in Figure 1A is presented. This Figure also shows the co-detection of the longer isoform of BRD4 (fBRD4) either with H4ac or NUT (B and C, indicated). Bar, 10 μ m.

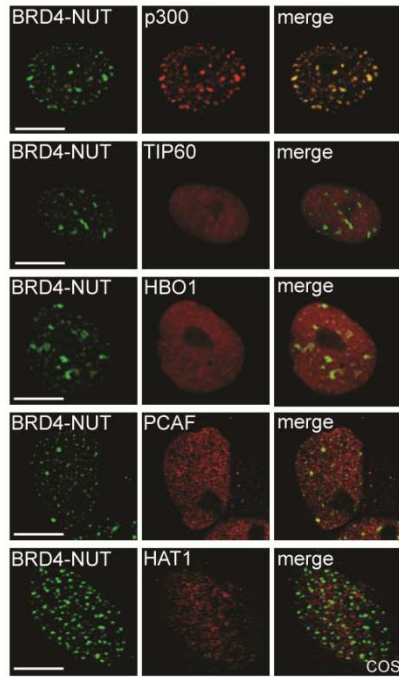
Supplementary Figure 2 Reynoird *et al.*



Supplementary Figure S2: Association of hyperacetylated but transcriptionally inactive chromatin with BRD4-NUT foci

(A) and (C) COS7 cells were transfected with a GFPBRD4- NUT expressing vector and the presence of the indicated histone marks in the foci was monitored using a series of specific antibodies (indicated). (B) In an experiment similar to (A), the presence of RNA polymerase II (RNA pol II) and its phosphorylated forms on serine 2 (CTD S2Ph) and serine 5 (CTD S5Ph) in BRD4-NUT foci was analysed using the indicated specific antibodies in Cos7 cells transfected with GFP-BRD4-NUT. (D) Endogenous BRD4-NUT foci were codetected with H3K14ac and H3K27ac marks in HCC2429 cells. Bar, 10 m.

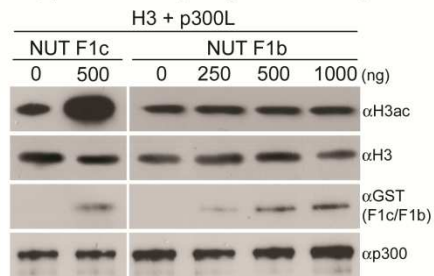
Supplementary Figure 3 Reynoird *et al.*



Supplementary Figure S3: Specific colocalization of BRD4-NUT foci with p300

COS7 cells were transfected with the GFP-BRD4-NUT expression vector and the indicated endogenous HATs were visualized by indirect immunofluorescence using the corresponding antibodies. Bar, 10 μ m.

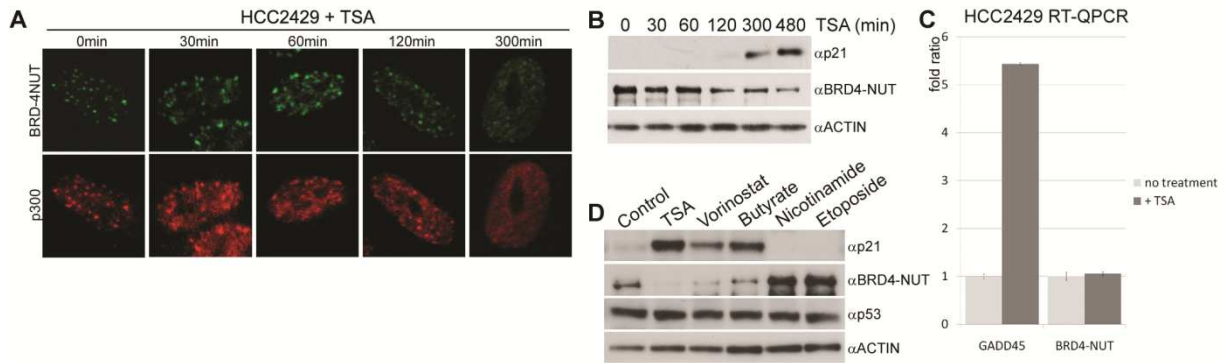
Supplementary Figure 4 Reynoird et al.



Supplementary Figure S4: Specific activation of p300 catalytic activity by NUT

The HAT activity of purified p300 was monitored as described in the legend of Figure 4 using the indicated amounts of NUT fragments (F1c, left panel and F1b, right panel).

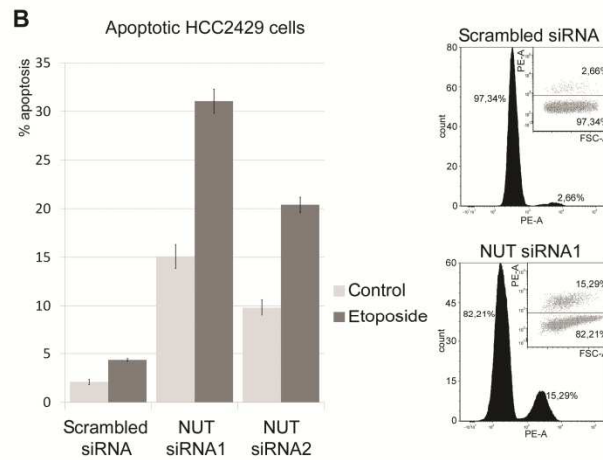
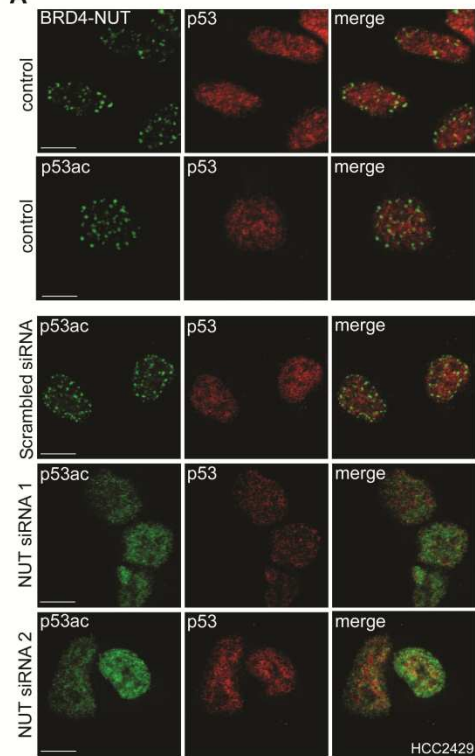
Supplementary Figure 5 Reynoird et al.



Supplementary Figure S5: Disruption of BRD4-NUT foci after the inhibition of class I/II histone deacetylases

(A) HCC2429 cells were treated with 50ng/mL TSA for the indicated times and BRD4-NUT and p300 were visualized with their respective antibodies. (B) In a similar experiment as in “(A)”, HCC2429 were treated for the indicated times and BRD4-NUT, p21 and ACTIN were visualized. (C) The amount of *GADD45* and *BRD4-NUT* mRNA was monitored in non-treated HCC2429 cells or cells treated for 5 hours with 50ng/mL TSA, normalized by comparison with *GAPDH* mRNA, and represented as the fold variation with respect to non treated cells. Data represent the mean +/- standard deviation of at least two independent experiments performed in triplicates. (D) HCC2429 cells were treated for 5 hours with the indicated molecules and BRD4-NUT, p53, p21 and ACTIN visualized as above.

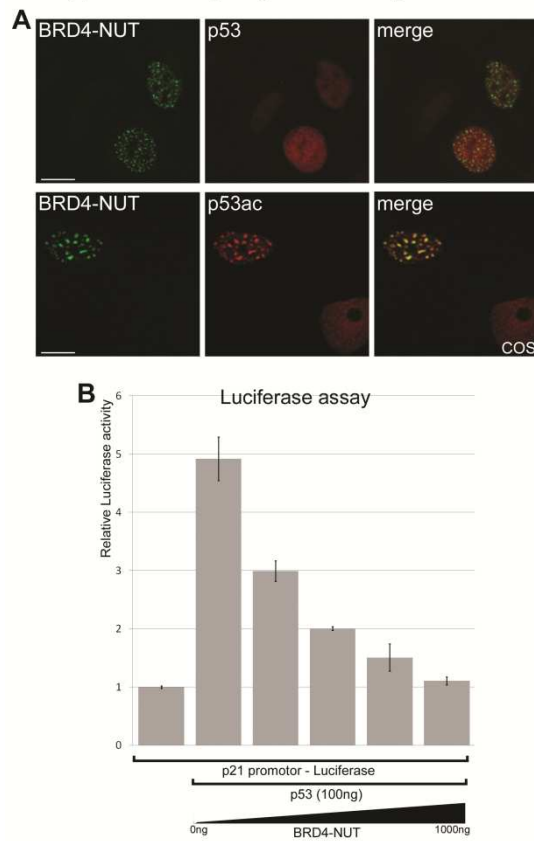
A **Supplementary Figure 6** *Reynoird et al.*



Supplementary Figure S6: p53 inactivation in BRD4-NUT expressing cells

(A) Total p53 (p53) or K373 and K382 acetylated p53 (p53Kac) were detected in HCC2429 cells. HCC2429 cells were treated either with scrambled and two anti-BRD4-NUT siRNAs and acetylated p53 and total p53 were detected as indicated. Control panels show non siRNA-treated cells. Bar, 10 μ m. (B) HCC2429 cells were treated either with scrambled and two anti-BRD4-NUT siRNAs in presence or absence of etoposide (20 μ M for 15 hours) and the apoptotic cells were visualized by immunofluorescent detection of the active caspase 3 and FACS analysis. The percentage of cells containing active caspase 3 with respect to the total number of analyzed cells is indicated (% apoptotic cells). The histogram indicates the mean values of three independent experiments, and two representative FACS analyses are shown (right panel).

Supplementary Figure 7 Reynoird *et al.*



Supplementary Figure S7: Inhibition of p53 activity by BRD4-NUT

(A) COS7 cells were transfected with GFP-BRD4-NUT and p53, acetylated p53 and BRD4-NUT were visualized with the respective antibodies as indicated. (B) The same cells were transfected with a *p21* promoter-luciferase reporter construct, p53-Flag plasmid and increasing amounts of BRD4-NUT-HA plasmid, as well as a CMV- β Gal construct for normalization, as indicated. 36 hours post-transfection, the luciferase activity was measured in independent triplicates, normalized with respect to β -Galactosidase activity and represented as fold variation compared to Luciferase activity in the absence of p53.

Discussion et article en collaboration

Ces travaux présentent un intérêt majeur pour la recherche de thérapies ciblées des patients atteints de ces cancers si dévastateurs. En effet, jusqu' alors, aucun traitement n'est parvenu à endiguer la rapide prolifération de ces cellules porteuses de la translocation induisant très rapidement de nombreuses métastases.

Lors de mon doctorat, nous avons établi une collaboration avec une équipe de médecins du Brigham and Women's Hospital de Boston, au Massachusetts. L'équipe de C. French est la première à avoir caractérisée cette translocation et ils ont soumis récemment un article dans « Journal of Clinical Investigation » dans lequel nous sommes co-auteurs. Leurs travaux confirment nos découvertes au sein de différentes lignées qu'ils ont établies à partir de patients. Ils ont réalisé une analyse transcriptomique comparative entre des cellules tumorales déplétées ou non en BRD4-NUT par siRNA, et leurs observations tendent également à confirmer de façon globale notre hypothèse de séquestration de CBP/p300. En effet, après le traitement siRNA qui conduit à une différenciation rapide des cellules, ils détectent une augmentation générale significative de la transcription de plus de 80% de gènes (Fig.1A). Ainsi, dans ces cellules transloquées, le manque de disponibilité du co-activateur transcriptionnelle CBP/p300 est responsable d'une diminution globale de la transcription, qui vient s'ajouter à nos données moléculaires d'abrogation de la voie p53, et participe ainsi en concomitance à la tumorigenèse.

De façon remarquable, l'équipe de C. French a réalisé le premier essai clinique sur un patient à base de Vorinostat, un inhibiteur de HDACs de classe I et II. Le Vorinostat est un analogue de la TSA, qui dans nos données déstabilise la formation des foci BRD4-NUT et permet ainsi de récupérer les fonctions de CBP/p300 et p53. Ce traitement a permis une stabilisation et une régression significative d'une tumeur pulmonaire d'un patient de dix ans pendant cinq semaines (Fig.1B), date à partir de laquelle le traitement ne fut malheureusement plus supporté par le patient, qui est mort peu de temps après. Néanmoins cette étude démontre l'importance d'un travail en synergie entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. En effet, ces deux articles mettent en avant les conséquences moléculaires de la fusion BRD4-NUT et les moyens efficaces pour les contrer. Un diagnostic précoce de ces cancers couplé à différentes thérapies à base d'inhibiteurs des HDACs de classe I et II, qu'il faudrait cependant réussir à mieux cibler pour contrer les effets secondaires, permettront on peut espérer de venir à bout de ces tumeurs agressives.

Informations de l'article soumis à JCI

TITLE

Differentiation of NUT Midline Carcinoma in Humans and Mice by Epigenomic Reprogramming

AUTHORS (unsorted)

Brian Schwartz / Christopher French / James Bradner / Jon Aster / Daniel Bauer / Sara Vargas / Antonio Perez-Atayde / Elin Agoston / Nathan West / Matthias Hofer / Madeleine Lemieux / Andrew Kung / Stephen Sallan / Michael Cameron / Katherine Janeway / Tan Ince / Amanda Christie / Saadi Khochbin / Nicolas Reynoird

ABSTRACT

NUT midline carcinoma (NMC) is a lethal tumor defined by the presence of BRD4-NUT fusion proteins that act by arresting differentiation. Here, we explore the mechanisms underlying the ability of BRD4-NUT to prevent squamous differentiation. We find that overexpression of the twin bromodomains of BRD4 or a portion of NUT that binds the histone acetyltransferase (HAT) p300 induces NMC cells to differentiate, suggesting a model in which BRD4-NUT sequesters HATs in areas of acetylated chromatin. Consistent with this idea, knockdown of BRD4-NUT caused global increases in histone acetylation, whereas enforced expression of BRD4-NUT had the opposite effect. Sequestration of HATs appears to occur in nuclear BRD4-NUT foci, which correspond to specific genomic regions that are rich in acetylated histones but transcriptionally inactive. Of therapeutic interest, treatment of NMC cells with histone deacetylase inhibitors (HDACi) dispersed nuclear foci, restored histone acetylation, induced NMC cells to differentiate in vitro, and had anti-tumor effects in NMC xenograft models. Based on these data, a child with NMC was treated with the FDA-approved HDAC inhibitor vorinostat. An objective response was obtained after five weeks of therapy, suggesting that this rational therapeutic approach merits further evaluation in patients with NMC.

Figure

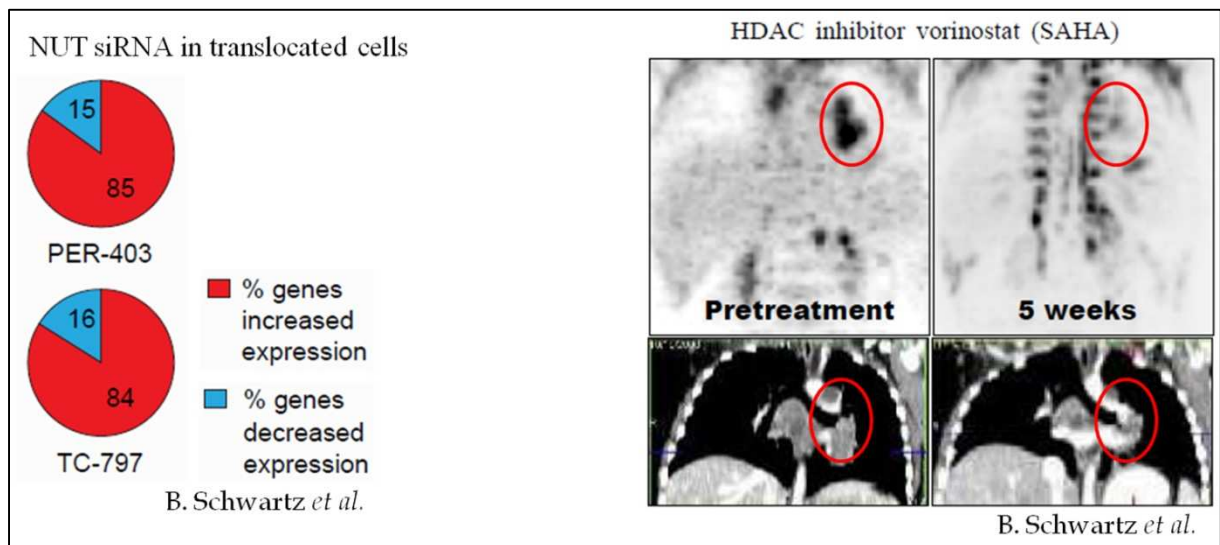


Figure 1 : Conséquences cliniques d'une inhibition des foci BRD4-NUT

A) Analyse transcriptomique du niveau global d'expression de cellules de patients atteints de la translocation BRD4-NUT, après traitement siRNA contre la protéine fusion.

B) Résultats cliniques du traitement d'un patient de cinq ans avec un inhibiteur de HDAC, le Vorinostat. Les radiographies confirment la régression de la tumeur pulmonaire après cinq semaines de traitement.

Projet 2 : Caractérisation de la protéine BRD3

Parmi la famille des protéines à double bromodomains BET, le membre BRD3 est très peu étudié. Pourtant, une répression de l'expression de BRD3 par siRNA dans des lignées cellulaires les fait entrer en apoptose (LeRoy *et al*, 2008). Cette protéine semble donc importante pour le bon fonctionnement des cellules, ou tout du moins pour les cellules tumorales. De plus, dans environ un tiers des carcinomes de la ligne médiane impliquant NUT, le gène *NUT* ne se retrouve pas fusionné avec *BRD4* mais avec son homologue *BRD3*. Ces cellules transloquées BRD3-NUT présentent les mêmes caractéristiques tumorales extrêmement agressives que la fusion BRD4-NUT, avec la formation de foci identiques au niveau du noyau (French *et al*, 2008). Ainsi, BRD3 semble pouvoir se substituer à BRD4 dans l'établissement d'un programme tumoral impliquant NUT. Enfin BRD3 est enrichie dans les cellules au niveau de la chromatine acétylée le long des régions codantes des gènes, et pourrait donc participer à la phase d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II (LeRoy *et al*, 2008). Toutes ces observations suggèrent un intérêt majeur pour la protéine BRD3 et la rendent particulièrement intéressante à étudier.

J'ai participé au cours de mon doctorat à l'élaboration d'un projet d'étude de la protéine BRD3, qui devrait être poursuivi par le laboratoire au vu du matériel et des résultats obtenus.

I) Brd3 est exprimée au cours de la spermatogenèse

Parmi les membres de la famille BET, BRDT est spécifique au testicule. Cependant, les autres membres sont également exprimés dans le tissu testiculaire d'après analyse des banques d'EST. Nous avons donc voulu caractériser l'expression de la protéine BRD3, très peu étudiée malgré l'importance fonctionnelle des autres membres de sa famille. Par PCR quantitative en temps réel sur différents tissus murins, nous avons pu détecter une expression ubiquiste du gène *BRD3*, avec cependant une expression importante au cours de l'embryogenèse et au sein du tissu testiculaire (Fig1.A).

Ainsi, bien que BRD3 ne soit pas exclusivement exprimé dans le testicule comme BRDT, son expression laisse suggérer un rôle important au cours de l'embryogenèse et lors de la maturation des cellules germinales mâles. Il est également possible que différentes isoformes de la protéine BRD3 existent, dont une pourrait être spécifique du testicule. Nous avons alors voulu savoir si BRD3 était exprimée au cours de la spermatogenèse. Nous avons réalisé un fractionnement des cellules germinales à partir de testicules de souris, par la technique de sédimentation sur gradient BSA. Après avoir vérifié la pureté des enrichissements des différents types cellulaires par observation au microscope, nous avons réalisé une extraction ARN puis une transcription inverse. Les ADN complémentaires ainsi obtenus ont permis de réaliser une PCR quantitative en temps réel et nous avons pu observer un profil d'expression atypique du gène *BRD3*. En effet, *BRD3* est bien exprimé au cours de la spermatogenèse, et son expression est maintenue au cours des stades tardifs de la spermiogenèse. Le gène *BRD3* est ainsi exprimé après méiose au niveau des spermatides rondes (Fig1.B), stade à partir duquel a normalement lieu une répression globale de la transcription. Les gènes présentant une expression pos-méiotique sont suspectés participer aux étapes de maturation des spermatides, lors du remodelage drastique de la chromatine et de la formation du flagelle. Ainsi, les gènes *BRD4* et *H4* sont pour leur part réprimés après méiose, alors que la protéine de transition TP1 intervenant dans la compaction du génome est quant à elle exprimée tardivement (Fig.1B).

II) Production et validation d'un anticorps anti-BRD3

Lors de l'élaboration de ce projet, aucun anticorps anti-BRD3 n'était commercialisé. Nous avons donc décidé d'injecter des lapins avec des peptides immunogènes afin de produire un anticorps. Après réception du prélèvement de lapin, nous avons purifié l'anticorps sur colonne couplée aux peptides immunogènes. Nous avons ensuite construit différents vecteurs d'expression eucaryote pour les différentes protéines de la famille BET et testé la spécificité de reconnaissance de notre anticorps. La figure 2A montre que seule la protéine ectopique BRD3 est reconnue parmi les autres membres de la famille BET, et nous avons testé la détection de BRD3 endogène au cours de la spermatogenèse. Pour cela, nous avons réalisé une extraction totale à l'Urée 8M des cellules germinales purifiées par sédimentation. Comme démontré préalablement pour le transcrit de BRD3, la protéine est exprimée jusqu'aux stades tardifs de la spermiogenèse, avec une diminution sensible lors de l'allongement des

spermatides (Fig.2B). BRD3 ne semble donc pas exprimée au cours du remodelage de la chromatine qui a lieu après allongement des spermatides, mais elle pourrait participer à la mise en place d'un profil d'expression particulier nécessaire pour le bon déroulement de la spermatogenèse. Ainsi, grâce à son double bromodomaine, BRD3 pourrait recruter certains facteurs et moduler la répression globale des gènes tout en activant celle de gènes spécifiquement nécessaires à la maturation des spermatides en spermatozoïdes.

III) Spécificité d'association de BRD3 à la chromatine

Les marques spécifiquement reconnues par les bromodomains de la famille BET sont connues, BRD3 mis à part. En effet, BRD2 reconnaît H4K5ac et H4K12ac, BRD4 reconnaît H4K5ac, H4K12ac et H3K14ac, alors que BRDT reconnaît le double motif H4K5ac/H4K8ac et H3K18ac. Ces différentes spécificités d'interactions des membres de la famille BET leur confèrent la capacité de cibler différenciellement les facteurs cellulaires avec lesquels ils interagissent sur la chromatine. Nous avons donc voulu savoir quelle est la spécificité des bromodomains de BRD3. Pour cela, nous avons réalisé un test d'interaction de BRD3 en incubation avec différents peptides acétylés couplés sur bille et mimant les queues d'histones acétylées. Nous avons pu observer que BRD3 s'associe uniquement avec l'histone H4 parmi les histones de cœur, et ceci uniquement lorsque sa partie N-terminale est acétylée (Fig.3). Nous avons ensuite utilisé des peptides mimant la partie N-terminale de H4, acétylés au niveau d'un seul résidu. Comme l'ensemble des protéines BET, BRD3 semble reconnaître l'acétylation de la lysine 5 (H4K5ac). Cependant, elle semble également reconnaître spécifiquement la lysine 16, ce qui est unique parmi les autres membres de la famille (Fig.3). Il faut noter également que la reconnaissance des peptides mono-acétylés est bien moindre que celle pour le peptide tétra-acétylé, ce qui laisse suggérer une reconnaissance combinée des deux marques H4K5ac et H4K16ac. L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 est une des marques d'acétylation les plus importantes au niveau de la chromatine. En effet, la mono-acétylation de H4K16 représente plus de 60% des mono-acétylations de l'histone H4 retrouvées sur les nucléosomes, et c'est également la seule qui varie lors du processus de tumorigenèse (Fraga *et al*, 2005). Enfin, la marque H4K16ac est retrouvée au niveau de régions actives de la chromatine, mais également au niveau de région d'hétérochromatine des télomères, où elle est indispensable à leur régulation (Shia *et al*, 2006). Cette marque est donc une marque clé de l'acétylation de la chromatine. Le fait que BRD3 puisse s'y lier

spécifiquement laisse supposer un rôle majeur de la protéine dans la régulation des informations épigénétiques associées à H4K16ac.

Ces résultats préliminaires permettent donc de comprendre l'importance d'une meilleure caractérisation de la protéine BRD3. Cet acteur de l'épigénétique possède un énorme potentiel de régulation sur l'épigénome. Le manque de données actuelles peut être rapidement comblé en se basant sur les connaissances établies pour les autres membres de la famille BET.

Figures

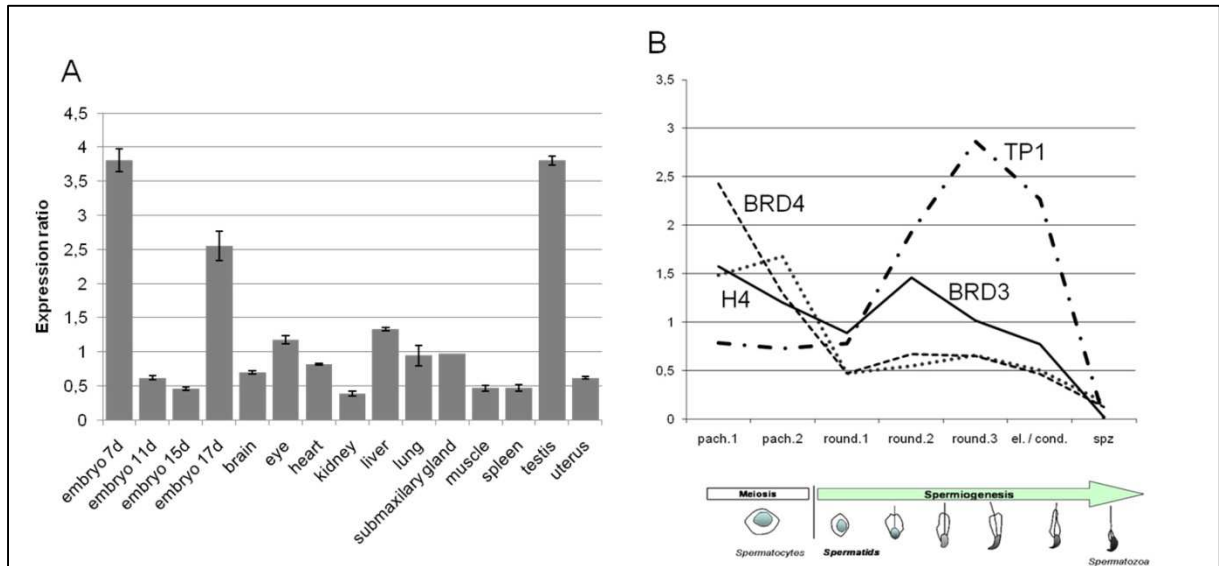


Figure 1 : Profil d'expression de BRD3 au cours de la spermatogenèse

(A) PCR quantitative en temps réel effectuée sur des extraits de différents tissus de souris. L'expression de *BRD3* a été normalisée par rapport aux gènes de ménage *GAPDH* et *ACTINE*.

(B) PCR quantitative en temps réel effectuée sur des extraits de différentes populations de cellules germinales mâles purifiées. *H4*, *BRD4* et *TP1* servent de contrôles de la pureté des préparations cellulaires.

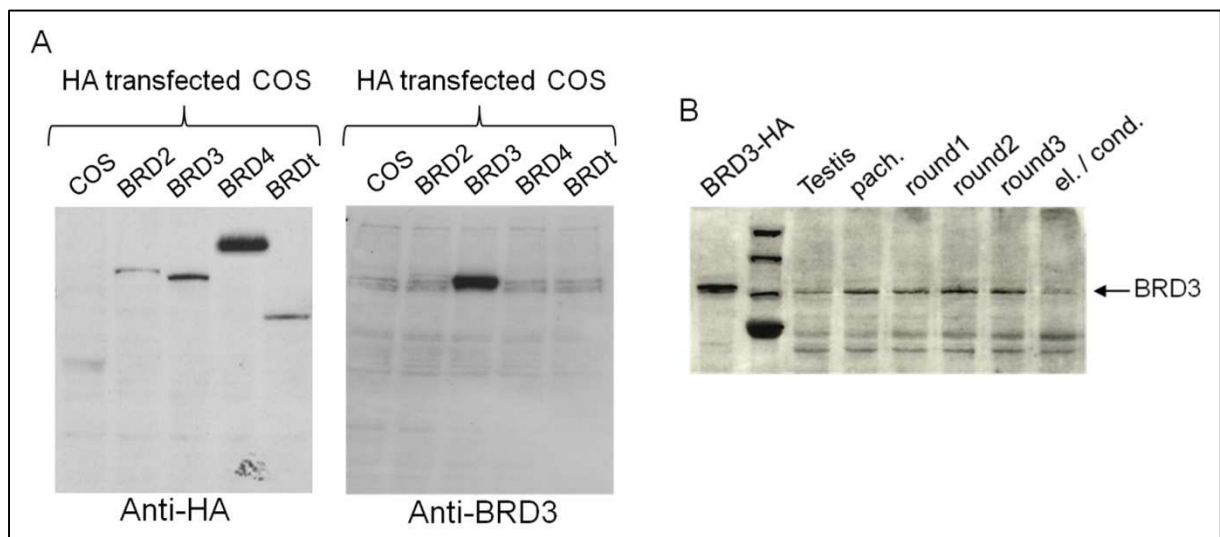


Figure 2 : Production et validation d'un anticorps anti-BRD3

(A) Test de la spécificité de l'anticorps anti-BRD3 produit. L'anticorps ne reconnaît pas les autres membres BRD2, BRD4 et BRDt de la famille BET, exprimés de manière ectopique dans la lignée cellulaire COS.

(B) Confirmation du profil d'expression de la protéine BRD3 au cours de la spermatogenèse à partir d'extraits de cellules germinales purifiées.

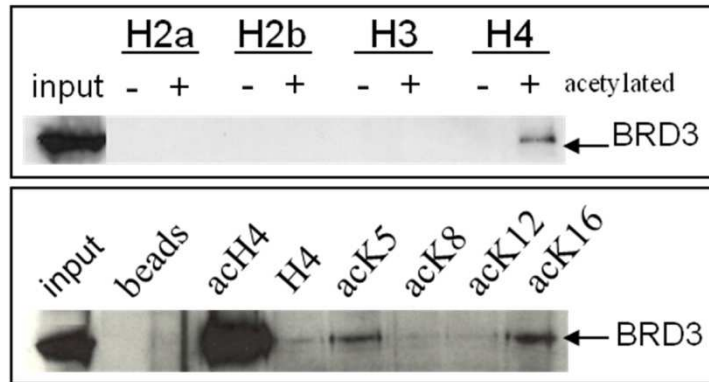


Figure 3 : association de BRD3 avec l'histone H4 acétylée

Essais de co-précipitation de la protéine BRD3 avec différents peptides biotinylés couplés sur bille. BRD3 s'associe spécifiquement avec le peptide tétra-acétylé de l'histone H4, et plus précisément au niveau des résidus acétylés K5 et K16.

Projet 3 : Conséquences de l'expression illégitime de NUT au sein de lignées cellulaires

L'acétylation des histones est une des signalisations utilisées par l'épigénome pour réguler la chromatine et les différents événements cellulaires. Historiquement, cette modification post-traductionnelle a été observée et relativement bien caractérisée pour les histones, mais de plus en plus de données confirment que l'ajout d'un groupement acétyl sur certaines lysines est loin d'être un phénomène exclusif aux histones. En 2009, un « acétylome » a été réalisé à partir de l'étude de peptides issus de 3 lignées cellulaires différentes. Cette étude a pu montrer qu'il existe environ 3600 résidus acétylés répartis au sein de plus de 1750 protéines chez l'homme (Choudhary *et al* 2009 *Nature*). Ceci rend compte de la grande diversité des protéines ciblées, dont le nombre est quasi identique à celui des protéines phosphorylables. Or, au vu des implications majeures que joue la phosphorylation sur les différentes voies de signalisation cellulaire, il est facilement imaginable que l'acétylation des protéines non-histones influe également de manière conséquente sur différentes voies de signalisation.

Nous avons cherché à caractériser un de ces protéines acétylées, qui s'est avéré être la protéine NUT, spécifique du tissu testiculaire et retrouvée illégitimement exprimée au sein d'au moins trois lignées cellulaires. Les travaux présentés ici ont été réalisés lors d'un projet commun avec Karin Sadoul au sein du laboratoire. Ses travaux ont porté sur l'identification d'une protéine fortement acétylée au sein de la lignée de rat A7R5, la protéine NUT. Nous avons ensuite travaillé ensemble sur les implications de l'expression illégitime de NUT au sein des différentes lignées cellulaires.

I) Détection d'un doublet de protéines acétylées dans une lignée transformée de cellules musculaires lisses

Dans le but d'identifier des protéines acétylées non caractérisées, nous avons criblé des extraits de différentes lignées cellulaires de différents organismes avec un anticorps

monoclonal anti-lysine acétylée (Kac). Dans la plupart des cas, l'anticorps reconnaît préférentiellement l'histone H3, l'histone H4 et la tubuline acétylée. Cependant, dans la lignée de cellules musculaires lisses de rat A7R5, deux protéines additionnelles d'environ 110 et 125kDa sont détectables (Fig.1A). La détection de ces protéines est augmentée après traitement des cellules avec des inhibiteurs d'histone déacétylases tels que la TSA, le Nicotinamide et le Sodium Butyrate.

Une approche de fractionnement cellulaire a ensuite été utilisée pour localiser le compartiment majeur de ces deux protéines. Nous avons pu observer une localisation cytoplasmique pour ces deux protéines, ce qui est plutôt rare au vu des données actuelles des histones et protéines non histones acétylées localisées préférentiellement dans le noyau (Fig1.B).

Nous nous sommes ensuite aperçus que la détection de ces protéines était influencée par la densité des cellules en culture, avec une baisse du signal d'acétylation en fonction de l'augmentation de la confluence des cellules (Fig.1C). Cette acétylation particulière des deux protéines est en réalité dépendante de l'état de prolifération des cellules, car une déplétion en sérum impliquant un arrêt de la division cellulaire est corrélée à une baisse du signal d'acétylation. De plus, la trypsinisation des cellules denses avec un signal faible des deux protéines et leur remise en culture dans du milieu frais en faible confluence restaure la détection du doublet de protéines.

II) Purification et identification du doublet acétylé

Après concentration de fractions contenant le doublet acétylé, nous avons procédé à une co-immunoprécipitation des protéines grâce à l'anticorps anti-Kac puis à la migration sur gel gradient d'acrylamide 6-15%. Les bandes révélées par coomassie ont ensuite été précisément découpées puis préparées pour une analyse et identification par spectrométrie de masse.

Les deux protéines ont été identifiées comme étant des variants d'une seule et unique protéine appelée NUT (Fig2.A). Curieusement, la protéine NUT est normalement exclusivement exprimée dans les testicules, bien que son expression illégitime par fusion avec une autre protéine ait été reportée dans certains cancers (French *et al*, 2008). De plus, il a été observé que NUT est localisée préférentiellement dans le noyau, alors que le doublet acétylé

correspondant dans les cellules A7R5 est strictement cytoplasmique. Il est donc possible que dans le hors-contexte de ces cellules A7R5, la protéine NUT voit ses fonctions physiologiques dérégulées et influe également sur l'homéostasie des cellules somatiques.

Lors de cette identification, nous avons pu mettre en évidence six sites d'acétylation présents sur chacune des deux versions de la protéine (Fig.2A). Cette protéine est donc sujette à de nombreuses acétylations qui rendent sans doute sa détection aisée par l'anticorps anti-Kac. L'analyse bioinformatique de la séquence de NUT suggère plusieurs séquences de localisation nucléaire potentielles. Nous appellerons par la suite le motif 335-351 NLS1, et le motif 1095-1118 NLS2. Parmi les six lysines acétylées identifiées, deux sont présentes au sein de ces séquences (Fig.3A). Enfin, une troisième lysine acétylée est localisée dans une séquence potentielle de liaison à l'ATP. L'acétylation de la protéine NUT sur ces résidus pourrait donc moduler ses fonctions. Cette protéine possède également un domaine d'export nucléaire, et est donc apte à effectuer une navette entre le cytoplasme et le noyau.

III) Confirmation de l'identification de la protéine NUT

Afin de valider définitivement l'identification du doublet acétylé, nous avons transfecté les cellules A7R5 avec des siRNA contre le transcrit NUT. Les cellules contrôles et les cellules déplétées ont ensuite été lysées et l'extrait protéique chargé sur un gel d'électrophorèse. Nous avons ensuite cherché à détecter le doublet acétylé grâce à l'anticorps anti-Kac. Le traitement siRNA entraîne la perte de la détection du doublet, ce qui suggère fortement que ces protéines soient bien identifiables à NUT (Fig.2B). Nous avons également utilisé un anticorps récemment commercialisé spécifique de la protéine NUT pour parachever l'identification du doublet. En effet, l'anticorps reconnaît spécifiquement une double bande de la taille du doublet acétylé, que le traitement siRNA NUT fait disparaître (Fig.2B). Enfin, par immunofluorescence, l'anticorps anti-NUT reconnaît préférentiellement la protéine au niveau du noyau dans les cellules A7R5, bien que nous ne détectons le doublet NUT acétylé que dans le cytoplasme. Ceci semble donc contradictoire, mais il est possible que la protéine nucléaire soit non-acétylée et majoritairement reconnue par l'anticorps anti-NUT, et que l'anticorps anti-Kac ne reconnaisse que la forme acétylée et donc exclusivement cytoplasmique dans les cellules A7R5. Cependant, après un double traitement des cellules avec les inhibiteurs TSA et Nicotinamide, ce qui entraîne une augmentation de l'acétylation du doublet (Fig.1A), l'anticorps anti-NUT détecte alors une forme cytoplasmique de la

protéine (Fig.3B). Il est intéressant de noter que le traitement avec seulement un des deux inhibiteurs ne permet pas cette détection cytoplasmique, ce qui laisse supposer que plusieurs type de résidus acétylés entrent en jeu dans ce processus.

IV) La localisation cytoplasmique de NUT est contrôlée par son acétylation, qui dépend elle-même de la prolifération des cellules

Les données obtenues et la présence de deux lysines acétylées dans les domaines de localisation nucléaire suggèrent que sa localisation cytoplasmique puisse être contrôlée par son acétylation. En effet, plusieurs études démontrent que l'acétylation de nombreuses protéines régule leur stabilité et leurs activités, et notre observation du changement d'acétylation de la protéine NUT en fonction de l'état de prolifération des cellules semble confirmer cette hypothèse.

Afin de tester la régulation de la localisation de NUT par son acétylation, nous avons transfectés des cellules COS avec la version humaine de la protéine NUT étiquetée HA. Dans presque 75% des cas, les cellules présentent un marquage nucléaire fort comparativement au cytoplasme, mais malgré cela une quantité variable mais bien présente de NUT est observable dans le cytoplasme (Fig.4A). Tout comme dans les cellules A7R5, le double traitement des cellules par les inhibiteurs TSA et Nicotinamide entraîne une augmentation du signal cytoplasmique, à l'inverse d'un traitement simple avec l'un ou l'autre (Fig.4A&B). Ceci suggère donc que des HDACs de classe I et de classe II soient nécessaires pour réguler l'acétylation de NUT. A l'inverse, l'inhibiteur spécifique de l'export nucléaire par CRM1, la Leptomycine B, bloque l'ensemble de la protéine NUT dans le noyau.

Nous avons ensuite voulu tester la fonctionnalité des deux séquences de localisation nucléaire, NLS1 et NLS2. Nous avons délété soit l'une, soit l'autre, soit les deux ensembles dans notre vecteur NUT humain, et transfecté des cellules COS avec. Alors que le mutant NLS1 ne présente aucune modification de localisation, le mutant NLS2 et le double mutant se localisent exclusivement dans le cytoplasme (Fig.4). Le NLS2 est donc primordial pour la localisation de NUT.

La lysine acétylée détectée dans la séquence NLS2 chez le rat n'est pas conservée chez l'homme. A la place, se trouve un résidu arginine. Nous avons muté cette arginine en

glutamine (qui mime une acétylation) et testé la localisation du mutant NLS2 R/Q. Chez l'homme cette mutation n'influence pas la localisation de NUT (Fig.4B). Nous avons alors voulu nous affranchir de cette différence entre espèce et avons cloné la forme de NUT chez le rat. La forme sauvage de NUT chez le rat se localise de la même manière que la forme humaine, et la forme mutée pour les deux lysines acétylées identifiées chez le rat ne présente pas de perturbation dans sa localisation (Fig.4B). Ainsi, bien que l'acétylation induite par les inhibiteurs TSA et Nicotinamide influe sur sa localisation cytoplasmique, ceci ne semble pas dû à l'acétylation des lysines contenues par les séquences NLS1&2.

V) La protéine NUT possède un grand nombre de lysines acétylables.

La protéine NUT n'a pas été identifiée dans la base de données de l'acétylome humain. Ceci s'explique simplement par le fait que cet acétylome a été fait sur la base de seulement 3 lignées cellulaires différentes. Il existe cependant de nombreuses protéines exprimées spécifiquement dans certains tissus, et il est donc fort possible que l'estimation des 1750 protéines acétylées soit en dessous de la réalité. Le testicule et ses cellules germinales représente un organe contenant de nombreuses protéines exclusives, dont NUT fait partie.

