



HAL
open science

ROLE PATHOLOGIQUE DES ANOMALIES DE L'HETEROCHROMATINE PERICENTROMERIQUE DU CHROMOSOME 1 DANS LES LYMPHOMES B MALINS NON-HODGKINIENS

Alexandra Fournier

► **To cite this version:**

Alexandra Fournier. ROLE PATHOLOGIQUE DES ANOMALIES DE L'HETEROCHROMATINE PERICENTROMERIQUE DU CHROMOSOME 1 DANS LES LYMPHOMES B MALINS NON-HODGKINIENS. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00545209

HAL Id: tel-00545209

<https://theses.hal.science/tel-00545209>

Submitted on 9 Dec 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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biologie Cellulaire et Intégrative

Présentée et soutenue publiquement par

Alexandra FOURNIER

Le 17 décembre 2009

Rôle pathologique des anomalies de l'hétérochromatine péricentromérique du chromosome 1 dans les lymphomes B malins non-Hodgkiniens

Thèse dirigée par le Dr Mary CALLANAN

JURY

Pr Olivier BERNARD	Rapporteur
Dr Patrick LOMONTE	Rapporteur
Dr Robert FEIL	Examineur
Pr Claire VOURC'H	Examinatrice
Dr Mary CALLANAN	Examinatrice
Pr Dominique LEROUX	Examinatrice
Dr Saadi KHOCHBIN	Examineur

Thèse préparée au sein de l'Equipe 7 « Voies Oncogéniques des Hémopathies Malignes »
Centre de Recherche INSERM U823 – Université Joseph Fourier Grenoble 1

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biologie Cellulaire et Intégrative

Présentée et soutenue publiquement par

Alexandra FOURNIER

Le 17 décembre 2009

Rôle pathologique des anomalies de l'hétérochromatine péricentromérique du chromosome 1 dans les lymphomes B malins non-Hodgkiniens

Thèse dirigée par le Dr Mary CALLANAN

JURY

Pr Olivier BERNARD	Rapporteur
Dr Patrick LOMONTE	Rapporteur
Dr Robert FEIL	Examineur
Pr Claire VOURC'H	Examinatrice
Dr Mary CALLANAN	Examinatrice
Pr Dominique LEROUX	Examinatrice
Dr Saadi KHOCHBIN	Examineur

Thèse préparée au sein de l'Equipe 7 « Voies Oncogéniques des Hémopathies Malignes »
Institut Albert Bonniot

Centre de Recherche INSERM U823 – Université Joseph Fourier Grenoble 1

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr Saadi Khochbin, le Pr Dominique Leroux, le Pr Claire Vourc'h, le Dr Robert Feil, et plus particulièrement le Pr Olivier Bernard et le Dr Patrick Lomonte d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je leur suis très reconnaissante du temps qu'ils y ont consacré.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, pour l'Allocation de Recherche allouée pour trois années, ainsi que les associations qui ont financé ma quatrième année de thèse, et sans lesquelles je n'aurais pas pu faire aboutir mon projet : l'Association pour la Recherche sur le Cancer, et la Société Française d'Hématologie. Je tiens également à remercier chaleureusement l'association Aramis, qui m'a permis notamment de participer à des congrès internationaux.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Dominique Leroux qui m'a accueillie dans son laboratoire, il y a maintenant quelques années, et qui m'a permis de réaliser ma thèse au sein de l'Equipe 7 du Centre de Recherche Inserm U823. Je la remercie sincèrement pour sa confiance et son soutien sur ce projet de recherche difficile.

J'exprime également ma profonde gratitude envers le Docteur Mary Callanan qui a dirigé ma thèse pendant ces quatre années, et qui m'a fait découvrir le monde passionnant des lymphomes et de l'épigénétique. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir formée et guidée tout au long de cette grande aventure. Son enthousiasme sans faille, son énergie débordante et le perpétuel bouillonnement d'idées qui la caractérise ne peuvent que donner envie de travailler avec elle ; c'est ainsi avec un grand plaisir et une réelle motivation que je me suis investie dans ce projet, et je la remercie de l'avoir rendu si vivant et si riche. Je la remercie enfin pour ses qualités humaines et pour son soutien tout au long de ma thèse, ainsi que pour la « pub » qu'elle m'a faite durant ces années !

Un très grand merci évidemment à tous les membres l'équipe 7, sans lesquels ce projet ne serait pas ce qu'il est. Merci à tous pour leur aide, leur soutien, leurs conseils ; merci également pour les interactions très enrichissantes et pour leur sympathie :

Merci à l'équipe du 5^{ème}, Martine, Estelle, Laëtitia R et Rémy ;

Merci à Anne et Christine, mes co-partenaires de projet, avec qui il a été très agréable de travailler !

Merci à Alicia et Thierry, « le conseil des sages ».

Et je souhaite adresser un merci plus particulier à celles et ceux que j'ai cotoyés quotidiennement : Juliana, notre rayon de soleil brésilien ; Sam, le pimousse blagueur ; Sieme, notre source d'informations diverses et variées (potins, mais pas seulement !) ; Stéphanie, la force tranquille ; et la petite dernière, Aurélie, miss bons plans, qui a apporté sa spontanéité rafraîchissante. Ils sont tellement plus que des collègues... je les remercie pour leur bonne humeur et pour leur amitié ; pour tous les moments forts partagés ; pour leur présence dans les moments difficiles ; enfin, pour leur aide inestimable.

Sans oublier ceux qui sont partis, Kass, Lamia et Nadira, la petite Anne, Tchin, ainsi que Marie-Anne et Laëtitia, que je tenais à remercier pour leur aide, et pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier chaleureusement Alexei Grichine pour son aide, ou plutôt son investissement dans notre projet de recherche, pour sa disponibilité et sa sympathie. Je les remercie, lui et Jacques Mazzega, pour leur aide précieuse en microscopie et en traitements d'images.

Je remercie Baptiste pour son aide bioinformatique, et je lui souhaite bon vent pour la suite.

Je remercie sincèrement Stefan Dimitrov pour ses conseils précieux dans la mise au point de la technique de X-ChIP, et pour le temps qu'il m'a consacré.

Je remercie biensûr sincèrement nos plus proches collaborateurs, Claire Vourc'h, Sophie Rousseau et Saadi Khochbin, ainsi que Robert Feil, qui ont permis de faire avancer et évoluer ce projet grâce à leurs discussions très enrichissantes et à leur soutien précieux. Je suis particulièrement reconnaissante envers Robert qui m'a permis de me former à la technique de ChIP au sein de son laboratoire, à mes tous débuts dans la recherche, et j'en profite pour remercier son équipe pour son accueil chaleureux ; mes remerciements s'adressent plus particulièrement à Katia, qui s'est personnellement « occupée » de moi durant cette semaine, et dont je garde un très bon souvenir.

Je remercie également tous les collaborateurs de ce projet, avec qui j'ai réellement apprécié de travailler : Florence de Fraipont, Martin Figeac et Jean-Pierre Kerckaert, John de Vos et Saïd Assou. Merci également aux réseaux ARECA et EpiPro.

Merci à tous ceux qui au sein de l'IAB ont facilité mon travail : Sylvie, Jacqueline, Aude, Charlotte et Gregory ; Dalenda, José, Danielle, Guenaël, et Stéphanie ; Brigitte ; Liliane, Nono et Michail.

Je tenais à remonter un peu dans le temps, à la fin de mon Master2, pour remercier Thierry Gaultier, pour son aide et son soutien à un moment crucial et décisif de mon parcours, Stefan Nonchev, ainsi que Angeline et Sabrina, à qui je dois beaucoup. Merci encore.

Je tiens à remercier les personnes qui font que la vie à l'IAB est si agréable, et notamment la click des doctorants : Angeline (un ptit mot tout particulier pour cette super miss !), Seb (un clin d'œil pour « l'ange gardien » de l'IAB), Nico, John, Emilie, Aurélia, Sophie, Sevgi, Haluk, Ozge, Xavier et Lien ; Maria-Ana, Molière ; Manue, Sabrina ; Peggy, Valérie et Arnaud.

Un petit mot également pour les membres de l'association 38Globule, notamment Dalil, Marion, Laure, Simon, Jackie, Isma, Damien, avec qui j'ai partagés des moments très riches, en découvrant une autre activité importante de la vie doctorante.

Une immense pensée pour tous mes amis, qui ont toujours répondu présents, et qui m'ont permis de me changer les idées. Un grand merci donc à Anne-Laure, Christophe et Anca ; à Amandine, Birahim, Celine, Dorian, Mélanie et Yannick. Merci aussi à l'« history team » pour toutes ces soirées animées, et plus particulièrement à Gwen, ma correctrice, et à Capu, toujours partante pour un moment de détente sportif ou cinématographique.

Je remercie du fond du cœur ma famille, dont la présence suffit à m'apporter du réconfort ; les moments passés dans le « cocon familial » me sont très chers, et m'ont permis de me ressourcer, à l'air pur des montagnes ! Merci à Pap et Mam, Steph et Juan, et Jul et Dounia. Merci d'être là...

Une pensée également pour le reste de ma famille qui vit plus loin et que je ne vois pas souvent, et en particulier pour ma grand-mère.

Je remercie aussi mon « autre » famille, Marie, Gérard et Jérémy, avec qui j'ai la chance de très bien m'entendre.

Un immense merci enfin à Jonathan, qui partage ma vie pour le meilleur et pour le ... meilleur (ou presque) ! Il a toujours été là pour me soutenir et m'encourager, particulièrement dans les moments les plus difficiles. Je le remercie infiniment pour son écoute et sa compréhension, et pour le réconfort qu'il sait m'apporter à chaque instant ; je remercie l'auto-proclamé « Cosette » de ces dernières longues et difficiles semaines. A mon homard...

Et puis pêle-mêle, je remercie Milka, Lipton, Guronsan (mes sponsors) ; ainsi que Meredith Grey, Bree Van de Kamp and Co., pour les moments de détente passés en leur compagnie !