Afin de déterminer les lysines acétylées chez la forme humaine de NUT, nous avons mis à profit nos résultats publiés antérieurement. En effet, nous avons montré que la protéine NUT est capable d'interagir avec la HAT CBP/p300. Nous avons observé lors d'essais d'activité HAT in vitro qu'en plus des histones, la protéine NUT est également un substrat de CBP/p300. Nous avons donc réalisé un test d'activité HAT in vitro en incubant différents fragments de NUT avec la protéine CBP/p300 et de l'acétyl Coa. Nous avons ensuite fait migrer sur gel par électrophorèse les fragments acétylés puis avons excisé les bandes obtenues après coloration au Coomassie (Fig.5A). Ces fragments ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse par deux méthodes différentes, une de MALDI TOF-TOF et l'autre de Q-TRAP, grâce à une collaboration avec Morgan Couvet du CIB de Grenoble. Les différentes techniques d'analyse ont identifiées dix-huit lysines acétylées au total, dont huit identifiées par les des deux méthodes à la fois et dix à l'aide d'une seule des deux méthodes (Fig.5B). De plus, certaines de ces lysines acétylées correspondent à celles identifiées par notre première analyse d'identification du doublet NUT chez les cellules de rat A7R5. Ce système in vitro est sans doute susceptible d'acétyler des résidus qui ne le seraient pas in vivo, mais l'obtention de dix-huit résidus acétylables et l'interaction directe entre CBP/p300 et NUT laissent supposer

que la protéine NUT puisse être largement acétylée tout au long de sa séquence. Ceci peut donc moduler les interactions avec ses partenaires et modifier ses fonctions physiologiques.

VI) La protéine NUT régule le cycle cellulaire des cellules A7R5

Nous avons observé une variation du signal l'acétylation de NUT en fonction de la prolifération et de la confluence des cellules. Nous avons alors voulu savoir si NUT et sa possible régulation fonctionnelle par acétylation ne pouvait pas directement influencer sur le cycle cellulaire. En effet, il est possible que l'expression illégitime de NUT au sein d'une lignée de cellules musculaires lisses puisse permettre d'apporter un avantage sélectif aux cellules, car sa fusion avec BRD4 ou BRD3 dans des cancers participe à la tumorigenèse des cellules. De nombreuses protéines testiculaires sont retrouvées anormalement exprimées dans des cancers. Une hypothèse généralement admises est que ces protéines propres au programme génétique des cellules germinales puissent être capables de déréguler le programme des cellules somatiques, et leur apporter un avantage de prolifération ou de transformation. Ces protéines sont regroupées sous le terme de facteurs Cancer-Testiculaires (C/T).

Nous avons réalisé des analyses par cytométrie en flux de cellules A7R5 transfectées avec du siRNA contrôle ou NUT. Nous avons remarqué que les cellules A7R5 ont une diminution de leur prolifération par inhibition de contact dès qu'elles sont trop confluentes, et dans ce cas, même si nous déplaçons efficacement la cellule en NUT, nous ne sommes pas capable d'observer une différence de cycle. Nous avons donc réalisé un test d'incorporation de BrdU afin de marquer les cellules en phase S de réplication, tout en les traitant avec un siRNA NUT ou contrôle en faible confluence. Dans ce cas de figure, nous avons pu observer une baisse du nombre de cellules en phase S lors de l'inhibition de NUT (baisse de 24% à 10%), avec une hausse des cellules en G0/G1 (Fig.6). Ceci montre clairement que la protéine NUT, illégitimement exprimée dans la lignée A7R5, confère un avantage de prolifération aux cellules.

VII) NUT confère un avantage prolifératif dans différentes lignées

humaines

Comme la lignée de cellules A7R5 n'est pas une lignée véritablement tumorale, nous avons voulu rechercher la protéine NUT au sein de cellules tumorales humaines mieux caractérisées. Un gel SDS-Page de différents extraits cellulaires nous a permis d'identifier au moins deux autres lignées cellulaires exprimant anormalement la protéine testiculaire NUT. Ainsi, la lignée tumorale pulmonaire A549 et la lignée tumorale d'ostéocarcinome U2OS sont deux autres exemples de lignées exprimant au moins un facteur C/T, la protéine NUT (Fig.7A).

Tout comme pour les cellules A7R5, nous avons voulu savoir si NUT conférait un avantage prolifératif à ces deux lignées cellulaires. Nous avons réitéré les analyses par cytométrie en flux des cellules après incorporation de BrdU suite à des transfections de siRNA NUT ou contrôle. Dans ces deux lignées, une répression de l'expression de NUT entraîne un blocage massif des cellules en phase G2/M (Fig.7B). En effet, les cellules A549 passent de 10% de cellules en phase G2/M à 48% trente-six heures après transfection de siRNA NUT. De façon encore plus drastique, les cellules U2OS passent de 15% à 66% de cellules en phase G2/M. Ces observations confirment l'avantage certain qu'apporte à ces cellules l'expression de la protéine NUT.

Nous avons cherché à mieux caractériser la fenêtre de temps ciblée par l'inhibition de la protéine NUT. Pour cela nous avons incubé nos cellules après siRNA NUT ou non en présence d'une drogue inhibant la polymérisation des microtubules, la Colcemid. Cette drogue bloque le cycle cellulaire en mitose, après la condensation des chromosomes, mais avant leur ségrégation du fait de l'incapacité des cellules à former les fuseaux mitotiques. Les chromosomes peuvent être détectés grâce à la marque H3S10ph spécifique de leur condensation en mitose. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le siRNA NUT bloque les cellules avant l'action de la Colcemid, car les cellules sont bloquées sans condensation de leurs chromosomes (Fig. 8). Ceci suggère donc fortement que l'inhibition de NUT entraîne un arrêt du cycle avant la mitose, vraisemblablement lors du point de contrôle entre les phases G2 et M.

Afin de mieux caractériser les conséquences de l'expression illégitime de NUT, nous avons démarré une étude transcriptomique sur les cellules U2OS grâce à une collaboration avec Philippe Guardiola du CHU d'Angers. Nous avons réalisé une cinétique du transcriptome des cellules U2OS après 16h, 24h et 36h de transfection avec le siRNA NUT. Les premières analyses réalisées au sein du laboratoire par Sophie Rousseau *et alexandra De Bernardi* sont extrêmement encourageantes. En effet, l'expression d'environ cinq mille gènes se trouve dérégulée lors de l'inhibition de l'expression de NUT dans les U2OS (Fig. 9). De plus, ces gènes peuvent être classés en clusters, en fonction de leur cinétique de réponse à l'inhibition de NUT, ceci nous permettant de rechercher des cascades de signalisation. Enfin, une analyse préliminaire par Ingenuity des fonctions des gènes ciblés permet d'identifier des familles de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire. NUT semble donc apporter un avantage prolifératif certain aux cellules U2OS. Nous confirmerons par PCR quantitative en temps réel les variations d'expression de gènes clés détectées par l'analyse, et nous efforcerons ensuite de valider certaines des voies de signalisation influencées par NUT.

Une de nos hypothèses de travail est que la protéine NUT dérégule l'activité d'un facteur clef de l'homéostasie cellulaire, et la protéine CBP/p300 est un candidat idéal. En effet, nous avons pu démontrer que NUT interagit avec et stimule CBP/p300, et des données de la littérature indique qu'une inhibition de CBP/p300 soit corrélée avec un arrêt en G2/M des cellules. Ainsi, lors de l'inhibition de NUT, CBP/p300 ne serait plus suffisamment stimulée pour induire l'avantage prolifératif nécessaire à la division des U2OS.

Ce travail devrait donner lieu à une soumission d'article avant la fin de l'année dans lequel je serais co-premier auteur avec Karin Sadoul, qui se chargera avec l'aide d'autres personnes du laboratoire de terminer les analyses transcriptomiques et les expériences supplémentaires à réaliser après mon départ.

Figures

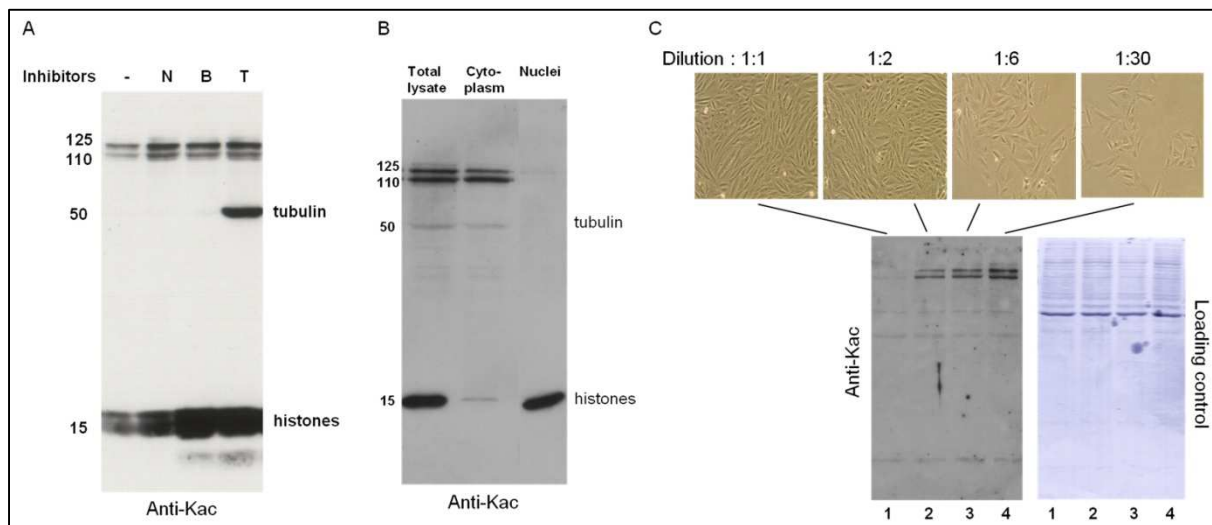


Figure 1 : Détection d'un doublet acétylé au sein des cellules A7R5

- A) Les cellules ont été incubées 3h en présence ou absence d'inhibiteurs de HDACs, puis les protéines acétylées ont été révélées par un anticorps anti-Kac.
- B) Détection de protéines acétylées après fractionnement cellulaire.
- C) Détection du doublet acétylé au sein d'extraits de cellules cultivées à différentes conditions de confluence.

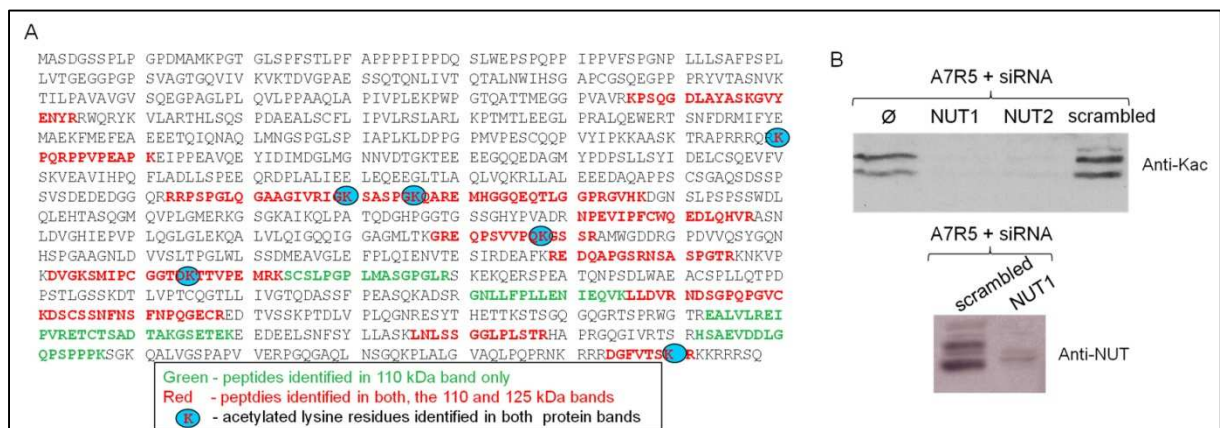


Figure 2 : Identification de la protéine NUT

A) Séquence de la protéine NUT et des différents peptides identifiés par spectrométrie de masse (rouge et vert). Les lysines acétylées sont marquées d'un rond bleu.

B) Confirmation du doublet et de NUT par siRNA NUT des cellules A7R5 et détection de la protéine par des anticorps anti-Kac ou anti-NUT.

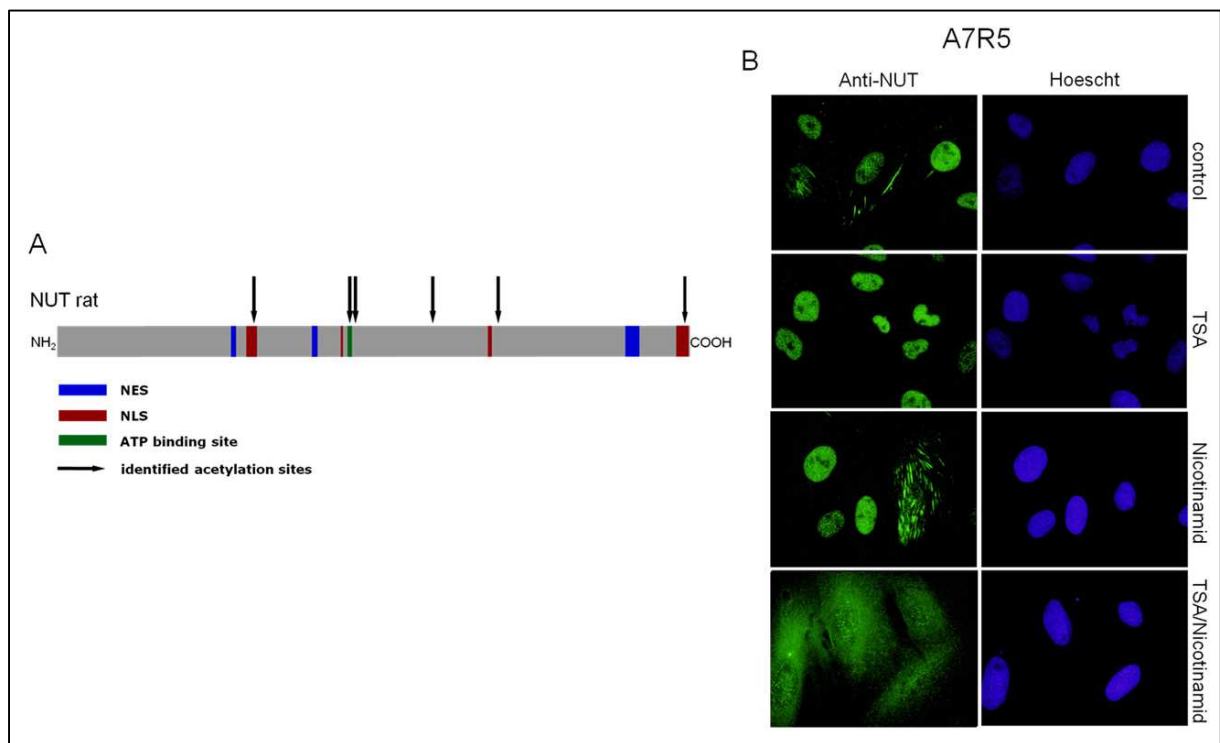


Figure 3 : Domaines de NUT et localisation dans les cellules A7R5

A) Schéma de la protéine NUT et des différentes séquences potentielles identifiées par bioinformatique

B) Immunofluorescence dans les A7R5 avec ou sans traitement aux inhibiteurs de HDACS après détection grâce à l'anticorps anti-NUT et coloration des noyaux au Hoescht.

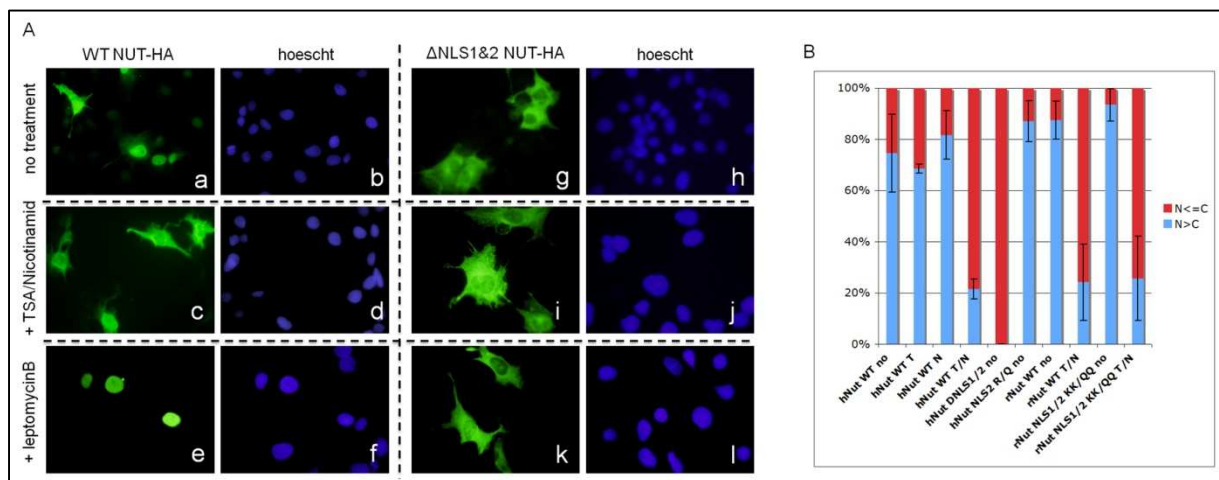


Figure 4 : Influence de l'acétylation sur la localisation cellulaire de NUT

A) Immunofluorescence dans des cellules COS transfectées avec le vecteur NUT WT ou NUT Δ NLS1&2, après différents traitements cellulaires.

B) Représentation graphique de la localisation cellulaire des différents mutants de NUT.

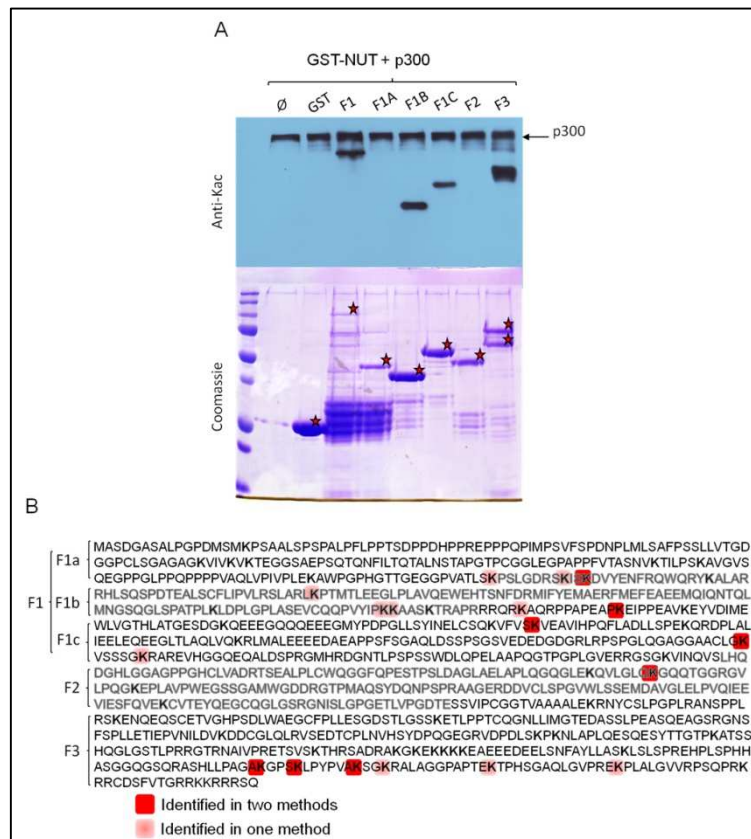


Figure 5 : Acétylation de la protéine NUT humaine

A) Test d'activité HAT par incubation de la protéine recombinante p300 avec différents fragments de la protéine NUT. Gel électrophorèse et détection de l'efficacité du test HAT par reconnaissance des fragments acétylés par l'anticorps anti-Kac (panel du haut), et gel Coomassie des différents fragments NUT découpés et utilisés pour l'analyse.

B) Analyse de l'acétylation des fragments NUT par spectrométrie de masse et Q-TRAP. Les résidus acétylés sont entourés d'un carré rouge (double identification) ou rose (simple identification)

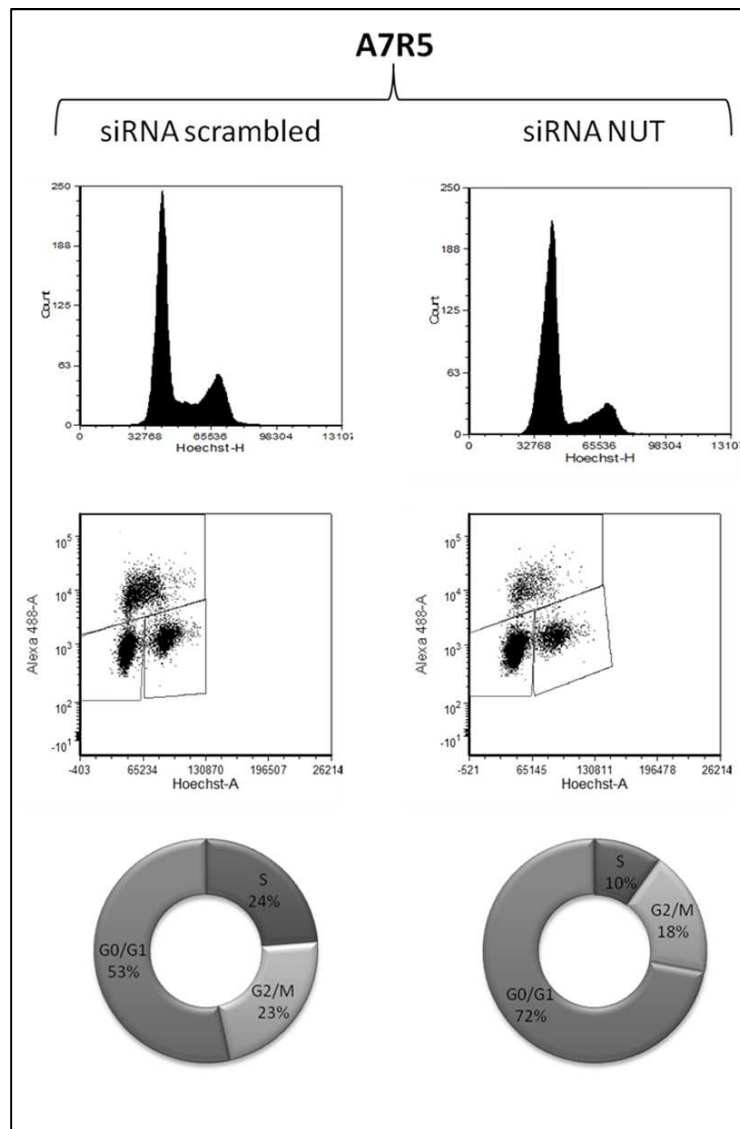


Figure 6 : NUT régule la prolifération des A7R5

Analyse par cytométrie en flux de l'incorporation de BrdU et de coloration au Hoescht des cellules A7R5 après un traitement de 24h de siRNA NUT ou siRNA contrôle. Les graphiques circulaires représentent le pourcentage de cellules comptabilisées dans chaque phase du cycle cellulaire.

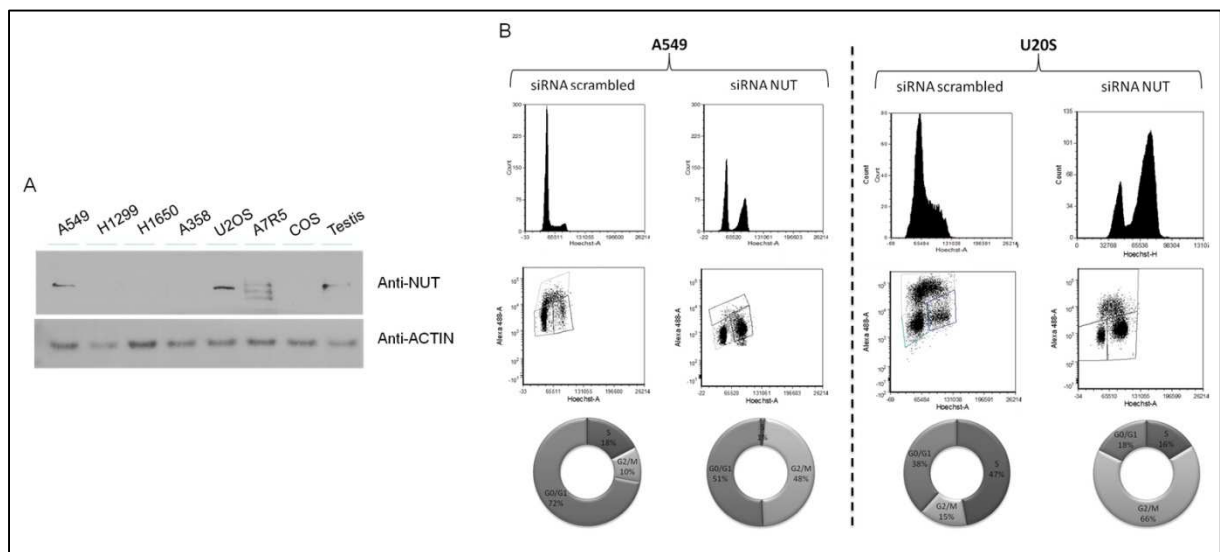


Figure 7 : NUT régule la prolifération des lignées cellulaires humaines A549 et U2OS

A) Immunodétection de la protéine NUT au sein de différentes lignées cellulaires.

B) Analyse par cytométrie en flux de l'incorporation de BrdU et de coloration au Hoescht des cellules A549 et U2OS après un traitement de 36h de siRNA NUT ou siRNA contrôle. Les graphiques circulaires représentent le pourcentage de cellules comptabilisées dans chaque phase du cycle cellulaire.

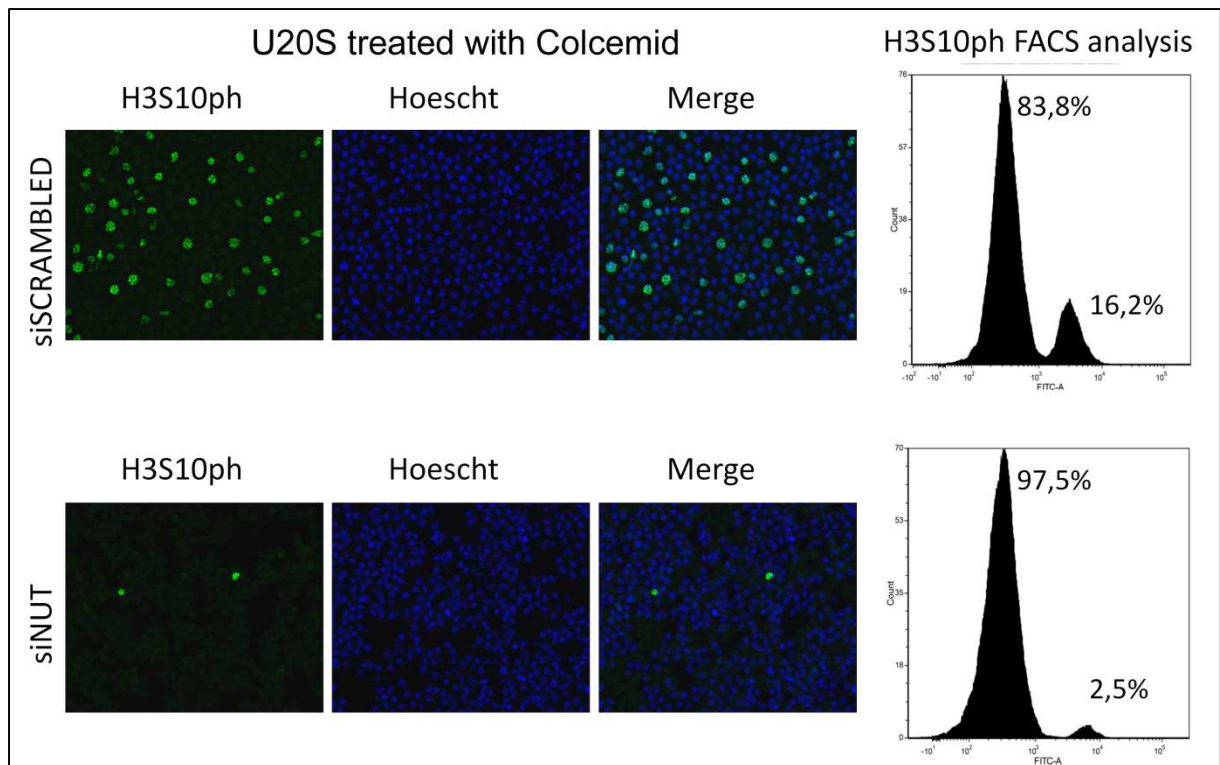


Figure 8 : L'inhibition de NUT bloque les cellules U2OS au point de contrôle G2/M

Détection en immunofluorescence sur lame ou en cytométrie de flux de la marque H3S10ph spécifique de la condensation des chromosomes. Les cellules ont été traitées avec de la Colcemid, qui bloque les cellules en mitose avant la formation des fuseaux mitotiques.

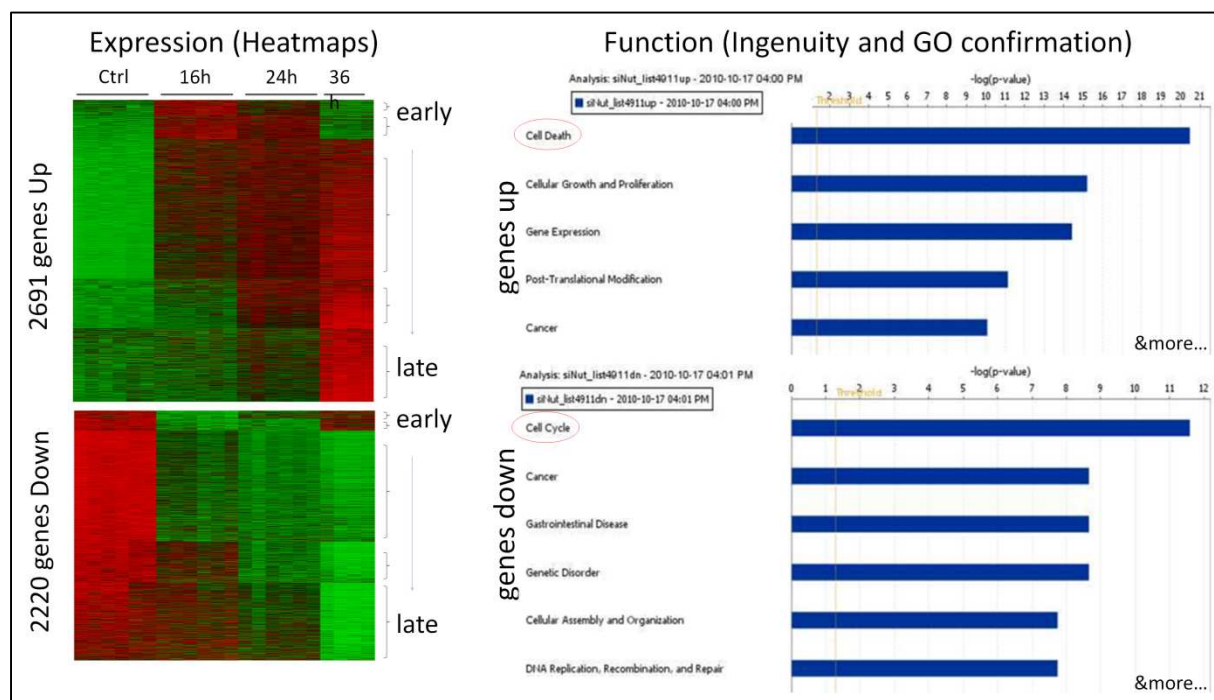


Figure 9 : Analyse transcriptomique après cinétique de siRNA NUT des cellules U2OS

Les cellules U2OS ont été incubées pendant 16, 24 ou 36h avec un siRNA NU, puis l'expression des gènes a été analysée en transcriptomique par la technique Illumina. La représentation en Heatmap regroupe les gènes dont l'expression est dérégulée en fonction de la cinétique d'incubation. Par la suite, une analyse fonctionnelle des gènes dérégulés a été effectuée grâce à Ingenuity.

Projet 4 : Rôle physiologique de NUT au cours de la spermatogenèse.

Au début de mon doctorat, aucune donnée n'existait quant à l'expression et la fonction de la protéine NUT. Nous nous sommes rapidement rendu compte par analyse informatique que la séquence même de cette protéine ne contenait aucun domaine caractéristique, si ce n'est deux séquences potentielles de localisation nucléaire, et un domaine dégénéré de liaison à l'ATP.

Un alignement de séquence entre espèces de cette protéine rend compte d'une faible conservation chez les êtres vivants. En effet, aucun homologue ne semble exister chez les espèces extérieures au règne des mammifères.

I) NUT est une protéine spécifique des cellules germinales.

L'analyse des banques ESTs laisse suggérer une expression spécifique de la protéine au niveau du tissu testiculaire. J'ai pu confirmer cette expression par PCR après transcription inverse (RT-PCR) des ARN messagers en ADN complémentaires sur différents tissus de souris. En effet, seule une amplification au sein du tissu testiculaire est détectable (Fig.1A). Nous avons ensuite confirmé ce résultat en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) sur une banque commerciale d'ADN complémentaires humains (Fig.1B). La protéine NUT est donc spécifique du testicule et pourrait être un facteur nécessaire au bon développement de la lignée germinale mâle chez les mammifères.

II) NUT est exprimée au cours de stades tardifs de la spermatogenèse.

De nombreux gènes spécifiques du testicule sont exprimés dans les cellules germinales mâles au cours du processus de formation du spermatozoïde, appelé spermatogenèse. Plus précisément, la spermatogenèse se compose d'une phase de prolifération (spermatogonies), puis une méiose (spermatocytes) pour enfin se terminer par une étape de maturation des

spermatides qui vont s'allonger puis se condenser jusqu'à obtention du spermatozoïde final. Cette dernière étape de maturation est appelée spermiogénèse.

Nous avons donc voulu tester l'expression du gène NUT au sein de ce phénomène de maturation des cellules germinales mâles. Pour ce faire, nous avons de nouveau utilisé la technique de Q-PCR sur des extraits de populations cellulaires spécifiques des différentes étapes de la spermiogénèse. Il est en effet possible de purifier les différentes populations cellulaires par sédimentation, du fait de la taille et de la densité différentes entre ces cellules. Les cellules collectées ont ensuite été lysées et leurs ARNm extraits. Nous avons ainsi obtenu six populations cellulaires correspondant à une partie de la chronologie de la spermiogénèse : deux de spermatocytes méiotiques (appelées commodément cellules pachytènes), trois de spermatides post méiotiques (appelées cellules rondes) et une dernière population de spermatides allongées et/ou condensées avant la formation finale du spermatozoïde.

Nous avons pu observer un profil d'expression atypique pour le gène NUT. En effet, alors que la plupart des gènes sont réprimés après la méiose, NUT possède un pic d'expression au niveau des cellules rondes (Fig.2). L'expression de l'histone H4 et de BRD4, réprimés après méiose, et celle de la protéine de transition TP1, activée dans les stades tardifs, confirment la bonne pureté des enrichissements de populations cellulaires par sédimentation.

Nous avons ensuite confirmé le profil d'expression de la protéine NUT au cours de la spermatogénèse chez le rat par analyse in situ. En effet, un anticorps commercial a été récemment produit et ne fonctionne pas chez la souris. Les différences entre la spermatogénèse murine, du rat et de l'homme sont minimales, et il est donc possible de faire une analogie entre les trois organismes. Nous avons pu observer par immunohistochimie sur coupe de testicules de rat que la protéine NUT est bien exprimée spécifiquement au niveau des cellules rondes, avec une diminution au niveau des spermatides allongées en condensation (Fig.3A). Nous avons enfin confirmé une fois de plus ce profil d'expression par analyse sur lame de coupe de tubules de testicule de rat par immunofluorescence, et cette technique nous permet de détecter une expression plus tardive jusqu'aux spermatides allongées en condensation (Fig.3B).

Ce profil d'expression post-méiotique du gène NUT suggère un rôle spécifique de la protéine au cours des étapes tardives de la spermatogénèse. Elle pourrait ainsi participer au processus unique de remodelage de la chromatine entraînant la compaction drastique du génome mâle. Une des étapes encore peu caractérisées de la spermiogénèse est la vague

d'acétylation détectée en fin de spermatides rondes. Sa fonction pourrait être de déstabiliser les nucléosomes et de faciliter ainsi le relargage des histones au profit de l'incorporation des protéines de transition. Cette acétylation des histones pourrait également recruter des facteurs de régulations épigénétiques capables de s'y associer et d'induire ce remplacement par les TP. Enfin, il est intéressant de noter que certaines histones vont être préservées dans le spermatozoïde (10 à 15% chez l'homme) au niveau de loci importants pour les étapes précoces du développement du futur zygote. Certaines de ces histones pourraient conserver des marques d'acétylation. En amont, les causes de cette vague d'acétylation sont également inconnues. Parmi les hypothèses possibles, on peut imaginer l'activité d'une histone acétyltransférase spécifique de la spermatogenèse, ou une répression des histones déacétylases. Cependant, à l'heure actuelle, aucune nouvelle HAT n'a été encore découverte. De par nos résultats publiés dans l'article précédemment cité, nous proposons une nouvelle hypothèse. Une HAT commune telle que CBP/p300 pourrait être responsable de cette vague d'acétylation, et son activité accrue nécessaire pourrait découler d'une interaction activatrice avec une protéine qui serait pour sa part spécifique du testicule. En cela, la protéine NUT semble être le candidat idéal, car nous avons montré qu'elle est spécifique du testicule, qu'elle est capable d'interagir avec CBP/p300, et qu'elle exacerbe son activité HAT.

III) NUT, acteur de la vague d'acétylation de la spermatogenèse ?

Nous avons dans un premier temps cherché à savoir si les protéines NUT et CBP/p300 pouvaient interagir au sein d'un complexe avec une activité HAT. Nous avons en effet montré que CBP/p300 est capable d'interagir avec NUT exprimée de manière ectopique ou fusionnée à BRD4 (voir article Embo J.).

Au cours de la spermatogenèse, CBP/p300 et NUT se retrouvent exprimées toutes deux au niveau des spermatides rondes. En effet, nous avons pu déterminer, par immunodétection après un gel électrophorèse, que CBP/p300 est exprimée jusqu'au stade des spermatides allongées, et se retrouve donc co-exprimée avec NUT dans une fenêtre physiologique courte seulement au niveau des spermatides rondes *et allongées* (Fig.4A).

Nous avons par la suite effectué des chromatographies d'exclusion à partir d'extraits de cellules germinales de rat, et pu mettre en évidence un possible complexe de NUT dans les fractions de plus de 600kD dans lesquelles la protéine p300 est également retrouvée (Fig.4B)

Nous avons réalisé une capture des protéines d'extraits cytoplasmique et nucléaire de cellules germinales mâles à partir du fragment NUT F1c-GST couplé sur bille (F1c étant le domaine de NUT interagissant avec CBP/p300). De même, nous avons effectué une immunoprécipitation du complexe endogène NUT à partir d'extraits totaux de cellules germinales mâles et de l'anticorps anti-NUT. Un essai d'activité acétyltransférase sur les complexes protéiques obtenus nous a permis de détecter une activité HAT couplé à la protéine. Cette activité a lieu sur l'ensemble des histones, ce qui laisse supposer que le complexe contient soit plusieurs HAT, soit une HAT peu spécifique comme pour l'être CBP/p300. Ceci est donc similaire à notre observation lorsque NUT est exprimée de manière ectopique dans des lignées cellulaires, où la protéine se trouve au sein d'un complexe contenant CBP/p300 (Fig.5A).

L'ensemble de ces données suggère fortement que NUT et CBP/p300 forment un complexe au sein des cellules germinales. Ces deux protéines, qui lorsqu'elles sont anormalement co-exprimées au sein de tumeurs portant la translocation BRD4-NUT, sont capables d'hyperacétyler la chromatine en synergie, pourraient être responsables de la vague d'acétylation de la spermatogenèse. Nous avons alors voulu savoir si la marque d'acétylation spécifique de CBP/p300, H3K56ac pouvait être observée au cours de la vague d'acétylation. Nous avons donc réalisé des immunofluorescences sur cellules germinales issues de tubules de souris, puis détecté la marque d'acétylation à l'aide d'un anticorps anti-H3K56ac. Alors qu'un marquage des complexes synaptonémaux est observable en méiose, les spermatocytes pachytènes sont faiblement marquées. Par contre, le signal est bien visible au niveau des spermatides rondes, perdure et s'intensifie jusqu'aux spermatides allongées pour diminuer au niveau des spermatides en condensation (Fig.5B). Il semble donc que CBP/p300 participe à la vague d'acétylation, au moins en partie, car cette marque H3K56ac lui est spécifique.

Ainsi, il est intéressant de penser que cette hyperacétylation du génome au niveau des spermatides rondes en élongation puisse être le résultat d'une HAT ubiquiste peu spécifique dont l'activité va se retrouver volontairement augmentée lors de la co-expression d'une protéine spécifique des cellules germinales mâles comme NUT.

IV) NUT et ses partenaires

Nous avons ensuite voulu rechercher les partenaires possibles de NUT au cours de la spermatogenèse. Nous avons pour cela utilisé deux méthodes : par précipitation de partenaires associés au fragment NUT F1c-GST couplé sur bille après incubation d'un extrait cytoplasmique, nucléaire ou totale de cellules du testicule de rat ; par co-immunoprécipitation de partenaires associés avec la protéine NUT couplée sur bille par un anticorps anti-NUT, après incubation d'un extrait total purifié de cellules germinales de rat. Dans chacune des expériences, des contrôles par GST vide ou anticorps aspécifique ont été effectués pour valider les interactions. Les éluats ont ensuite été migrés par électrophorèse sur gel gradient 6-15% acrylamide, puis colorés par Coomassie. Les bandes spécifiques ont ensuite été découpées puis envoyées en analyse par spectrométrie de masse pour identifier les partenaires de NUT (Fig.6A).