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RESUME.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
AVANT-PROPOS.....	12
INTRODUCTION.....	13
<u>Partie 1 : Organisation, fonction et régulation du génome et de l'épigénome.....</u>	13
Introduction.....	13
I. <u>La chromatine, support de l'information génétique et épigénétique</u>.....	14
I.1. Structure et compaction de la chromatine.....	14
I.1.1. <u>Les différents niveaux de compaction de la chromatine</u>	15
I.1.2. <u>L'euchromatine et l'hétérochromatine</u>	17
I.2. Régulation de l'organisation et de la fonction de la chromatine.....	18
I.2.1. <u>L'épigénétique, définition</u>	18
I.2.2. <u>La méthylation de l'ADN</u>	19
I.2.2.a. Les ADN méthyltransférases – DNMT.....	20
<i>Les DNMT de maintien</i>	21
<i>Les DNMT de novo</i>	21
<i>Les autres DNMT</i>	22
I.2.2.b. Méthylation de l'ADN et silencing.....	23
I.2.3. <u>Les modifications post-traductionnelles des histones</u>	23
I.2.3.a. L'acétylation des histones.....	25
<i>Les histone acétyltransférases – HAT</i>	26
<i>Les histone déacétylases – HDAC</i>	26
I.2.3.b. La méthylation des histones.....	27
<i>Les histone méthyltransférases – HMT</i>	28
<i>Les histone déméthylases – HMD</i>	30
I.2.4. <u>Les variants d'histone</u>	30
I.2.5. <u>L'hypothèse du code histone</u>	31
<i>Lecture du code histone</i>	32
I.2.5.a. Les protéines liant l'ADN méthylé : les MDB.....	33
I.2.5.b. Les protéines à chromodomaine.....	34
<i>La famille SUV39</i>	35
<i>La famille HP1</i>	35
<i>La famille Polycomb</i>	36
<i>Reconnaissance spécifique des lysines 9 et 27 de l'histone H3</i>	38
Conclusion.....	39

I.2.6. Les complexes de remodelage.....	39
I.2.7. Les petits ARN.....	41
I.2.7.a. PTGS.....	41
I.2.7.b. TGS.....	42
I.2.8. <u>Interactions entre les différents paramètres épigénétiques pour la régulation de l'organisation et des fonctions de la chromatine</u>	43
II. <u>Organisation spatiale du génome dans le noyau interphasique</u>	45
II.1. Organisation spatiale et architecture nucléaire	45
II.1.1. <u>Le concept d'architecture nucléaire</u>	45
II.1.2. <u>Les compartiments subnucléaires</u>	45
II.1.3. <u>Organisation non-aléatoire des compartiments subnucléaires</u>	46
II.1.4. <u>Les chromosomes sont des structures dynamiques</u>	47
II.2. Organisation spatiale et activité transcriptionnelle	47
II.2.1. <u>Modèle de contraintes structurales sur la mobilité de la chromatine et les interactions gène-gène</u>	48
II.2.2. <u>Mouvements vis-à-vis de la périphérie ou de l'intérieur du noyau</u>	48
II.2.2.a. Modèles d'étude artificiels dans les cellules vivantes.....	48
II.2.2.b. Mouvements vers l'intérieur du noyau et activité transcriptionnelle.....	49
II.2.2.c. Mouvements vers la périphérie nucléaire et répression transcriptionnelle.....	49
II.2.3. <u>Mouvements vis-à-vis de l'hétérochromatine</u>	51
II.2.3.a. « Gene kissing » et répression transcriptionnelle.....	52
II.2.3.b. « Gene kissing » et activation transcriptionnelle.....	53
Conclusion	54
III. <u>L'hétérochromatine</u>	54
III.1. L'hétérochromatine facultative	55
III.1.1. <u>L'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles</u>	55
III.1.2. <u>L'empreinte parentale</u>	56
III.2. L'hétérochromatine constitutive	56
III.2.1. <u>Les séquences répétées</u>	57
III.2.1.a. Les séquences répétées en tandem.....	58
<i>Les satellites</i>	58
<i>Les minisatellites</i>	59
<i>Les microsatellites</i>	59
III.2.1.b. Les séquences répétées non-satellites.....	59
III.2.1.c. Les éléments répétés dispersés.....	60
<i>LINE</i>	60
<i>SINE</i>	60
<i>Rétroélément à LTR</i>	60
<i>Les transposons à ADN</i>	61