Au cours de ces différentes identifications, nous avons pu déterminer des partenaires potentiels de la protéine NUT : des partenaires confirmés plusieurs fois comme la Neurofibromine 1 (NF1) et STIM1 (Stromal Interacting factor 1), et d'autres confirmés plus aléatoirement comme l'histone spécifique du testicule H1t et la protéine de liaison à la chromatine phosphorylée 14-3-3.

Nous avons confirmé par co-immunoprécipitation endogène les interactions de la protéine NUT avec les protéines STIM1 et NF1 (Fig.6B). De manière intéressante, nous ne sommes pas capables de détecter une co-immunoprécipitation entre STIM1 et NF1, ce qui suggère que NUT peut être présent au sein d'au moins deux complexes différents. L'absence d'un bon anticorps spécifique pour H1t chez le rat nous a obligés à utiliser un système d'expression ectopique des protéines étiquetées après transfection de cellules COS. Nous avons alors pu confirmer une interaction entre NUT et H1t (Fig.6B).

L'identification du variant d'histone H1t comme partenaire de NUT est particulièrement intéressant. Il est ainsi possible que NUT puisse agir sur le remodelage de la chromatine en s'associant à H1t et en y recrutant CBP/p300 afin d'acétyler le génome. Tout comme NUT, ce variant d'histone est spécifique aux mammifères. NUT pourrait alors aider à l'éviction de cette histone de liaison dont les fonctions sont encore inconnues. En effet, nous savons que H1t est incorporée à la chromatine lors du stade spermatocytes pachytènes et est relargué en fin de stade spermatides (Drabent *et al*, 2003). L'interaction avec la protéine 14-3-3 reste à confirmer, mais est également particulièrement intéressante : elle est capable de

s'associer aux résidus histones phosphorylés et pourrait ainsi permettre le recrutement de NUT et peut-être de CBP/p300 au niveau de régions ciblées de la chromatine.

Les interactions avec STIM1 et NF1 sont plus délicates à interpréter. La protéine STIM1 est exclusivement cytoplasmique, et nous avons montré que NUT semble capable d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme, où sa fonction pourrait différer. STIM1 est un senseur du taux de Ca²⁺ dans la cellule (Zhang *et al*, 2005c), et NUT pourrait ainsi participer à la régulation des fonctions calcium-dépendantes des cellules germinales. En effet, le calcium est primordial pour la spermatogenèse, car un blocage des canaux calciques induit une infertilité, et la réaction acrosomale, la capacitation, la motilité du flagelle sont régulées par le calcium cytoplasmique. La protéine NF1 quant à elle, majoritairement cytoplasmique, est impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment les cancers, du fait de son action de régulation des voies Ras-dépendantes telle que la signalisation mTOR (Johannessen *et al*, 2005).

V) Génération d'une souris délétée pour NUT

Une méthode efficace pour obtenir des informations de l'importance et des fonctions d'une protéine est d'observer les effets de son absence dans un organisme. Nous avons donc entrepris de réaliser la délétion du gène NUT chez la souris, et je participe actuellement avec Faycal Boussouar et Thierry Buchou à l'élaboration de ce projet. La génération de ces souris se fera par recombinaison homologue entre deux vecteurs et le génome d'une cellule ES. In fine, nous obtiendrons une souris hétérozygote délétée pour le second exon du gène NUT, avec insertion d'une cassette Neo à la place, ce qui aura pour effet de perturber la transcription de NUT et rendra inactif le gène (Fig.7). Nous avons délibérément choisi de ne pas cibler le premier exon pour plusieurs raisons : Premièrement, celui-ci est court, et code seulement quelques acides aminés. Il n'est ainsi pas exclu que la transcription puisse sauter une délétion si peu importante dans la région codante de NUT. Deuxièmement, il n'existe actuellement aucune donnée claire des régions promotrices de NUT, et il subsiste un flou sur l'origine de transcription du gène. En effet, les bases informatiques diffèrent entre elles quant à la région 3' transcrite du gène NUT, certaines faisant référence à un premier exon antérieur au premier exon admis par la base de données Pubmed. Une délétion du premier exon délimité par Pubmed pourrait donc ne pas empêcher la transcription à partir de cet autre potentiel départ de transcription. Enfin, la région 3' du gène NUT est également la région 3'

d'un gène du brin complémentaire, NOLA. Une fois encore, les séquences promotrices ne sont pas définies, mais de par leur proximité, il est quasi certain que les séquences promotrices et activatrices de NUT et NOLA se chevauchent tête-bêche. Déleter les régions avoisinantes du premier exon de NUT pourrait ainsi avoir pour conséquence une perte d'expression simultanée de NOLA. Les gènes NUT et NOLA semblent transcrits de façon exclusive d'après analyse de données transcriptomiques, et donc l'inactivation de NUT et NOLA au cours de la spermatogenèse ne devrait pas avoir de conséquences inhérentes à NOLA. Cependant, cette protéine est ubiquiste et importante pour le fonctionnement de la cellule. En effet, la protéine NOLA fait partie de la famille des H/ACA snoRNPs (petites ribonucleoprotéines nucléolaires) qui participent à la formation des ARN ribosomiaux. La répression d'un seul membre de cette famille a pour conséquence l'incapacité de fabrication des ARNr 18S par exemple, avec bien entendu des conséquences drastiques pour la cellule. Il est donc vital de ne pas perturber l'expression de ce gène : c'est pour cela que nous avons décidé de cibler l'exon 2 de NUT. Nous nous attendons à obtenir un phénotype spécifique des cellules germinales, provoquant une infertilité. Potentiellement, l'altération de la vague d'acétylation pourrait être un des phénotypes facilement observables nous renseignant sur la fonction de la protéine NUT.

Cette partie de mon projet n'a pas encore donné suite à un article, car nous entamons la création de souris délétées pour le gène NUT, afin d'accroître l'importance des résultats déjà obtenus lors de ma thèse. Thierry Buchou et Faycal Boussouar au sein de notre laboratoire continueront le travail entamé pour la génération de ces souris. Les connaissances et les outils du laboratoire permettront une analyse rapide des phénotypes espérés lors de la spermatogenèse.

Matériel et Méthode

Les techniques et matériels préalablement détaillés dans la publication d'Embo J. ne seront pas détaillés ici, ainsi que les méthodes expérimentales du laboratoire issues de publications antérieures.

RT-PCR, Q-PCR et PCR et anticorps:

RT-PCR :

NUT souris : F' CAGGACTTCCTCTGCAGGTC et R' CCCTGGAGGATCAAGTTTCA

Q-PCR

NUT souris : F' GAGAACTATCGTCGCTGGCAG et R' ACGAAGCACTGGGATA
AGGAA

BRD4 souris F' TTCAGTCAAGGGAACCATCACT et R' AGGCAGGACCTGTTTCA
GAGT

NUT humain : F' AGGCTGTCATTCACCCTCAA et R' CTCTTCCAAGGCCATGAGTC

Les anticorps utilisés sont : anti-Nut lapin (cell signaling), anti-NF1 lapin (abcam), anti-Stim1
souris (BD Biosciences), anti-p300 lapin (Santa Cruz).

Spermatogenèse souris et rat

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cellules germinales à partir
de tubules micro-dissequés, préparés comme décrit par (Kotaja *et al*, 2004).

Le protocole d'immunofluorescence est détaillé dans (Govin *et al*, 2007).

Le protocole d'immunohistochimie sur coupe de testicule en paraffine a été décrit dans (Faure
et al, 2003).

Le fractionnement cellulaire s'est fait sur un gradient de BSA 2-4% selon le protocole détaillé
dans (Pivot-Pajot *et al*, 2003).

Figures

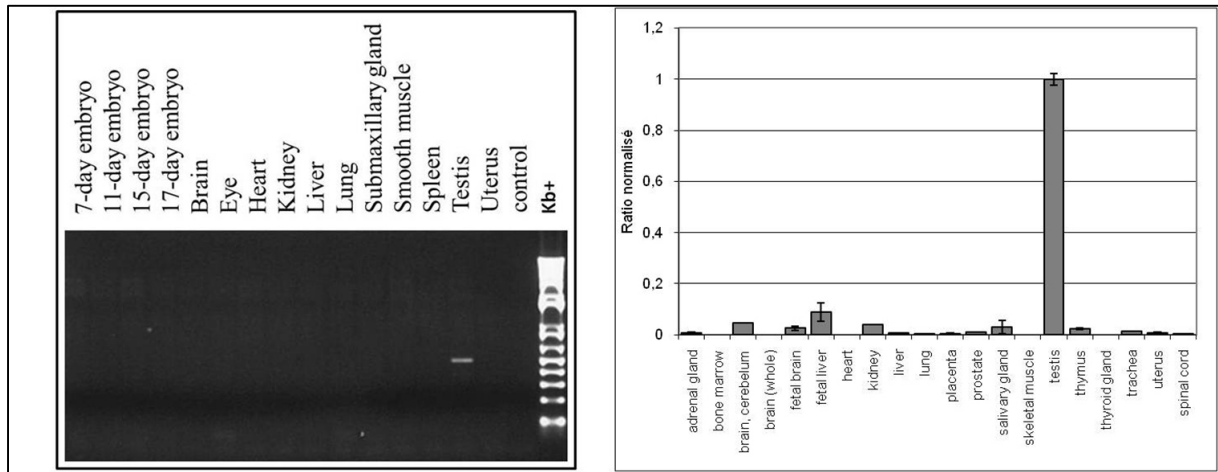


Figure 1 : Expression spécifique de NUT au sein du tissu testiculaire chez la souris et l'humain

A) Extractions ARNs de différents tissus de souris, suivies d'une transcription inverse. Les transcrits du gène NUT ont été détectés à l'aide d'une amplification PCR à partir d'amorces spécifiques puis migration par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%.

B) PCR quantitative en temps réel à partir d'une banque humaine d'ADN complémentaires. L'expression des transcrits NUT à partir d'amorces spécifiques au sein de vingt tissus humains a ensuite été normalisée par rapport à un gène de ménage tel GAPDH et U6.

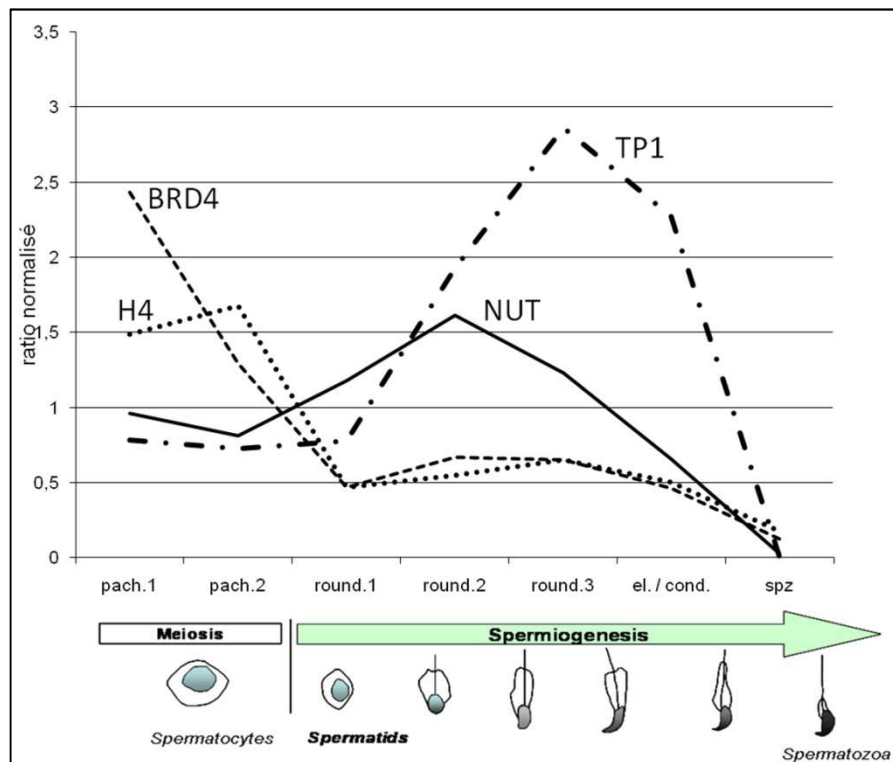


Figure 2 : profil d'expression de NUT au cours de la spermiogenèse murine

L'expression du transcrit NUT a été détectée par PCR quantitative en temps réel sur différentes populations enrichies de cellules germinales mâle de souris. Le profil d'expression des gènes BRD4, H4 et TP1 sert de référence et confirme la bonne purification des cellules germinales. L'ensemble des transcrits a été normalisé par rapport au gène de ménage GAPDH.

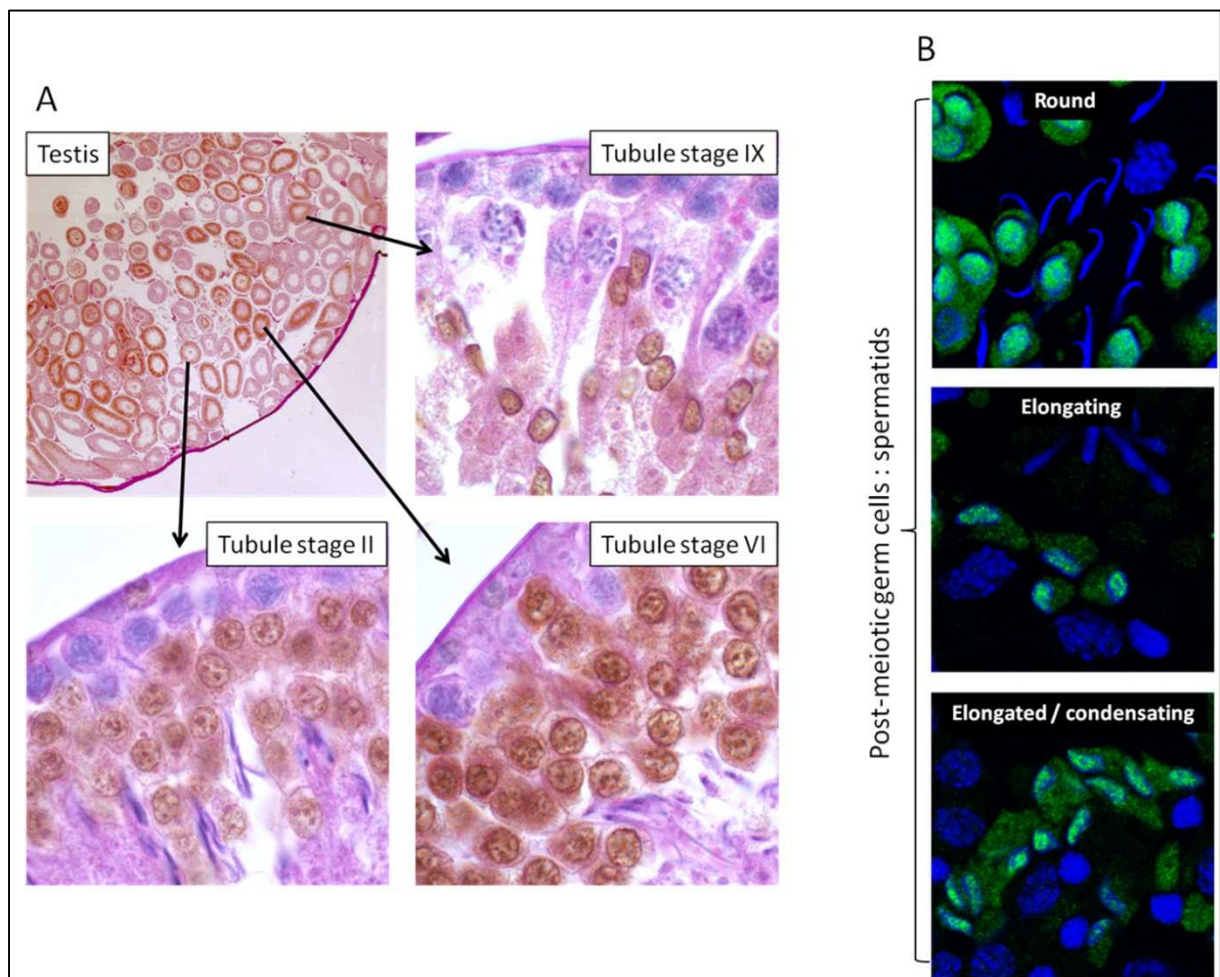


Figure 3 : La protéine est présente du début des spermatides ronds jusqu'aux spermatides allongées/condensées chez le rat.

A) Marquage de la protéine NUT par immunohistochimie dans les tubes séminifères chez le rat. Les coupes de testicules inclus dans la paraffine sont coupées en lames de 5 à 10 microns puis colorées au PAS/HE afin de permettre de « stader » les différents tubules. Les spermatides ronds correspondent aux stades II à VIII chez le rat, puis lors des stades IX à XI les spermatides s'allongent et se condensent jusqu'à former les spermatozoïdes.

B) Marquage par immunofluorescence de la protéine NUT (anticorps secondaire anti-lapin a488). Le marquage au Hoechst du noyau des cellules permet de différencier les cellules germinales entre elles. Brièvement, les tubules sont séparés les uns des autres puis découpés en section. Ces sections contiennent des combinaisons de différentes cellules germinales, qui seront congelées à l'azote liquide avant réalisation d'une immunofluorescence sur lame.

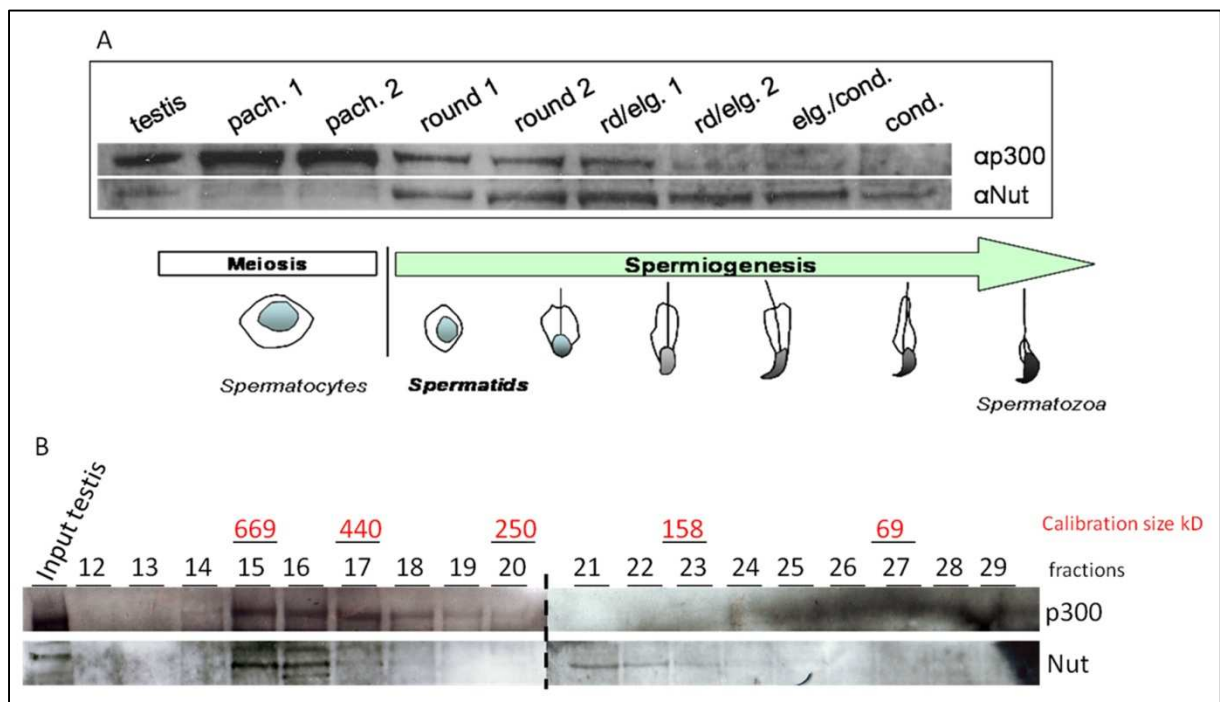


Figure 4 : CBP/p300 et NUT sont localisés au niveau de complexes spermatiques de même taille

A) Immunodétection de CBP/p300 et NUT au sein des spermatides rondes et spermatides en allongement chez le rat

B) Immunodétection de CBP/p300 et NUT au sein de fractions communes après chromatographie par exclusion de taille.

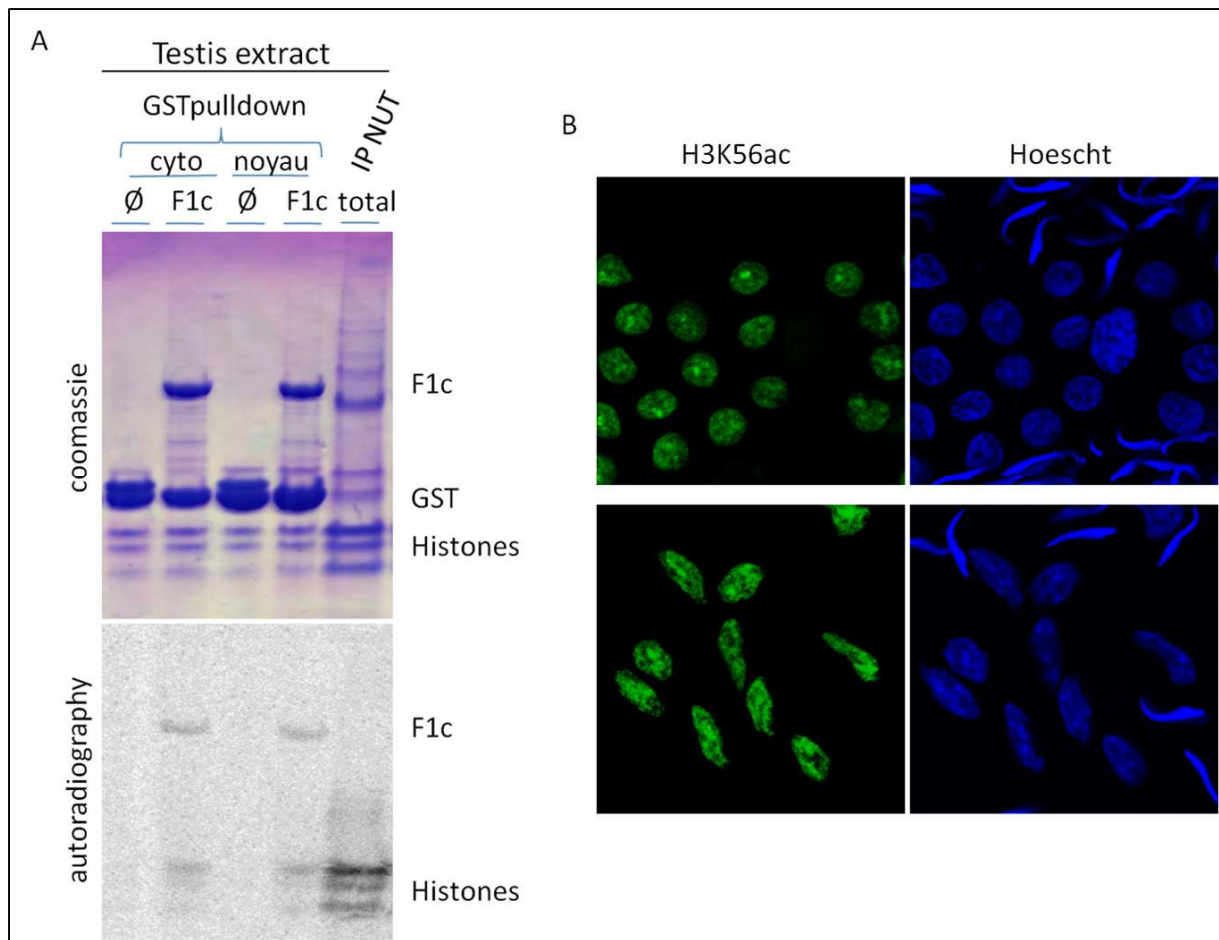


Figure 5 : Le complexe NUT endogène contient une activité HAT

A) Test d'activité HAT réalisé soit à partir d'extraits cytoplasmiques ou nucléaires de cellules germinales après précipitation de protéines liant le fragment NUT F1c-GST, soit à partir d'extrait total de cellules germinales après co-immunoprécipitation de protéines par l'anticorps anti-NUT.

B) Immunofluorescence sur cellules germinales de souris après dissection de tubules. Les noyaux ont été colorés au Hoescht (bleu) et la marque H3K56ac détectée grâce à un anticorps spécifique (vert). Les spermatides rondes (panel du haut) et les spermatides allongées (panel du bas) présentent un marquage significatif.

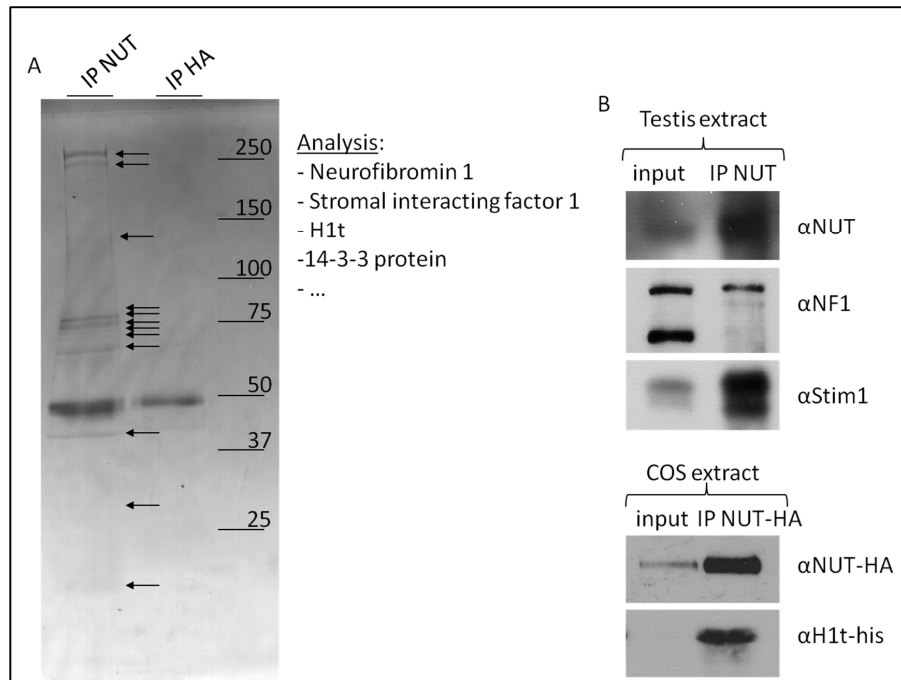


Figure 6 : Identification de partenaires physiologiques de NUT

A) Electrophorèse sur gel gradient et coloration Coomassie. Les protéines co-immunoprécipitées spécifiquement par l'anticorps anti-NUT sont colorées et envoyées à analyse par spectrométrie de masse pour identification.

B) Contrôle de certains des partenaires identifiés par spectrométrie de masse. Analyse par immunoprécipitation anti NUT à partir d'extrait testiculaire, couplée à la détection directe par anticorps des protéines interagissant ou par expression ectopique et co-immunoprécipitation de NUT et la protéine H1t étiquetée.

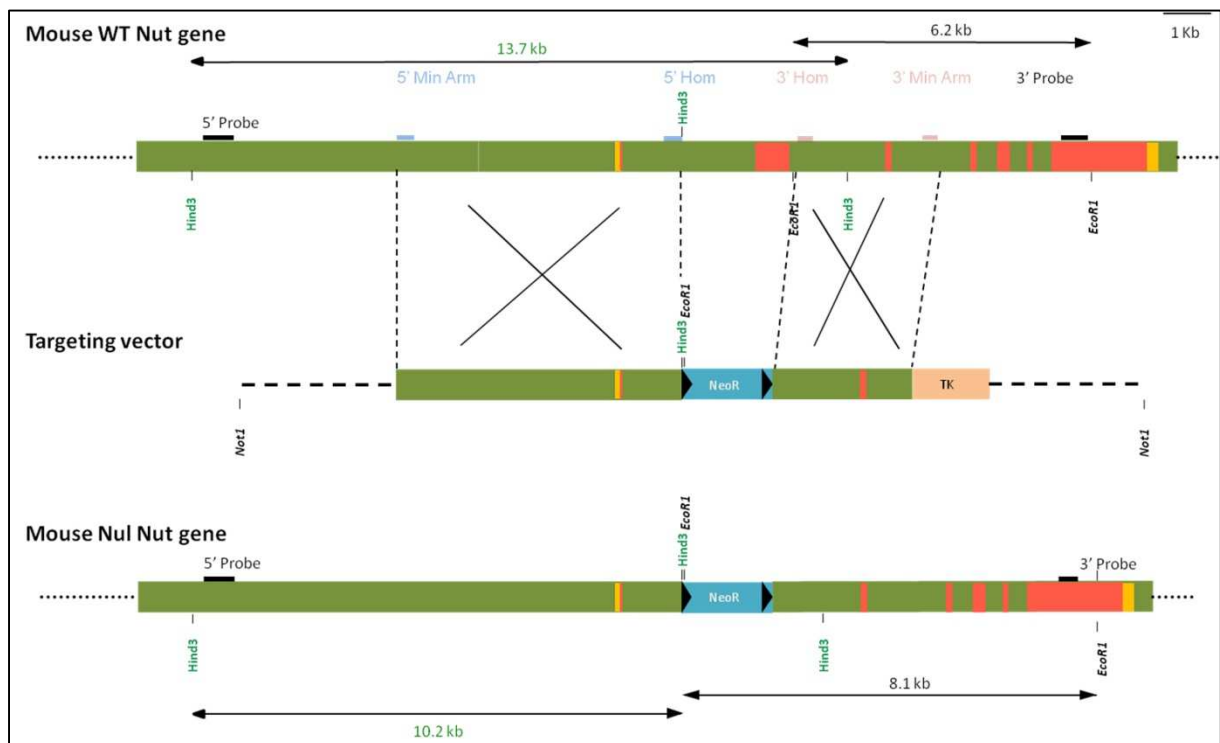


Figure 7 : Génération de souris délétées pour le gène NUT

Stratégie de délétion du gène NUT chez la souris, par recombinaison homologue et insertion d'une cassette Neo à la place d'une partie de l'intron 1-2 et de l'exon 2.

Discussion

I) Remodelage épigénétique au cours de la spermatogenèse

Au cours de mes travaux, je me suis attaché à caractériser la protéine NUT. J'ai pu confirmer que cette protéine est exprimée chez la souris, le rat et l'homme, exclusivement au niveau du tissu testiculaire. Il n'est pas rare de retrouver un profil d'expression spécifique du testicule, car ce tissu est très particulier. En effet, le tissu testiculaire est le lieu de production et de maturation des cellules germinales mâles, processus qui perdure tout au long de la vie d'un individu mâle. Les cellules germinales sont des cellules extrêmement particulières de l'organisme, et elles présentent un programme génétique et épigénétique très différents du reste des autres cellules somatiques. Ainsi, le testicule et les tubes séminifères sont le siège d'importants évènements cellulaires spécifiques aux cellules germinales (Figure A, p179).

IA) La spermatogenèse

Les cellules germinales souches sont appelées spermatogonies. Les spermatogonies de type A prolifèrent par mitose afin d'assurer leur renouvellement tout au long de la vie d'un individu. Certaines d'entre elles se différencient par la suite en spermatogonies de type B. Les spermatogonies de type B sont caractérisées par plusieurs nucléoles et une forte activité transcriptionnelle, permettant de synthétiser les protéines nécessaires à l'étape suivante. Elles vont subir une dernière mitose, qui produit les premières cellules de la seconde phase, la méiose.

La méiose est une succession de deux divisions particulières produisant quatre cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Les cellules germinales franchissant cette étape sont appelées spermatocytes. La prophase de la première division méiotique (prophase I) est très

longue, et est subdivisée en 5 étapes successives : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse. La duplication de l'ADN a lieu au tout début du stade leptotène, appelé préleptotène. Les chromosomes se condensent durant le stade leptotène, et les éléments latéraux des complexes synaptonémaux sont assemblés. Les chromosomes homologues s'apparient lors du stade zygotène grâce à l'assemblage des éléments centraux des complexes synaptonémaux. Lors du stade pachytène, la recombinaison homologe brasse l'information génétique entre les chromosomes d'une même paire. De plus, transcription et traduction augmentent lors de ce stade pour préparer l'étape suivante. Les complexes synaptonémaux se rompent lors du stade diplotène, ce qui sépare les chromosomes homologues. L'enveloppe nucléaire disparaît pendant la diacynèse.

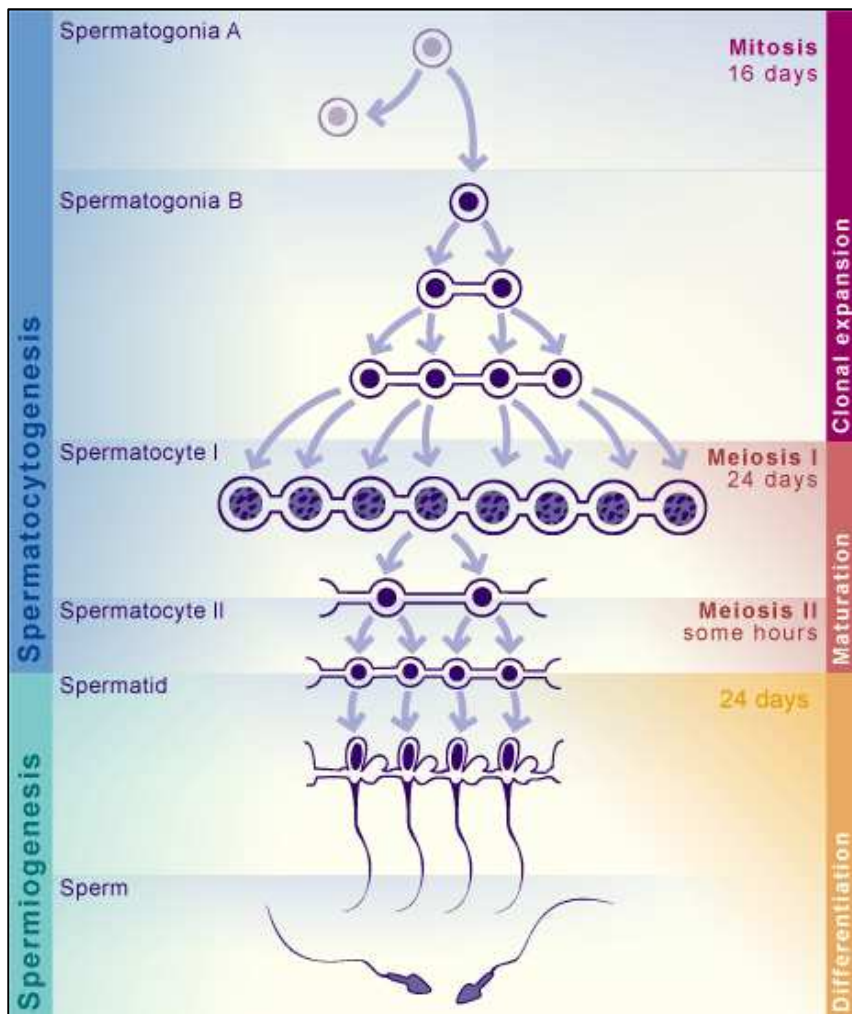


Figure A : Schéma descriptif des différentes étapes de la spermatogénèse, et leur durée respective chez l'homme. (issu du site <http://www.embryology.ch>)

Après s'être alignés sur la plaque métaphasique, les deux chromosomes homologues de chaque paire sont séparés et migrent vers un pôle différent durant l'anaphase I. La télophase sépare complètement les chromosomes et produit les spermatocytes secondaires. Cette première division est dite réductionnelle car elle divise le stock chromosomique par deux en produisant des cellules haploïdes.

Les spermatocytes secondaires traversent une interphase très courte, sans répliquer leur ADN. La deuxième division, dite équationnelle car le stock génétique est conservé, se déroule comme une mitose conventionnelle, avec séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Cette dernière division donne naissance aux spermatides.

La différenciation des spermatides, appelée spermiogenèse, est séparée en trois phases, regroupant au total 16 étapes de différenciation chez la souris. La première phase regroupe les spermatides rondes de type 1 à 7, caractérisée par une chromatine homogène, un développement progressif de l'acrosome et une activité transcriptionnelle modérée spécifique à la suite des événements. Dans un deuxième temps, le noyau des spermatides en élongation (type 8 à 11) s'allonge, et la transcription stoppe complètement lorsque leur chromatine commence à se condenser. Enfin la différenciation des spermatides condensées (type 12 à 16) produit les spermatozoïdes. Leur noyau finit de s'allonger, l'acrosome connaît sa maturation terminale, le flagelle termine sa croissance et la chromatine est structurée sous sa forme la plus compacte. L'étape de la spermiogenèse implique un remodelage de la chromatine et une réécriture complète de l'épigénome des cellules germinales mâles. Ceci réclame donc la mise en place de voies de signalisation et d'activités épigénétiques propres à ces cellules.

IB) La spermiogenèse

IB1) Variants histones

Un grand nombre de variants d'histones est incorporé au cours de cette étape de maturation des spermatides, et certains perdurent jusqu'aux stades tardifs de la spermiogenèse (H2AL1/2 par exemple). Ces variants participent à la mise en place de structures

chromatiniennes et à la régionalisation de zone spéciale du génome spermatique. En effet, H2AL1/2 sont associés à une nouvelle structure de la chromatine, non nucléosomale et moins stable que les nucléosomes (Govin *et al*, 2007). Cette structure pourrait représenter une forme intermédiaire de structuration de la chromatine, dont l'instabilité témoigne de la dynamique de réorganisation. De plus, H2AL1/2 et H2BL1 sont maintenus dans les spermatozoïdes, et sont probablement impliqués dans la transmission d'une information épigénétique. L'étude de leur devenir au moment de la fécondation est en cours, et nous aidera sans doute à comprendre la nature et le rôle de l'information épigénétique qu'ils portent.

IB2) Hyper acétylation et dialogue épigénétique

L'éviction des histones et leur remplacement par les protéines de transition puis les protamines semble être déclenchés par une hyperacétylation ponctuelle au niveau des spermatides en élongation. Les causes et conséquences de cette acétylation globale du génome sont encore mal caractérisées.

Des données suggèrent cependant que cette acétylation coïncide avec la perte de la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 chez la souris. Cette marque est présente dans la phase post méiotique de la différenciation des gamètes mâles, aussi bien durant la sporulation d'un organisme unicellulaire (levure) que durant la spermatogénèse d'un insecte (drosophile) et d'un mammifère (souris). H4S1P est impliquée dans la compaction du génome, car son absence entraîne des problèmes de sporulation et une augmentation du volume des spores de levures. Enfin, H4S1P disparaît au moment de l'hyperacétylation des histones. A pH physiologique, un grand nombre de charges positives est exposé au niveau d'un stretch d'acides aminés basiques de la queue N terminale d'H4 (acides aminés 16-20). La phosphorylation de la sérine 1 accumule des charges positives à l'extrémité de la queue N terminale, charges qui pourraient interagir avec le stretch basique et former une boucle au sein de la queue N terminale. Cette boucle pourrait bloquer l'accès des lysines aux complexes HAT, et aux protéines liant habituellement la queue N terminale d'H4. En effet, des tests HAT réalisés sur des peptides représentant la queue N terminale d'H4, phosphorylée ou non, indiquent que H4S1P inhibe *in vitro* l'activité HAT de Esa1 et NuA4 (Utley *et al*, 2005).

Au début de la spermiogénèse, les queues N terminales d'H4 seraient ainsi verrouillées par la structure induite par H4S1P. Au stade VIII, la déphosphorylation d'H4S1P

libérerait la queue N terminale, alors accessible aux complexes HAT. Cette déphosphorylation préalable permet également d'expliquer l'exclusion mutuelle d'H4S1P et H4ac observée à ce stade de la spermatogénèse. Il reste malgré tout à définir clairement les mécanismes impliqués dans cette vague d'hyperacétylation.

L'hyperacétylation des histones marque très certainement les premières étapes de la réorganisation finale du génome. De plus, l'extraction de l'ensemble des histones nécessite sans aucun doute l'intervention de complexes spécifiques. Ainsi, BRDt est une protéine à double bromodomaines, exprimé spécifiquement dans les testicules, et fait partie de la famille BET. Cette famille est composée des protéines BRD2 à BRD4 et de BRDt. Il a été montré que BRDt est capable de compacter *ex vivo* la totalité de la chromatine de cellules somatiques, lorsqu'une hyperacétylation est induite par la TSA (Pivot-Pajot *et al*, 2003). *In vivo*, BRDt est détectée au moment où les histones sont hyperacétylées, et suit exactement le profil de leur distribution. La protéine BRDt agit sans doute en faveur d'une compaction de la chromatine acétylée au cours de la spermiogénèse et elle semble également capable d'éjecter les histones de liaison de la chromatine (Govin *et al*, 2006). Ceci favorisait ainsi leur échange avec les variants d'histone de liaison H1t2 et HILS1, qui sont incorporés à la chromatine dans les spermatides allongées. La chromatine pourrait donc être compactée de manière globale par certains facteurs de remodelage, assurant la mise en place de la majeure partie de la structure chromatinienne spermatique. L'éviction des histones semble impliquer également la machinerie d'ubiquitination. Une étude récente démontre que les souris déficientes en protéine RNF8 présentent un défaut de l'enlèvement des histones au cours de la spermatogénèse (Lu *et al*). La protéine RNF8 est une protéine à activité ubiquitine-ligase E3 capable d'ubiquitiner les histones H2A et H2B dans les cellules germinales. En plus de cette activité permettant vraisemblablement la déstabilisation des nucléosomes et la dégradation des dimères H2A/H2B, il a été montré que RNF8 participe à la mise en place de l'acétylation de H4K16. Or cette marque est sans doute critique pour le remodelage de la chromatine et l'éviction des histones, car elle permet d'empêcher le contact entre différentes fibres de la chromatine et prévient ainsi la formation des fibres de 30nm (Shogren-Knaak *et al*, 2006). Ainsi, la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acétylation des histones seraient imbriquées dans des signalisations épigénétiques régulant l'éviction des histones et la compaction drastique du génome des cellules germinales mâles.

Cependant, le rôle fonctionnel de l'acétylation des histones n'est pas limité à une future compaction générale de la chromatine et elle pourrait participer à la reprogrammation de deux types de régions chromatinienne.

IB2a) Hétérochromatine péricentrique

H4ac est détectée au sein de l'hétérochromatine péricentrique des spermatides condensées, avant de disparaître dans les stades plus tardifs. Néanmoins, une partie des histones modifiées serait maintenue dans les spermatozoïdes. H4K8ac et H4K12ac sont notamment détectées au sein de l'hétérochromatine péricentrique des gamètes mâles (van der Heijden *et al*, 2006). En effet, la vague d'acétylation, qui touche l'ensemble du génome, marque le début de la décondensation du chromocentre. L'hétérochromatine péricentrique adopte alors une organisation originale, en perdant HP1beta et en affichant les marques contradictoires H3K9me3 et H4ac. Une étude récente démontre que les histones rémanentes au sein du spermatozoïde sont associées à des loci spécifiques. Les nucléosomes conservés sont ainsi enrichis en marques H3K4me2 et H3K27me3, au niveau des groupes de gènes tels que les gènes soumis à l'empreinte, les gènes codant pour des miRNAs et les gènes HOX, ainsi qu'au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la transcription et les voies de signalisations au cours du développement (Hammoud *et al*, 2009). Ainsi, les marques épigénétiques conservées sur le génome paternel sont nombreuses et semblent apporter une information précise et sans doute capitale pour le bon déroulement des premières étapes du développement du zygote. Plusieurs protéines de la famille BET pourraient protéger les histones acétylées du remodelage de la chromatine. Il est connu que chez la levure, la protéine Bdf1, homologue aux protéines de la famille des BET, est capable de protéger des résidus acétylés d'une déacétylation active (Ladurner *et al*, 2003). Notre laboratoire a montré que BRDt se relocalise au niveau de l'hétérochromatine péricentrique dans les spermatides allongées. Outre son rôle dans la compaction de la chromatine, BRDt pourrait avoir un rôle similaire à celui de Bdf1, et protéger l'extraction de certaines histones acétylées de l'hétérochromatine péricentrique. De plus, certains membres de la famille BET pourraient faciliter l'incorporation de variants d'histones. En effet, Bdf1 fait partie du complexe SWR-C, responsable de l'incorporation d'H2A.Z au sein de la chromatine.

IB2b) Régions soumises à l’empreinte

L’acétylation d’H4 marque fortement les régions soumises à l’empreinte (ICR) tout au long de la spermatogénèse. Il serait intéressant de déterminer si cette marque recrute des protéines de la famille BET, et notamment BRDt, au niveau des ICR. De manière similaire à l’hétérochromatine péricentrique, des membres de la famille BET pourraient protéger la chromatine des ICR, qui seraient alors maintenues dans une structure nucléosomale dans les spermatozoïdes. L’acétylation pourrait ainsi participer à la mise en place d’une information épigénétique au niveau des gènes soumis à l’empreinte parentale, et permettre ainsi un développement correct du futur embryon après fécondation.

IB3) Fonctions de NUT au cours de la spermiogénèse

IB3a) NUT et la vague d’acétylation

Toutes ces étapes spécifiques des cellules germinales réclament un grand nombre d’acteurs propres à ces cellules. La protéine NUT, de par son expression testiculaire, est un de ces acteurs et doit participer à l’élaboration d’un des mécanismes de la spermatogénèse. Nous avons pu caractériser plus en détail l’expression de NUT dans le testicule et détecté un pic d’expression au niveau des spermatides rondes. Nous avons ensuite confirmé que la protéine est bien retrouvée depuis les spermatides rondes en sortie de méiose jusqu’aux spermatides rondes allongées en début de condensation. Il est donc vraisemblable que NUT joue un rôle au cours de la maturation des spermatides. Extrêmement peu de données existent sur le remodelage que subissent aussi bien le noyau que le cytoplasme des cellules germinales en fin de spermatogénèse. Le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse se déroule en présence de nombreuses modifications post-traductionnelles d’histones et de nombreux variants d’histones. L’étude de différentes modifications d’histones confirme qu’une hyperacétylation induite dans les spermatides de type 9-10 affecte les histones et leurs lysines de manière différentielle (Hazzouri *et al*, 2000b). Les lysines les plus touchées par cette hyperacétylation sont les lysines 5, 8 et 12 d’H4 et la lysine 5 d’H2A. Bien que cette hyperacétylation soit décrite depuis plus de 20 ans, la HAT responsable n’a pas encore été identifiée. Plusieurs hypothèses permettent d’expliquer cette hyperacétylation :

- l'activité d'une HAT spécifique de la spermatogenèse. Cependant, cette HAT devra être capable d'acétyler de nombreux résidus différents, et aucune protéine candidate spécifique du testicule ne ressort des études bioinformatiques.

- l'inactivation des HDACs. Une baisse de la quantité des HDACs a été observée au cours de la spermatogenèse. En effet les principales HDACs nucléaires, HDAC1 et HDAC2, sont dégradées au moment où les histones sont hyperacétylées (Caron *et al*, 2003). Cependant, cette diminution n'a rien d'anormal vu la baisse transcriptionnelle qui se met en place après méiose.

- Enfin, les données obtenues lors de ma thèse nous laissent imaginer une troisième possibilité, concernant l'activité d'une HAT non spécifique de la spermatogenèse, dont la fonction va se retrouver spécifiquement régulée par une protéine qui est pour sa part exclusivement exprimée dans les spermatides.

Nous avons pu observer une interaction entre la protéine NUT et l'histone acétyltransférase CBP/p300. De plus, nous avons pu observer que CBP/p300 est présente au niveau des spermatides et que la vague d'acétylation de la spermatogenèse inclut la marque H3K56ac. Or, cette marque est spécifique de l'activité de CBP/p300, ce qui suggère que la HAT participe activement à la vague d'hyperacétylation (Das *et al*, 2009). Cependant, CBP/p300 seule ne peut promouvoir cette acétylation, car elle est déjà présente dans les autres types cellulaires sans la provoquer. Il faudrait donc un changement de son activité dans une fenêtre de temps et dans un type cellulaire bien précis, pour tenter d'expliquer la possibilité que CBP/p300 puisse être responsable de cet événement si original.

La protéine NUT pourrait être le facteur modulant l'activité de CBP/p300. En effet, NUT est exprimée exclusivement au cours de ce laps de temps, et dans aucune autre cellule de l'organisme. De plus, non seulement NUT interagit avec CBP/p300, mais nous avons pu démontrer qu'elle est capable d'exacerber son activité. Bien que le mécanisme d'action de NUT sur l'activité de CBP/p300 reste à déterminer, il est fort excitant de constater que NUT augmente son activité d'acétylation sur différentes lysines substrats à la fois, notamment H3K56ac. En effet, l'acétylation de H3K56ac par CBP/p300 ou son homologue RTT109 chez la levure semble requérir une protéine chaperon, CIA1/ASF1 (Endo *et al*). Une délétion de cette protéine chaperon entraîne une diminution de la marque H3K56ac. Or NUT, de façon encore inconnue, est capable d'induire cette acétylation spécifique par CBP/p300. Soit elle exacerbe son activité en lui faisant surpasser les restrictions d'activité normalement

dépendantes de chaperon, soit elle peut servir elle-même de chaperon et induire une conformation spécifique entre l'histone H3 et CBP/p300, conformation apte à permettre l'acétylation de H3K56. De plus, la HAT CBP/p300 est un candidat idéal vu sa faible spécificité et sa capacité d'acétyler un grand nombre de lysines différentes, notamment celles retrouvées au cours de la spermiogenèse.

Ainsi, CBP/p300 pourrait être la HAT majeure responsable de l'hyperacétylation survenant au cours de la spermatogenèse, et sa suractivité inhabituelle pourrait dépendre de sa régulation par interaction avec la protéine spécifique de la spermiogenèse, NUT. Evidemment, ceci n'exclut pas l'activité d'autres histones acétyltransférases, ni l'existence d'une HAT spécifique à la spermatogenèse, mais conforte sérieusement l'importance de CBP/p300. Pour confirmer définitivement notre hypothèse, nous avons entamé un double projet au sein du laboratoire, visant à déléter CBP/p300 et NUT dans des modèles de souris.

Comme l'expression de CBP et p300 est vitale pour la survie des souris, nous avons récupéré des souris dont le gène p300 est entouré de sites LOX qui peuvent être excisés en présence de l'enzyme CRE. Ceci nous permet de contrôler le moment précis de la délétion du gène. Nous avons également récupéré des souris dont le gène codant pour CRE a été inséré sous la dépendance du promoteur des protamines. Ainsi, ces souris expriment l'enzyme CRE en fin de spermatogenèse, lorsque la transcription spécifique des protamines a lieu. Le croisement de ces souris nous permettra d'obtenir une lignée de souris délétée pour p300, uniquement dans les phases tardives de la spermatogenèse. Ces souris devraient donc être viables, mais infertiles. En effet, si la HAT majeure responsable de la vague d'acétylation est bien CBP/p300, alors son absence devrait inhiber cette hyperacétylation. Ces souris nous permettront donc de répondre à deux questions. Premièrement, savoir si CBP/p300 est bien responsable de cette hyperacétylation, et deuxièmement, observer les conséquences d'un blocage de cette hyperacétylation, nous permettant alors de mieux comprendre la fonction que peut avoir ce phénomène unique en son genre.

Nous démarrons également la génération de souris délétée du gène NUT. Comme NUT est exprimée uniquement au cours de la spermatogenèse, nous nous attendons à ce que les souris complètement délétées du gène soient viables. Il est intéressant de remarquer que lors de la mise en place de la stratégie d'inactivation du gène NUT, nous nous sommes rendu compte que le gène était en concomitance avec un second gène, NOLA (ou Nop10), et qu'ils partageaient sans doute une région promotrice identique bien qu'inversée entre les deux. Des analyses transcriptomiques ont révélé que l'expression de NUT ou de NOLA est exclusive.

L'activation de la transcription de l'un par la machinerie transcriptionnelle entraînerait donc la répression du second gène. Le gène NOLA code pour une protéine nucléolaire de la famille H/ACA snoRNPs impliquée dans la formation de la sous-unité ribosomale 18S (Reichow & Varani, 2008). Une mutation d'un seul membre de cette famille, entraîne la perte des ARNr 18S. L'expression de NUT au cours de la spermatogenèse peut donc impliquer une répression de l'ARNr 18S, ce qui pourrait participer à la diminution de l'expression de nombreuses protéines.

Les souris KO pour le gène NUT devraient vraisemblablement être infertiles. En effet, si la protéine NUT joue un rôle important au cours de la spermatogenèse, sa délétion, ainsi que l'absence de protéines homologues permettant de compenser sa perte de fonction, devrait en toute logique grandement perturber la production de spermatozoïdes. Ces souris permettront de mieux cerner les fonctions de la protéine NUT. Si elle potentialise CBP/p300 et participe activement à la vague d'acétylation, ces souris devraient présenter une perte de cette acétylation, avec des conséquences possibles sur les processus suivants de la spermiogenèse. L'expertise du laboratoire permettra de rapidement identifier tout phénotype subtil entraîné par la délétion de NUT.

Enfin, la caractérisation des partenaires de la protéine NUT permettra de mieux cerner ses fonctions. En effet, NUT semble capable d'interagir aussi bien avec des protéines cytoplasmiques (Stim1, NF1) que nucléaires (H1t).

IB3b) NUT et le remodelage de la chromatine

Il est donc envisageable que la protéine NUT nucléaire participe dans un premier temps à l'hyperacétylation de la chromatine, avec des interactions possibles avec CBP/p300 et H1t. Son association avec le variant d'histone de liaison H1t pourrait lui permettre de cibler CBP/p300 au niveau de régions de chromatine où le variant est incorporé. De manière intéressante, des données du laboratoire laissent suggérer que l'histone H1t en complexe avec la protéine NUT puisse être acétylée, ce qui suggère effectivement que NUT vienne recruter CBP/p300 sur l'histone H1t. La sur-activation de CBP/p300 par NUT entraînerait alors l'acétylation plus ou moins spécifique de H1t. Il est cependant intéressant de noter que des souris délétées pour le gène H1t ne présentent pas de problème de fertilité, suggérant que ce variant d'histone n'ait pas un rôle critique pour la spermatogenèse. H1t représente malgré cela plus de 55% des histones de liaison lors de son expression depuis les spermatocytes pachytène jusqu'aux spermatozoïdes allongés (Drabent *et al*, 1996; Steger *et al*, 1998). La chromatine

contenant H1T aurait une structure plus lâche qu'avec les autres histones de liaison (De Lucia *et al*, 1994; Khadake & Rao, 1995) : ceci pourrait faciliter les crossing-over lors de la méiose, et augmenter l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de remodelage. La protéine NUT pourrait permettre le ciblage de ces facteurs de remodelage sur H1t, ou encore participer à son éviction, pour permettre la compaction de la chromatine après relargage de la quasi-totalité des histones. Il est excitant de penser que NUT pourrait agir comme un chaperon à l'interface entre les HATs et les histones. En effet, l'acétylation de H3K56ac au sein de nucléosomes par CBP/p300 ou son homologue RTT109 chez la levure requiert une protéine chaperon, CIA1/ASF1 (Das *et al* 2009). Une délétion de cette protéine chaperon entraîne une diminution de la marque H3K56ac. Or, CBP/p300 mise en présence de NUT est capable d'acétyler la lysine 56 de l'histone H3 *in vitro*, au sein de structures nucléosomales. La protéine NUT pourrait donc permettre le couplage entre l'activité CBP/p300 et l'acétylation des histones, et nous avons pu détecter une acétylation de l'histone H1t lors de l'expression ectopique de NUT et H1t dans des cellules COS.

Enfin, bien que l'analyse par spectrométrie de masse des partenaires de NUT n'ait identifié que le variant H1t, il n'est pas impossible que les autres variants de l'histone H1 interagissent avec NUT. Le variant HILS1 (H1 like protein in spermatid 1) a été décrit chez la souris et chez l'homme (Iguchi *et al*, 2003; Yan *et al*, 2003). Ce variant est détecté dans des stades plus tardifs que H1T, à savoir dans les spermatides allongées et condensées, suggérant un rôle dans les dernières étapes de la réorganisation de la chromatine. H1T2 est le variant d'histone de liaison spécifique du testicule découvert le plus récemment (Martianov *et al*, 2005; Tanaka *et al*, 2005). Ce variant est capable d'interagir avec l'ADN et la Protamine 1. Les souris mâles, dont le gène H1t2 a été invalidé, sont stériles, probablement à cause de problèmes de restructuration du noyau. Les spermatides présentent un retard de condensation de la chromatine, un allongement aberrant, un détachement de l'acrosome et une fragmentation de l'ADN (Martianov *et al*, 2005). De plus, le taux de Protamines détectées est inférieur à celui présent dans les souris sauvages (Tanaka *et al*, 2005). Si NUT est capable de s'associer à ces variants d'histone H1, elle pourrait réguler leur localisation ou entraîner leur éviction après acétylation par le facteur CBP/p300.

Enfin, l'interaction entre NUT et la protéine 14-3-3, qui reste à confirmer, permettrait d'accroître les possibilités d'action de NUT. En effet, la protéine 14-3-3 est capable de s'associer aux résidus phosphorylés des histones. Il est tentant d'imaginer ainsi que NUT et 14-3-3 permettraient alors de coupler la phosphorylation à l'acétylation, en recrutant

CBP/p300 au niveau de régions phosphorylées du génome. En effet, H3S10ph et H4S1ph par exemple sont détectées à partir de la méiose jusqu'en fin de spermatides rondes, précédant la vague d'acétylation. 14-3-3 pourrait s'associer à ces marques en partenariat avec NUT, et recruter ainsi CBP/p300 pour promouvoir l'hyperacétylation du génome.

IB3c) Rôle cytoplasmique de NUT

Lors de l'hyperacétylation du génome, la protéine NUT pourrait elle-même servir de substrat à CBP/p300. Or, nous avons pu démontrer que l'acétylation de NUT entraîne sa relocalisation dans le cytoplasme. NUT pourrait ainsi entraîner ses partenaires avec elle dans le cytoplasme, inactivant ainsi la fonction de co-activateur transcriptionnel de CBP/p300. Il est également possible que la protéine NUT puisse promouvoir la dégradation du variant d'histone H1t en l'entraînant hors du noyau.

Une fois cytoplasmique, NUT pourrait alors interagir avec les partenaires identifiés en spectrométrie de masse localisés dans ce compartiment cellulaire.

Nous avons en effet pu mettre en évidence une interaction entre NUT et la Neurofibromine 1 (NF1). Nous avons pu confirmer par immuno-précipitation cette interaction. La protéine NF1 n'est pas caractérisée au cours de la spermatogenèse, et elle est plutôt exprimée de manière ubiquiste. Des mutations/délétions de NF1 provoquent une maladie autosomale dominante appelée neurofibromatose de type 1. Cette maladie génétique est une des plus fréquentes chez l'homme (1/3000 naissances). Les symptômes sont un défaut des tissus dérivés des cellules de la crête neurale, avec des aberrations développementales de la face, des perturbations de la pigmentation de la peau (taches « café au lait ») et de multiples tumeurs du système nerveux central et périphérique. La protéine NF1 est également classée dans la famille des suppresseurs de tumeurs, et sa fonction se trouve perturbée dans de nombreux cancers. Sa fonction principale est la régulation de la voie de signalisation Ras, car elle est responsable de l'hydrolyse du GTP associé à Ras en GDP (Trovo-Marqui & Tajara, 2006). Elle réprime ainsi la voie de Ras car cette dernière est active couplée à du GTP et inactive couplée à du GDP. Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) délétés pour NF1 ont une sur-activation de Ras, une activité prolongée d'ERK et une capacité de prolifération plus importante. Il est donc possible que l'expression illégitime de NUT dans les cancers, que nous détaillerons plus tard, perturbe la fonction de NF1 et active en continu les voies de prolifération mTOR et MAPK-dépendantes. Cependant, les conséquences d'une interaction entre NUT et NF1 au cours de la spermatogenèse restent obscures. Certaines

données de la littérature font cependant état d'une localisation transitoire de NF1 dans le noyau, bien que sa fonction y soit alors inconnue (Vandenbroucke *et al*, 2004). NUT pourrait participer à son transfert lorsqu'elle est non-acétylée.

NUT interagit également avec la protéine Stim1 (stromal interaction factor 1). La protéine Stim1 est exclusivement cytoplasmique, et est associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Stim1 est un senseur du taux de calcium dans la cellule (Zhang *et al*, 2005c). Lorsque la concentration de calcium dans le RE est trop faible, Stim1 s'oligomérisse et va se transloquer au niveau de la membrane plasmique, où il va s'associer à la protéine Orai1 contenue dans les canaux CRAC, activant alors l'entrée de calcium extra cellulaire dans le réticulum endoplasmique (Cahalan, 2009). NUT pourrait ainsi participer à la régulation des fonctions calcium-dépendantes des cellules germinales. En effet, le calcium est primordial pour la spermatogenèse, car un blocage des canaux calciques induit une infertilité, et la réaction acrosomale, la capacitation, et la motilité du flagelle sont régulées par le calcium cytoplasmique.

Toutes ces interactions et fonctions physiologiques possibles de la protéine NUT pourraient grandement perturber les différentes voies de signalisation cellulaires lors d'une expression illégitime de NUT dans des cellules somatiques. Ainsi, l'expression anormale de nombreuses protéines spécifiques du testicule est très souvent corrélée à la formation de cancer.

II) Cancer et facteurs CT

IIA) Implication des gènes CT dans les cancers

Depuis longtemps, les similarités entre le développement des cellules germinales, du trophoblaste, et le développement des tumeurs, ont interpellé les chercheurs : par exemple, un grand nombre de cancers produit de la gonadotrophine et d'autres hormones trophoblastiques (Louhimo *et al*, 2004). Ces hormones servent actuellement d'indicateur de pronostic pour plusieurs types de cancers. Mais la découverte la plus frappante est le nombre de protéines spécifiques des cellules germinales retrouvées anormalement exprimées dans les cancers. Ces protéines ont été regroupées au sein de la superfamille des antigènes cancer/testicule - ou gènes C/T (Scanlan *et al*, 2004). Cette observation permet d'émettre une hypothèse fort intéressante : l'expression aberrante de gènes de la lignée germinale résulterait d'une réactivation du programme gamétogénique normalement réprimé dans les cellules somatiques, et cela pourrait entraîner les cellules vers la voie de la tumorigenèse (Old, 2001). En effet, au cours de la gamétogenèse et lors de la tumorigenèse, les différentes cellules partagent des phénotypes en commun : une hypométhylation globale de l'ADN, un pouvoir angiogénique et une évasion immunitaire. Les deux types cellulaires présentent également des similarités troublantes comme l'immortalisation des cellules germinales souches et la transformation des cellules tumorales, la migration des cellules primordiales et les cellules métastatiques, etc... (Figure B, p193)

Les gènes C/T ont été historiquement découverts pour leur caractère antigénique. Un antigène de cancer idéal pour espérer une thérapie doit être stablement exprimé par la tumeur, être absent des tissus normaux et être crucial pour la survie des cellules tumorales. Le premier antigène C/T a été découvert à partir d'un patient atteint d'un mélanome, dont les cellules T cytotoxiques reconnaissaient les cellules tumorales. Le gène codant cet antigène a été cloné et dénommé MAGEA1. Des études relatives à MAGEA1 ont permis de se rendre compte que son expression était également détectable au sein de plusieurs mélanomes, carcinomes du sein et autres cancers, mais jamais dans des tissus sains, à l'exception du testicule. Il s'est avéré par la suite que MAGEA1 appartient à un groupe de douze gènes localisés sur la région du chromosome Xq28 (famille MAGEA). De plus, deux autres familles de gènes C/T ont été découvertes, MAGEB et MAGEC, localisées également sur le chromosome X. Ces trois groupes de gènes présentent tous la particularité d'avoir une expression restreinte au testicule et aux cancers.

La super famille des gènes C/T regroupe de nos jours plus de 40 familles correspondant à une centaine de gènes, tous spécifiques du testicule et anormalement exprimés dans les cancers. Le criblage bioinformatique de l'expression de gènes au sein de

transcriptomes de différents tissus et de cancers permet de prédire l'ensemble des membres de cette famille. Les antigènes C/T peuvent être classés en deux sous-groupes, ceux localisés sur le chromosome X, et les autres.

Une des particularités des antigènes CT, principalement ceux du chromosome X, est leur réactivation simultanée dans les cancers. En effet, les antigènes C/T sont très souvent co-exprimés. Dans des études d'expression de neuf antigènes C/T au niveau de tumeurs, il s'est avéré que 65% des mélanomes sont positifs pour trois ou plus de ces protéines, et 57% des tumeurs de poumons en expriment au moins deux (Sahin *et al*, 1998; Tajima *et al*, 2003). Dans les tumeurs testées, il s'est avéré également que le gène *NY-ESO-1* est rarement exprimé en l'absence de *MAGEA3*. Bien que l'expression illégitime de la plupart des gènes C/T résulte d'une levée de l'hyperméthylation de l'ADN qui pourrait être aléatoire, il serait malgré tout curieux que ces co-expressions surviennent spontanément. Les cellules tumorales subissent une hypométhylation globale de l'ADN, mais les mécanismes impliquant la levée spécifique de la répression des gènes C/T reste incertains. Une première indication semble cependant émaner de la caractérisation du gène *BORIS*.

La protéine *BORIS*, paralogue du facteur *CTCF*, est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales mâles. *CTCF* est un régulateur de l'information épigénétique ayant un rôle déterminant dans la régulation spécifique d'allèle de gènes soumis à l'empreinte parentale, et il n'est pas exprimé dans les cellules germinales. (Gabory & Dandolo, 2005). Il possède entre autres une fonction de barrière transcriptionnelle ainsi qu'un rôle dans la régulation de l'expression des gènes en général (Wallace & Felsenfeld, 2007). Une récente étude démontre que les souris délétées du gène *BORIS* présentent des défauts de spermatogenèse, avec des petits testicules et une mort importante des cellules germinales (Suzuki *et al*, 2010). Il a été observé que *BORIS* régule directement l'expression d'au moins un autre gène spécifique du testicule, *CST*, en se fixant sur son promoteur. Il est donc fort possible que *BORIS* régule l'expression d'autres gènes spécifiques du testicule, et que son expression illégitime dans les cancers entraîne l'expression de plusieurs autres gènes C/T. De manière intéressante, l'activation de *BORIS* dans les cellules somatiques induit l'expression d'autres facteurs C/T (pour cancer/testis), plus particulièrement celle des gènes *MAGE-A* (Vatolin *et al*, 2005) et de *CTAG1/NY-ESO1* (Hong *et al*, 2005). Dans ce dernier cas, *BORIS* recrute le facteur de transcription *SP1* au promoteur de *CTAG1* pour déréguler sa transcription (Kang *et al*, 2007). Ainsi, une première phase d'expression anormale de facteurs transcriptionnels spécifiques du testicule amènerait, dans un second temps, à la réactivation d'un programme

germinal au sein de cellules somatiques, participant à la tumorigenèse de ces cellules. Il a été clairement établi que l'expression illégitime de la famille MAGEA peut convertir les cellules somatiques dans une configuration favorisant leur transformation maligne. En effet, il a été montré que la suppression de leur expression induit une apoptose des lignées cellulaires issues de mélanomes les exprimant illégitimement. Des études supplémentaires ont montré que cette résistance à l'apoptose était associée à une action neutralisante des MAGE sur p53 (Yang *et al*, 2007a). En accord avec ces données, une autre étude a montré que MAGEA2 recrute l'histone-déacétylase 3 (HDAC3) et cible p53, s'opposant ainsi à l'acétylation et à l'activation de p53 à la suite d'un traitement génotoxique (Monte *et al*, 2006).

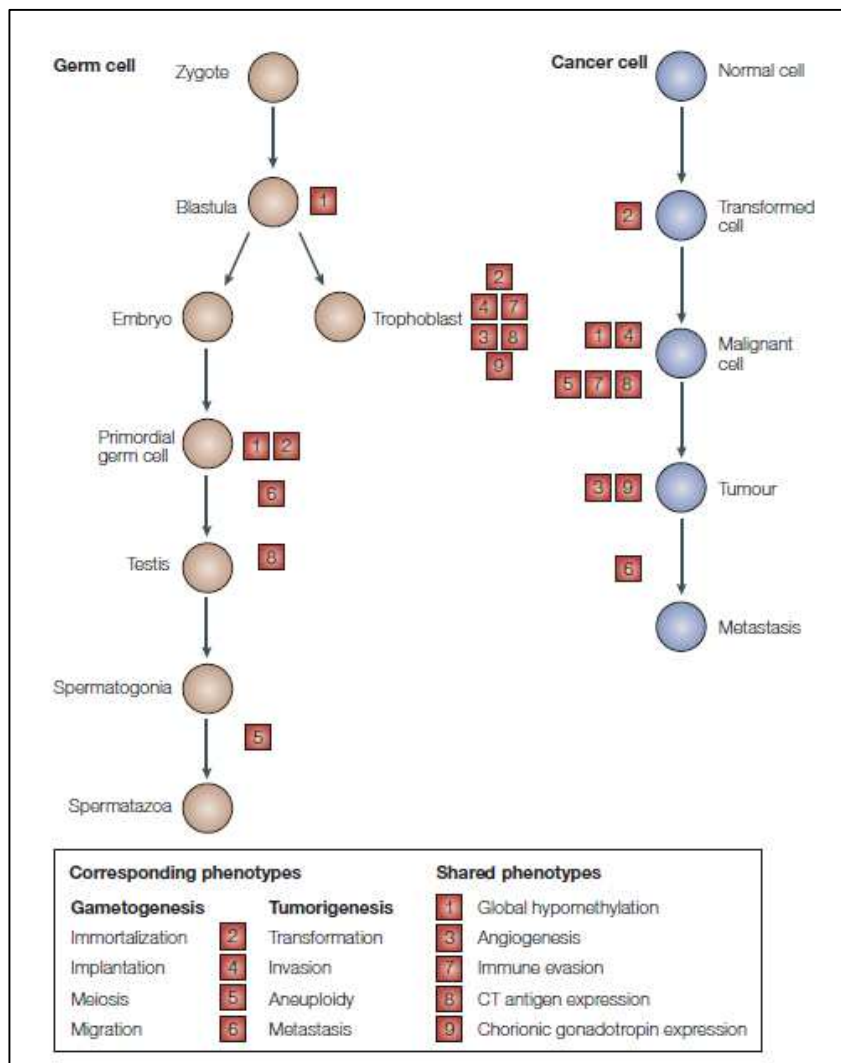


Figure B : Comparaison entre les cellules germinales et les cellules tumorales. (issu de Simpson *et al*, 2005)

De plus, MAGEA1 recrute l'histone déacétylase HDAC1 et transforme ainsi le régulateur transcriptionnel SKIP en un répresseur de transcription (Laduron *et al*, 2004).

Certains antigènes C/T sont spécifiques des spermatocytes et des spermatides. Comme nous venons de le voir, ces cellules sont le siège de réorganisations globales très importantes de leur génome, sans équivalent dans les cellules somatiques. L'expression illégitime, dans les cellules somatiques, des protéines testiculaires impliquées dans ce remodelage de la chromatine pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'organisation et les fonctions du génome et de l'épigénome, et participer ainsi à la transformation cellulaire.

Par exemple, la protéine Spo11, qui induit des cassures double brins d'ADN lors de la méiose, est exprimée dans des cellules cancéreuses et pourrait faciliter des translocations chromosomiques (Keeney *et al*, 1997). La protéine BRDt, capable de compacter la chromatine acétylée, a été retrouvée anormalement exprimée dans des cancers du poumon. Ainsi, une expression anormale de BRDt pourrait fortement perturber les fonctions génomiques impliquant l'acétylation des histones, en particulier la transcription des gènes. La protéine HSP70.2, impliquée dans l'incorporation de protéines basiques au sein de la chromatine, est également décrite comme nécessaire à la croissance et à la survie de cellules tumorales (Daugaard *et al*, 2005). Une autre protéine à bromodomaine, ATAD2, dont il existe une isoforme spécifique du testicule, est retrouvée dans des cancers, et son expression est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon (Caron *et al*). Cette étude montre également que la répression par siRNA du gène ATAD2 induit un changement global de la transcription des cellules. Son expression illégitime dans des cancers est donc à même de perturber la transcription des cellules somatiques.

IIB) La protéine NUT est un nouveau gène CT

L'activation illégitime dans les cellules somatiques de facteurs spécifiques du testicule, notamment de ceux qui sont impliqués dans la modulation de l'épigénome, peut donc avoir un effet amplificateur, aboutissant à des perturbations épigénétiques secondaires et déterminantes dans la transformation cellulaire.

Lors de ma thèse je me suis attaché à caractériser la protéine testiculaire NUT. Bien que les analyses transcriptomiques réalisées dans le laboratoire n'ont pas permis de détecter la protéine NUT au sein de cancer, nous avons pu observer une expression de NUT au sein d'au moins trois lignées tumorales, A7R5, A549 et U2OS. Des données préliminaires réalisées sur différents cancers du poumon laissent supposer que la protéine NUT soit exprimée au sein de cancers directement récupérés sur des patients. Il est possible que le transcrite de NUT soit peu stable, et donc difficilement détectable lors des analyses transcriptomiques. La protéine quant à elle semble être particulièrement stable : il suffirait ainsi d'une faible quantité de traduction des ARNm pour avoir suffisamment de protéine NUT illégitimement exprimée. En effet, l'expression de NUT est faiblement détectée par PCR quantitative sur les cellules A7R5, A549 et U2OS, mais la protéine est bien détectable grâce à un anticorps anti-NUT. Les détections relatives sont bien spécifiques de NUT car dans les deux cas une répression par siRNA entraîne une diminution des quantités respectives d'ARNm et de protéines. Il est ainsi possible que les analyses systématiques de transcriptomes ne puissent permettre la caractérisation de certaines protéines à faible transcription.

IIC) NUT et CBP/p300

NUT est capable de s'associer à CBP/p300 et de stimuler son activité HAT. Au cours de la spermatogenèse, il est possible que ce couple de protéines participe à la vague d'hyperacétylation caractéristique qui touche les cellules germinales spermatides. Une fois exprimée au sein de cellules somatiques, NUT pourrait recréer cette interaction physiologique dans les spermatides, et déréguler les voies de signalisation impliquant CBP/p300. Comme nous l'avons montré dans le cas de la fusion BRD4-NUT, NUT pourrait séquestrer CBP/p300, ou tout du moins l'aiguiller vers des substrats ou des activités différentes. Il n'est en effet pas impossible que NUT puisse interagir avec la chromatine indirectement, ne serait-ce que grâce au bromodomaine et domaine PHD de CBP/p300. Cependant, l'expression ectopique de NUT dans des cellules COS n'induit pas la formation de foci acétylés. NUT ne semble donc pas capable de recréer seul des foci hyperacétylés uniquement grâce à p300, avec comme conséquence la séquestration des deux protéines. Nous n'avons également pas détecté

d'augmentation de l'acétylation des histones dans les cellules exprimant ectopiquement NUT. L'interaction NUT et CBP/p300 dans les cellules somatiques ne semble donc pas capable d'hyperacétyler le génome des cellules. Cependant, nos observations sont préliminaires, et réalisées sur le niveau global des histones par immunodétection des histones acétylées à l'aide d'un anticorps pan-acétylé. Nous n'observons pas non plus de variations à l'échelle des cellules de la marque spécifique de CBP/p300 H3K56ac. Mais l'utilisation d'anticorps après électrophorèse n'est sans doute pas la plus appropriée des méthodes. En effet, dans les cellules portant la translocation BRD4-NUT, malgré l'hyperacétylation ponctuelle des foci, une analyse globale par électrophorèse de l'acétylation ne révèle pas de variation du niveau générale dans la cellule. En réalité, l'hyperacétylation ponctuelle des foci est compensée par une baisse de l'acétylation dans le reste du génome de par l'absence de CBP/p300. Il faudrait ainsi réaliser une analyse fine de l'acétylation de la chromatine. Une possibilité reviendrait à effectuer une immunoprécipitation de chromatine à l'aide d'anticorps anti-histones acétylées et analyser ainsi les régions génomiques dont l'acétylation pourrait être perturbée. De manière similaire, il serait intéressant de comparer les régions de chromatine associées à CBP/p300 en présence ou absence de NUT.

Sans forcément être capable de modifier la localisation de CBP/p300 sur la chromatine, la protéine NUT pourrait inhiber les fonctions de la HAT ou en permettre de nouvelles. Il n'est en effet pas exclu que NUT entre en compétition avec d'autres protéines s'associant via le domaine CH3 de CBP/p300. Par exemple, bien que la protéine p53 interagisse avec plusieurs domaines de CBP/p300, le domaine TAZ2/CH3 de CBP/p300 semble avoir le plus d'affinité pour p53, et entre en compétition avec MDM2 pour se fixer en partie N-terminale de p53 (Teufel *et al*, 2007). La protéine MDM2 est responsable de la dégradation de p53, et la fixation de NUT avec le domaine CH3 de CBP/p300 pourrait favoriser l'inactivation de p53. Le domaine CH3 est également un des sites d'association de la famille de facteurs de transcription GATA1-6 (Blobel *et al*, 1998), et NUT pourrait perturber l'activité co-transcriptionnel de CBP/p300 avec les protéines GATA.

Les protéines CBP et p300 sont capitales pour la cellule, car elles interviennent dans de nombreuses voies de signalisation épigénétiques en acétylant les histones, mais également en tant que co-activateur de la transcription. Enfin, les centaines de partenaires connus pour CBP/p300 laissent imaginer des possibilités d'interconnexion entre les différentes voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée. Par exemple, CBP/p300 est à la fois capable de stabiliser p53 en l'acétylant dans le noyau, permettant alors la cascade de signalisation de

l'apoptose p53-dépendante, comme elle est capable au contraire de participer à sa dégradation en stimulant l'activité de poly-ubiquitination de MDM2 au niveau du cytoplasme (Grossman, 2001). Il serait intéressant de déterminer si l'expression illégitime de NUT dans les cancers fait pencher cette balance de la régulation de p53 plutôt vers sa dégradation, bloquant ainsi la réponse apoptotique de la cellule à sa tumorigenèse. En effet, l'acétylation de NUT par CBP/p300 semble permettre sa relocalisation dans le cytoplasme, où elle pourrait également emmener la HAT avec elle, augmentant ainsi le ratio de CBP/p300 dans le cytoplasme. Ceci aurait pour conséquence une dégradation systématique de p53, et la perte du contrôle de l'homéostasie cellulaire par l'un des gardiens du génome. Cette possible relocalisation partielle de CBP/p300 pourrait également nuire à l'ensemble des activités de la protéine dans le noyau, notamment son importance pour la transcription cellulaire.

IID) NUT et autres partenaires

Les différents partenaires de NUT que nous avons identifiés en plus de CBP/p300 pourraient également voir leur fonction physiologique au sein des cellules somatiques altérée par l'expression illégitime de la protéine testiculaire.

Parmi ces partenaires, nous avons confirmé la protéine Stim1. A première vue, une implication de NUT et Stim1 dans les cancers semble peu probable. Cependant, Stim1, protéine senseur du calcium et associée à la membrane du Réticulum endoplasmique, semble jouer un rôle important dans la formation des métastases et la migration des cellules tumorales. En effet, la réduction de la quantité de Stim1 ou de son partenaire Orai1 par siRNA dans des cellules de cancer du sein décroît considérablement le nombre de métastases dans des modèles animaux (Yang *et al*, 2009). Les canaux calciques et le stockage du calcium sont en effet importants pour la migration des cellules et semblent inhiber le renouvellement des adhésions focales. NUT pourrait d'une façon ou d'une autre participer à l'activité de Stim1. Dans ce cas la, le diagnostic de l'expression de NUT dans les cancers signifierait un risque élevé de formation de métastases.

Les possibles altérations de fonction de la protéine NF1, et leurs conséquences au sein de cancers, semblent plus évidentes. En effet, NF1 est une protéine suppresseur de tumeur capable de réguler négativement l'activité de Ras, en hydrolysant son GTP. De ce fait, NF1 inhibe les voies de signalisation de prolifération cellulaire mTOR-dépendantes ou ERK-dépendantes (Figure C, p199). L'interaction de NUT avec NF1 pourrait donc empêcher le contrôle de Ras, activant ainsi en permanence sa signalisation et permettant la prolifération des cellules. Ainsi, l'inactivation du gène NF1 suite à des mutations génétiques assez fréquentes donne lieu à une maladie autosomale dominante dont un des symptômes est le développement de nombreuses tumeurs dans le système nerveux central et périphérique.

Il serait enfin intéressant de rechercher si la protéine NUT n'est pas capable d'interagir avec de nouveaux partenaires dans les cellules somatiques, auxquels elle n'est normalement pas confrontée dans les cellules germinales spermatides. En effet, nos identifications de partenaires du testicule ne reflètent peut-être pas l'ensemble des interactions possible de NUT dans une lignée tumorale.

IIE) NUT et avantage cellulaire

Dans ces différents cas de figure, la répression de l'expression anormale de NUT devrait reconduire à un état physiologique des cellules qui sont encore dépendantes de l'expression de NUT pour leur tumorigenèse. Dans les trois lignées pour lesquelles nous avons pu détecter la protéine NUT, nous avons observé que l'inhibition de NUT par siRNA entraîne un blocage du cycle cellulaire. Ceci confirme donc de façon claire l'avantage qu'apporte NUT à ces cellules. La figure D (p200) résume notre hypothèse de travail quant à l'implication de NUT dans la dérégulation de facteurs clefs de l'homéostasie cellulaire tels que CBP/p300. Il est remarquable qu'une protéine, dont l'expression est normalement spécifique aux cellules germinales, puisse à elle seule déréguler suffisamment l'homéostasie cellulaire pour que sa perte d'expression bloque la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, les lignées cellulaires de poumon A549, d'ostéocarcinome U20S, ou de muscle lisse A7R5, de fonds génétiques extrêmement différents, semblent dépendantes de la protéine NUT pour conserver leur immortalisation.

Cependant, il est fort surprenant que les différentes lignées ne se bloquent pas aux mêmes phases du cycle. En effet, les cellules A7R5 dont le gène NUT est réprimé s'accumulent en G0/G1. Les cellules semblent donc rentrer en quiescence, et il est fort possible que cet arrêt de la prolifération soit en réalité le reflet d'une différenciation des cellules. Il serait donc intéressant de tester l'expression de marqueurs de différenciation des cellules musculaires lisses après traitement au siRNA NUT. Il faut noter que la lignée A7R5 n'est pas véritablement une lignée tumorale mais plutôt une lignée transformée non immortalisée. Il est donc possible que la différence d'arrêt du cycle entre les cellules A7R5 et les deux autres lignées proviennent de ce statut de cellules transformées. Les conséquences de l'expression de la protéine NUT peuvent donc différer en fonction de l'avancement des cellules dans le processus de tumorigénèse.