III.2.2. <u>Les centromères</u>	61
III.2.2.a. Les séquences répétées centromériques.....	61
III.2.2.b. Paramètres épigénétiques et protéines centromériques.....	62
III.2.3. <u>Les régions péricentromériques</u>	64
III.2.3.a. Les séquences répétées péricentromériques.....	64
III.2.3.b. Paramètres épigénétiques et protéines péricentromériques.....	65
III.2.3.c. Rôle des péricentromères - cohésion des chromatides sœurs.....	66
III.2.3.d. Rôle des constriction secondaires.....	66
III.2.3.e. Polymorphisme des constriction secondaires.....	67
III.2.4. <u>Les télomères</u>	67
III.2.4.a. Structure du télomère.....	67
III.2.4.b. Les protéines télomériques.....	68
III.2.4.c. Statut épigénétique du télomère.....	68
III.3. Formation et maintien de l'hétérochromatine	69
III.3.1. <u>Les modification chimiques de l'ADN et des histones</u>	69
III.3.1.a. HP1 et SUV39H.....	69
III.3.1.b. HP1 et SUV4-20H.....	70
III.3.1.c. HP1, SUV39H et DNMT.....	71
III.3.1.d. Interactions entre les différents acteurs.....	72
III.3.2. <u>L'ARN interférence</u>	72
III.4. L'hétérochromatine et silencing génique par effet de position (PEV)	74
III.4.1. Silencing - effet de position en cis.....	74
III.4.2. Silencing - effet de position en trans.....	75
Conclusion	76
<u>Partie 2 : Ontogenèse et oncogenèse B</u>	77
I. L'ontogenèse B	77
I.1. La recombinaison V(D)J	78
I.1.1. <u>Organisation du locus V(D)J</u>	78
I.1.2. <u>Mécanismes de recombinaison V(D)J</u>	79
I.1.3. <u>Contrôle de la recombinaison VDJ</u>	80
I.1.3.a. Expression contrôlée des recombinases.....	81
I.1.3.b. Accessibilité des séquences RSS.....	81
<i>Contrôle épigénétique</i>	82
<i>Rôle des facteurs de transcription</i>	82
I.1.3.c. Transcription germinale antisens.....	83
I.1.3.d. Relocalisation spatiale des loci.....	83
I.2. Les mutations somatiques	86
I.3. La commutation de classe	86
Conclusion	87

II. Les lymphomes malins non-Hodgkiniens.....	88
II.1. Définition et classification.....	88
II.2. Génétique des lymphomes malins non-Hodgkiniens – LMNH.....	90
II.2.1. <u>Chromosomes et cancers</u>	90
II.2.2. <u>Anomalies primaires et lymphomagenèse</u>	91
II.2.2.a. Analyse chromosomique.....	91
II.2.2.b. Conséquences moléculaires des anomalies primaires.....	92
<i>Lymphome folliculaire et translocation t(14; 18)(q32; q21) - BCL2</i>	93
<i>Lymphomes B diffus à grandes cellules et anomalies de la bande 3q27 – BCL6</i>	94
<i>Lymphome de Burkitt et translocation t(8; 14) – c-MYC</i>	94
Conclusions.....	95
II.2.3. <u>Anomalies secondaires et progression tumorale</u>	96
II.2.3.a. Analyse chromosomique.....	96
<i>Modèle des lymphomes folliculaires</i>	96
II.2.3.b. Mécanismes moléculaires de la progression tumorale.....	96
<i>Rôle des translocations secondaires – modèle du lymphome folliculaire</i>	97
<i>Rôle des pertes et gains de matériel chromosomique</i>	97
II.2.3.c. Anomalies 1q.....	98
<i>Anomalies 1q et LMNH</i>	98
<i>Anomalies 1q et tumeurs solides</i>	99
II.2.3.d. Analyse moléculaire des anomalies 1q.....	100
<i>Cas particulier : l'hétérochromatine constitutive 1q12</i>	100
Conclusion.....	101
<u>Partie 3 : Epigénétique et cancers</u>	102
I. De l'origine épigénétique des cancers : « epigenetic progenitor of cancer » ?.....	102
II. Perturbations épigénétiques dans les cancers.....	103
III. Perturbations épigénétiques dans les hémopathies malignes.....	105
III.1. Organisation spatiale du génome et translocations chromosomiques.....	105
III.2. Gènes cibles des translocations chromosomiques et perturbations de l'épigénome.....	107
III.2.1. <u>Protéines de fusion et méthylation de l'ADN</u>	108
III.2.2. <u>Protéines de fusion et activité histone méthyltransférase</u>	108
III.3. Méthylation de l'ADN.....	109
IV. Thérapies épigénétiques.....	111
IV.1. Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.....	111
IV.2. Les inhibiteurs des HDAC (HDACi).....	113
IV.3. Perspectives.....	115
Conclusion.....	115

ARGUMENTAIRE ET OBJECTIF DU PROJET.....	116
MATERIELS ET METHODES.....	119
I. <u>Cellules et échantillons de patients</u>.....	119
I.1. Lignées cellulaires et conditions de culture.....	119
I.1.1. <u>Lignées cellulaires</u>	119
I.1.2. <u>Conditions de culture</u>	121
I.2. Lymphocytes B normaux	121
I.3. Sélection des échantillons de patients pour l'étude du profil d'expression génique – 1^{ère} série (10 échantillons).....	122
II. <u>Obtention de métaphases, technique cytogénétique</u>.....	122
III. <u>FISH sur préparation cytogénétique</u>.....	123
III.1. Marquage des sondes par Nick-translation.....	123
III.2. Précipitation et dénaturation des sondes.....	123
III.3. Traitement, dénaturation des lames et hybridation.....	123
III.4. Lavages et montage.....	124
III.5. Lecture et interprétation.....	124
IV. <u>FISH sur noyaux interphasiques fixés en 3D</u>.....	124
IV.1. Préparation des noyaux pour analyse 3D.....	124
IV.2. FISH 4 couleurs sur noyaux interphasiques 3D	124
IV.2.1. <u>Préparation de la sonde</u>	124
IV.2.2. <u>Préparation des lames</u>	125
IV.2.3. <u>Dénaturation de la sonde et des lames</u>	125
IV.2.4. <u>Lavages et montage</u>	125
IV.2.5. <u>Acquisition et analyse des images</u>	125
IV.3. <u>Immuno-FISH sur noyaux 3D</u>	125
IV.3.1. <u>Immunofluorescence (IF)</u>	125
IV.3.2. <u>FISH</u>	126
IV.3.3. <u>Acquisition des images 3D par microscopie confocale</u>	126
V. <u>Méthylation de l'ADN sur chromosomes mitotiques</u>.....	127
V.1. Dénaturation des chromosomes : traitement aux UV (12W)	127
V.2. Détection de l'ADN méthylé	127
V.3. Lecture, acquisition des images	127
VI. <u>Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)</u>.....	127
VI.1. ChIP sur chromatine native (N-ChIP)	127
VI.1.1. <u>Préparation de la chromatine</u>	127
VI.1.2. <u>Pré-clear de la chromatine</u>	128
VI.1.3. <u>Immunoprécipitation de la chromatine</u>	128
VI.1.4. <u>Extraction de l'ADN</u>	128