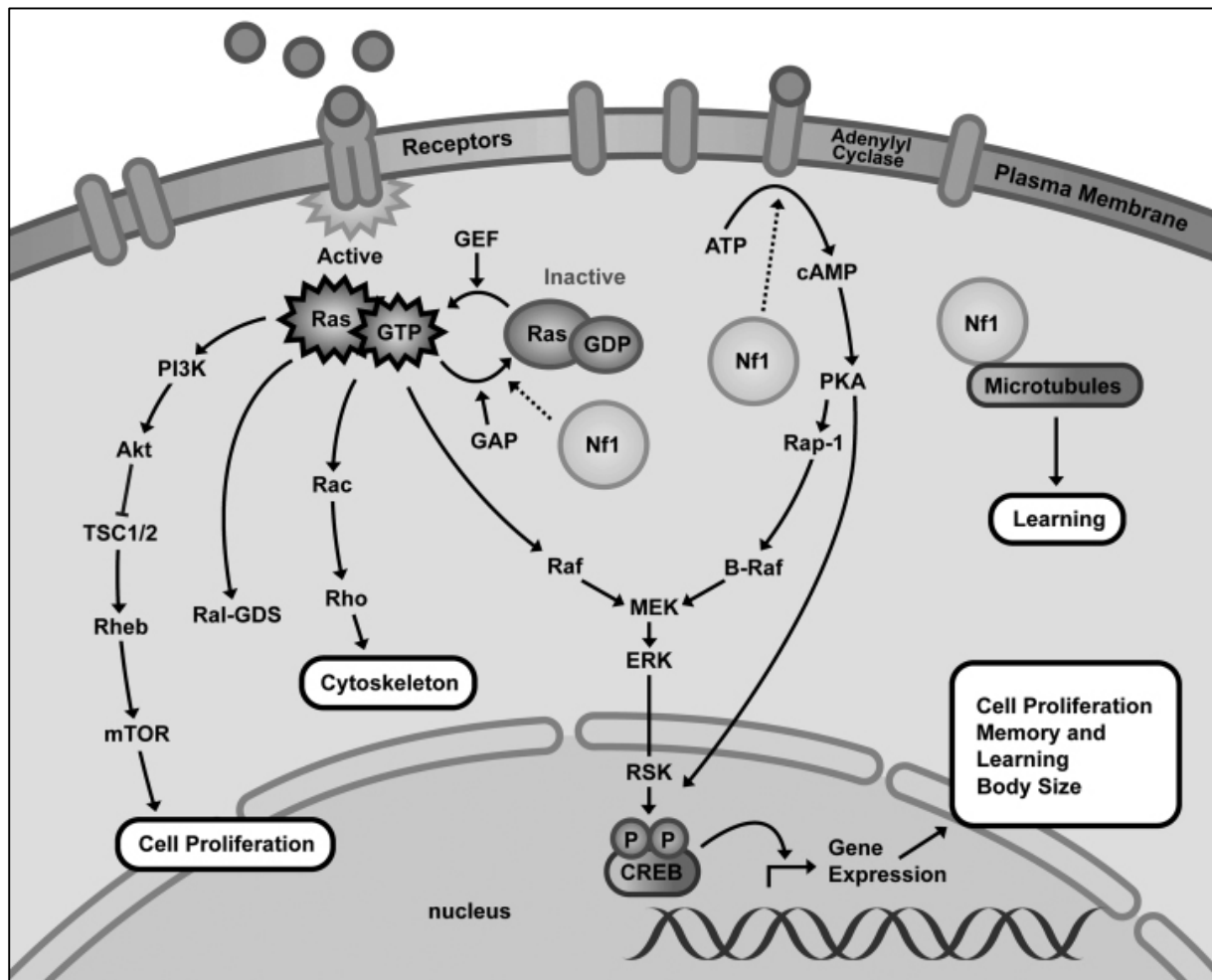


Figure C : Schéma résumant les différentes voies de signalisation régulées par la protéine NF1. (issu de Trovo-Marqui *et al.* , 2006)

Les cellules U20S et A549, quant à elles, se retrouvent donc bloquées en phase G2/M. Les deux lignées peuvent donc être stoppées soit juste après la phase S de réplication de l'ADN, soit durant la mitose. Il serait donc intéressant d'observer les cellules en microscopie ou d'analyser certains aspects moléculaires de la mitose, et rechercher des anomalies de mitoses dans ces cellules.

Une façon de tester la capacité de NUT à induire un avantage cellulaire est de transfecter stablement des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) pour leur faire exprimer NUT, et réaliser des essais classiques de prolifération cellulaire, de test de survie au nombre de passages, d'indépendance au sérum de croissance et de perte d'inhibition de contact en culture en milieu agar. Il est par la suite envisageable de tester la formation de tumeurs à partir de cellules MEFS exprimant NUT, par injection de ces MEFs au sein de souris immuno-déficientes.

Enfin, une méthode expérimentale nous permettant de mieux définir les fonctions et conséquences de NUT dans les lignées tumorales l'exprimant anormalement, est de comparer le transcriptome de cellules avec ou sans inhibition de la protéine NUT. Comme la répression de NUT dans les trois lignées induit un arrêt du cycle, il est fort probable que le transcriptome reflète des variations des voies de signalisation impliquées.

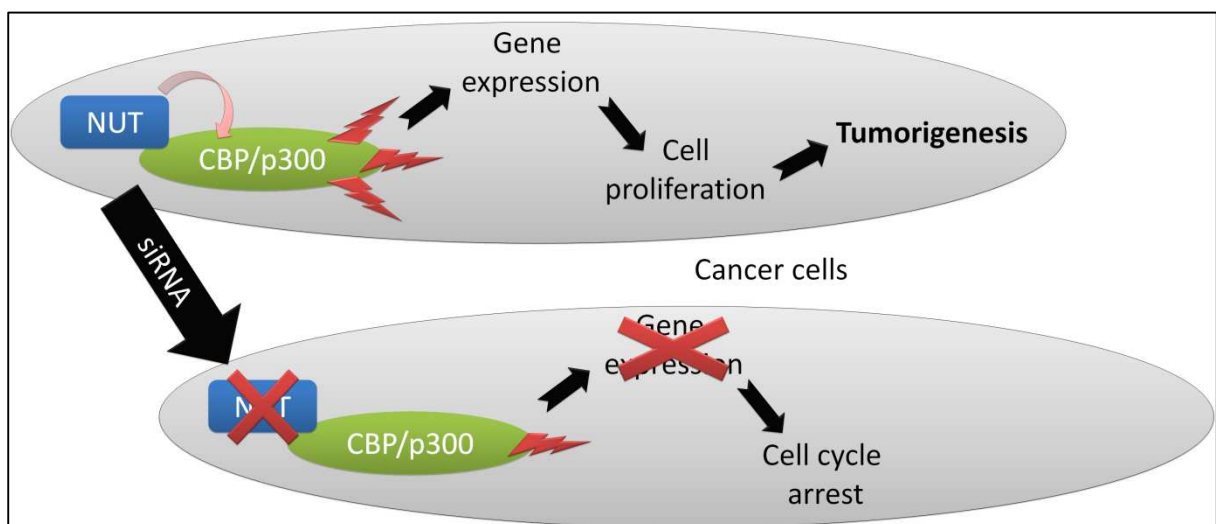


Figure D : Schéma résumant les conséquences possibles de l'expression illégitime de NUT et les conséquences de son inhibition

Afin de tenter de comprendre la cinétique des changements transcriptionnels, nous avons trouvé judicieux de réaliser l'étude du transcriptome des cellules U2OS à différents temps après transfection de siRNA NUT. Nous espérons ainsi détecter la première série de variations des transcrits reflétant directement la perte de NUT dans ces cellules, puis à l'aide des transcriptomes plus tardifs, déterminer les différentes voies de signalisation impliquées dans cet arrêt de prolifération des cellules. Il sera particulièrement intéressant de rechercher les possibles corrélations existantes entre ces voies et celles impliquant CBP/p300, mais également celles impliquant NF1 et les signalisations dépendantes de mTOR et de CREB.

III) Altérations épigénétiques et cancers NMC

L'expression illégitime de protéines de la spermatogenèse est donc une possibilité d'explication de la tumorigenèse de cellules somatiques. Cependant, comme nous avons pu le voir lors de l'introduction, une dérégulation du paysage épigénétique d'une cellule peut également influencer négativement sur son devenir, et participer aux différentes étapes de la tumorigenèse (Jones & Baylin, 2002).

IIIA) Cancer et méthylation de l'ADN

L'altération de la méthylation de l'ADN est l'exemple le mieux caractérisé à l'heure actuelle dans la formation des cancers. Les analyses globales du génome par immunoprécipitation de l'ADN méthylé ont permis de révéler une hypométhylation généralisée de l'ADN des cellules cancéreuses. Cette perte de méthylation peut lever la répression transcriptionnelle de certains oncogènes (Wilson *et al*, 2007), mais également

entraîner la perte de l'inactivation de régions d'hétérochromatine. Cette hypométhylation peut donc s'accompagner de la transcription de nombreux ARN non codants ou d'éléments transposables (Howard *et al*, 2008; Rodriguez *et al*, 2006). Il a été montré que ces deux événements peuvent fragiliser la chromatine, et permettre une amplification graduelle des altérations de l'ADN telles que les mutations ponctuelles ou les translocations chromosomiques. L'hypométhylation peut également entraîner une perte de l'empreinte parentale dans certaines tumeurs, avec comme conséquence une dérégulation de l'expression hautement contrôlée de ces gènes soumis à l'empreinte parental, associée à de nombreuses maladies chez l'homme (Rainier *et al*, 1993).

De plus, l'hypométhylation globale de l'ADN des cellules tumorales s'accompagne, de façon contradictoire, d'une hyperméthylation ponctuelle des îlots CpG (Jones & Baylin, 2007). Cette observation démontre que les altérations de la méthylation de l'ADN ne sont pas aléatoires et ne résultent pas uniquement des conséquences d'une dégénérescence progressive de la machinerie de méthylation. Il semble donc y avoir des mécanismes précis mis en place, apportant un avantage de prolifération et de transformation conduisant in fine, et en partenariat avec d'autres altérations cellulaires, à la formation des tumeurs. La répression transcriptionnelle par méthylation des îlots CpG touche ainsi des gènes de la réparation de l'ADN, du cycle cellulaire, de l'adhérence cellulaire, de l'apoptose et de l'angiogenèse, autant de protéines au pouvoir oncogénique impliqué dans le processus de développement des cancers.

Bien évidemment, la bonne intégrité de l'information épigénétique liée à la méthylation de l'ADN requiert une discussion parfaite entre les DNMTs, les processus de déméthylation et les protéines liant l'ADN méthylé. Mais une altération au niveau d'un de ces trois axes n'est pas la seule cause de tumorigenèse des cellules.

IIIB) Cancer et modifications post-traductionnelles des histones

Ainsi, de nombreux cancers présentent également des anomalies de l'information codée par les modifications post-traductionnelles des histones. Les principales altérations investiguées portent sur les erreurs de signalisation liées à la méthylation ou l'acétylation des résidus lysines des queues N-terminales des histones. Les avancées technologiques du séquençage à grande échelle à partir d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de cartographier le profil des modifications post-traductionnelles des histones au niveau des différentes régions de la chromatine dans les cancers. Certaines de ces marques semblent donc déposées de façon aberrante au niveau de la chromatine, perturbant ainsi grandement l'analyse de l'épigénome par la machinerie cellulaire.

Les cancers présentent une baisse globale de l'acétylation de l'histone H4 sur sa lysine K16 (Fraga *et al*, 2005). Cette marque est associée à une activation de la transcription et semble capable d'inhiber la formation de structure compacte des fibres de 30nm (Shogren-Knaak *et al*, 2006). Sa diminution est donc à même d'induire une répression transcriptionnelle, notamment des gènes suppresseurs de tumeurs. De manière plus générale, la chromatine des cellules tumorales est globalement hypoacétylée et une surexpression des HDACs semble en être la cause. En effet, les HDACs vont notamment conduire à un état hypoacétylé des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs, favorisant une répression de la transcription de gènes clés du contrôle de l'homéostasie cellulaire. L'inhibition des HDACs est donc un des nombreux espoirs thérapeutiques utilisables contre le cancer.

Ces aberrations des profils de modifications des histones concernent également les méthylations (Chi *et al*, 2010). Ainsi, les marques préférentielles de l'hétérochromatine, H3K9me3 et H3K27me3, sont très souvent surreprésentées dans les cancers (Nguyen *et al*, 2002; Valk-Lingbeek *et al*, 2004). Tout comme une hypo-acétylation des histones, ces marques de méthylation vont entraîner la perte de l'expression de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs. Mais certaines marques de méthylation induisant une conformation active de la chromatine peuvent également être soit réprimées, soit au contraire anormalement localisées, et induire l'expression de gènes normalement éteints. MLL, une des HMTs de H3K4, une marque d'activation de la transcription, est ainsi perturbée dans des translocations chromosomiques, conduisant à l'expression des gènes homéotiques HOX. Dans ce cas, le profil épigénétique s'orienterait donc vers une dédifférenciation des cellules, participant activement à la progression tumorale (Krivtsov & Armstrong, 2007).

IIIC) Epigénétique et progression tumorale

Il est difficile de comprendre la suite d'évènements amenant une cellule somatique à se transformer. Avant les premières notions épigénétiques, la génétique humaine des cancers supposait que la tumorigenèse émanait de la succession de mutations ponctuelles apportant à chaque étape un nouvel avantage à la cellule. Cependant il est peu probable qu'une cellule accumule assez rapidement toutes les mutations nécessaires. La découverte de l'épigénome redonne un nouveau souffle à cette théorie. En effet, si les premières mutations génétiques ont lieu sur des régulateurs du paysage épigénétique, les conséquences cellulaires sont immenses. Ceci peut entraîner une dérégulation complète de la transcription en faveur d'un programme de transformation cellulaire, une instabilité de la chromatine et de l'ADN apportant de nouvelles mutations génétiques, et la perte du contrôle de la destinée de la cellule affectée. Ainsi, en partenariat avec les mutations génétiques, les « épimutations » peuvent entraîner rapidement une cellule vers la dangereuse pente de la tumorigenèse.

Les causes des différentes aberrations épigénétiques découlent le plus souvent d'une dérégulation initiale de l'expression des protéines capables d'écrire et réécrire ce paysage épigénétique. Ainsi, la PKMT EZH2, responsable de la méthylation de H3K27, est surexprimée dans de nombreux cancers (Valk-Lingbeek *et al*, 2004). Une suractivité d'EZH2 entraînerait alors la répression de suppresseurs de tumeurs telles que p53, p27 et BRCA1 par exemple (Chi *et al*, 2010). Les translocations chromosomiques impliquent souvent des acteurs de l'information épigénétique. Par exemple, une translocation dans les leucémies myéloïdes aiguës fusionne deux HATs ensemble, CBP et MOZ, induisant une expression aberrante de gènes (Kitabayashi *et al*, 2001). La translocation t(11;16) (q23;p13.3) va quant à elle fusionner MLL à CBP. La transplantation de moelle osseuse affectée par cette translocation induit des leucémies myéloïdes chez un modèle souris (Lavau *et al*, 2000). La protéine CBP possède une activité d'acétylation, un bromodomaine et un domaine PHD alors que la protéine MLL possède une activité de méthylation, un domaine PHD et un domaine de liaison à l'ADN non méthylé. Il est donc facilement imaginable que les perturbations causées par cette protéine fusion vont être dévastatrices sur le bon épigénome de la cellule (Hess, 2004; Krivtsov & Armstrong, 2007). Enfin, les différentes enzymes catalysant les modifications post-traductionnelles des histones sont également capables, pour certaines, de modifier les

résidus de protéines non-histones. CBP/p300 est notamment responsable de l'acétylation de p53, induisant sa stabilisation, afin de permettre l'entrée en apoptose des cellules (Figure E, p205). TIP60, quant à elle, est capable d'acétyler la protéine ATM, ce qui régule positivement son activité kinase (Sun *et al*, 2005).

IIID) Dérégulation épigénétique de BRD4-NUT

Lors de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude d'une protéine fusion, BRD4-NUT, qui résume à elle seule un grand nombre des possibilités et conséquences qu'une dérégulation de l'épigénome peut avoir sur la tumorigenèse des cellules contenant cette translocation. En effet, la protéine fusion BRD4-NUT comporte une protéine à double bromodomaine, BRD4, capable d'interpréter l'acétylation de la chromatine, avec une protéine spécifique du testicule appartenant au groupe de gènes C/T, NUT. La dérégulation provoquée dans les cellules implique une dérégulation de l'activité de la HAT CBP/p300, et donc une acétylation aberrante de la chromatine et des défauts de transcription, avec l'incapacité des cellules d'activer la voie d'apoptose p53-dépendante (Fig. F, p208 et Chi *et al*, 2010).

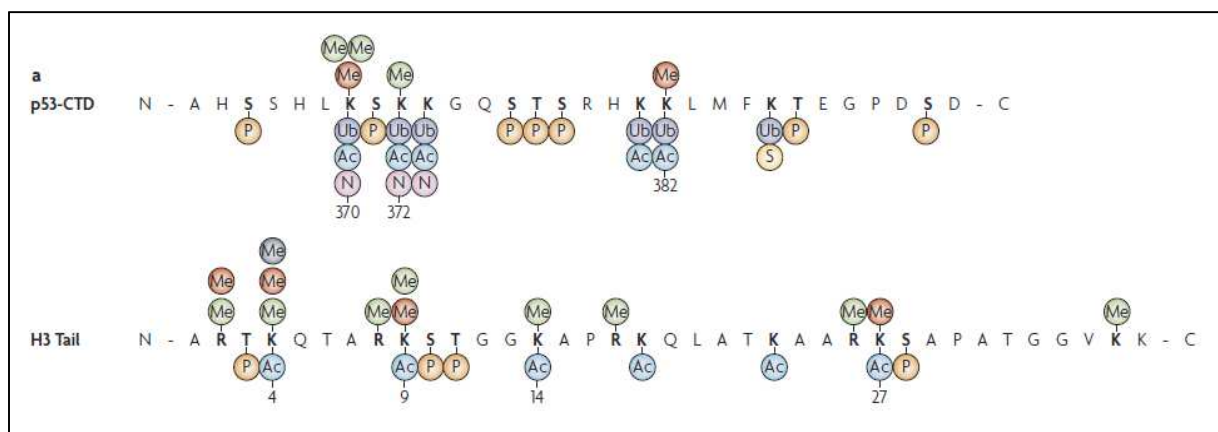


Figure E : Exemple de modification post-traductionnelles d'une protéine non-histones, p53, et de la queue N-terminale de l'histone H3. (issu de R J. Sims & D.Reinberg, 2008)

La translocation t(15 ;19) est retrouvée dans plusieurs cas de cancers extrêmement agressifs, chez des patients de tous âges (du nourrisson à l'adulte) et sans historique familial. Ces cancers ont été regroupés sous le terme de cancer NUT de la ligne médiane (NMC), car ils impliquent une translocation du gène NUT. Ce sont des tumeurs malignes d'origine épithéliale. Dans deux tiers des cas, la translocation de NUT a lieu au niveau du gène BRD4.

Dans l'ensemble de ces cancers, le gène NUT est entier, ou délété de ses six premiers acides aminés correspondant au court exon 1, et vient s'insérer systématiquement après le domaine ET de BRD4. Ainsi, la protéine NUT est complète, et les deux bromodomains et le domaine ET de BRD4 semblent nécessaires pour induire les cancers. De façon très intéressante, parmi le tiers restant des cancers NMC, le gène NUT se retrouve notamment transloqué sur un gène différent de BRD4, mais appartenant à la même famille, BRD3. Cette fois encore, la protéine NUT est entière et le double bromodomaine et le domaine ET de BRD3 sont présents. Ces cancers ont un très mauvais pronostic, avec une mortalité dans 100% des cas et dans un délai extrêmement court de six mois en moyenne après diagnostic.

Ces cancers ne répondent à aucun des traitements actuels classiques, ce qui explique leur progression rapide, et ils forment très rapidement de nombreuses métastases. Le nombre de cas déclaré de cancers NMC est relativement faible, mais il est fort possible que cela ne soit dû qu'à la méconnaissance de l'existence de ces cancers et leur difficulté de caractérisation. Une détection plus aisée grâce à un anticorps récemment produit permettra sans doute d'augmenter malheureusement le nombre de cas de cancers NMC observés chez les patients atteints de tumeur ne répondant pas aux traitements de thérapies classiques.

Alors que la plupart des cancers à translocations chromosomiques arborent une grande quantité de remodelage de leurs chromosomes, les cancers NMC ne présentent qu'une seule translocation, suffisante pour induire à elle seule la tumorigenèse des cellules. Ceci laisse supposer que les fonctions altérées de la protéine fusion BRD4-NUT sont responsables de cette transformation cellulaire.

Lorsque j'ai commencé mon projet de thèse, seules des données descriptives existaient sur les cancers BRD4-NUT. Nous nous sommes rendu compte que la protéine fusion forme des foci, et sur la base fonctionnelle des bromodomains de BRD4, nous avons pu démontrer que ces foci correspondent à des régions de chromatine hyperacétylée. Nous avons observé que ces foci arborent une grande diversité de marques d'acétylation des histones H3 et H4. Cette concentration anormale d'acétylation peut être la conséquence de deux phénomènes,

soit un remaniement des régions acétylées au sein de même foyers, soit une acétylation active au niveau de la chromatine. Nous avons pu montrer en transfectant BRD4-NUT dans des cellules exprimant stablement une histone H2A-GFP que les foci BRD4-NUT ne concentrent pas le signal GFP des nucléosomes (données non publiées). Ainsi, l'hyperacétylation des foci BRD4-NUT est un phénomène actif et nous avons pu montrer qu'il est dépendant de l'histone acétyltransférase CBP/p300. En effet, CBP et p300 colocalisent avec les foci et sont co-immunoprécipités avec les protéines BRD4-NUT et NUT. Un des dogmes de l'épigénétique veut qu'une chromatine acétylée est une chromatine ouverte apte à être transcrite. Cependant nous n'avons pas été capables de détecter une co-localisation de transcrits ARN naissants ayant incorporé du BrU.

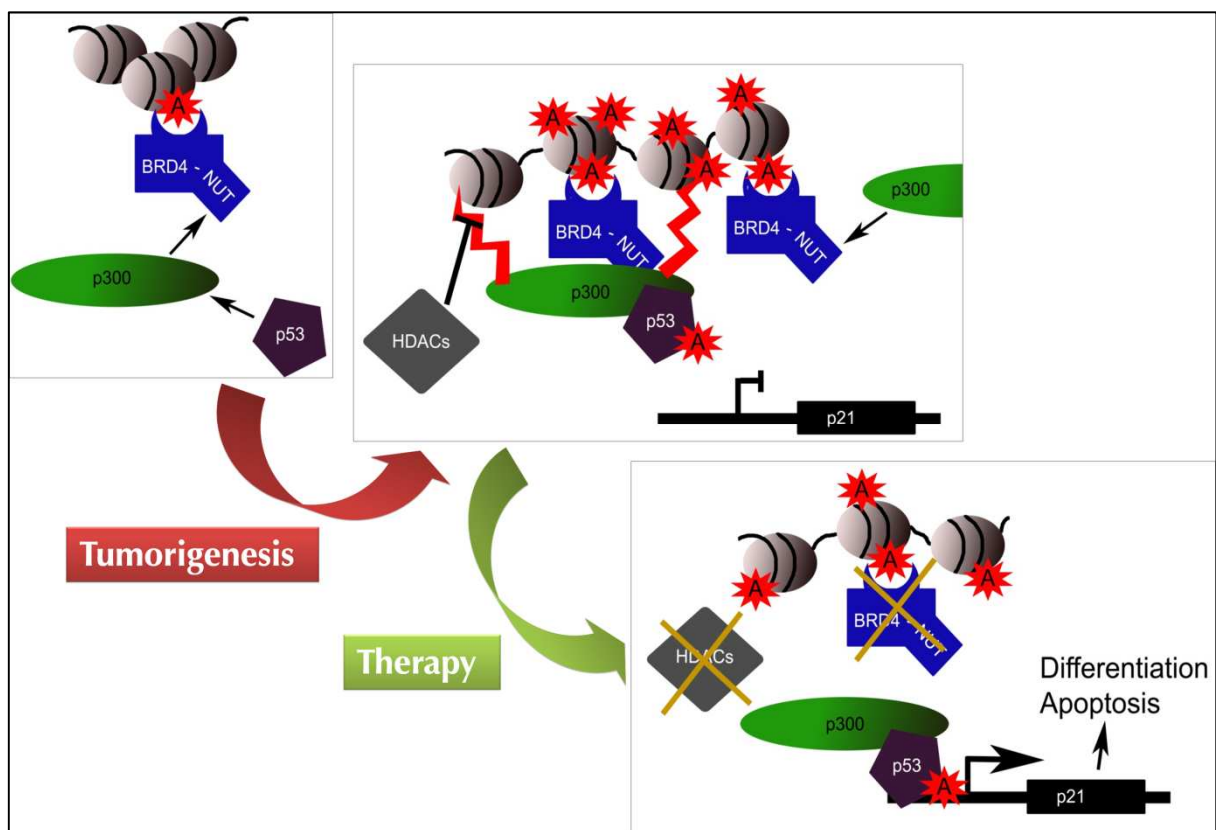


Figure F : Conséquences moléculaires de l'expression de la protéine fusion BRD4-NUT, et perspectives thérapeutiques envisageables contre la lutte de ces cancers.

La méthylation H3K4me3 qui est également une marque de la chromatine active n'est pas détectée au sein des foci. Nous n'avons également pas été en mesure de détecter une hausse de la transcription des gènes correspondants aux sites d'association à la chromatine de BRD4. En effet, il est possible que les foci acétylés BRD4-NUT correspondent aux régions préférentielles de fixation des bromodomains de BRD4. Ces différentes observations indiquent que les foci BRD4-NUT, bien qu'hyperacétylés, ne sont pas des régions significativement transcrites. Pourtant, le partenaire P-TEFb de BRD4 semble co-localiser avec ces foci BRD4-NUT (données de C.French). P-TEFb est un facteur nécessaire pour l'activation de la phase d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II, mais cette dernière n'est cependant pas concentrée au niveau des foci.

De manière fort intéressante, un autre exemple d'hyperacétylation non associée à une transcription active est la vague d'acétylation survenant au cours de la spermiogenèse. Dans ces deux cas, deux protéines sont présentes et pourraient donc jouer un rôle majeur, CBP/p300 et surtout la protéine NUT, de fonction encore inconnue. Au cours de la spermatogenèse, l'hyperacétylation est associée à une compaction de la chromatine. Ce phénomène semble impliquer la protéine spécifique du testicule BRDt, membre de la même famille que BRD4. Nous avons pu montrer que la protéine BRD4 est également capable de compacter la chromatine lorsqu'elle est surexprimée de manière ectopique dans des cellules hyperacétylées suite à un traitement avec la TSA, un inhibiteur de HDACs (données non publiées). Enfin, nous avons pu observer une compaction similaire avec la protéine BRD4-NUT exprimée dans des cellules COS, après traitement TSA, mais pas lors d'un traitement identique dans les cellules HCC2429, endogènes pour BRD4-NUT. Il se peut que la quantité de protéines soit prépondérante pour permettre la visualisation à l'échelle du noyau de cette compaction. En effet, la TSA entraîne dans les cellules HCC2429 une perte des foci par diffusion progressive de BRD4-NUT qui ne peut plus être suffisamment concentré, du fait d'un manque évident de quantité de protéines. Au contraire, dans les cellules COS avec une expression ectopique et beaucoup plus importante de BRD4-NUT, la TSA entraîne la propagation de ces foci acétylés, qui vont finir par fusionner et ne former plus qu'un grand ensemble de chromatine acétylée et extrêmement compactée (données non publiées).

A l'inverse, il est également possible que l'hyperacétylation des histones au niveau de foci entiers perturbe l'interaction entre l'octamère d'histones et l'ADN au sein des nucléosomes. Cela pourrait fragiliser l'ADN et entraîner des cassures de l'ADN, mais les cellules tumorales BRD4-NUT devraient alors porter de nombreuses autres translocations

résultant de cette fragilité. Il serait malgré tout intéressant de savoir si ces foci BRD4-NUT sont associés à des régions précises du génome, ou si leur localisation est aléatoire et ne résulte que d'une association aspécifique des bromodomains de BRD4 au niveau de régions hyperacétylées par le recrutement de CBP/p300. Une des façons de procéder serait de réaliser des immunoprécipitations de la chromatine à l'aide d'anticorps anti-NUT, et d'analyser les séquences génomiques associées. Malgré tout, si la formation des foci se fait aléatoirement, une telle technique réalisée sur une population de cellules ne permettrait pas de discriminer des variations fines de localisation.

Si la protéine BRD4-NUT n'est pas capable de modifier la transcription des gènes au niveau des foci formés, son action sur la tumorigenèse doit venir d'une autre dérégulation. Nous nous sommes aperçus que la protéine CBP/p300 était recrutée au niveau des foci via son interaction avec NUT. Comme NUT augmente son activité HAT, il se met en place un système original de propagation de part en part de l'acétylation des histones, permettant la formation des foci hyperacétylés. Nous avons pu montrer que les HDACs régulent cette propagation, car leur inhibition entraîne la propagation des foci, et in fine leur dissolution, par dilution des protéines BRD4-NUT et CBP/p300 au sein du noyau. Le traitement des cellules avec des inhibiteurs des HDACs, et donc la perte des foci, permet la différenciation des cellules et leur entrée en apoptose. Ainsi, la formation de ces foci est intimement corrélée à la tumorigenèse des cellules. De plus, malgré la formation de foci hyperacétylés, le niveau global d'acétylation des histones au sein des cellules diminue ou reste stable. Ces deux observations laissent supposer que l'élément majeur de la tumorigenèse de ces cellules est la dérégulation de l'activité HAT de CBP/p300. En effet, CBP/p300 semble être séquestrée au niveau de ces foci, et absente du reste du noyau. La protéine CBP/p300 est donc incapable d'aller acétyler correctement les autres régions du génome, et il est vraisemblable que son activité de co-activateur transcriptionnel soit également inhibée. Ainsi, les cellules BRD4-NUT doivent avoir une baisse de leur niveau de transcription, et des données confirment cette hypothèse. L'équipe de C.French a en effet démontré que la perte des foci par siRNA NUT entraîne une hausse globale de la transcription des cellules. Les foci BRD4-NUT inhibent donc la transcription, et les cellules semblent souffrir d'un manque de CBP/p300. L'observation de la co-localisation de P-TEFb au niveau des foci laisse imaginer que ce facteur manque également à la machinerie transcriptionnelle cellulaire ailleurs dans le noyau.

Ce cas de figure de séquestration de CBP/p300 n'est pas unique. En effet, la protéine virale E1A est également capable de séquestrer CBP/p300 avec comme conséquence la

répression transcriptionnelle des facteurs utilisant normalement la protéine comme co-activateur (Gallimore & Turnell, 2001). Enfin, certaines maladies formant des agrégats polyQ, comme la maladie de Huntington ou la maladie de Kennedy, séquestrent la protéine de par sa séquence C-terminale riche en glutamine, ce qui tend là encore à réprimer la transcription globale de la cellule (McCampbell *et al*, 2000).

La dérégulation de la transcription n'est cependant pas la seule altération des cellules BRD4-NUT. Une baisse globale de la transcription peut évidemment amener une baisse d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, et réprimer certaines voies de signalisation. Nous avons démontré que la protéine BRD4-NUT intervient également dans le phénomène de transformation cellulaire en inactivant la protéine p53. La protéine p53 est un facteur central du contrôle de la bonne condition d'une cellule. De façon surprenante, les cellules HCC2429 ont une protéine p53 intègre, car nous avons séquencé son gène, alors que la plupart des cancers arborent une mutation fonctionnelle ou une délétion du gène. Les cancers avec une protéine p53 sauvage mettent le plus souvent en place un système contournant les voies de signalisation de p53 : soit en empêchant son expression ou sa stabilisation, soit en inactivant la réponse cellulaire de p53 en aval. Curieusement, les cellules HCC2429 présentent une forte expression constitutive de p53. La protéine est donc stabilisée mais d'une certaine manière inactivée. Une façon de stabiliser la protéine p53 est d'empêcher son interaction avec MDM2, son principal régulateur, qui l'ubiquitine et l'envoie ainsi en dégradation. Cette stabilisation peut se faire via différentes modifications post-traductionnelles de p53 (Figure D). Plusieurs phosphorylations de p53 semblent capables de stabiliser et activer la protéine (Brooks & Gu, 2003). De plus, CBP/p300 est capable d'acétyler p53 au niveau de ses lysines 373 et 382, et cela permet également de stabiliser et activer la protéine (Brooks & Gu, 2003). Dans les cellules HCC2429, la forme acétylée et active de p53 n'est pas diffuse au sein du noyau comme peut l'être la protéine non acétylée, mais se localise au niveau des foci. Il est logique que la protéine p53 libre vienne être acétylée au niveau des foci séquestrant CBP/p300. Cependant, à notre plus grande surprise, les foci semblent également séquestrer la forme acétylée active de p53. Afin de nous affranchir d'une possible aspécificité de l'anticorps anti-p53Kac, nous avons exprimé de façon ectopique la protéine BRD4-NUT au sein de cellules mutées pour p53, les H1299. Dans cette lignée, l'anticorps anti-p53Kac ne détecte aucun antigène (données non publiées).

Les foci BRD4-NUT bloquent donc la signalisation d'apoptose en aval de l'activation de p53. En effet, dans ces cellules, malgré le fait que p53 non acétylée soit diffuse dans le

noyau, aucun des gènes cibles de la signalisation p53-dépendante n'est activé. Il serait intéressant de comprendre ce qui séquestre p53 dans les foci BRD4-NUT. La protéine CBP/p300 peut s'associer à la chromatine acétylée et à NUT en même temps, ce qui explique sans doute qu'elle se retrouve bloquée au niveau des foci. La protéine p53 est capable d'interagir spécifiquement avec CBP/p300, mais cette seule connexion permet difficilement d'expliquer sa séquestration. La protéine p53 est également capable de s'associer à l'ADN sur des séquences cibles retrouvées au niveau des promoteurs de certains gènes, mais il est peu vraisemblable que de tels gènes se retrouvent au niveau des foci, où leur transcription serait donc possible du fait de la présence de CBP/p300, P-TEFb et p53. Il existe sans doute d'autres protéines séquestrées au niveau des foci de chromatine acétylée créés par BRD4-NUT, permettant la formation de super-complexes inactifs. Cependant, le simple fait d'inhiber BRD4-NUT par siRNA NUT, soit par la perte des bromodomains de BRD4-NUT, soit par l'inhibition des HDACs, entraîne la différenciation ou l'apoptose des cellules. La protéine BRD4-NUT est donc nécessaire pour l'initiation de la formation des foci, mais également pour leur maintien une fois formés.

La différenciation et l'apoptose des cellules HCC2429 suite à la perte des foci est en fait la résultante de la réactivation des voies de signalisation de CBP/p300 et p53. En effet, ces protéines se retrouvent de nouveau libres dans le noyau. Sans que le niveau global de p53 augmente, le simple fait que p53Kac ne soit plus séquestrée permet l'activation de l'expression de ses gènes cibles, tels que p21, PUMA et GADD45. Nous avons pu démontrer que p53 et son co-activateur transcriptionnel CBP/p300 se relocalisent notamment au niveau du promoteur du gène p21 suite à l'inhibition des foci par siRNA NUT. De plus, nos collaborateurs ont montré que cette inactivation de BRD4-NUT entraîne un gain du niveau de la transcription globale des cellules, reflétant vraisemblablement la réactivation de CBP/p300. Nous n'avons pas eu accès à leurs données transcriptomiques durant ma thèse, mais il serait particulièrement intéressant d'analyser les différentes voies réactivées par le siRNA NUT. Ceci pourrait permettre de confirmer la réactivation dans son ensemble des voies p53 et CBP/p300-dépendantes, tout comme de mettre au jour d'autres voies possibles inactivées par la formation des foci BRD4-NUT. Ces dernières informations pourraient être confirmées par la recherche au sein des foci BRD4-NUT de certains des acteurs des voies impliquées.

Les découvertes des partenaires spécifiques de NUT apportent également d'autres possibilités de causes de formation des tumeurs. En effet, les protéines Stim1 et NF1, présentes dans le testicule où elles interagissent avec NUT, sont également exprimées dans le

reste des cellules somatiques. La protéine BRD4-NUT peut donc interagir avec et moduler leurs fonctions, comme NUT pourrait le faire au cours de la spermatogenèse. La protéine Stim1 est cependant uniquement retrouvée dans le cytoplasme, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Il apparaît donc difficile que BRD4-NUT puisse moduler son activité. Malgré cela, il est excitant de remarquer que Stim1 et son partenaire Orai1 sont particulièrement importants pour la migration et la formation des métastases (Yang *et al*, 2009). Une des caractéristiques des cancers NMC est leur grande capacité à produire des cellules métastatiques qui vont aller coloniser le reste des organes du patient. BRD4-NUT et Stim1 pourraient donc influencer favorablement sur la formation de ces métastases. La protéine NF1 quant à elle, semble capable de se localiser à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules (Vandenbroucke *et al*, 2004). Son rôle majeur est d'aller inactiver la protéine Ras, au niveau du cytoplasme, et de réguler ainsi négativement la prolifération cellulaire (Figure C). Par contre, les fonctions de NF1 au sein du noyau sont encore inconnues. Une mutation de NF1 est le plus souvent associée à la formation de cancers, suite à son incapacité de bloquer la voie Ras (Trovo-Marqui & Tajara, 2006). Il est particulièrement excitant d'imaginer que la protéine BRD4-NUT puisse séquestrer la protéine NF1 lors de ses trajets dans le noyau, comme elle le fait avec de nombreuses autres protéines. Cette séquestration empêcherait la répression de la voie de prolifération de Ras, connectée avec la voie mTOR et les voies de transcription CREB-dépendantes. Ainsi, malgré le fait que la transcription soit globalement diminuée dans les cellules BRD4-NUT, les voies de prolifération Ras-dépendantes constitutivement actives permettraient d'immortaliser les cellules et de participer ainsi à la tumorigenèse. Enfin, on peut imaginer qu'une fois exprimée dans les cellules somatiques, la protéine NUT puisse se découvrir de nouveaux partenaires auxquelles elle n'était pas confrontée dans les cellules germinales spermatides. Il serait intéressant de réaliser une co-immunoprécipitation de la protéine BRD4-NUT grâce à l'anticorps NUT, et d'analyser les différents partenaires en spectrométrie de masse. Il serait également intéressant de réaliser cette expérience au sein des différentes lignées cellulaires exprimant NUT sans impliquer une translocation. L'ensemble de ces données permettrait à coup sûr de mettre en évidence d'autres mécanismes de dérégulation de l'homéostasie cellulaire par la protéine NUT, participant à la tumorigenèse.

La translocation BRD4-NUT implique qu'un des allèles de BRD4 soit dérégulé. Cependant, il reste encore une copie intègre du gène, et une des autres conséquences possible de la protéine fusion BRD4-NUT pourrait être tout simplement une haplo-insuffisance de

BRD4. En effet, BRD4 est une protéine capitale pour la machinerie transcriptionnelle, car elle recrute au niveau de région de chromatine acétylée le facteur P-TEFb, permettant alors l'activation de la phase d'élongation de la transcription. Plusieurs études font apparaître que la protéine BRD4 puisse être le facteur déclenchant d'une transcription active, car l'ARN polymérase II et CBP/p300 sont retrouvées sur les promoteurs de gènes non transcrits jusqu'au recrutement du complexe BRD4/P-TEFb (Byun *et al*, 2009). Ainsi une seule copie valide de BRD4 pourrait nuire à la transcription générale des cellules en addition des possibles absences de CBP/p300 et P-TEFb séquestrées dans les foci BRD4-NUT. Enfin, BRD4 est indispensable à la division cellulaire. En effet, la seule délétion d'un des deux allèles de BRD4 entraîne des arrêts en mitose avec des problèmes de ségrégation des chromosomes (Nishiyama *et al*, 2006). Cependant, les cellules BRD4-NUT ne semblent pas présenter de troubles mitotiques malgré l'absence d'un allèle valide de BRD4.

Enfin, la région 5' du gène NUT semble être une région chromosomique fragile, apte à casser et à se transloquer ailleurs sur le génome. La région promotrice 5' de NUT est partagée avec la région promotrice d'un gène inversé, NOLA (ou Nop10). Ainsi, les translocations BRD4-NUT ou BRD3-NUT pourraient déstabiliser la régulation d'un des deux allèles codant pour NOLA, créant également une haplo-déficiencia de la protéine. NOLA est une protéine nucléolaire capitale pour la production de la sous unité 18S des ARN ribosomiaux (Reichow & Varani, 2008). Il serait tentant d'imaginer que la translocation BRD4-NUT inhibe la répression d'un des deux allèles de NOLA, ce qui aurait comme conséquence la diminution de la production des ARN ribosomiaux. Ainsi, une baisse effective du niveau de la traduction pourrait venir s'ajouter à la baisse transcriptionnelle due à la séquestration de CBP/p300. La détection d'une baisse de transcription du gène NOLA dans les cellules transloquées reste cependant difficile à obtenir. En effet, il sera délicat d'avoir un référentiel correct du niveau d'expression de NOLA ou du niveau de production de la sous-unité ARN 18S, et les études ne pourraient se faire qu'en comparaison de cellules similaires sans translocation, mais néanmoins différentes des HCC2429. Les analyses transcriptomiques réalisées par nos collaborateurs de l'équipe de C.French pourraient ainsi ne refléter qu'une partie de la baisse généralisée de la quantité de production de protéine au sein des cellules tumorales.

Les cancers NUT de la ligne médiane résultent donc d'une dérégulation épigénétique provoquée par la formation de foci hyperacétylés. Le facteur principal nécessaire à la tumorigenèse des cellules semble être l'addition de bromodomains à la protéine NUT, car les translocations BRD3 ou BRD4-NUT conduisent à la formation de ces foci. Malgré la grande

homologie entre BRD3 et BRD4, leurs fonctions peuvent être différentes, mais ne semblent pas capables de différencier les deux sous-classes de cancers NMC. De plus, la spécificité de reconnaissance des bromodomaines de BRD3 (H4K5ac H4K16a) et de BRD4 (H3K14ac, H4K5ac, H4K12ac) n'influe pas sur la formation des foci. Ces bromodomaines pourraient cependant moduler la localisation de ces foci, mais au vu des similarités entre les deux cancers, la localisation spécifique sur la chromatine de ces foci ne semble pas être un facteur déterminant de la tumorigenèse. Lors de la caractérisation des cancers NMC, l'équipe de French a également détecté des cancers impliquant une translocation NUT différente d'avec BRD3 ou BRD4. Il serait particulièrement intéressant de mieux caractériser ces autres sous-types de cancer afin de rechercher des partenaires à bromodomaines ou autres domaines de reconnaissances de marques épigénétiques.

La caractérisation et la détection systématique de ces cancers sont primordiales. En effet, ces cancers sont extrêmement agressifs, mais au vu des connaissances moléculaires que nous avons acquises au cours de ma thèse, ils présentent des facilités de diagnostic et de thérapies. Comme ils impliquent l'expression illégitime d'une protéine spécifique du testicule, ils peuvent être facilement diagnostiqués. En effet, la protéine NUT est un marqueur de choix pour détecter ces cancers, car elle n'est normalement jamais exprimée dans aucun autre tissu que le testicule. L'utilisation d'un anticorps anti-NUT sur des coupes de tissus après biopsie serait un outil efficace. La recherche systématique par transcriptomique ou par test Elisa de l'expression de NUT serait également un outil à grande échelle permettant de cribler les cancers NMC parmi d'autres. Enfin, une manière encore plus simple, mais sans doute moins précise, consisterait à rechercher des anticorps produits par le patient contre la protéine antigénique NUT. En effet, l'ensemble des protéines spécifiques du testicule n'est pas reconnu comme du soi par le système immunitaire, du fait de la barrière hémato/testiculaire, similaire à la barrière retrouvée dans le cerveau. Toute expression illégitime de facteurs spécifiquement testiculaires entraîne donc une réaction immunitaire contre du non-soi. Si des fractions de la protéine NUT sont excrétées en dehors des cellules tumorales, elles se retrouvent en contact avec le système immunitaire et entraîneront donc la production d'anticorps spécifiques. Enfin, une fois le cancer diagnostiqué, nous avons pu montrer que la répression de la formation des foci entraîne l'apoptose des cellules tumorales. L'équipe de C. French a confirmé cela en réalisant le premier traitement efficace d'un patient atteint d'un cancer NMC à l'aide du Vorinostat. Malheureusement, malgré une rémission significative de la tumeur, le patient n'a pas supporté les effets secondaires de cette drogue, et l'obligation

d'arrêter le traitement a conduit irrémédiablement à sa mort, provoquée par de nombreuses métastases. Il serait donc judicieux de tenter d'autres inhibiteurs de HDACs, ou comme nous l'avons vu dans l'introduction, coupler ces thérapies avec un régime alimentaire agissant en synergie vers la guérison. Il pourrait également être envisagé de tenter un ciblage des cellules tumorales afin d'éviter les effets secondaires néfastes de ces inhibiteurs sur le reste des cellules du corps humain. Ici encore, la spécificité de la protéine NUT pourrait être utilisée, du fait de son expression spécifique aux tissus tumoral et testiculaire.

IV) Conclusion

Malgré la grande agressivité des cancers NMC, les connaissances après ma thèse nous permettent d'espérer un diagnostic et un traitement efficace. Il est important de continuer à caractériser la protéine NUT et sa forme fusionnée BRD-NUT, et de l'utiliser comme marqueur et vecteur thérapeutique potentiels afin de lutter efficacement contre ces cancers. Enfin, la protéine NUT peut avoir une fonction majeure au cours de la spermatogenèse, et mes travaux de thèses ont permis de soulever un grand nombre de questions et d'hypothèses qu'il faudra maintenant confirmer ou infirmer. La poursuite du projet au laboratoire avec la génération de souris délétées du gène NUT apportera certainement une partie de ces réponses.

Annexes

Au cours de mon doctorat, j'ai participé à la réalisation de plusieurs revues scientifiques. Deux d'entre elles seront présentées dans ces annexes. La première résume les modifications épigénétiques ayant lieu au cours de la spermiogenèse, et la seconde résume nos connaissances actuelles sur l'enlèvement des histones au cours de la spermiogenèse.

Symposium: Genetic and epigenetic aspects of assisted reproduction

Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote

S Rousseaux, N Reynoird, E Escoffier, J Thevenon, C Caron, S Khochbin
INSERM, U823, Grenoble, F-38706 France and Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France

¹Correspondence: sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr

Abstract

During post-meiotic maturation, male germ cells undergo a formidable reorganization and condensation of their genome. During this phase most histones are globally acetylated and then replaced by sperm-specific basic proteins, named protamines, which compact the genome into a very specific structure within the sperm nucleus. Several studies suggest that this sperm-specific genome packaging structure conveys an important epigenetic message to the embryo. This paper reviews what is known about this fundamental, yet poorly understood, process, which involves not only global changes of the structure of the haploid genome, but also localized specific modifications of particular genomic regions, including pericentric heterochromatin and sex chromosomes. After fertilization, the male genome undergoes a drastic decondensation, and rapidly incorporates new histones. However, it remains different from the maternal genome, bearing specific epigenetic marks, especially in the pericentric heterochromatin region. The functional implications of male post-meiotic and post-fertilization genome reprogramming are not well known, but there is experimental evidence to show that it affects early embryonic development.

Keywords: chromatin, epigenetics, histone acetylation, one-cell zygote, pericentric heterochromatin, spermatogenesis

Introduction

Epigenetic information is conveyed by inherited modifications of chromatin, which define the 'epigenome' (Bernstein *et al.*, 2007). In somatic cells, it involves DNA methylation as well as modifications of the genome packaging structure, or chromatin. The basic unit of chromatin is the nucleosome, where a length of 146 base pairs (bp) of DNA is wrapped around an octamer of core histones, H2A, H2B, H3 and H4 (Wolffe, 1995). Well-studied modifications of this structure include histone covalent modifications (Berger, 2007; Kouzarides, 2007; Li *et al.*, 2007), the incorporation of histone variants (Kamakaka and Biggins, 2005; Sarma and Reinberg, 2005), the recruitment of chromatin remodelling factors (Eberharter *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006; Choudhary and Varga-Weisz, 2007; Hogan and Varga-Weisz, 2007) and the expression of non-coding RNA (Bernstein and

Allis, 2005; Grewal and Elgin, 2007; Zaratiegui *et al.*, 2007). In somatic cells, some histone modifications, including H3 and H4 lysine acetylation, and H3 lysine 4 methylation are associated with an open/accessible chromatin state, whereas the so-called 'repressive' marks are H3 methylation on lysine 9 and 27, and H4 methylation on its lysine 20.

Epigenetic information is involved in the regulation of gene expression, and, directly or indirectly, in numerous cellular processes, including cell differentiation and proliferation, and has been found deregulated in several constitutive and acquired diseases, including imprinting disorders and cancers (Feinberg, 2007; Jones and Baylin, 2007).

In the 1980s, pronuclei transfer experiments showing that zygotes with either two male or two female haploid pronuclei could not develop, demonstrated that the male and female haploid genomes, although each contributing half of the genetic information, were not equivalent (McGrath and Solter, 1984). This observation has led to the discovery of the so-called imprinted genes, which are monoallelically expressed, either from the maternal or from the paternal allele (Cattanach and Kirk, 1985). It is now known that these genes, which are crucial for early embryo development, are grouped in clusters, and that the allelic differences in their expression correspond to differential DNA methylation in the *cis*-regulatory control regions, named imprint control regions (ICR) between the paternal and the maternal chromosomes (Reik and Walter, 1998, 2001; Mann, 2001; Reik *et al.*, 2001, 2003; Kierszenbaum, 2002; Li, 2002). These allelic differences in the paternal and maternal DNA methylation profiles of the ICR are erased early during gametogenesis (in primordial germ cells), and then acquired in a sex-specific manner during oogenesis and spermatogenesis (for review see Reik *et al.*, 2001; Delaval and Feil, 2004; Allegrucci *et al.*, 2005; Reik, 2007; Schaefer *et al.*, 2007). Hence, along with its genome, each gamete brings sex-specific epigenetic information, which is crucial for early development of the embryo. In addition to the sex-specific DNA methylation reprogramming mentioned above, it has also been established that the male genome is globally restructured and reorganized during spermatogenesis.

The composition of the epigenome in the mature sperm cell is the result of a major restructuring of the genome, which takes place in the late phases of spermatogenesis, in post-meiotic maturing spermatids. The molecular mechanisms underlying this genome reorganization are just starting to be understood. The resulting sperm-specific genome structure could be crucial for the epigenetic information conveyed to the embryo, but this structure is still poorly known.

Another important global chromatin restructuring takes place immediately after the fusion of the sperm and the egg. It involves male genome decompaction, partly mirroring its post-meiotic compaction, followed by a series of chromatin changes of both maternal and paternal pronuclei, finally leading to their fusion and the first embryonic mitotic division.

The present review will focus on chromatin transitions affecting the genome, in male maturing germinal cells as well as in the early 1-cell embryo. Although at these stages the genome is globally remodelled, several studies have recently revealed that specific genomic regions, including the sex chromosomes and pericentric heterochromatin are differentially modified and are sites of specific chromatin reorganization.

Chromatin reorganization during male gametogenesis

One of the most dramatic chromatin remodelling and genome reorganizations ever observed takes place during the post-meiotic maturation of male germ cells. After meiosis, early male haploid cells, or spermatids, inherit a somatic-like chromatin-based genome organization. During the following stages of their maturation, histones are removed and replaced by testis-specific basic proteins, namely transition proteins and then protamines,

the latter being responsible for the very tight compaction of the sperm genome. Spermiogenesis is also associated with the extinction of gene transcription. Indeed, transcription is active in spermatogonia, pachytene spermatocytes and round spermatids. It is thought to stop shortly after in elongating spermatids (Sassone-Corsi, 2002).

Genome-wide nuclear protein transitions in condensing spermatids

During spermatid differentiation, between histone removal and the incorporation of protamines, transition proteins represent 90% of the basic proteins associated with chromatin (for reviews see Poccia, 1986; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998; Meistrich *et al.*, 2003).

In humans, transition protein 1 (TP1) appears in step 3 to 4 spermatids, whereas TP2 is present in step 1 to 5 spermatids (Steger *et al.*, 1998). Although their time of appearance during spermiogenesis suggests that they actively contribute to the process of post-meiotic sperm nuclear packaging, the molecular basis of their action has not yet been unravelled.

Experimental disruption of the major transition nuclear protein (TNP) genes, *TNP1* (Yu *et al.* 2000) or *TNP2* (Adham *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001) produces subfertile knockout mice, with an abnormal processing of protamine 2 (which is normally produced from a large precursor, subsequently undergoing a proteolytic maturation), and insufficient nuclear condensation. The absence of one *TNP* gene seems to affect the displacement of the other *TNP* gene, leading to its abnormal retention (Zhao *et al.*, 2004). By examining the effect of the nine possible combinations of heterozygous and homozygous *TNP1* and/or *TNP2* null mutations, a general decrease in normal morphology, motility and chromatin condensation has been observed, as well as in protamine 2 processing, with decreasing global levels of transition proteins in epididymal spermatozoa from mutant mice, suggesting some functional redundancy between *TNP1* and *TNP2* (Shirley *et al.*, 2004). Moreover, the fact that spermatozoa from double heterozygous males (*TNP1*^{-/+}; *TNP2*^{-/+}) show fewer abnormalities than spermatozoa from males homozygous for a single *TNP*-null mutation suggests that the redundancy of TNP function is only partial. Interestingly, following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatids from mice lacking both *TNP* genes, the success rate of fertilization was one third of that of wild-type mice, and fewer pre-implantation embryos developed to the morula/blastocyst stage (Shirley *et al.*, 2004).

The molecular mechanisms driving the incorporation and removal of transition proteins are unknown. Recent results suggest that chaperones are involved. Indeed, the HSP70.2 protein, known to play a critical role in the completion of meiosis during male germ cell differentiation, acquires new functions in post-meiotic cells, where it becomes a chaperone of TP1 and TP2 (Govin *et al.*, 2006a).

In the final stages of spermatid condensation, the protamines become the predominant nuclear proteins. Protamines are highly basic proteins of low molecular mass that are

associated with nuclear DNA in the spermatozoa. They are responsible for the DNA being packaged in a very compact manner (Wouters-Tyrou *et al.* 1998; Lewis *et al.*, 2003b). In several mammals, including humans and mice, two protamines, Prm1 and Prm2, are present in sperm nuclei. It has been shown that both protamines are essential for normal sperm function, and that haploinsufficiency caused by a targeted disruption of one allele of either Prm1 or Prm2 results in a reduced amount of the respective protein, an abnormal processing of Prm2 and prevents genetic transmission of both mutant and wild-type alleles (Cho *et al.*, 2001). Using single-cell DNA electrophoresis (comet assay) and ultrastructural analysis these workers have further demonstrated a direct correlation between haploinsufficiency of Prm2 and spermatozoa with damaged DNA and a reduced compaction of chromatin (Cho *et al.*, 2003). The use of Prm2-deficient sperm for ICSI of metaphase II mouse eggs showed that, although most eggs were reactivated, only a few were able to develop to the blastocyst stage. According to these results, Prm2 would be essential for maintaining the integrity of sperm chromatin, and early embryo development (Cho *et al.*, 2003).

The phosphorylation of protamines has also been shown to be essential. Indeed, mutation of the calmodulin-dependent protein kinase Camk4, which phosphorylates Prm2, results in defective spermiogenesis and male sterility (Wu and Means, 2000; Wu *et al.*, 2000).

The structure of nucleoprotamine, predominant in the mature sperm nucleus, is significantly different from that of nucleosomes. Essentially, complete neutralization of DNA negative charge by basic amino acids, present in fish as well as mammalian protamines, results in a very tight packaging of the DNA (Balhorn, 1982; Risley, 1990; Raukas and Mikelsaar 1999).

Although the global transitions in nuclear proteins mentioned above have been known for some time, the molecular basis of the driving elements controlling them is only starting to be deciphered.

Before global histone removal, two specific kinds of events affecting the nucleosome have been described: the incorporation of histone variants (Trostle-Weige, 1984; Meistrich *et al.*, 1985; Grimes, 1986; Nickel *et al.*, 1987; De Lucia *et al.*, 1994; Churikov *et al.*, 2004) and an increased global acetylation of the core histone tails (Grimes *et al.*, 1975; Christensen and Dixon, 1982; Oliva and Mezquita, 1982; Christensen *et al.*, 1984; Grimes and Henderson, 1984; Meistrich *et al.*, 1992; Hazzouri *et al.*, 2000a; Sonnack *et al.*, 2002; Faure *et al.*, 2003;). It has been postulated that these modifications could result in a looser nucleosomal structure, and facilitate the recruitment of factors and complexes further involved in histone replacement. (For reviews, see Govin *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005).

More recently, specific functions have been described for some histone variants and histone modifications, which are leading to a better understanding of epigenomic changes during male gametogenesis.

Role of histone variants in remodelling and compartmentalizing the meiotic and post-meiotic genome during male gametogenesis

Histone variants are non-allelic forms of the conventional histones (Malik and Henikoff, 2003). Several histone variants replace canonical histones during spermatogenesis, many of them are incorporated during meiosis, and the function of some of them is beginning to be understood (for reviews see Lewis *et al.*, 2003a; Govin *et al.*, 2004; Rousseaux *et al.*, 2005). However, the functions of several testis-specific histone variants, such as TH2A, TH2B, TH3 (in rat) or H3t (in the human) have not been defined (Rao *et al.*, 1983; Trostle-Weige *et al.*, 1984; Meistrich *et al.*, 1985; van Roijen *et al.*, 1998).

Among the linker histone variants (Khochbin, 2001), the main known testis-specific variant is H1t, which is incorporated during meiosis, and is likely to act post-meiotically. Interestingly, H1t^{-/-} mice are fertile (Drabent *et al.*, 2000, 2003; Lin *et al.*, 2000). Another linker histone variant, HILS1 (H1-like protein in spermatids), was identified in mouse and human testis (Iguchi *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Its expression profile suggests that it could replace H1t in elongating condensing spermatids and be involved in reorganizing chromatin in these cells. Another variant, H1t2, is expressed late during spermatogenesis (Martianov *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). Its polar nuclear localization in elongating and condensing spermatids, as well as the phenotype of the mutant mice in which this gene was inactivated, suggests a major role for this variant during post-meiotic chromatin remodelling.

Several variants of the core histone H2A are involved in the formation of a separate chromatin domain called the sex body, which characterizes the mammalian male meiotic prophase (Handel, 2004). Within this specific DAPI 4,6-diamidino-2-phenylindole-dense structure, the X and Y chromosomes are partially synapsed and transcriptionally silenced, a process termed meiotic sex-chromosome inactivation or MSCI (Turner, 2007). The variants, which have been found associated with MSCI, include macroH2A.2 (Motzkus *et al.*, 1999; HoyerFender *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2001), H2AX (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003), H3.3 (van der Heijden *et al.*, 2007), and H2AZ (Greaves *et al.*, 2006). According to these studies, MSCI is initiated by the asynapsis of the non-homologous regions of the sex chromosomes, and triggered by phosphorylation of H2AX (Turner *et al.*, 2004, 2005). There is now recent evidence that some degree of transcriptional repression of the sex chromosomes is retained in post-meiotic cells as a direct consequence of MSCI (Turner *et al.*, 2006). In round spermatids, repressive chromatin marks, such as histone H3 dimethylated on lysine 9 and heterochromatin protein Hp1beta/CBX1, have been shown to co-localize, not only with the round chromocentre (corresponding to the pericentric heterochromatin region) but also with the nearby X or Y DAPI-dense domain (Turner *et al.*, 2006). Moreover, the histone variant H2A.Z, which was shown to be enriched in the sex chromosome domain in post-meiotic cells, could also have a role in maintaining the sex chromosomes in a repressed state (Greaves *et al.*, 2006). Recently, de Boer and collaborators have demonstrated that nucleosomes are massively replaced shortly after the induction of MSCI, resulting in the exclusive incorporation of the H3.3

variant (van der Heijden *et al.*, 2007), which, interestingly, was previously known as an 'active' chromatin mark. This process is accompanied by loss of all H3 modifications followed by reacquisition of a specific set of H3 modifications in the post-meiotic sex chromosome domain. Together, these studies suggest that the sex chromosomes define a specific chromatin domain in the male meiotic and post-meiotic germinal cells, which is functionally differentiated by the recruitment of specific histone variants and modifications.

Recent work suggests that core histone variants could also be incorporated in specific genomic regions of late spermatids, despite the removal of most core histones from the rest of the genome. Indeed, three new core histone variants, homologous to H2A and H2B, have been identified recently and named H2AL1, H2AL2 and H2BL1, respectively (Govin *et al.*, 2007). Interestingly, these new histone variants are incorporated very late during spermiogenesis, when most other histones are removed, and remain present in the mature spermatozoa. They are part of new chromatin structures, which associate with pericentric heterochromatin regions in late condensing spermatids, and could therefore be involved in specifically reprogramming these regions during male gametogenesis (see below).

Genome-wide histone acetylation and initiation of pericentric heterochromatin reprogramming

A massive increase in global histone acetylation, which mostly affects H4 and H2A, takes place in elongating spermatids in many species (Oliva and Mezquita, 1982; Meistrich *et al.*, 1992), including mice and humans (Hazzouri *et al.*, 2000a; Faure *et al.*, 2003).

In addition to this global increase in histone acetylation, phosphorylation of H4 serine 1 (S1), could also be an important event involved in genome post-meiotic reprogramming (Krishnamoorthy *et al.*, 2006). Recently Kimmins and co-workers observed that histone H3 lysine 4 mono-, di- and trimethylation is finely regulated during mammalian spermatogenesis and suggested that this mark, which interacts with transcriptional regulatory complexes, could be involved in the epigenetic control of the specific transcriptional programme governing male germ cell differentiation (Godmann *et al.*, 2007). The analysis of the other histone modifications did not highlight any other remarkable event (M Godmann, unpublished).

In addition, the authors and other researchers observed that the genome-wide histone H4 hyperacetylation, which occurs at the beginning of spermatid elongation, is followed by a dramatic reprogramming of the pericentric heterochromatin (van der Heijden *et al.*, 2006; Govin *et al.*, 2007).

In interphase somatic cells, pericentric heterochromatin from several chromosomes tend to cluster and form the so-called chromocentres, which are DAPI-dense regions, and are particularly visible in mouse cells (Haaf and Schmid, 1991; Guenatri *et al.*, 2004). Investigations on the molecular nature of heterochromatin at chromocentres have shown that histone methyltransferases homologous to Su(var)3-9 specifically methylate lysine 9 of histone H3 at chromocentres (Peters *et*

al., 2001) and that the heterochromatin proteins HP1 alpha and beta bind these modified histone tails (Muchardt *et al.*, 2002; Cheutin *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2003; Maison and Almouzni, 2004).

After the completion of meiosis, in early round spermatids, the pericentric heterochromatin regions become grouped and organized in a unique round chromocentre. Investigations show that, in these cells, the chromocentre exhibits all the expected characteristics of somatic-cell heterochromatin, including association with HP1 (heterochromatin protein 1) proteins and enrichment in H3 trimethylated in lysine 9 (H3K9me). Interestingly, in elongating spermatids, it has been shown that the occurrence of the global histone H4 hyperacetylation corresponds to a decompaction of this unique chromocentre, followed by a complete reprogramming of these pericentric regions. Initially devoid of acetylated histones, these regions gain histone H4 acetylation, and loose the associated HP1 proteins. However, despite the spreading of histone acetylation, H3K9me remains associated with these pericentric regions. A detailed analysis shows that, at this stage, pericentric heterochromatin is composed of a mixture of nucleosomes individually bearing, either the usual H3K9me mark or acetylated H4, but not both. Moreover, as the elongation/condensation of the spermatids proceeds, histone acetylation persists in the pericentric regions, while it disappears from the other regions, reflecting global histone removal in the latter (Govin *et al.*, 2007).

These data suggest that histone acetylation is associated not only with global histone replacement by transition proteins (in most of the genome) but also with constitutive heterochromatin reprogramming.

Genome-wide compaction of acetylated chromatin by a testis-expressed double bromodomain-containing protein

In order to establish a molecular link between histone acetylation and their replacement, Pivot-Pajot *et al.* (2003) looked for factors potentially capable of reading and functionally interpreting these specific histone acetylation marks, i.e. factors bearing the acetyl-lysine binding module, the bromodomain. Testis-specific bromodomain (BRDT) is a double bromodomain-containing protein expressed in testis. It is present during the critical post-meiotic stages, and is a very interesting possible candidate factor.

These investigations showed that BRDT has the extraordinary capacity of compacting chromatin, *in vivo* and *in vitro*, in a strictly acetylation-dependent manner (Pivot-Pajot *et al.*, 2003). This function is highly dependent on the integrity of its bromodomains and their ability to bind acetylated histone H4. It was further shown that BRDT colocalized very precisely with acetylated genomic regions throughout spermiogenesis (Govin *et al.*, 2006b). These results suggested that BRDT could indeed be involved in an early global compaction of acetylated chromatin occurring in condensing spermatids. Accordingly, recent observations showed that male mice bearing a homozygous deletion of the first bromodomain of BRDT are infertile, with signs of defective post-meiotic genome packaging (Shang, 2007; S Rousseaux, unpublished).

Pericentric heterochromatin regions remain associated with specific nucleosomes and nucleosome-like structures in condensing spermatids

In condensing spermatids, the persistence of nucleosomes associated with constitutive heterochromatin, despite their replacement in all other regions, was observed (van der Heijden *et al.*, 2006; Govin *et al.*, 2007). This suggested that specific chromatin-associated structures and proteins could differentiate these regions from the rest of the genome. A digestion of condensing spermatid nuclei by micrococcal nuclease (MNase) confirmed this hypothesis, and identified two MNase-resistant structures in these cells. One was identical to the somatic nucleosome and one was of a smaller size and contained new testis-specific histone H2A and H2B variants that have been named H2AL1, H2AL2, and H2BL1 (Govin *et al.*, 2007). More detailed investigations showed that TH2B, a previously identified testis-specific H2B variant of unknown function (Rao *et al.*, 1983; Meistrich *et al.*, 1985; van Rooijen *et al.*, 1998), could provide a platform for the structural transitions accompanying the incorporation of these new histone variants (Govin *et al.*, 2007). Both structures, as well as the new histone variants, were specifically associated with pericentric heterochromatin in late condensing spermatids as well as in mature spermatozoa. The new nucleosome-like structures that were associated with pericentric heterochromatin could convey information important for embryo development.

Working model for post-meiotic chromatin remodelling

After the completion of meiosis, the induction of a massive and genome-wide histone hyperacetylation triggers the reprogramming process. This is associated with histone replacement in most of the genome and a specific reprogramming of pericentric heterochromatin (**Figure 1**).

In elongating spermatids, histone acetylation would signal their removal and degradation. BRDT would link histone acetylation to: (i) a first step of genome compaction and massive histone removal in most of the genome; and (ii) to nucleosome survival and histone exchange, with incorporation of new histone variants, in pericentric regions.

The assembly of these structures allows regional differentiation of the male genome to be established in mature spermatozoa, mediating the transmission of yet unknown male-specific epigenetic information to the embryo. All these events should somehow be linked together. Future efforts should focus on establishing these links.

The sperm epigenome

In an effort to understand the global composition of the sperm nucleus, the basic unit of the nucleoprotamine structure was elucidated (Brewer *et al.*, 1999, 2002; Balhorn, 1982, 1989; Fita *et al.*, 1983), and it has been proposed that it is organized into loop domains attached at their bases to a nuclear matrix (Ward and Coffey, 1990, 1991; Ward, 1994; Ward and Zalensky, 1996; Yabuta *et al.*, 2006).

The relationship between function and nuclear organization has been well established in somatic cells (Cremer and Cremer, 2001; Fraser and Bickmore, 2007; Misteli, 2007). Several studies, describing the position of chromosomes and subchromosomal regions within the sperm nucleus (Zalensky and Zalenskaya, 2007), have established that, in the sperm cell, individual chromosomes define distinct territories (Haaf and Ward, 1995; Zalensky *et al.*, 1995), which are not randomly positioned relative to one another (Luetjens *et al.*, 1999; Hazzouri *et al.*, 2000b), and that centromeres are grouped well inside the nuclear volume whereas telomeres are localized at the nuclear periphery, where they interact in dimers and tetramers (Meyer-Ficca *et al.*, 1998; Hazzouri *et al.*, 2000b; Zalenskaya and Zalensky, 2002). A refined model for the organization of the nucleoprotamine fibre within the chromosome and subchromosomal domains has now been proposed (Mudrak *et al.*, 2005). The functional significance of this specific sperm nuclear architecture remains to be clearly defined.

Although the main component of sperm chromatin is the nucleoprotamine unit, the work described above, as well as other studies, suggest that the sperm nucleus structure is actually more heterogeneous and complex than initially thought. One hypothesis is that different chromatin structures could be associated with specific regions of the genome, defining a specific epigenetic code, which could be transmitted to the embryo, and be important for its development.

Several mammalian species retain a dual nucleohistone/nucleoprotamine organization within their sperm chromatin, including humans (Gatewood *et al.*, 1987) and mice (Pittoggi *et al.*, 1999). The human sperm nucleus retains about 15% of the usual haploid histone complement and also contains a heterogeneous mixture of protamines (Balhorn *et al.*, 1987) and other basic proteins (Tanphaichitr *et al.*, 1978; Ammer *et al.*, 1986; Gusse *et al.*, 1986). Gatewood and collaborators have demonstrated that the nucleohistone and nucleoprotamine portions of human sperm chromatin form discrete structures, which are, at least partly, sequence specific (Gatewood *et al.*, 1987). They have also purified the four core histones from mature human sperm chromatin including H2A (and its variants H2A.X and H2A.Z), H4 (in its unacetylated and acetylated forms), H3.1 and H3.3, and H2B (Gatewood *et al.*, 1990). Whether the nucleohistone/nucleoprotamine dual structure corresponds to a specific differential arrangement of chromatin regions according to potential functions remains to be investigated. A few studies argue in favour of this hypothesis, which suggests that regions of the genome that contain genes that are either differentially expressed during spermatogenesis, such as the cluster *PRM1-PRM2-TNP2* (Kramer *et al.*, 2000; Martins and Krawetz, 2007), or that are expressed very early during embryogenesis are histone-enriched (Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Wykes and Krawetz, 2003). Imprinted genes and some repetitive DNA regions could also be differentially marked (Wykes and Krawetz, 2003).

In addition, a human testis/sperm specific histone H2B, hTSH2B, was identified (Zalensky *et al.*, 2002), which was found located at the basal nuclear area of a subpopulation (20%) of mature sperm. Interestingly this histone variant associates with a telomere-binding activity, suggesting

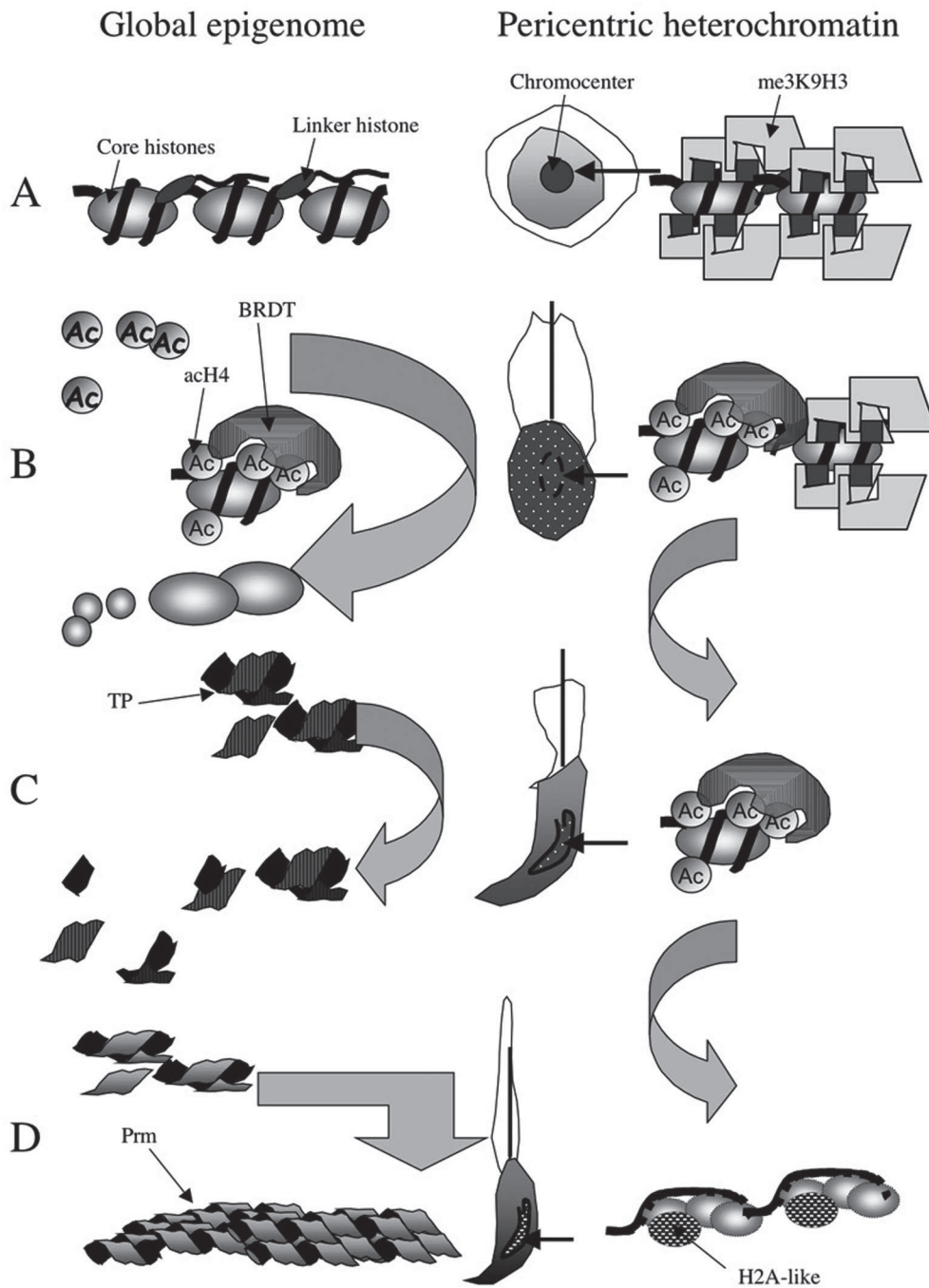


Figure 1. Working model for post-meiotic chromatin remodelling. (A) Round spermatid nucleus with a somatic-like nucleosomal structure: DNA (black line) is wrapped around octamers of core histones (ovals) and internucleosomal DNA is associated with linker histones. Pericentric heterochromatin form a round chromocentre and is enriched in lysine 9 trimethylated histone 3 (me3K9H3; parallelic shapes). (B) Early elongating spermatids: histones become globally hyperacetylated (round light circle), bromodomain, testis-specific (BRDT) associates with acetylated (Ac) histones (H) and compacts the genome, while most histones are removed. In pericentric heterochromatin histones remain and nucleosomes with acetylated histones co-exist with nucleosomes bearing me3K9H3. (C) In condensing spermatids, most histones have been removed and replaced by transition proteins (TP). Heterochromatin remains enriched with acetylated histones and bound BRDT. (D) In late-condensing spermatids and sperm cells, most of the genome is associated with protamines (Prm), but pericentric heterochromatin remains associated with testis-specific histones (H2A-like), forming a small nucleosome-like structure.

a possible role during post-fertilization sperm nucleus decondensation (Zalenskaya and Zalensky, 2002).

Moreover, the recently identified mouse testis-specific H2A variants, H2A-L1 and H2A-L2, appear in late condensing spermatids, where they specifically mark pericentric heterochromatin regions, and remain in mature epididymal sperm (Govin *et al.*, 2007). These variants could also be involved in directing the fate of these regions after fertilization. Hence, the presence of genomic islands that maintain a somatic-like chromatin structure despite the global transition into the nucleoprotamine structure during spermiogenesis could correspond to an essential mark for the establishment of adequate epigenetic information in the offspring. A detailed study of the chromatin features associated with specific genomic regions in the sperm nucleus will help to define these epigenetic marks. Finally, in addition to chromosomal architecture and histone variants and modifications, other factors could also be involved in the epigenetic information conveyed by the sperm nucleus, including non-coding RNAs.

The lack of detectable transcriptional activity during late post-meiotic stages, and the small cytoplasmic volume, supported the idea that DNA and chromatin were the only basis for the transmission of information by the male gamete to the embryo. Recent discoveries strongly suggest that this was a false idea. Indeed Krawetz and Miller have shown that spermatozoa from fertile men contain more than 3000 different mRNA species (Ostermeier *et al.*, 2002, 2004). Some of these RNAs encode proteins that are necessary for early embryo development, but the function of most of them is unknown. It has been shown that, in addition to mRNAs, the sperm cell contains small RNAs involved in regulating the expression of some genes (Ainsworth, 2005). Moreover, Rassoulzadegan and collaborators have recently demonstrated that the transfer of RNA molecules in fertilized eggs could induce a stable and transmissible phenotype (Rassoulzadegan *et al.*, 2007). These data show that RNA molecules could be directly involved in the epigenetic information transmitted to the zygote. However, the molecular basis of this process remains to be explored.

Moreover, a recent set of data suggest that non-coding RNAs and their associated proteins, including piRNAs associated with the Argonaute family members PIWI/PAZ proteins, are involved in the silencing of transposon activity and maintaining genomic integrity in the male germ cells (O'Donnell and Boeke, 2007; Wu and Chu, 2008).

Chromatin remodelling and nuclear protein exchanges in the zygote

After fertilization, several major global changes in nuclear and chromatin composition occur in the early developing embryo, which are associated with the establishment of specific and regulated nuclear functions. Immediately after sperm entry, the volume of the paternal chromatin dramatically increases, protamines are removed and new histones are quickly incorporated from the oocyte cytoplasm (McLay and Clarke, 2003). Despite the rapid acquisition of histones in the male pronucleus, the paternal and maternal genomes remain separated

and undergo differential modifications of their chromatin and epigenetic marks during the first cell cycle.

Global chromatin structure and organization is different between paternal and maternal genomes in the 1-cell embryo

The DNA of the paternal genome is globally, actively and rapidly demethylated within the first 6 h after gamete fusion (Reik *et al.*, 2001; Reik and Walter, 2001; Santos *et al.*, 2002; Beaujean *et al.*, 2004; Santos and Dean, 2004), whereas the maternal genome remains methylated. However, some specific regions of the paternal genome, including the paternally methylated imprinting control regions, are spared from this global demethylation. Recently, PGC7/Stella, a maternal factor essential for early development, was identified as the factor protecting the maternal genome as well as the paternal imprinting control regions (ICR) from this initial wave of DNA demethylation (Nakamura *et al.*, 2006).

The histone composition of the paternal genome also drastically differs from that of the maternal genome owing to the predominant incorporation of the H3 variant H3.3 by the assembly factor Hira (van der Heijden *et al.*, 2005). The variant H3.3 could be a key factor in maintaining the differentiation of the early male genome from the female, after histone incorporation. In the 1-cell zygote, the respective histone modifications differ between the maternal and the paternal genomes (Morgan *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; van der Heijden *et al.*, 2005, 2006).

A decade ago, it was observed that following fertilization, hyperacetylated H4 was associated with paternal but not with maternal chromatin (Adenot *et al.*, 1997). Interestingly, histone H4 acetylated at K8 or K12 was recently observed even prior to full decondensation of the sperm nucleus, and it was suggested that these histones could have been inherited from the sperm cells, where they had remained specifically associated with pericentric heterochromatin (van der Heijden *et al.*, 2006). Other marks, including H4 K5 and K16 acetylation, H3 K9, K14 and K18 acetylation, H3 S10 phosphorylation were shown to be absent from the epididymal sperm and present on the maternal histones incorporated during sperm decondensation (van der Heijden *et al.*, 2006).

The only histone methylation marks observed in the early male pronucleus are monomethylation of H3K4 and H4K20, which are rapidly acquired in the decondensing male pronucleus (van der Heijden *et al.*, 2005). The paternal genome also shows increasing monomethylation on lysine 9 and 27 of H3. Trimethyl H3-K27 is not observed in the male until the completion of DNA replication (Santos *et al.*, 2005). Heterochromatin protein 1 beta is abundant in the male pronucleus in association with monomethyl H3-K9, and it was suggested that its presence could help prevent further methylation of H3-K9 by histone methyl transferases (Santos *et al.*, 2005).

The histones associated with the maternal genome show not only mono- but also di- and trimethylation of H3 on lysine 4, 9 and 27, as well as trimethylation of H4 lysine 20.

The role and meaning of this differential marking of the male and female genomes in the 1-cell embryo is not clear yet. However, the inefficiency of cloning technologies using somatic cell nuclear transfer suggests that it is essential for a successful embryonic development (Loi *et al.*, 2008).

Pericentric chromatin is differentially marked in the male and female pronuclei

Interestingly, in the female pronucleus, trimethylation of H3K9 and H4K20 are marks specifically localized in the pericentric heterochromatin, at the periphery of nucleolar precursor bodies (NPB, which form round-shaped structures devoid of nucleic acids within the nucleus) in the maternal pronucleus (Morgan *et al.*, 2005). In contrast, in the male pronucleus, trimethylated H3K9 and trimethylated H4K20 are absent and HP1 *beta* and monomethylated H4K20 are homogeneously distributed (van der Heijden *et al.*, 2005). This was recently confirmed by the work of Probst *et al.* (2007). Debey and collaborators, who focused on the reorganization of centric and pericentric regions during early mouse development, observed that, although the centromeres were predominantly present in the periphery of NPB, in both male and female pronuclei, these regions were enriched in late replicating DNA only in the female nucleus (Martin *et al.*, 2006).

Altogether, these data suggest that the division between euchromatin and heterochromatin in the paternal chromatin is either non-existent or requires specific marks, which are different to those of the maternal or somatic chromatin. They also provide a molecular basis for understanding how the sex-specific marks of the paternal and maternal genomes are maintained during early development.

Several data also suggest that specific genomic regions, which are differentially marked during gametogenesis, are crucial for early genome reprogramming. For instance, it has been shown that the pericentric regions described above undergo progressive spatial and temporal reorganization in the early dividing embryo, until the blastocyst stage, when chromocentres acquire their somatic characteristics, which are important for the regulation of differential gene expression patterns (Martin *et al.*, 2006). Other important sex-specific marks are those differentiating the male from the female X chromosome in XX embryos, enabling the process of imprinted X inactivation (Heard *et al.*, 1997; Heard, 2004; Heard and Distèche, 2006; Wagschal and Feil, 2006).

Consequences of the male genome post-meiotic reprogramming on early development

The lower success rate for offspring production following round spermatid injection (ROSI) (Ogura and Yanagimachi, 1995) compared with ICSI suggests that immature post-meiotic cells, although haploid, are not as efficient in supporting embryo development as mature spermatozoa. A recent study has identified epigenetic abnormalities specifically associated with embryos obtained from ROSI. Indeed, unlike the normal paternal genome, the paternal genome derived from a round spermatid, after being globally demethylated, is highly

remethylated before first mitosis. Genomes from elongated spermatids exhibit an intermediate level of DNA methylation, suggesting that the male germ cell acquires the ability to remain unmethylated in the 1-cell zygote during its post-meiotic maturation (Kishigami *et al.*, 2006). The molecular basis of this property of the male genome remains to be elucidated.

Conclusion

Fundamental work has shown that a unique set of specific epigenetic modifications mark the male haploid genome during its post-meiotic differentiation, and that the pericentric heterochromatin and sex chromosome regions are differentially affected. Although the functional meaning of these modifications has yet to be unravelled, there is strong evidence that it affects male genome reprogramming during early embryonic development.