VI.2. ChIP sur chromatine fixée (X-ChIP)	129
VI.2.1. <u>Cross-link et lavages des cellules</u>	129
VI.2.2. <u>Lyse des cellules et fragmentation de la chromatine</u>	129
VI.2.3. <u>Dosage, pré-clear et IP de la chromatine</u>	129
VI.2.4. <u>Lavages, élution et reverse crosslink</u>	129
VI.2.5. <u>Traitements RNase-pK, extraction et précipitation de l'ADN</u>	130
VII. Lysats cellulaires et Western-blot	130
VII.1. Extraction protéique à l'urée	130
VII.2. Western-blot	130
VIII. Extraction et purification des acides nucléiques	131
VIII.1. Extraction d'ADN génomique	131
VIII.2. Extraction des ARNs	131
XIX. Analyses par qPCR et RT-qPCR	132
X. CGH-array (Comparative Genomic Hybridization sur puce)	133
XI. Profiling transcriptionnel – puces Affymetrix	133
RESULTATS – DISCUSSION – PERSPECTIVES	135
<u>Partie I : Caractérisation d'un réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans une lignée modèle de lymphome B</u>	135
I.1. Résumé de l'article	136
I.2. Article	137
I.3. Résultats complémentaires / en cours	174
I.4. Discussion – conclusion	176
<u>Partie II : Profiling transcriptionnel dans une série de patients atteints de lymphome B avec réarrangement 1q12</u>	179
II.1. Introduction	179
II.2. Résultats (analyses en cours)	179
II.3. Conclusion – perspectives	182
CONCLUSION GENERALE	184
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
ANNEXE – REVUE	208

RESUME

ABREVIATIONS

AVANT-PROPOS

RESUME

Les descriptions de perturbations épigénétiques dans les cancers sont aujourd'hui en pleine explosion, et l'exploration de ce nouveau champ de recherche offre des perspectives d'innovation diagnostique, pronostique et thérapeutique considérables. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à la caractérisation des mécanismes génétiques et plus récemment épigénétiques sous-tendant la lymphomagenèse, en se focalisant sur un modèle particulier – celui des réarrangements chromosomiques qui affectent la région d'hétérochromatine constitutive du chromosome 1 humain (bande cytogénétique 1q12). Ces anomalies sont remarquablement fréquentes dans les lymphomes, les myélomes, les leucémies aiguës et également dans certaines tumeurs solides (sein, ovaire, poumon...). Ceci suggère fortement l'existence de mécanismes oncogéniques dépendant de l'hétérochromatine constitutive dans ces maladies. L'hétérochromatine constitutive joue un rôle crucial dans la stabilité du génome et le silencing de gènes ; ainsi, la compréhension des mécanismes oncogéniques dépendants de l'hétérochromatine représente un défi majeur.

Dans ce cadre, mon projet de thèse avait comme objectif d'une part de caractériser un réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans une lignée modèle de lymphome B, et d'autre part de réaliser une étude pilote de profiling transcriptionnel dans une petite série de patients DLBCL présentant ou non une anomalie de l'hétérochromatine 1q12. Ces travaux montrent pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphome B. Les conséquences majeures de ces anomalies sont la formation de foyers hétérochromatiques aberrants résultant d'« appariements » intra-chromosomiques à longue distance entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 réarrangé et le domaine d'hétérochromatine centromérique. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la répression de l'expression de gènes, parmi lesquels *MXD1* et *GMCL1* qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la signalisation MYC et P53, respectivement. De telles perturbations sont remarquables, et n'avaient pas encore été décrites dans le cadre de réarrangements chromosomiques dans les tumeurs humaines. D'autre part, l'étude pilote de profiling transcriptionnel par puces Affymetrix dans des cas de lymphome avec ou sans anomalie de l'hétérochromatine 1q12 confirme et identifie de nouvelles cibles de dérégulation liées à l'hétérochromatine dans les lymphomes B non-Hodgkiniens.

Finalement, la compréhension du rôle de ces foyers hétérochromatiques aberrants dans la progression tumorale présenterait un intérêt majeur pour les lymphomes B et pour d'autres tumeurs hématologiques ou solides, puisque ces anomalies sont observées de manière fréquente et non-aléatoire dans un large spectre de tumeurs humaines, et sont liées à la progression tumorale et à un mauvais pronostic.