More effort is needed to understand the molecular basis of the epigenetic message, which is conveyed by the spermatozoan to the embryo, and how this message could be altered in patients suffering from infertility. This understanding will not only provide more insight into potential causes of male infertility, but will also help to evaluate the chances of assisted reproductive technologies being successful and resulting in the birth of healthy children. Moreover, some recent studies have highlighted adverse effects of environmental polluting components, including endocrine disruptors, on male germ cell epigenome reprogramming, leading to transgenerational transmission of adult-onset diseases such as spermatogenic defects and cancer (Anway and Skinner, 2007).

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of Agence Nationale de la Recherche (ANR, Regulome, EPISPERM and EMPREINTE projects), of the Région Rhone-Alpes (CIBLE project) and of CNRS (GDR 2586, Méiose et Reproduction).

References

- Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM 1997 Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* **124**, 4615–4625.
- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E *et al.* 2001 Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Molecular Human Reproduction* **7**, 513–520.
- Ainsworth C 2005 Cell biology: the secret life of sperm. *Nature* **436**, 770–771.
- Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L 2005 Epigenetics and the germline. *Reproduction* **129**, 137–149.
- Ammer H, Henschen A, Lee CH 1986 Isolation and amino-acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **367**, 515–522.
- Anway MD, Skinner MK 2007 Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reproductive BioMedicine Online* **16**, 23–25.
- Balhorn R 1989 Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: KW Adolph (ed.) *Molecular Biology of Chromosome Function*. Springer Verlag, New York, pp. 366–395.
- Balhorn R 1982 A model for the structure of chromatin in mammalian

- sperm. *Journal of Cell Biology* **93**, 298–305.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J *et al.* 1987 High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnology Applied Biochemistry* **9**, 82–88.
- Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J *et al.* 2004 Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Current Biology* **14**, R266–R267.
- Berger SL 2007 The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412.
- Bernstein E, Allis CD 2005 RNA meets chromatin. *Genes and Development* **19**, 1635–1655.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES 2007 The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669–681.
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R 2002 Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 24.
- Brewer LR, Corzett M, Balhorn R 1999 Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* **286**, 120–123.
- Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S 2005 How to pack the genome for a safe trip. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **38**, 65–89.
- Cattanach BM, Kirk M 1985 Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**, 496–498.
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T *et al.* 2003 Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721–725.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD *et al.* 2003 Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of Reproduction* **69**, 211–217.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH *et al.* 2001 Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genetics* **28**, 82–86.
- Choudhary P, Varga-Weisz P 2007 ATP-dependent chromatin remodelling: action and reaction. *Subcellular Biochemistry* **41**, 29–43.
- Christensen ME, Dixon GH 1982 Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Developmental Biology* **93**, 404–415.
- Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH 1984 Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acid Research* **12**, 4575–4592.
- Churikov D, Zalenskaya IA, Zalensky AO 2004 Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenetic and Genome Research* **105**, 203–214.
- Cremer T, Cremer C 2001 Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* **2**, 292–301.
- De Lucia F, Faraone-Mennella MR, D'Erme M *et al.* 1994 Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **198**, 32–39.
- Delaval K, Feil R 2004 Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 188–195.
- Drabent B, Benavente R, Hoyer-Fender S 2003 Histone H1t is not replaced by H1.1 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenetics Genome Research* **103**, 307–313.
- Drabent B, Saftig P, Bode C, Doenecke D 2000 Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry Cell Biology* **113**, 433–442.
- Eberharter A, Ferreira R, Becker P 2005 Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biological Chemistry* **386**, 745–751.
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A *et al.* 2003 Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Molecular Human Reproduction* **9**, 757–763.
- Feinberg AP 2007 Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**, 433–440.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A *et al.* 2003 H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell* **4**, 497–508.
- Fita I, Campos JL, Puigjaner LC, Subirana JA 1983 X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *Journal of Molecular Biology* **167**, 157–177.
- Fraser P, Bickmore W 2007 Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* **447**, 413–417.
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PP 1998 Histone and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3350–3356.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R *et al.* 1990 Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 20662–20666.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R *et al.* 1987 Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* **236**, 962–964.
- Gilbert N, Boyle S, Sutherland H *et al.* 2003 Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO Journal* **22**, 5540–5550.
- Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguir V *et al.* 2007 Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **77**, 754–764.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S *et al.* 2007 Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology* **176**, 283–294.
- Govin J, Caron C, Escoffier E *et al.* 2006a Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 37888–37892.
- Govin J, Lestrat C, Caron C *et al.* 2006b Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 155–172.
- Govin J, Caron C, Lestrat C *et al.* 2004 The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3459–3469.
- Greaves IK, Rangasamy D, Devoy M *et al.* 2006 The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 5394–5405.
- Grewal SI, Elgin SC 2007 Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**, 399–406.
- Grimes SR Jr 1986 Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comparative Biochemical Physiology B* **83**, 495–500.
- Grimes SR Jr, Henderson N 1984 Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research* **152**, 91–97.
- Grimes SR Jr, Chae CB, Irvin JL 1975 Acetylation of histones of rat testis. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **168**, 425–435.
- Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G 2004 Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *Journal of Cell Biology* **166**, 493–505.
- Gusse M, Sautiere P, Belaiche D *et al.* 1986 Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta* **884**, 124–134.
- Haaf T, Schmid M 1991 Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Experimental Cell Research* **192**, 325–332.
- Haaf T, Ward DC 1995 Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Experimental Cell Research* **219**, 604–611.
- Handel MA 2004 The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Experimental Cell Research* **296**, 57–63.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK *et al.* 2000a Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *European Journal of Cell*

- Biology* **79**, 950–960.
- Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F *et al.* 2000b Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Molecular Reproduction and Development* **55**, 307–315.
- Heard E 2004 Recent advances in X-chromosome inactivation. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 247–255.
- Heard E, Disteche CM 2006 Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes and Development* **20**, 1848–1867.
- Heard E, Clerc P, Avner P 1997 X-chromosome inactivation in mammals. *Annual Reviews in Genetics* **31**, 571–610.
- Hogan C, Varga-Weisz P 2007 The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutation Research* **618**, 41–51.
- Hoyer-Fender S, Costanzi C, Pehrson JR 2000 Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Experimental Cell Research* **258**, 254–260.
- Iguchi N, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y 2003 Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *International Journal of Andrology* **26**, 354–365.
- Jones PA, Baylin SB 2007 The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683–692.
- Kamakaka RT, Biggins S 2005 Histone variants: deviants? *Genes Development* **19**, 295–310.
- Khochbin S 2001 Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1–12.
- Kierszenbaum AL 2002 Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Molecular Reproduction and Development* **63**, 269–272.
- Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T *et al.* 2006 Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Developmental Biology* **289**, 195–205.
- Kouzarides T 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- Kramer JA, McCarrey JR, Djakiew D, Krawetz SA 2000 Human spermatogenesis as a model to examine gene potentiation. *Molecular Reproduction and Development* **56**, 254–258.
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J *et al.* 2006 Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes and Development* **20**, 2580–2592.
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J 2003a A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology* **81**, 131–140.
- Lewis JD, Song Y, de Jong ME *et al.* 2003b A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**, 473–482.
- Li E 2002 Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* **3**, 662–673.
- Li B, Carey M, Workman JL 2007 The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719.
- Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI 2000 Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2122–2128.
- Loi P, Beaujean N, Khochbin S *et al.* 2008 Asymmetric nuclear reprogramming in somatic cells nuclear transfer? *Bioessays* **30**, 66–74.
- Luetjens CM, Payne C, Schatten G 1999 Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* **353**, 1240.
- Maison C, Almouzni G 2004 HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **5**, 296–305.
- Malik HS, Henikoff S 2003 Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology* **10**, 882–891.
- Mann JR 2001 Imprinting in the germ line. *Stem Cells* **19**, 287–294.
- Martianov I, Brancorsini S, Catena R *et al.* 2005 Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **102**, 2808–2813.
- Martin C, Beaujean N, Brochard Vet *et al.* 2006 Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Developmental Biology* **292**, 317–332.
- Martins RP, Krawetz SA 2007 Decondensing the protamine domain for transcription. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **104**, 8340–8345.
- McGrath J, Solter D 1984 Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179–183.
- McLay DW, Clarke HJ 2003 Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* **125**, 625–633.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M 2003 Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483–488.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R *et al.* 1992 Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular Reproduction and Development* **31**, 170–181.
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA 1985 Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Developmental Biology* **112**, 230–340.
- Meyer-Ficca M, Muller-Navia J, Scherthan H 1998 Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *Journal of Cell Science* **111** (Pt 10), 1363–1370.
- Misteli T 2007 Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* **128**, 787–800.
- Morgan HD, Santos F, Green K *et al.* 2005 Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics* **14** (Suppl. 1), R47–R58.
- Motzkus D, Singh PB, Hoyer-Fender S 1999 M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenetics and Cell Genetics* **86**, 83–88.
- Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS *et al.* 2002 Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Report* **3**, 975–981.
- Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A 2005 Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *Journal of Cell Science* **118**, 4541–4550.
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H *et al.* 2006 PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biology* **9**, 64–71.
- Nickel BE, Roth SY, Cook RG *et al.* 1987 Changes in the histone H2A variant H2A.Z and polyubiquitinated histone species in developing trout testis. *Biochemistry* **26**, 4417–4421.
- O'Donnell KA, Boeke JD 2007 Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* **129**, 37–44.
- Ogura A, Yanagimachi R 1995 Spermatids as male gametes. *Reproduction Fertility Development* **7**, 155–158; discussion 158–159.
- Oliva R, Mezquita C 1982 Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Research* **10**, 8049–8059.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD *et al.* 2004 Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* **429**, 154.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D *et al.* 2002 Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* **360**, 772–777.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H *et al.* 2001 Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337.
- Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G *et al.* 1999 A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of Cell Science* **112**, 3537–3548.
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J *et al.* 2003 Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5354–5365.
- Poccia D 1986 Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *International Review of*

- Cytology* **105**, 1–65.
- Probst AV, Santos F, Reik W *et al.* 2007 Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma* **116**, 403–415.
- Rao BJ, Brahmachari SK, Rao MR 1983 Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 13478–13485.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F 2007 Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochemical Society Transactions* **35**, 623–625.
- Raukas E, Mikelsaar RH 1999 Are there molecules of nucleoprotamine? *Bioessays* **21**, 440–448.
- Reik W 2007 Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425–432.
- Reik W, Walter J 2001 Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Genetics Reviews* **2**, 21–32.
- Reik W, Walter J 1998 Imprinting mechanisms in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**, 154–164.
- Reik W, Santos F, Mitsuya K *et al.* 2003 Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences* **358**, 1403–1409; discussion 1409.
- Reik W, Dean W, Walter J 2001 Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089–1092.
- Risley MS 1990 *Chromatin Organization in Sperm*. CRC Press, Boca Raton.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J *et al.* 2005 Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**, 139–153.
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR 2006 Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **7**, 437–447.
- Santos F, Dean W 2004 Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* **127**, 643–651.
- Santos F, Peters AH, Otte AP *et al.* 2005 Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Developmental Biology* **280**, 225–236.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W 2002 Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology* **241**, 172–182.
- Sarma K, Reinberg D 2005 Histone variants meet their match. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **6**, 139–149.
- Sassone-Corsi P 2002 Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* **296**, 2176–2178.
- Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D 2007 Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* **316**, 398–399.
- Shang E, Nickerson HD, Wen D *et al.* 2007 The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507–3515.
- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S *et al.* 2004 Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biology of Reproduction* **71**, 1220–1229.
- Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K 2002 Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34**, 384–390.
- Steger K, Klönisch T, Gavenis K *et al.* 1998 Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction* **4**, 939–945.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A *et al.* 2005 HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7107–7119.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisaraichai P 1978 Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental Cell Research* **117**, 347–356.
- Trostle-Weige PK, Meistrich ML, Brock WA, Nishioka K 1984 Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 8769–8776.
- Turner JM 2007 Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**, 1823–1831.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ *et al.* 2006 Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental Cell* **10**, 521–529.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O *et al.* 2005 Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics* **37**, 41–47.
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X *et al.* 2004 BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology* **14**, 2135–2142.
- Turner JM, Burgoyne PS, Singh PB 2001 M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *Journal of Cell Science* **114**, 3367–3375.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E *et al.* 2007 Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nature Genetics* **39**, 251–258.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L *et al.* 2006 Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology* **298**, 458–469.
- van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA *et al.* 2005 Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of Development* **122**, 1008–1022.
- van Roijen JH, Ooms MP, Spaargaren MC *et al.* 1998 Immunoeexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Human Reproduction* **13**, 1559–1566.
- Wagschal A, Feil R 2006 Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenetics and Genome Research* **113**, 90–98.
- Ward WS 1994 The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cell Biochemistry* **55**, 77–82.
- Ward WS, Coffey DS 1991 DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* **44**, 569–574.
- Ward WS, Coffey DS 1990 Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **173**, 20–25.
- Ward WS, Zalensky AO 1996 The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **6**, 139–147.
- Wolffe A 1995 *Chromatin – Structure and Function* 2nd edn. Academic Press, London.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevallier P, Sautiere P 1998 Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117–128.
- Wu TF, Chu DS 2008 Epigenetic processes implemented during spermatogenesis distinguish the paternal pronucleus in the embryo. *Reproductive Biomedicine Online* **16**, 13–22.
- Wu JY, Means AR 2000 Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV is expressed in spermatids and targeted to chromatin and the nuclear matrix. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7994–7999.
- Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE *et al.* 2000 Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nature Genetics* **25**, 448–452.
- Wykes SM, Krawetz SA 2003 The structural organization of sperm chromatin. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29471–29477.
- Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y *et al.* 2006 Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biology of Reproduction* **75**, 705–716.
- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM 2003 HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **100**, 10546–10551.
- Yu YE, Zhang Y, Unni E *et al.* 2000 Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **97**, 4683–4688.

- Zalenskaya IA, Zalensky AO 2002 Telomeres in mammalian male germline cells. *International Review of Cytology* **218**, 37–67.
- Zalensky A, Zalenskaya I 2007 Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochemical Society Transactions* **35**, 609–611.
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA *et al.* 2002 Human testis/ sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43474–43480.
- Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A *et al.* 1995 Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* **103**, 577–590.
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA 2007 Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* **128**, 763–776.
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML 2004 Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biology of Reproduction* **71**, 1016–1025.
- Zhao M, Shirley CR, Yu YE *et al.* 2001 Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 7243–7255.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 1 October 2007; refereed 23 October 2007; accepted 23 November 2007.

From meiosis to postmeiotic events: The secrets of histone disappearance

Jonathan Gaucher, Nicolas Reynoird, Emilie Montellier, Fayçal Boussouar, Sophie Rousseaux and Saadi Khochbin

INSERM, U823; Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

Keywords

acetylation; chromatin; epigenetics; histone variants; nucleosomes; protamines; protease; sperm; transition proteins

Correspondence

S. Khochbin, INSERM, U823, Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France
Fax: +33 4 76 54 95 95
Tel: +33 4 76 54 95 83
E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

One of the most obscure phenomena in modern biology is the near genome-wide displacement of histones that occurs during the postmeiotic phases of spermatogenesis in many species. Here we review the literature to show that, during spermatogenic differentiation, three major molecular mechanisms come together to 'prepare' the nucleosomes for facilitated disassembly and histone removal.

(Received 20 July 2009, accepted 20 October 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x

Introduction

One of the last completely unknown biological processes is the molecular basis of postmeiotic haploid genome reprogramming. Our lack of knowledge of this phenomenon includes sporulation in lower eukaryotes and pollen formation in plants, as well as spermatogenesis, all directing a large-scale genome compaction. Simple and fundamental questions regarding the molecular basis of genome compaction and reorganization are completely unanswered. Additional questions concern the assembly of new DNA-packaging proteins, including specific histone variants and nonhistone small basic proteins such as transition proteins (TPs) and protamines (Prms) [1–4].

For about 30 years, these questions have inspired various types of investigation, without providing any insights into the molecular mechanisms involved. These studies have, however, suggested that an essen-

tial element in histone replacement could be the very nature of the testis-specific genome-packaging proteins themselves. Indeed, in various species, histones are replaced by small basic structural DNA-packaging proteins [5]. In mammals, TPs are the first nonhistone DNA-packaging proteins to appear in large amounts and replace histones, which are in turn replaced by Prms [1,6]. This is, however, not a general rule, because, in some species of fish, birds and invertebrates, histones may be replaced directly by Prms and Prm-like proteins [7,8]. Another important aspect of the genome organization that occurs during male germ cell differentiation is the replacement of canonical histones by a variety of histone variants, which takes place extensively in meiotic and postmeiotic cells before the replacement of almost all of the histones.

Abbreviations

Prm, protamine; TP, transition protein.

Although no clear mechanisms have been proposed for histone replacement, analysis of the literature suggests that three general mechanisms act in combination to destabilize the nucleosomes and replace the histones. These are: (a) large-scale incorporation of histone variants, creating less stable nucleosomes; (b) genome-wide histone hyperacetylation; and (c) competition for DNA binding with very basic DNA-interacting nonhistone proteins such as TPs and Prms (Fig. 1). Here, we review the literature on these three aspects, to highlight our lack of knowledge about the mechanisms controlling the shift from a nucleosome-based genome organization to a genome packed via nucleoprotamines.

Destabilization of the nucleosomes by histone variants

In different species, many of the core or linker histone variant genes are exclusively expressed in male germ cells. In mice and humans, almost all of the H2A, H2B, H3 and H1 variants are expressed in testis. Among them, some are highly and/or exclusively expressed in spermatogenic cells, and, interestingly, the only known H2B variants are testis-specific (Table 1). Some of these H2A and H2B variants have been subjected to structural and functional analyses, and all of these studies point to the nucleosomes containing these variants as being significantly less stable than those composed of canonical histones.

Table 1. The list of testis-specific histone variants in the mouse and human. Homologous proteins in the mouse and human [1,11,15] are indicated by an asterisk. +, H2ABbd is an ortholog of mouse H2AL1/L2 [12] and, accordingly, is almost exclusively expressed in testis (our unpublished data).

Histone variants	Mouse	Human
H2A	H2AI 1* H2AI 2* H2AI 3	H2A.Bbd*+
H2B	H2BI 1 H2BI 2 TH2B*	hTSH2B* H2BFWT
H3	H3t	H3T
H1	H1t H1t2 Hils1	H1T H1T2 HILS1

The only testis-specific H2B variants, hTSH2B/TH2B and H2BFWT, that have been studied in a nucleosome showed a marked ability to induce nucleosome instability when associated with somatic-type histones [9,10]. Moreover, recently, five new testis-specific H2A and H2B variants have been identified in the mouse, and named H2AL1, H2AL2, H2AL3, H2BL1, and H2BL2 [11]. Here again, investigation of nucleosomes composed of some of these variants showed that H2AL2/TH2B-containing nucleosomes are less stable than those containing H2A/H2B. These particular studies also supported the idea that TH2B-containing nucleosomes could be preferential sites for H2AL1-L2

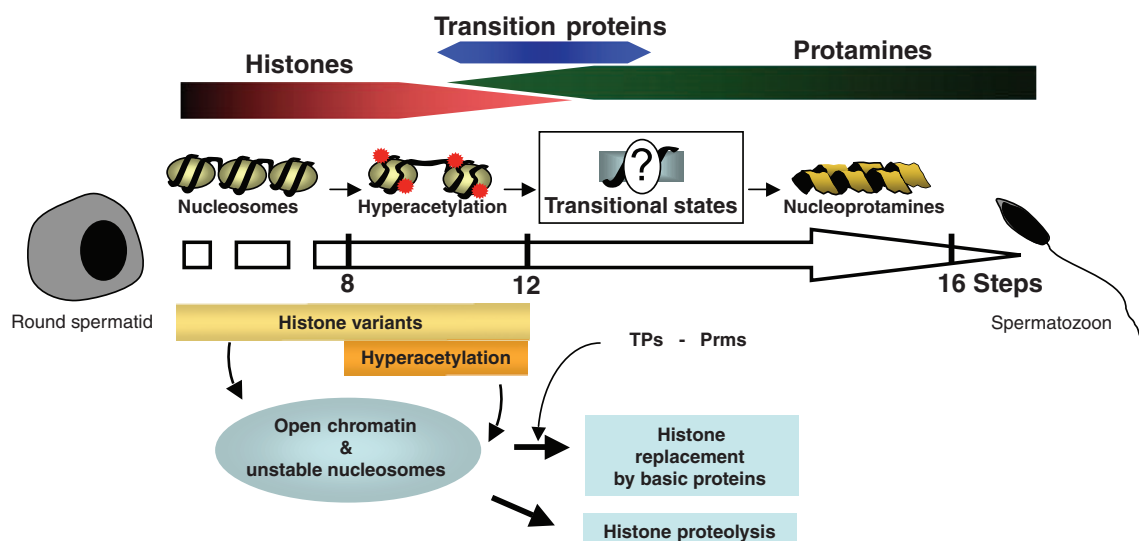


Fig. 1. The secrets of histone disappearance in elongating spermatids. (A) Extensive incorporation of histone variants and global histone hyperacetylation prior to their replacement create open chromatin domains containing unstable nucleosomes. The presence of highly basic small DNA-packaging proteins such as TPs could facilitate histone eviction and a shift from a nucleosomal-based genome organization to nonhistone protein-based DNA packaging.

incorporation, as H2AL1 and H2AL2 dimerize better with TH2B than with H2B [11].

The incorporation of the human homolog of H2AL2 [12], H2A.Bbd, has also been shown to significantly affect nucleosome stability [13].

It is also of note that, even in the case of somatic-type histone variants expressed in spermatogenic cells, there is a high probability of them combining to create peculiar nucleosomes bearing various combinations of histones, such as H3.3 and H2A.Z, that induce nucleosome instability [3,14].

Furthermore, the testis-specific linker histone, H1t, has also been shown to be less efficient in compacting chromatin than other H1 subtypes, and has less affinity not only for nucleosomal DNA but also for free DNA [15].

It is therefore very tempting to hypothesize that waves of histone variants with the capacity to open chromatin and to form unstable nucleosomes are synthesized and incorporated to create chromatin domains, which then constitute preferential targets for nucleosome disassembly and histone displacement.

Facilitated histone displacement by massive chromatin acetylation

Histone hyperacetylation has long been observed in elongating spermatids in many species [1]. In the mouse, histone hyperacetylation starts while a general transcriptional shutdown is observed [16]. Therefore, elongating spermatids heavily acetylate their histones in the total absence of DNA replication and transcription. TP1 and TP2 are detected first, and the acetylation signal gradually disappears during the course of histone replacement [17]. This chromatin acetylation therefore seems to be tightly linked to histone replacement. Additional arguments in favor of acetylation-dependent histone displacement come from studies showing that histones remain underacetylated in species where they remain present all through spermiogenesis such as winter flounder and carp [18,19]. Furthermore, the antero-caudal disappearance of the acetylation signal correlates very well with an anterior-to-posterior direction of genome compaction [17].

Additionally, several *in vitro* and biochemical studies support the idea that nucleosomes containing hyperacetylated histones are more prone to displacement by highly basic proteins such as Prms [20–22]. These results fit well with later investigations showing that general and site-specific histone acetylation can affect the higher-order structure of chromatin and nucleosome properties [23–26] and facilitate the exchange of histones [27].

Although these acetylation-dependent changes in chromatin properties convincingly point to histone hyperacetylation as a critical element in histone removal, they do not indicate how this removal of acetylated histones is performed. Consideration of the ‘histone code’ and of the corresponding ‘reading factors’ has opened new ways to tackle the *in vivo* mechanistic issue. Indeed, because of the recognition of acetylated histones by bromodomains, which are structural modules of 110 amino acids capable of interacting with acetylated lysines [28], factors containing these domains appear to be the first-choice candidates for interaction with acetylated histones in elongating spermatids and mediation of their removal. This reasoning led us to investigate the function of a testis-specific double-bromodomain factor, Brdt, which has the ability to interact with acetylated chromatin and induce its global reorganization [29]. These investigations support a critical role for Brdt in mediating chromatin acetylation-dependent events during spermiogenesis. This hypothesis has received additional support from the demonstration of its indispensable action in elongating/condensing spermatids [30]. The molecular characterization of this particular factor, as well as of other bromodomain-containing proteins expressed in elongating spermatids, should shed light on the nature of the underlying mechanisms [31].

Direct histone displacement by nonhistone DNA-packaging basic proteins

The chromatin opening and enhanced histone exchange induced by global histone hyperacetylation, as well as the nucleosome instability resulting from the incorporation of histone variants, explain why *in vitro* histone replacement by small testis-specific basic proteins is facilitated [20–22]. These considerations point to TPs in mammals as sufficient to displace the histones. The generation of mice lacking either TP1 or TP2 did not, however, bring an answer, because of considerable functional redundancy between the two proteins [32]. Analysis of mice lacking both TPs gave surprising results. In these mice, histone displacement was found to occur normally despite the total absence of TPs. These results show that, as opposed to the prediction, TPs do not play a role in the removal of histones. A detailed analysis showed, however, that when histone removal is complete, genome compaction does not occur normally along the antero-caudal axis, but that, instead, focal DNA condensations are observed [16]. Interestingly, a focal chromatin condensation has been observed in several species where a

direct histone-to-protamine replacement takes place without any other intermediary states [8,33]. In spermatids lacking TPs, where focal condensation units form upon histone removal and enlarge during later stages, the situation is somehow similar to that observed in these organisms [16]. It is therefore highly probable that, in the absence of TPs, direct replacement of histones by Prms could take place, because the latter would be the winners of the competition for DNA binding.

The generation of mice without TPs did not, therefore, allow conclusions to be drawn concerning the role of small basic DNA-packaging proteins in histone displacement. In order to test this hypothesis, mice lacking both TPs and Prms would be required. Indeed, to understand the basis of histone replacement, it would be critical to know whether the competition for DNA binding plays a direct role in histone displacement. However, these mice would be difficult to obtain, as Prm haploinsufficiency results in male sterility [34], and therefore Prm conditional mutants would need to be generated, and then crossed with mice lacking TPs. The role of Prms in histone removal could, however, be investigated in *Drosophila*, where spermatogenesis is also associated with histone hyperacetylation and histone replacement by two Prm-like proteins [35]. In this organism, the absence of both Prm-encoding genes did not affect histone removal. Here again, it was not possible to draw conclusions about the role of small basic proteins in histone displacement, as a TP-like protein was discovered that is synthesized during histone removal, and the above-mentioned work did not consider the impact of the inactivation of the gene encoding this protein on histone replacement [35].

Histone replacement through proteolysis

The possibility also exists that histones are degraded in place by some specific proteases before or during TP assembly. Indeed, early studies suggested that spermatogenic cells could have specific histone proteases that may account for the disappearance of histones in spermatids.

Marushige *et al.* [20] were the first to propose that histone hyperacetylation combined with the action of chromosomally associated proteases could explain the disappearance of hyperacetylated histones in spermatids. Other reports followed, among which the most interesting was that of Faulkner *et al.*, [36] who found that a chromatin-associated protease is present in micrococcal nuclease-solubilized chromatin from

mouse seminiferous tubules. The protease was associated with dinucleosomes or oligonucleosomes, but not with mononucleosomes, and its activity appeared in a stage-specific manner, as it was not present in spermatogenic cells up to 3–4 weeks after birth [36], suggesting that it affected late postmeiotic cells. Here also, the authors proposed a role for this protease in histone displacement. Although all of these findings need to be taken with caution, mostly because of the presence of many proteases associated with the acrosome [37], the possibility of direct degradation of histones by a chromatin-bound protease should be seriously considered.

There are also some hints on the possibility of histone degradation through the ubiquitin–proteasome system. Indeed, an early report described the presence of mono-ubiquitinated and polyubiquitinated H3, H3t and H2B in elongating rat spermatids, where histones are removed [38]. More interestingly, later on, the group of Wing [39] identified a ubiquitin ligase, named E3^{Histone}, capable of ubiquitinating all histones *in vitro*. Although the enzyme was found to be expressed in many tissues besides testis, its preferred E2 is UBC4, which has a testis-specific isoform, UBC4-testis, expressed mainly in round and elongating spermatids [39]. However, a detailed study of E3^{Histone} expression did not show its presence in spermatids, a result that invites caution concerning its involvement in histone replacement [40]. Involvement of the ubiquitin–proteasome system in histone removal received better support in *Drosophila*. Indeed, the inactivation of a testis-specific proteasome core particle subunit, Pro α 6T, leads to spermiogenesis defects affecting spermatids during the elongation process. A detailed analysis of flies expressing a green fluorescent protein-tagged His2AvD transgene showed that, under these conditions, histone removal is delayed but Prm incorporation and histone disappearance finally take place [41]. This report provides the first serious indication of the role of histone degradation and, more specifically, the involvement of the ubiquitin–proteasome system in histone removal.

Concluding remarks

This minireview highlights the fact that, although the question of the mechanisms controlling genome-wide histone replacement has been raised many times by many investigators, very few studies have specifically aimed at the identification of the principal actors. Analysis of the literature allows us to suggest a working model based on three distinct events that occur long before histone replacement itself but prepare chromatin for these dramatic transitions. It is of note that the findings of many studies converge to show the

occurrence of events known to destabilize chromatin higher-order structures and the nucleosomes themselves during stages preceding the synthesis and incorporation of small basic DNA-packaging proteins. However, almost nothing is known of the actual molecular machinery involved in histone replacement. To better tackle this issue, one has to know whether histones are evicted through competition with TPs and Prms, or degraded on chromatin prior to the assembly of these proteins. There is also a strong possibility that before or during their replacement, histones become degraded by chromatin-bound proteases or the ubiquitin–proteasome system. It is also important to determine whether histone proteolysis concerns nucleosomal histones or histones released after nucleosome disassembly. Further dedicated and specific research is needed to unravel one of the important mysteries of modern biology.

Acknowledgements

The work in SK laboratory is supported by the ANR blanche “EpiSperm” and “Empreinte” and INCADHOS research programs.

References

- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S & Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**, 3459–3469.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK & Khochbin S (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**, 139–153.
- Boussouar F, Rousseaux S & Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* **7**, 3499–3502.
- Govin J & Berger SL (2009) Genome reprogramming during sporulation. *Int J Dev Biol* **53**, 425–432.
- Ausio J, Eirin-Lopez JM & Frehlick LJ (2007) Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 63–79.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P & Sautiere P (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117–128.
- Oliva R & Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**, 25–94.
- Kurtz K, Martinez-Soler F, Ausio J & Chiva M (2007) Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J Cell Biochem* **102**, 1432–1441.
- Li A, Maffey AH, Abbott WD, Conde e Silva N, Prunell A, Siino J, Churikov D, Zalensky AO & Ausio J (2005) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* **44**, 2529–2535.
- Boulard M, Gautier T, Mbele GO, Gerson V, Hamiche A, Angelov D, Bouvet P & Dimitrov S (2006) The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol* **26**, 1518–1526.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S *et al.* (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**, 283–294.
- Syed SH, Boulard M, Shukla MS, Gautier T, Travers A, Bednar J, Faivre-Moskalenko C, Dimitrov S & Angelov D (2009) The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res* **37**, 4684–4695.
- Gonzalez-Romero R, Mendez J, Ausio J & Eirin-Lopez JM (2008) Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* **413**, 1–7.
- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K & Felsenfeld G (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark ‘nucleosome-free regions’ of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* **41**, 941–945.
- Godde JS & Ura K (2009) Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int J Dev Biol* **53**, 215–224.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R & Meistrich ML (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* **38**, 200–213.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S & Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**, 950–960.
- Kennedy BP & Davies PL (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* **255**, 2533–2539.
- Kennedy BP & Davies PL (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* **256**, 9254–9259.
- Marushige K, Marushige Y & Wong TK (1976) Complete displacement of somatic histones during

- transformation of spermatid chromatin: a model experiment. *Biochemistry* **15**, 2047–2053.
- 21 Oliva R & Mezquita C (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry* **25**, 6508–6511.
 - 22 Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C & Dixon GH (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem* **262**, 17016–17025.
 - 23 Garcia-Ramirez M, Rocchini C & Ausio J (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* **270**, 17923–17928.
 - 24 Tse C, Sera T, Wolffe AP & Hansen JC (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**, 4629–4638.
 - 25 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**, 844–847.
 - 26 Kan PY, Caterino TL & Hayes JJ (2009) The H4 tail domain participates in intra- and inter-nucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays. *Mol Cell Biol* **29**, 538–546.
 - 27 Benson LJ, Gu Y, Yakovleva T, Tong K, Barrows C, Strack CL, Cook RG, Mizzen CA & Annunziato AT (2006) Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J Biol Chem* **281**, 9287–9296.
 - 28 Mujtaba S, Zeng L & Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521–5527.
 - 29 Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S & Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5354–5365.
 - 30 Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X & Wolgemuth DJ (2007) The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507–3515.
 - 31 Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ *et al.* (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664–668.
 - 32 Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR & Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483–488.
 - 33 Saperas N, Ribes E, Buesa C, Garcia-Hegart F & Chiva M (1993) Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. *J Exp Zool* **265**, 185–194.
 - 34 Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB & Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**, 82–86.
 - 35 Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R & Renkawitz-Pohl R (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci* **120**, 1689–1700.
 - 36 Faulkner RD & Bhatnagar YM (1987) A protease activity is associated with testicular chromatin of the mouse. *Biol Reprod* **36**, 471–480.
 - 37 Marushige Y & Marushige K (1983) Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim Biophys Acta* **761**, 48–57.
 - 38 Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR & Meistrich ML (1998) Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* **273**, 13165–13169.
 - 39 Liu Z, Oughtred R & Wing SS (2005) Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Mol Cell Biol* **25**, 2819–2831.
 - 40 Liu Z, Miao D, Xia Q, Hermo L & Wing SS (2007) Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. *Dev Dyn* **236**, 2889–2898.
 - 41 Zhong L & Belote JM (2007) The testis-specific proteasome subunit Pros{alpha}6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* **134**, 3517–3525.

Références

Bibliographiques

- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W (2001) Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* **7**(6): 513-520.
- Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H, Ren CY, Yuasa Y, Herman JG, Baylin SB (2003) GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8429-8439
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**(4): 633-636
- Almouzni G, Mechali M (1988) Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *Embo J* **7**(13): 4355-4365
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* **23**(2): 185-188
- Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Choo KH (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-368
- Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Cote J, Khochbin S, Bouvet P, Dimitrov S (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* **11**(4): 1033-1041
- Arany Z, Sellers WR, Livingston DM, Eckner R (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* **77**(6): 799-800
- Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* **31**(6): 785-799
- Avalos JL, Bever KM, Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* **17**(6): 855-868
- Axelsen JB, Lotem J, Sachs L, Domany E (2007) Genes overexpressed in different human solid cancers exhibit different tissue-specific expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 13122-13127
- 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**(1): 55-67
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**(6610): 641-643
- Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* **11**(12): 2509-2514
- Barradas M, Anderton E, Acosta JC, Li S, Banito A, Rodriguez-Niedenfuhr M, Maertens G, Banck M, Zhou MM, Walsh MJ, Peters G, Gil J (2009) Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* **23**(10): 1177-1182
- Baudat F, de Massy B (2004) [SPO11: an activity that promotes DNA breaks required for meiosis]. *Med Sci (Paris)* **20**(2): 213-218

- Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2** **Suppl 1**: S4-11
- Baylin SB, Ohm JE (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **6**(2): 107-116
- Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB (2003) Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* **63**(21): 7089-7093
- Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vaniushin BF (1967) [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. *Biokhimiia* **32**(5): 988-993
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**(7143): 407-412
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**(7143): 396-398
- Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekstrom TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, Feinberg AP (2008) Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* **299**(24): 2877-2883
- Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2061-2066
- Blower MD, Karpen GH (2001) The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* **3**(8): 730-739
- Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD (2003) Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell* **11**(6): 1587-1598
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**(5845): 1760-1764
- Bourc'his D, Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**(7004): 96-99
- Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* **7**(22): 3499-3502
- Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA (2004) Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 52-57
- Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V (1998) Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* **396**(6711): 594-598
- Bradbury EM (1977) Histone nomenclature. *Methods Cell Biol* **16**: 179-181
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. *Cell* **128**(6): 1089-1103
- Brooks CL, Gu W (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 164-171
- Brownell JE, Allis CD (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 176-184

- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**(6): 843-851
- Byun JS, Wong MM, Cui W, Idelman G, Li Q, De Siervi A, Bilke S, Haggerty CM, Player A, Wang YH, Thirman MJ, Kaberlein JJ, Petrovas C, Koup RA, Longo D, Ozato K, Gardner K (2009) Dynamic bookmarking of primary response genes by p300 and RNA polymerase II complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(46): 19286-19291
- Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat Cell Biol* **11**(6): 669-677
- Cairns BR (2004) Around the world of DNA damage INO80 days. *Cell* **119**(6): 733-735
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**(1): 103-107
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595): 1039-1043
- Cardoso C, Timsit S, Villard L, Khrestchatsky M, Fontes M, Colleaux L (1998) Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum Mol Genet* **7**(4): 679-684
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* **269**(1): 7-17
- Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S (2005) How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* **38**: 65-89
- Caron C, Lestrat C, Marsal S, Escoffier E, Curtet S, Virolle V, Barbry P, Debernardi A, Brambilla C, Brambilla E, Rousseaux S, Khochbin S Functional characterization of ATAD2 as a new cancer/testis factor and a predictor of poor prognosis in breast and lung cancers. *Oncogene* **29**(37): 5171-5181
- Caron C, Pivot-Pajot C, van Grunsven LA, Col E, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep* **4**(9): 877-882
- Carrozza MJ, Utey RT, Workman JL, Cote J (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**(6): 321-329
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**(4): 642-655
- Cattanach BM, Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**(6019): 496-498
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-679
- Chai J, Charboneau AL, Betz BL, Weissman BE (2005) Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res* **65**(22): 10192-10198
- Chakravarthy S, Gundimella SK, Caron C, Perche PY, Pehrson JR, Khochbin S, Luger K (2005) Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7616-7624
- Chan HM, La Thangue NB (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2363-2373

- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **65**(14): 6029-6033
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT (2007a) Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* **26**(5): 745-752
- Chang YL, King B, Lin SC, Kennison JA, Huang DH (2007b) A double-bromodomain protein, FSH-S, activates the homeotic gene ultrabithorax through a critical promoter-proximal region. *Mol Cell Biol* **27**(15): 5486-5498
- Chaumeil J, Okamoto I, Guggiari M, Heard E (2002) Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells. *Cytogenet Genome Res* **99**(1-4): 75-84
- Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL (1991) Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**(46): 11018-11025
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1914-1918
- Chen Z, Zang J, Whetstone J, Hong X, Davrazou F, Kutateladze TG, Simpson M, Mao Q, Pan CH, Dai S, Hagman J, Hansen K, Shi Y, Zhang G (2006) Structural Insights into Histone Demethylation by JMJD2 Family Members. *Cell*
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* **6**(2): 151-158
- Chi P, Allis CD, Wang GG (2010) Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* **10**(7): 457-469
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**(1): 82-86.
- Cho H, Orphanides G, Sun X, Yang XJ, Ogryzko V, Lees E, Nakatani Y, Reinberg D (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5355-5363
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**(5942): 834-840
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**(6449): 855-859
- Chua P, Roeder GS (1995) Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Mol Cell Biol* **15**(7): 3685-3696
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K (2008) Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* **22**(9): 1115-1140
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**(7184): 215-219

- Collins RE, Tachibana M, Tamaru H, Smith KM, Jia D, Zhang X, Selker EU, Shinkai Y, Cheng X (2005) In vitro and in vivo analyses of a Phe/Tyr switch controlling product specificity of histone lysine methyltransferases. *J Biol Chem* **280**(7): 5563-5570
- Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, Baudard M, Moehler T, Pantesco V, Moos M, Schved JF, Rossi JF, Reme T, Goldschmidt H, Klein B (2007) Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol* **178**(5): 3307-3315
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* **267**(5609): 364-366
- Cooper DL, Lahue RS, Modrich P (1993) Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem* **268**(16): 11823-11829
- Cortez CC, Jones PA (2008) Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutat Res* **647**(1-2): 44-51
- Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-1043
- Costa FF, Le Blanc K, Brodin B (2007) Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* **25**(3): 707-711
- Costanzi C, Pehrson JR (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**(6685): 599-601
- Costanzi C, Pehrson JR (2001) MACROH2A2, a New Member of the MACROH2A Core Histone Family. *J Biol Chem* **276**(24): 21776-21784
- Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levrero M (2002) DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* **9**(1): 175-186
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* **2**(4): 292-301
- Crowley T, Brunori M, Rhee K, Wang X, Wolgemuth DJ (2004) Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res Dev Brain Res* **149**(2): 93-101
- Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP (2003) Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* **299**(5613): 1753-1755
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5): 545-553
- D'Alessio AC, Weaver IC, Szyf M (2007) Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* **27**(21): 7462-7474
- D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, Docquier F, Torrano V, Chernukhin I, Smart M, Farrar D, Metodiev M, Fernandez N, Richard C, Delgado MD, Lobanenko V, Klenova E (2006) The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin Cancer Res* **12**(20 Pt 1): 5978-5986

- D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita GX, Rai S, Smart M, Farrar D, Pack S, Lobanenkov V, Klenova E (2008) BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br J Cancer* **98**(3): 571-579
- Dahm R (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet* **122**(6): 565-581
- Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK (2009) CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**(7243): 113-117
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob ST (2009) A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* **69**(10): 4277-4285
- Daugaard M, Jaattela M, Rohde M (2005) Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* **4**(7): 877-880
- Davis CD, Uthus EO, Finley JW (2000) Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. *J Nutr* **130**(12): 2903-2909
- Davuluri RV, Grosse I, Zhang MQ (2001) Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet* **29**(4): 412-417
- De Lucia F, Faraone-Mennella MR, D'Erme M, Quesada P, Caiafa P, Farina B (1994) Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* **198**(1): 32-39.
- de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**(5): 663-676
- De Smet C, Lorient A, Boon T (2004) Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Mol Cell Biol* **24**(11): 4781-4790
- Dekker J (2008) Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J Biol Chem* **283**(50): 34532-34540
- Delaval K, Feil R (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 188-195
- Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J* **26**(3): 720-729
- Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* **7**(17): 2643-2646
- Denis GV, McComb ME, Faller DV, Sinha A, Romesser PB, Costello CE (2006) Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *J Proteome Res* **5**(3): 502-511
- Denis GV, Vaziri C, Guo N, Faller DV (2000) RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F. *Cell Growth Differ* **11**(8): 417-424
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8758-8763