LISTE DES ABREVIATIONS

ac	acetylation	IGL	chaîne légères Lambda des immunoglobulines
Ac	anticorps	IHC	immunohistochimie
ADN	acide désoxyribonucléique	K	lysine
AID	activation Induced deaminase	LAM	leucémie aiguë myéloïde
Ag	antigène	LLC	leucémie lymphoïde chronique
ARN	acide ribonucléique	MTC	major translocation cluster
ARNm	acide ribonucléique messenger	MBD	methyl binding domain
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	MCL	lymphome du manteau
BCL2	B cell lymphoma -2	MDM2	Mouse Double Minute 2
BCL6	B cell lymphoma -6	me	methylation
BCR	B cell receptor	Mb	megabase
BL	lymphome de Burkitt	MGUS	gammapathie monoclonale bénigne d'origine indéterminée
CGH	hybridation génomique comparative	MZL	lymphome de la zone marginale
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
CMF	cytométrie de flux	P	phosphorylation
CSR	commutation de classe	pb	paires de bases
DLBCL	lymphome B diffus à grandes cellules	PcG	Polycomb Group
DNMT	DNA methyltransferase	PHD	Plant HomeoDomain
FISH	Hybridation Fluorescente <i>In Situ</i>	PMBL	lymphome B primitif du médiastin
FL	lymphome folliculaire	R	arginine
GCB	cellule B du centre germinatif	RB	Rétinoblastome
HAT	histone acetyltransferase	SET	Su(var)39, Enhancer of zeste, Trithorax
HDAC	histone deacetylase	SHM	hypermutations somatiques
HDM	histone demethylase	SMZL	lymphome splénique de la zone marginale
HG	hyperplasie ganglionnaire	TCR	T-cell Receptor
HMT	histone methyltransferase	TSA	Trichostatin A
HP1	heterochromatin protein 1		
Ig	immunoglobline		
IGH	chaînes lourdes des immunoglobulines		
IGK	chaîne légère Kappa des immunoglobulines		

AVANT PROPOS

L'ADN est la molécule contenue dans le noyau de nos cellules et sur laquelle sont inscrites environ 25000 instructions qui seront décodées pour donner les protéines, et finalement l'intégralité des constituants qui font de nous ce que nous sommes. Mais l'ADN n'explique pas tout, et son étude ne suffit pas à comprendre comment un organisme se construit et comment il évoluera au cours de sa vie. Ainsi, l'ensemble des phénomènes que la génétique ne permet pas d'expliquer a été qualifié d'épigénétique. Un exemple particulièrement frappant de l'importance de l'épigénétique est la différenciation cellulaire : *«En effet, bien que toutes les cellules de notre corps comportent la même version de la molécule d'ADN et les mêmes instructions, il y a pourtant des différences énormes et fondamentales entre une cellule musculaire, une cellule hépatique et un globule blanc.»* Dans la comparaison classique de l'ADN comme étant «le grand livre de la vie», l'épigénétique se retrouve ainsi être le lecteur qui décide quels passages de ce mode d'emploi lire et comment les interpréter. L'enjeu de l'épigénétique est donc non seulement fondamental, puisqu'il concerne la compréhension de ce qui définit un être vivant, mais il a également de véritables répercussions médicales : cancer, diabète, schizophrénie sont des maladies dont la composante épigénétique s'affirme de plus en plus.

Adapté d'après Hervé Ratel, Sciences et Avenir

Ainsi, l'intégration des cancers dans un contexte épigénétique semble essentielle pour améliorer la compréhension de leurs origines, des mécanismes mis en jeu et des solutions thérapeutiques à apporter. Dans ce cadre, l'introduction de ce mémoire vise à montrer, à travers le modèle des lymphomes, comment l'épigénome est impliqué dans la régulation des mécanismes altérés dans les cancers. Elle s'articule en trois parties : dans une première partie sont exposées les notions fondamentales et les grands concepts du génome et de l'épigénome ; la deuxième partie définit les lymphomes, après avoir décrit les principales étapes de la différenciation lymphoïde B ; enfin, la troisième partie propose un état des lieux de la place de l'épigénétique dans les cancers.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Partie 1 : Organisation, fonction et régulation du génome et de l'épigénome

Introduction

Les origines de la vie remontent à l'apparition de « molécules intelligentes » que sont l'ARN, l'ADN et les protéines. L'ADN est le support de l'information génétique pour la grande majorité des organismes vivants, à l'exception des virus à ARN. Sa structure en double hélice le rend très stable, une nécessité pour conserver les instructions qui vont générer la vie et les transmettre aux générations suivantes (Figure 1).

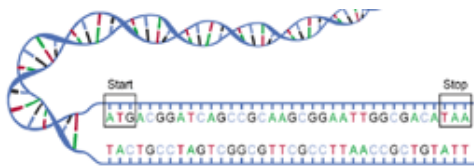


Figure 1 : La molécule d'ADN est composée de 4 bases azotées différentes : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G), fixées sur une armature sucre (désoxyribose) – phosphate.

La réplication de l'ADN permet de dupliquer le matériel génétique lors du cycle cellulaire afin d'assurer la transmission d'une copie complète du génome à chacune des deux cellules filles. Un gène est une portion d'ADN qui spécifie la synthèse d'une protéine ou d'un ARN fonctionnel. L'expression d'un gène implique la transcription de l'ADN en ARN dit messager s'il est codant, qui sera traduit en protéine (Figure 2). Le code génétique établit une correspondance entre les bases de l'ADN (adénine, guanine, cytosine et thymine) et les acides aminés qui constituent les protéines. Les protéines sont le support de l'activité biologique ; certaines participent à la structure même des cellules, tandis que d'autres – les enzymes – assurent le métabolisme et la synthèse qui permettent à la cellule de vivre et d'assurer ses fonctions.

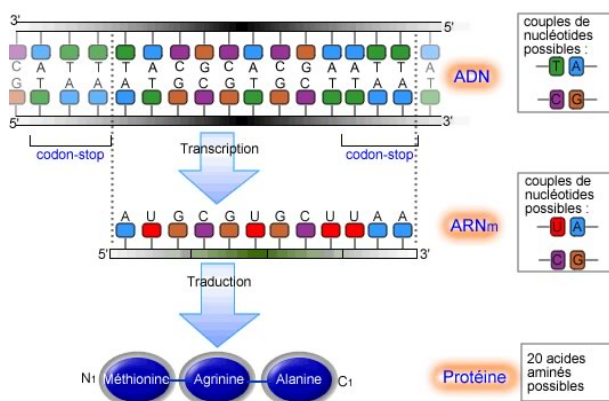


Figure 2 : L'expression d'un gène en protéine passe par 2 grandes étapes : la transcription de l'ADN en ARN dit messager, et la traduction de l'ARN messager en acides aminés dont l'assemblage forme les protéines. D'après : http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/701/chap3c_contenu.htm

Cependant, la formule selon laquelle « chaque gène sur l'ADN est transcrit en une molécule d'ARN, qui, elle-même, sera traduite en une protéine » n'est pas tout à fait exact. En effet, un seul gène peut coder pour plusieurs protéines, et qui plus est, il existe des portions d'ADN qui

seront transcrites en ARN, sans production de protéines, ou encore des portions d'ADN qui ne seront pas transcrites mais auront tout de même une fonction. L'ADN comprend des régions codantes et des régions qui servent à réguler leur expression, mais également des régions longtemps qualifiées d'« ADN poubelle » car de fonction inconnue, et qui s'avèrent aujourd'hui essentielles pour la structure, l'organisation et la fonction du génome. Ainsi, le génome ne représente pas simplement l'ensemble des gènes, il est la séquence complète de l'ADN d'un organisme.

Chez les procaryotes, le nombre de gènes et la taille du génome sont parfaitement corrélés. En revanche, chez les eucaryotes, la complexité des organismes n'est pas proportionnelle à la taille de leur génome (Figure 3). La comparaison de la proportion globale d'ADN non codant entre différentes espèces indique que chez les procaryotes, tels que les bactéries, environ 90% du génome est codant. Au fil de l'évolution, la quantité d'ADN codant présent dans les différents organismes diminue, pour atteindre moins de 2% pour l'Homme. Ainsi, de manière surprenante, il existe une relation évidente entre la complexité des organismes et la quantité d'ADN non codant qu'ils possèdent.

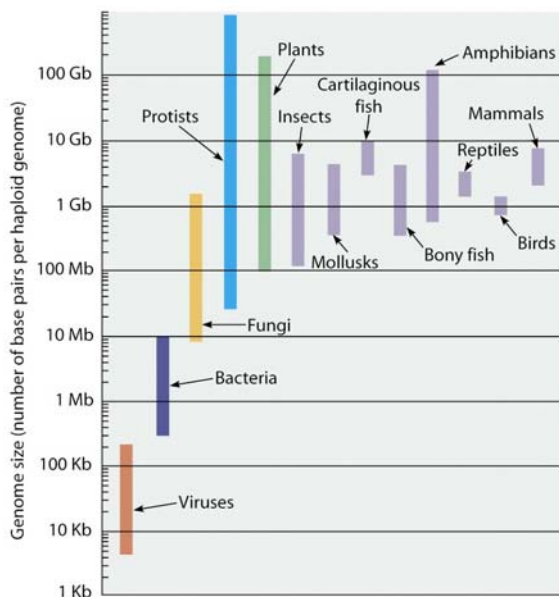


Figure 3 : Taille du génome en fonction de la complexité des organisme. D'après : <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/CB18.html>

I. La chromatine, support de l'information génétique et épigénétique

I.1. Structure et compaction de la chromatine

Le génome humain est composé de six milliards de paires de bases (pb), organisées en 46 chromosomes, et représentant une longueur totale d'ADN déroulé d'environ deux mètres. Or cet ADN est présent au sein du noyau cellulaire, dont le diamètre n'excède pas une dizaine de micromètres. Afin de pouvoir être contenu dans le noyau, l'ADN doit donc être compacté. Pour

cela, l'ADN est associé à des protéines particulières, les histones, pour former une structure appelée chromatine (Figure 4).