- Dey A, Ellenberg J, Farina A, Coleman AE, Maruyama T, Sciortino S, Lippincott-Schwartz J, Ozato K (2000) A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6537-6549
- Dey A, Nishiyama A, Karpova T, McNally J, Ozato K (2009) Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* **20**(23): 4899-4909
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG (2002) Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**(5557): 1079-1082
- Digan ME, Haynes SR, Mozer BA, Dawid IB, Forquignon F, Gans M (1986) Genetic and molecular analysis of fs(1)h, a maternal effect homeotic gene in *Drosophila*. *Dev Biol* **114**(1): 161-169
- Dodge JE, Kang YK, Beppu H, Lei H, Li E (2004) Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol* **24**(6): 2478-2486
- Dorer DR, Henikoff S (1994) Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* **77**(7): 993-1002
- Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* **306**(5701): 1571-1573
- Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, Robbiani DF, Di Virgilio M, San-Martin BR, Heidkamp G, Schwickert TA, Eisenreich T, Rajewsky K, Nussenzweig MC (2008) MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* **28**(5): 630-638
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**(6): 979-990
- Doyen CM, An W, Angelov D, Bondarenko V, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S (2006) Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **26**(3): 1156-1164
- Drabent B, Benavente R, Hoyer-Fender S (2003) Histone H1t is not replaced by H1.1 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenet Genome Res* **103**(3-4): 307-313
- Drabent B, Bode C, Bramlage B, Doenecke D (1996) Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochemistry Cell Biol* **106**(2): 247-251
- du Chene I, Basyuk E, Lin YL, Triboulet R, Knezevich A, Chable-Bessia C, Mettling C, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Bertrand E, Marcello A, Emiliani S, Kiernan R, Benkirane M (2007) Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J* **26**(2): 424-435
- Eckner R, Arany Z, Ewen M, Sellers W, Livingston DM (1994) The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 85-95
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**(5618): 455
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**(6990): 457-463

- Eltsov M, Maclellan KM, Maeshima K, Frangakis AS, Dubochet J (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19732-19737
- Endo H, Kawashima S, Sato L, Lai MS, Enomoto T, Seki M, Horikoshi M Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in postreplicative recombination. *Genes Cells* **15**(9): 945-958
- Esteller M (2007) Rett syndrome: the first forty years: 1966-2006. *Epigenetics* **2**(1): 1
- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* **63**(22): 7563-7570
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2003) Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* **9**(12): 757-763
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* **7**(1): 21-33
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**(5895): 89-92
- Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* **15**(7): 827-832
- Ferrari R, Pellegrini M, Horwitz GA, Xie W, Berk AJ, Kurdistani SK (2008) Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science* **321**(5892): 1086-1088
- Field M, Tarpey P, Boyle J, Edkins S, Goodship J, Luo Y, Moon J, Teague J, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R, Raymond FL, Turner G (2006) Mutations in the RSK2(RPS6KA3) gene cause Coffin-Lowry syndrome and nonsyndromic X-linked mental retardation. *Clin Genet* **70**(6): 509-515
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* **26**(1): 169-181
- Finch JT, Klug A (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(6): 1897-1901
- Finlan LE, Sproul D, Thomson I, Boyle S, Kerr E, Perry P, Ylstra B, Chubb JR, Bickmore WA (2008) Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* **4**(3): e1000039
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**(7071): 1116-1122
- Flemming W (1882) *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, Leipzig.
- Florence B, Faller DV (2001) You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* **6**: D1008-1018
- Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, Yates JR, 3rd, Bassett EA, Wood S, Black BE, Cleveland DW (2009) Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* **137**(3): 472-484
- Foltz DR, Jansen LE, Black BE, Bailey AO, Yates JR, Cleveland DW (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* **8**(5): 458-469

- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**(4): 391-400
- Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* **23**(8): 413-418
- French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA (2003) BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res* **63**(2): 304-307
- French CA, Ramirez CL, Kolmakova J, Hickman TT, Cameron MJ, Thyne ME, Kutok JL, Toretsky JA, Tadavarthy AK, Kees UR, Fletcher JA, Aster JC (2008) BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene* **27**(15): 2237-2242
- Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA (2009) The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* **69**(6): 2623-2629
- Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ (2006) Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* **38**(5): 540-549
- Frisch SM, Mymryk JS (2002) Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 441-452
- Funabiki H, Hagan I, Uzawa S, Yanagida M (1993) Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**(5): 961-976
- Gabory A, Dandolo L (2005) [Epigenetics and development: genomic imprinting]. *Med Sci (Paris)* **21**(4): 390-395
- Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, Zhang X, Lin JC, Liang G, Jones PA, Tanay A (2008) Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 12979-12984
- Gallimore PH, Turnell AS (2001) Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**(54): 7824-7835
- Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**(3): 300-303
- Gehring M, Reik W, Henikoff S (2009) DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* **25**(2): 82-90
- Gelbart ME, Larschan E, Peng S, Park PJ, Kuroda MI (2009) Drosophila MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation. *Nat Struct Mol Biol* **16**(8): 825-832
- Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR (2000) Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* **24**(4): 368-371
- Giordano A, Avantaggiati ML (1999) p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* **181**(2): 218-230

- Gjerset R, Gorka C, Hasthorpe S, Lawrence JJ, Eisen H (1982) Developmental and hormonal regulation of protein H1 degrees in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(7): 2333-2337
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**: 15-23
- Gojis O, Rudraraju B, Gudi M, Hogben K, Sousha S, Coombes RC, Cleator S, Palmieri C (2010) The role of SRC-3 in human breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **7**(2): 83-89
- Gokul G, Gautami B, Malathi S, Sowjanya AP, Poli UR, Jain M, Ramakrishna G, Khosla S (2007) DNA methylation profile at the DNMT3L promoter: a potential biomarker for cervical cancer. *Epigenetics* **2**(2): 80-85
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**(4): 635-638
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514
- Goodman RH, Smolik S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**(13): 1553-1577
- Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**(6): 1349-1363
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**(3): 283-294
- Govin J, Lestrat C, Caron C, Pivot-Pajot C, Rousseaux S, Khochbin S (2006) Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*(57): 155-172
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* **83**(2): 155-158
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**(1): 17-31
- Grigoryev SA, Arya G, Correll S, Woodcock CL, Schlick T (2009) Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32): 13317-13322
- Grigoryev SA, Nikitina T, Pehrson JR, Singh PB, Woodcock CL (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6153-6162
- Grossman SR (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* **268**(10): 2773-2778
- Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* **300**(5617): 342-344
- Grune T, Brzeski J, Eberharter A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB, Muller CW (2003) Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* **12**(2): 449-460
- Guillemette B, Bataille AR, Gevry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**(12): e384

- Guo N, Faller DV, Denis GV (2000) Activation-induced nuclear translocation of RING3. *J Cell Sci* **113** (Pt 17): 3085-3091
- Gyuris A, Donovan DJ, Seymour KA, Lovasco LA, Smilowitz NR, Halperin AL, Klysik JE, Freiman RN (2009) The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1789**(5): 413-421
- Hake SB, Allis CD (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6428-6435
- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF (2006) Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* **281**(1): 559-568
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* **59**(2): 177-189
- Hall IM, Noma K, Grewal SI (2003) RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 193-198
- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**(5590): 2232-2237
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**(7254): 473-478
- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14412-14417
- Hansson ML, Popko-Scibor AE, Saint Just Ribeiro M, Dancy BM, Lindberg MJ, Cole PA, Wallberg AE (2009) The transcriptional coactivator MAML1 regulates p300 autoacetylation and HAT activity. *Nucleic Acids Res* **37**(9): 2996-3006
- Harp JM, Uberbacher EC, Roberson AE, Palmer EL, Gewiss A, Bunick GJ (1996) X-ray diffraction analysis of crystals containing twofold symmetric nucleosome core particles. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**(Pt 2): 283-288
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**(3): 369-379
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000a) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**(12): 950-960
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000b) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**(12): 950-960
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**(7148): 1130-1134
- Heard E (2005) Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* **15**(5): 482-489

- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401**(6750): 301-304
- Henikoff S, Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 133-153
- Herrera FJ, Triezenberg SJ (2004) VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J Virol* **78**(18): 9689-9696
- Hershey AD, Chase M (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* **36**(1): 39-56
- Hess JL (2004) MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* **10**(10): 500-507
- Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**(7071): 1176-1180
- Holbert MA, Marmorstein R (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol* **15**(6): 673-680
- Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* **1**(2): 76-80
- Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI, Vatolin S, Risinger JI, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanenkov VV, Schrupp DS (2005) Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* **65**(17): 7763-7774
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RH, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* **129**(1): 69-82
- Houzelstein D, Bullock SL, Lynch DE, Grigorieva EF, Wilson VA, Beddington RS (2002) Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3794-3802
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A (2008) Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* **27**(3): 404-408
- Huang B, Yang XD, Zhou MM, Ozato K, Chen LF (2009) Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol* **29**(5): 1375-1387
- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**(5774): 748-751
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**(6887): 455-458
- Hutchins AS, Mullen AC, Lee HW, Sykes KJ, High FA, Hendrich BD, Bird AP, Reiner SL (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* **10**(1): 81-91
- Iguchi N, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y (2003) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* **26**(6): 354-365
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**(6771): 795-800

- Ishii M, Shimizu S, Wajima T, Hagiwara T, Negoro T, Miyazaki A, Tobe T, Kiuchi Y (2005) Reduction of GTP cyclohydrolase I feedback regulating protein expression by hydrogen peroxide in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* **97**(2): 299-302
- James SR, Link PA, Karpf AR (2006) Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b. *Oncogene* **25**(52): 6975-6985
- Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN, Ozato K (2005) The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**(4): 523-534
- Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K (2005) The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8573-8578
- Johansen KM, Johansen J (2006) Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res* **14**(4): 393-404
- Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J, Jacobsen SE (2007) The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol* **17**(4): 379-384
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**(6): 415-428
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128**(4): 683-692
- Joshi AA, Struhl K (2005) Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* **20**(6): 971-978
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* **13**(19): 2570-2580
- Kalejs M, Erenpreisa J (2005) Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int* **5**(1): 4
- Kang Y, Hong JA, Chen GA, Nguyen DM, Schrupp DS (2007) Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* **26**(30): 4394-4403
- Kasten M, Szerlong H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Werner M, Cairns BR (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J* **23**(6): 1348-1359
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**(3): 375-384
- Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, MacGregore-Cortelli B, Tong W, Secrist JP, Schwartz L, Richardson S, Chu E, Olgac S, Marks PA, Scher H, Richon VM (2005) Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **23**(17): 3923-3931
- Keohane AM, O'Neill L P, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM (1996) X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* **180**(2): 618-630
- Khadake JR, Rao MR (1995) DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* **34**(48): 15792-15801.

- Khochbin S (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**(1): 1-12
- Khochbin S, Verdel A, Lemerrier C, Seigneurin-Berny D (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 162-166
- Kholmanskikh O, Lorient A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C (2008) Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer* **122**(4): 777-784
- Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**(2): 259-272
- Kiefer JC (2007) Epigenetics in development. *Dev Dyn* **236**(4): 1144-1156
- Kierszenbaum AL (2002) Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Mol Reprod Dev* **63**(3): 269-272
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*
- Kind J, Vaquerizas JM, Gebhardt P, Gentzel M, Luscombe NM, Bertone P, Akhtar A (2008) Genome-wide analysis reveals MOF as a key regulator of dosage compensation and gene expression in *Drosophila*. *Cell* **133**(5): 813-828
- Kisseleva-Romanova E, Lopreiato R, Baudin-Baillieu A, Rousselle JC, Ilan L, Hofmann K, Namane A, Mann C, Libri D (2006) Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J* **25**(15): 3576-3585
- Kitabayashi I, Aikawa Y, Yokoyama A, Hosoda F, Nagai M, Kakazu N, Abe T, Ohki M (2001) Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation. *Leukemia* **15**(1): 89-94
- Klisovic MI, Maghraby EA, Parthun MR, Guimond M, Sklenar AR, Whitman SP, Chan KK, Murphy T, Anon J, Archer KJ, Rush LJ, Plass C, Grever MR, Byrd JC, Marcucci G (2003) Depsipeptide (FR 901228) promotes histone acetylation, gene transcription, apoptosis and its activity is enhanced by DNA methyltransferase inhibitors in AML1/ETO-positive leukemic cells. *Leukemia* **17**(2): 350-358
- Klose R, Bird A (2003) Molecular biology. MeCP2 repression goes nonglobal. *Science* **302**(5646): 793-795
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97
- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A (2006) The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* **20**(11): 1931-1936
- Knight SJ, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, *et al.* (1993) Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* **74**(1): 127-134
- Knoepfler PS, Eisenman RN (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**(5): 447-450
- Kondo T, Zhu X, Asa SL, Ezzat S (2007a) The cancer/testis antigen melanoma-associated antigen-A3/A6 is a novel target of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb through histone H3 modifications in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* **13**(16): 4713-4720

Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Boumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP (2008) Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One* **3**(4): e2037

Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y (2007b) Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* **37**(11): 974-983

Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**(139): 868-871

Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P (2004) Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* **1**(3): 249-254

Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* **19**(6): 1176-1179

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4): 693-705

Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung WL, Dorsey J, Schindler K, Winter E, Allis CD, Guacci V, Khochbin S, Fuller MT, Berger SL (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev* **20**(18): 2580-2592

Krivtsov AV, Armstrong SA (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**(11): 823-833

Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**(6597): 269-272

Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T (2008) DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* **22**(7): 908-917

Kyrk J. (2010a) Chromatin organization : <http://www.johnkyrk.com/chromosomestructure.fr.html>.

Kyrk J. (2010b) mitosis : <http://www.johnkyrk.com/mitosis.fr.html>.

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**(6824): 116-120

Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R (2003) Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**(2): 365-376

Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, De Smet C, Hayward SD, Fuks F, Boon T, De Plaen E (2004) MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* **32**(14): 4340-4350

Laget S, Joulie M, Le Masson F, Sasai N, Christians E, Pradhan S, Roberts RJ, Defossez PA (2010) The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One* **5**(8)

Lange M, Kaynak B, Forster UB, Tonjes M, Fischer JJ, Grimm C, Schlesinger J, Just S, Dunkel I, Krueger T, Mebus S, Lehrach H, Lurz R, Gobom J, Rottbauer W, Abdelilah-Seyfried S, Sperling S (2008) Regulation

of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* **22**(17): 2370-2384

Lavau C, Du C, Thirman M, Zeleznik-Le N (2000) Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *EMBO J* **19**(17): 4655-4664

Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 284-295

LeRoy G, Rickards B, Flint SJ (2008) The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* **30**(1): 51-60

Li A, Eirin-Lopez JM, Ausio J (2005) H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol* **83**(4): 505-515

Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**(6): 915-926

Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, Egger G, Gal-Yam EN, Jones PA (2007) Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell* **12**(5): 432-444

Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**(5524): 2077-2080

Lindroth AM, Shultis D, Jasencakova Z, Fuchs J, Johnson L, Schubert D, Patnaik D, Pradhan S, Goodrich J, Schubert I, Jenuwein T, Khorasanizadeh S, Jacobsen SE (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J* **23**(21): 4286-4296

Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430**(6998): 471-476

Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, Cole PA (2008) The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* **451**(7180): 846-850

Long C, Yin B, Lu Q, Zhou X, Hu J, Yang Y, Yu F, Yuan Y (2007) Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* **25**(8): 685-690

Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1068-1075

Loriot A, De Plaen E, Boon T, De Smet C (2006) Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells. *J Biol Chem* **281**(15): 10118-10126

Louhimo J, Alfthan H, Stenman UH, Haglund C (2004) Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer. *Oncology* **66**(2): 126-131

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, 3rd, Lobanenko VV (2002) BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6806-6811

- Loyola A, Almouzni G (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 3-11
- Loyola A, LeRoy G, Wang YH, Reinberg D (2001) Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev* **15**(21): 2837-2851
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043): 834-838
- Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell* **18**(3): 371-384
- Luderus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange T (1996) Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* **135**(4): 867-881
- 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**(6648): 251-260
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13556-13561
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2259-2264
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone H3 by 14-3-3. *Mol Cell* **20**(2): 199-211
- MacDonald VE, Howe LJ (2009) Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics* **4**(3): 139-143
- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* **65**(5): 775-783
- Mahy NL, Perry PE, Bickmore WA (2002) Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol* **159**(5): 753-763
- Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 296-304
- Malik HS, Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-891
- Mann JR (2001) Imprinting in the germ line. *Stem Cells* **19**(4): 287-294
- Marmorstein R, Roth SY (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 155-161
- Marshall GM, Gherardi S, Xu N, Neiron Z, Trahair T, Scarlett CJ, Chang DK, Liu PY, Jankowski K, Iraci N, Haber M, Norris MD, Keating J, Sekyere E, Jonquieres G, Stossi F, Katzenellenbogen BS, Biankin AV, Perini G, Liu T Transcriptional upregulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects. *Oncogene*
- Martens JA, Winston F (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* **13**(2): 136-142

- Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I (2005) Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2808-2813
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* **19**(4): 662-671
- Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA (2007) Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res* **85**(9): 2006-2016
- Matangkasombut O, Buratowski S (2003) Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* **11**(2): 353-363
- Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, Sahin F, Hruban RH, Goggins M (2003) Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin Cancer Res* **9**(4): 1446-1452
- Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP (1996) Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 3026-3030
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* **21**(24): 6820-6831
- McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG (2004) Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol* **12**(12): 527-529
- McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* **9**(14): 2197-2202
- McCord RA, Broccoli D (2008) Telomeric chromatin: roles in aging, cancer and hereditary disease. *Mutat Res* **647**(1-2): 86-93
- McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**(1): 179-183
- McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA (2006) Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* **80**(19): 9530-9543
- Meilinger D, Fellingner K, Bultmann S, Rothbauer U, Bonapace IM, Klinkert WE, Spada F, Leonhardt H (2009) Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep* **10**(11): 1259-1264
- Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Jewell A, Lim SH (2007) Cancer-testis antigens in haematological malignancies. *Br J Haematol* **136**(6): 769-776
- Mellor J (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet*
- Mendell JT (2008) miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133**(2): 217-222
- Merienne K, Pannetier S, Harel-Bellan A, Sassone-Corsi P (2001) Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol Cell Biol* **21**(20): 7089-7096

- Mersfelder EL, Parthun MR (2008) Involvement of Hat1p (Kat1p) catalytic activity and subcellular localization in telomeric silencing. *J Biol Chem* **283**(43): 29060-29068
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**(19): 5194-5201
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**(7057): 436-439
- Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**(7186): 492-496
- Michishita E, McCord RA, Boxer LD, Barber MF, Hong T, Gozani O, Chua KF (2009) Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* **8**(16): 2664-2666
- Miescher F (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* **4**: 441-460
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**(7153): 553-560
- Miotto B, Struhl K (2008) HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev* **22**(19): 2633-2638
- Miotto B, Struhl K (2010) HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell* **37**(1): 57-66
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**(5656): 343-348
- Mochizuki K, Nishiyama A, Jang MK, Dey A, Ghosh A, Tamura T, Natsume H, Yao H, Ozato K (2008) The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase. *J Biol Chem* **283**(14): 9040-9048
- Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ, Dirks RW (2003) Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *Embo J* **22**(24): 6631-6641
- Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006) MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11160-11165
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, Martinez-Macias MI, Ariza RR, Roldan-Arjona T (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 6853-6858
- Morey L, Brenner C, Fazi F, Villa R, Gutierrez A, Buschbeck M, Nervi C, Minucci S, Fuks F, Di Croce L (2008) MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol Cell Biol* **28**(19): 5912-5923
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279**(50): 52353-52360

- Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, Krijgsveld J, Khochbin S, Muller CW, Petosa C (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**(7264): 664-668
- Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG (2005) A census of mammalian imprinting. *Trends Genet* **21**(8): 457-465
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* **305**(5688): 1289-1292
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**(6): 767-775
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Friendewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**(2): 315-329
- Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* **2**(4): 457-467
- Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, Miyaki M (1996) p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* **12**(7): 1565-1569
- Nagashima T, Maruyama T, Furuya M, Kajitani T, Uchida H, Masuda H, Ono M, Arase T, Ozato K, Yoshimura Y (2007) Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis. *Mol Hum Reprod* **13**(3): 141-148
- Nagy Z, Tora L (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**(37): 5341-5357
- Naidu SR, Love IM, Imbalzano AN, Grossman SR, Androphy EJ (2009) The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells. *Oncogene* **28**(27): 2492-2501
- Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S, Bird A (2007) Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2709-2714
- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6): 703-716
- Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A (2007) Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* **8**(1): 34-39
- Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA (2002) Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **62**(22): 6456-6461
- Nishiyama A, Dey A, Miyazaki J, Ozato K (2006) Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell* **17**(2): 814-823
- Nuber UA, Kriaucionis S, Roloff TC, Guy J, Selfridge J, Steinhoff C, Schulz R, Lipkowitz B, Ropers HH, Holmes MC, Bird A (2005) Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* **14**(15): 2247-2256

- Oakes CC, Smiraglia DJ, Plass C, Trasler JM, Robaire B (2003) Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1775-1780
- Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, Pan L, Ritter G, VILLELLA J, Thomas B, Rodabaugh K, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Gnjatich S (2007) Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12837-12842
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE (1993) Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* **362**(6422): 749-751
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**(5): 953-959
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* **39**(2): 237-242
- Okada M, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, Yates JR, Desai A, Fukagawa T (2006) The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol* **8**(5): 446-457
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257
- Old LJ (2001) Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immunol* **1**: 1
- Olins AL, Olins DE (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**(4122): 330-332
- Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L (2009) miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* **23**(24): 2839-2849
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**(7154): 714-717
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* **36**(10): 1065-1071
- Ottinger M, Christalla T, Nathan K, Brinkmann MM, Viejo-Borbolla A, Schulz TF (2006) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. *J Virol* **80**(21): 10772-10786
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**(4): 281-300
- Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet JC, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* **317**(5837): 516-519
- Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**(22): 6141-6149

- Paik WK, Kim S (1973) Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochem Biophys Res Commun* **51**(3): 781-788
- Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, Zhang F, Durner M, Greenberg DA (2003) BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* **73**(2): 261-270
- Park JH, Lin ML, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T (2006) PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer. *Cancer Res* **66**(18): 9186-9195
- Paweletz N (2001) Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 72-75
- Pehrson JR, Fried VA (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**(5075): 1398-1400
- Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG (2006) Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**(7098): 100-103
- Perez-Cadahia B, Drohic B, Davie JR (2009) H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol* **87**(5): 695-709
- Peters I, Vaske B, Albrecht K, Kuczyk MA, Jonas U, Serth J (2007) Adiposity and age are statistically related to enhanced RASSF1A tumor suppressor gene promoter methylation in normal autopsy kidney tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(12): 2526-2532
- Petrij F, Dorsman JC, Dauwerse HG, Giles RH, Peeters T, Hennekam RC, Breuning MH, Peters DJ (2000) Rubinstein-Taybi syndrome caused by a De Novo reciprocal translocation t(2;16)(q36.3;p13.3). *Am J Med Genet* **92**(1): 47-52
- Phillips DM, Johns EW (1965) A Fractionation of the Histones of Group F2a from Calf Thymus. *Biochem J* **94**: 127-130
- Pinney SE, Simmons RA (2010) Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* **21**(4): 223-229
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5354-5365
- Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP (2007) Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* **48**(8): 1472-1481
- Poirier LA (1994) Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev* **26**(1-2): 185-199
- Polesskaya A, Harel-Bellan A (2001) Acetylation of MyoD by p300 requires more than its histone acetyltransferase domain. *J Biol Chem* **276**(48): 44502-44503
- Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR, 3rd, Grant PA (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**(7024): 434-438
- Qiu J (2006) Epigenetics: unfinished symphony. *Nature* **441**(7090): 143-145
- Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Arskog V, Tufeland KR, Breen K, AM OY, Eberharter A, Gibson TJ, Becker PB, Aasland R (2004) Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J Mol Biol* **337**(4): 773-788

- Rai K, Huggins JJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* **135**(7): 1201-1212
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP (1993) Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* **362**(6422): 747-749
- Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL, Schreiber SL, Rando OJ, Madhani HD (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**(2): 233-248
- Raska I (2003) Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* **13**(10): 517-525
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F (2006) RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* **441**(7092): 469-474
- Reichow SL, Varani G (2008) Nop10 is a conserved H/ACA snoRNP molecular adaptor. *Biochemistry* **47**(23): 6148-6156
- Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009) Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol* **87**(1): 41-57
- Reinke H, Horz W (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* **11**(6): 1599-1607
- Reisman D, Glaros S, Thompson EA (2009) The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* **28**(14): 1653-1668
- Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE (2003) Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* **63**(3): 560-566
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**(5986): 532-537
- Riggs AD, Jones PA (1983) 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res* **40**: 1-30
- Risinger JI, Chandramouli GV, Maxwell GL, Custer M, Pack S, Loukinov D, Aprelikova O, Litz T, Schrupp DS, Murphy SK, Berchuck A, Lobanenkova V, Barrett JC (2007) Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin Cancer Res* **13**(6): 1713-1719
- Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6506-6511
- Robinson PJ, Rhodes D (2006) Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* **16**(3): 336-343
- Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capella G, Ribas M, Peinado MA (2006) Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* **66**(17): 8462-9468
- Roelfsema JH, White SJ, Ariyurek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ (2005) Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet* **76**(4): 572-580

- Ross ED, Minton A, Wickner RB (2005) Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol* **7**(11): 1039-1044
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**(3): 269-277
- Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S (2008) Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* **16**(4): 492-503
- Sahin U, Tureci O, Chen YT, Seitz G, Villena-Heinsen C, Old LJ, Pfreundschuh M (1998) Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int J Cancer* **78**(3): 387-389
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11810-11813
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**(6): 435-443
- Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom Witzel S, Okano H, Ko MS, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP (2005) Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* **307**(5717): 1976-1978
- Saksouk N, Avvakumov N, Champagne KS, Hung T, Doyon Y, Cayrou C, Paquet E, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Yang XJ, Gozani O, Kutateladze TG, Cote J (2009) HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Mol Cell* **33**(2): 257-265
- Sankar N, Baluchamy S, Kadeppagari RK, Singhal G, Weitzman S, Thimmapaya B (2008) p300 provides a corepressor function by cooperating with YY1 and HDAC3 to repress c-Myc. *Oncogene* **27**(43): 5717-5728
- Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A, Clarke AR (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* **34**(2): 145-147
- Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(22): 6993-6997
- Sapountzi V, Logan IR, Robson CN (2006) Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol* **38**(9): 1496-1509
- Sarraf SA, Stancheva I (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* **15**(4): 595-605
- Sasaki T, Maier B, Bartke A, Scoble H (2006) Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell* **5**(5): 413-422
- Sato A, Isaac B, Phillips CM, Rillo R, Carlton PM, Wynne DJ, Kasad RA, Dernburg AF (2009) Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to coordinate meiotic chromosome pairing and synapsis. *Cell* **139**(5): 907-919
- Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2000) Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett* **150**(2): 155-164

- Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, Jager D, Jager E, Knuth A, Old LJ (2002) Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int J Cancer* **98**(4): 485-492
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* **4**: 1
- Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**(7047): 138-141
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* **39**(2): 232-236
- Schneid H, Seurin D, Vazquez MP, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y (1993) Parental allele specific methylation of the human insulin-like growth factor II gene and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **30**(5): 353-362
- Schones DE, Zhao K (2008) Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* **9**(3): 179-191
- Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schule R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J (2009) Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res* **69**(5): 2065-2071
- Schultz J (1936) Variegation in Drosophila and the Inert Chromosome Regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **22**(1): 27-33
- Schweiger MR, You J, Howley PM (2006) Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**(9): 4276-4285
- Segal E, Widom J (2009) What controls nucleosome positions? *Trends Genet* **25**(8): 335-343
- Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemercier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**(23): 8035-8044
- Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ (2007) The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**(19): 3507-3515
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* **4**(5): 513-519
- Shang E, Wang X, Wen D, Greenberg DA, Wolgemuth DJ (2009) Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse. *Dev Dyn* **238**(4): 908-917
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**(7171): 908-912
- Sharma N, Nyborg JK (2008) The coactivators CBP/p300 and the histone chaperone NAP1 promote transcription-independent nucleosome eviction at the HTLV-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(23): 7959-7963
- Shaw PJ, Jordan EG (1995) The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 93-121

- Shi D, Pop MS, Kulikov R, Love IM, Kung AL, Grossman SR (2009) CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38): 16275-16280
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**(7098): 96-99
- Shi Y (2007) Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet* **8**(11): 829-833
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA (2004a) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004b) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953
- Shia WJ, Li B, Workman JL (2006) SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **20**(18): 2507-2512
- Shibata Y, Takeshita H, Sasakawa N, Sawa H (2010) Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*. *Development* **137**(7): 1045-1053
- Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE (1999) Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* **399**(6734): 316-317
- Shikama N, Lutz W, Kretschmar R, Sauter N, Roth JF, Marino S, Wittwer J, Scheidweiler A, Eckner R (2003) Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J* **22**(19): 5175-5185
- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* **71**(4): 1220-1229
- 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**(5762): 844-847
- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-625
- Sinha A, Faller DV, Denis GV (2005) Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A. *Biochem J* **387**(Pt 1): 257-269
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* **415**(6873): 810-813
- Smit AF, Riggs AD (1996) Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1443-1448
- Smith ER, Pannuti A, Gu W, Steurnagel A, Cook RG, Allis CD, Lucchesi JC (2000) The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* **20**(1): 312-318
- Sommer M, Poliak N, Upadhyay S, Ratovitski E, Nelkin BD, Donehower LA, Sidransky D (2006) DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse. *Cell Cycle* **5**(17): 2005-2011

- Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW (2005) Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS* **113**(4): 264-268
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6763-6768
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* **4**(10): 939-945
- Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**(7): 2390-2396
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45
- Su IH, Tarakhovsky A (2006) Lysine methylation and 'signaling memory'. *Curr Opin Immunol* **18**(2): 152-157
- Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* **147**(5): 913-920
- 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**(37): 13182-13187
- Sural TH, Peng S, Li B, Workman JL, Park PJ, Kuroda MI (2008) The MSL3 chromodomain directs a key targeting step for dosage compensation of the *Drosophila melanogaster* X chromosome. *Nat Struct Mol Biol* **15**(12): 1318-1325
- Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414**(6859): 122-128
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P (2007) Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* **128**(4): 747-762
- Susumu S, Nagata Y, Ito S, Matsuo M, Valmori D, Yui K, Udono H, Kanematsu T (2008) Cross-presentation of NY-ESO-1 cytotoxic T lymphocyte epitope fused to human heat shock cognate protein 70 by dendritic cells. *Cancer Sci* **99**(1): 107-112
- Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, Shin DM, Yoon J, Abdullaev Z, Pugacheva E, Morse HC, 3rd, Loukinov D, Lobanenko V (2010) Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol Cell Biol* **30**(10): 2473-2484
- Svetelis A, Gevry N, Gaudreau L (2009) Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem Cell Biol* **87**(1): 179-188
- Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y (2005) Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* **19**(7): 815-826
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Gasser SM (2004) The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet* **38**: 305-345
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**(1): 51-61

- Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T (2003) Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* **42**(1): 23-33
- Takami Y, Kikuchi H, Nakayama T (1999) Chicken histone deacetylase-2 controls the amount of the IgM H-chain at the steps of both transcription of its gene and alternative processing of its pre-mRNA in the DT40 cell line. *J Biol Chem* **274**(34): 23977-23990
- Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q (2007) Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* **21**(9): 1050-1063
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M, Toshimori K, Okabe M, Nishimune Y (2005) HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol* **25**(16): 7107-7119
- Tang Y, Holbert MA, Wurtele H, Meeth K, Rocha W, Gharib M, Jiang E, Thibault P, Verreault A, Cole PA, Marmorstein R (2008) Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat Struct Mol Biol* **15**(9): 998
- Teufel DP, Freund SM, Bycroft M, Fersht AR (2007) Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7009-7014
- Thoma F, Koller T, Klug A (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* **83**(2 Pt 1): 403-427
- Tomita A, Towatari M, Tsuzuki S, Hayakawa F, Kosugi H, Tamai K, Miyazaki T, Kinoshita T, Saito H (2000) c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* **19**(3): 444-451
- Toyama R, Rebbert ML, Dey A, Ozato K, Dawid IB (2008) Brd4 associates with mitotic chromosomes throughout early zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn* **237**(6): 1636-1644
- Trojer P, Reinberg D (2006) Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell* **125**(2): 213-217
- Trovo-Marqui AB, Tajara EH (2006) Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet* **70**(1): 1-13
- Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R (2002) Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15536-15541
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR (2003) Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* **34**(2): 157-165
- Turnell AS, Stewart GS, Grand RJ, Rookes SM, Martin A, Yamano H, Elledge SJ, Gallimore PH (2005) The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature* **438**(7068): 690-695
- Turner BM (2005) Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* **12**(2): 110-112
- Umehara T, Nakamura Y, Jang MK, Nakano K, Tanaka A, Ozato K, Padmanabhan B, Yokoyama S (2010) Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *J Biol Chem* **285**(10): 7610-7618

- Umlauf D, Goto Y, Cao R, Cerqueira F, Wagschal A, Zhang Y, Feil R (2004) Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat Genet* **36**(12): 1296-1300
- Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M (2009) Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* **8**(11): 1056-1072
- Urtle RT, Lacoste N, Jobin-Robitaille O, Allard S, Cote J (2005) Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* **25**(18): 8179-8190
- Vagin VV, Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Aravin AA (2009) Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* **23**(15): 1749-1762
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* **118**(4): 409-418
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**(6): 777-788
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**(5038): 1643-1647
- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol*
- van Haafte G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Cole J, Forbes S, Jia M, Jones D, Kok CY, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, Pleasance E, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Collins VP, Ichimura K, Law S, Wong J, Yuen ST, Leung SY, Tonon G, DePinho RA, Tai YT, Anderson KC, Kahnoski RJ, Massie A, Khoo SK, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA (2009) Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet* **41**(5): 521-523
- Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L (2004) Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett* **560**(1-3): 98-102
- Vanyushin BF, Nemirovsky LE, Klimenko VV, Vasiliev VK, Belozersky AN (1973) The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* **19**(3): 138-152
- Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H, 3rd, Schrupp DS, Risinger JI, Barrett JC, Lobanenkova VV (2005) Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res* **65**(17): 7751-7762
- Ventura A, Jacks T (2009) MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* **136**(4): 586-591
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, Khochbin S (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* **10**(12): 747-749
- Verdel A, Khochbin S (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* **274**(4): 2440-2445

- Verreault A (2000) De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* **14**(12): 1430-1438
- Vetting MW, LP SdC, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**(1): 212-226
- Viejo-Borbolla A, Ottinger M, Bruning E, Burger A, Konig R, Kati E, Sheldon JA, Schulz TF (2005) Brd2/RING3 interacts with a chromatin-binding domain in the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 (LANA-1) that is required for multiple functions of LANA-1. *J Virol* **79**(21): 13618-13629
- Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**(7078): 871-874
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**(6811): 495-498
- Waddington C (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* (n°3811): 563-565
- Wallace JA, Felsenfeld G (2007) We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* **17**(5): 400-407
- Wang F, Liu H, Blanton WP, Belkina A, Lebrasseur NK, Denis GV (2010) Brd2 disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes. *Biochem J* **425**(1): 71-83
- Wang GG, Song J, Wang Z, Dormann HL, Casadio F, Li H, Luo JL, Patel DJ, Allis CD (2009a) Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* **459**(7248): 847-851
- Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS (2004a) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**(5): 637-646
- Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM, Knipe DM (2005) Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 16055-16059
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004b) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* **306**(5694): 279-283
- Wang Z, Schones DE, Zhao K (2009b) Characterization of human epigenomes. *Curr Opin Genet Dev* **19**(2): 127-134
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K (2009c) Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**(5): 1019-1031
- Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**(7): 897-903
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**(3): 567-576
- Watson JD, Crick FH (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**: 123-131

- Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**(9): 1136-1143
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* **38**(7): 787-793
- Werbowski-Ogilvie TE, Bosse M, Stewart M, Schnerch A, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Wynder T, Smith MJ, Dingwall S, Carter T, Williams C, Harris C, Dolling J, Wynder C, Boreham D, Bhatia M (2009) Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* **27**(1): 91-97
- Whetstone JR, Ceron J, Ladd B, Dufourcq P, Reinke V, Shi Y (2005) Regulation of tissue-specific and extracellular matrix-related genes by a class I histone deacetylase. *Mol Cell* **18**(4): 483-490
- Whetstone JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**(3): 467-481
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* **39**(2): 157-158
- Williamson R (1970) Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *J Mol Biol* **51**(1): 157-168
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 138-162
- Wilson VL, Jones PA (1983) DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* **220**(4601): 1055-1057
- Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG (1987) Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* **262**(21): 9948-9951
- Witcher M, Emerson BM (2009) Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* **34**(3): 271-284
- Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, Li Y, Allis CD, Tempst P, Svejstrup JQ (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**(1): 123-128
- Wu F, Caron C, De Robertis C, Khochbin S, Rousseaux S (2008) Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *J Reprod Dev* **54**(6): 413-417
- Wu SY, Chiang CM (2007) The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* **282**(18): 13141-13145
- Wu SY, Lee AY, Hou SY, Kemper JK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang CM (2006) Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* **20**(17): 2383-2396
- Wu WH, Alami S, Luk E, Wu CH, Sen S, Mizuguchi G, Wei D, Wu C (2005) Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1064-1071
- Wyrobek AJ, Meistrich ML, Furrer R, Bruce WR (1976) Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J* **16**(7): 811-825

- Wysocka J, Allis CD, Coonrod S (2006a) Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci* **11**: 344-355
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD (2006b) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**(7098): 86-90
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**(3): 483-495
- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM (2003) HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10546-10551
- Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP (2003) Comment on "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation" and "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation". *Science* **302**(5648): 1153; author reply 1153
- Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007a) MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* **67**(20): 9954-9962
- Yang B, Wu J, Maddodi N, Ma Y, Setaluri V, Longley BJ (2007b) Epigenetic control of MAGE gene expression by the KIT tyrosine kinase. *J Invest Dermatol* **127**(9): 2123-2128
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY (2009) Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **15**(2): 124-134
- Yang XJ (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**(10): 1076-1087
- Yang XJ, Gregoire S (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* **25**(8): 2873-2884
- Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**(6589): 319-324
- Yang XJ, Ullah M (2007) MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* **26**(37): 5408-5419
- Yang Z, He N, Zhou Q (2008) Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **28**(3): 967-976
- Yang Z, Yik JH, Chen R, He N, Jang MK, Ozato K, Zhou Q (2005) Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* **19**(4): 535-545
- Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**(3): 361-372
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* **297**(2): 97-100
- Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**(1): 37-50

- Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* **12**(3): 723-734
- You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL (2001) CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1454-1458
- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**(3): 349-360
- You J, Li Q, Wu C, Kim J, Ottinger M, Howley PM (2009) Regulation of aurora B expression by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell Biol* **29**(18): 5094-5103
- Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci Usa* **97**(9): 4683-4688
- Yuan J, Pu M, Zhang Z, Lou Z (2009) Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* **8**(11): 1747-1753
- Yuan LW, Soh JW, Weinstein IB (2002) Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta. *Biochim Biophys Acta* **1592**(2): 205-211
- Yuan W, Condorelli G, Caruso M, Felsani A, Giordano A (1996) Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J Biol Chem* **271**(15): 9009-9013
- Zeng L, Zhang Q, Li S, Plotnikov AN, Walsh MJ, Zhou MM (2010) Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* **466**(7303): 258-262
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* **302**(1): 1-12
- Zhang H, Roberts DN, Cairns BR (2005a) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**(2): 219-231
- Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD, Adams PD (2005b) Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**(1): 19-30
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD (2005c) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* **437**(7060): 902-905
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* **22**(5): 1168-1179
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod* **71**(3): 1016-1025
- Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NH, Weil MM, Russell LD, Behringer RR, Meistrich ML (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* **21**(21): 7243-7255.
- Zhou YB, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muyldermans S (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* **395**(6700): 402-405

Zippo A, Serafini R, Rocchigiani M, Pennacchini S, Krepelova A, Oliviero S (2009) Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* **138**(6): 1122-1136

Zofall M, Persinger J, Kassabov SR, Bartholomew B (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 339-346

Résumé/Abstract

Au cours de ma thèse, nous avons pu démontrer que la protéine fusion BRD4-NUT est suffisante pour induire la tumorigenèse des cellules transloquées, par un mécanisme de séquestration de la protéine histone acétyltransférase (HAT) CBP/p300. En effet, NUT interagit avec CBP/p300 et suractive son activité d'acétylation, créant des foci hyperacétylés de chromatine qui bloquent notamment la réponse apoptotique p53-dépendante. Cette étude est un exemple précis de l'impact qu'une dérégulation épigénétique peut avoir sur l'homéostasie cellulaire et de son mécanisme d'induction de la tumorigenèse.

La protéine NUT seule, quant à elle, est exprimée uniquement lors des stades tardifs de la spermatogenèse, où ses fonctions physiologiques restent encore à déterminer, mais elle est également exprimée de façon illégitime dans certaines lignées tumorales. NUT semble alors conférer un avantage prolifératif aux cellules, notamment pour la lignée U2OS.

Ainsi, la protéine NUT, seule ou fusionnée avec BRD4, est un facteur Cancer/Testiculaire capable d'influer négativement sur l'homéostasie des cellules somatiques dans lesquelles ses fonctions, normalement restreintes à la spermiogenèse, participent à la tumorigenèse.

During my PhD, we have shown that the fusion protein BRD4-NUT is sufficient to induce tumorigenesis in translocated cells, by sequestration of the histone acetyltransferase CBP/p300. Indeed, NUT interacts with CBP/p300 and stimulates its HAT activity, creating hyperacetylated chromatin foci. One consequence of these foci is the inhibition of the p53-dependant apoptosis pathway. This study shows how an epigenetic deregulation can alter cell homeostasis and participates in tumorigenesis.

The NUT protein, alone, is specifically expressed in late stages of spermatogenesis, where its functions remain unknown, and is illegitimately expressed in cancer cell lines. NUT seems to confer a proliferative advantage to cells, notably for U2OS cells.

Thus, the NUT protein, alone or fused to BRD4, is a Cancer/Testis factor capable of negatively influence on somatic cells homeostasis, where its functions, normally restricted to spermatogenesis, participates to tumorigenesis.