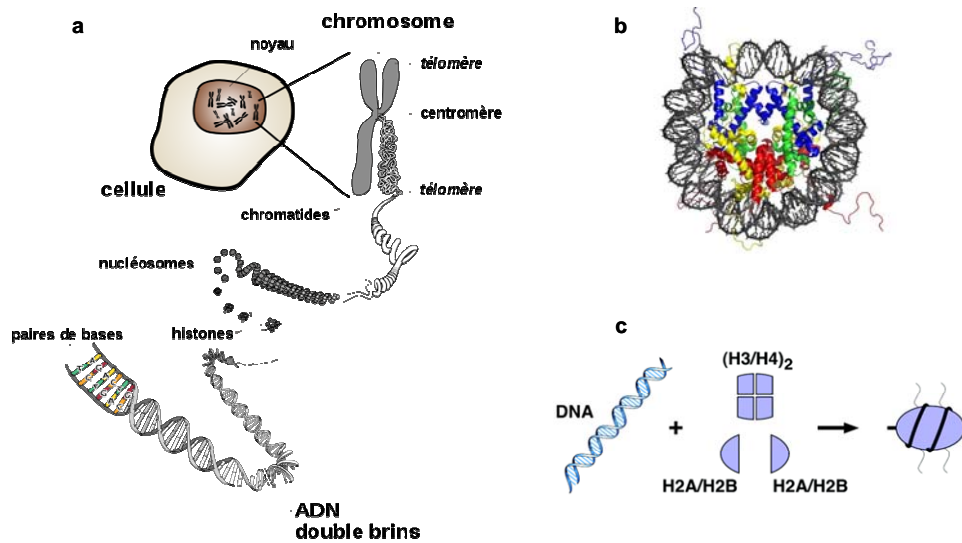


Figure 4 : Compaction de l'ADN. a) Enroulement de l'ADN sous forme de nucléosome et compaction en fibre de chromatine pour former le chromosome métaphasique, contenu dans le noyau de la cellule. b) Structure du nucléosome par diffraction aux rayons X, montrant la double hélice d'ADN (en noir) enroulée deux fois autour des 4 histones (4 couleurs) présentes chacune en deux exemplaires. *D'après Luger, K. et al., 1997, adapté : <http://www.christopher-vidal.com/thegenome.htm>* c) Représentation d'un nucléosome, composé d'un octamère des histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule l'ADN. *D'après Grewal SI, Moazed D, 2003.*

La chromatine contient l'information génétique et contrôle les fonctions cruciales du génome. C'est une structure dynamique qui peut se réorganiser au cours de différents processus tels que la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. Elle possède trois fonctions essentielles : compacter l'ADN, organiser les territoires et les fonctions chromosomiques (télomères, centromères), et moduler l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs régulateurs des fonctions nucléaires.

Les différents niveaux de compaction de la chromatine (Figure 6)

La chromatine des cellules eucaryotes constitue un polymère nucléoprotéique. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est composé de 146pb d'ADN enroulées autour d'un octamère protéique, comprenant deux exemplaires de chacune des histones de cœur – H2A, H2B, H3 et H4 (Luger and Richmond, 1998), (Kornberg and Lorch, 1999). Les nucléosomes sont reliés entre eux par un fragment d'ADN internucléosomique ou ADN de liaison. Le nucléofilament de 11nm de diamètre ainsi formé ressemble à un collier de perles (chaque perle correspondant à un nucléosome) régulièrement espacées le long du brin d'ADN.

L'ADN de liaison interagit avec une autre protéine histone, H1, dite « histone de liaison ». Les histones H1 permettent la compaction des nucléosomes pour former la fibre de 30nm. L'architecture et le mode de compaction de cette fibre de 30 nm ne sont pas clairement définis et deux modèles d'organisation sont actuellement proposés (Figure 5). Dans le premier modèle, le modèle du solénoïde, l'ADN compris entre deux nucléosomes se courbe pour permettre

l'enroulement du nucléofilament en une structure de forme hélicoïdale. Dans le deuxième modèle, le nucléofilament est considéré comme une structure de type rigide adoptant une forme en « zig-zag » (Woodcock and Dimitrov, 2001).

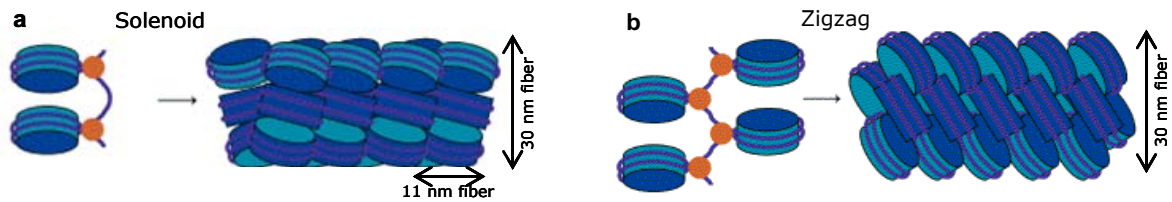


Figure 5 : Représentation schématique des deux modèles de compaction de la fibre de 30nm. a) modèle du solénoïde, b) modèle en zig-zag. Les ronds oranges représentent les histones de liaison H1. *D'après Khorasanizadeh S., 2004*

Les stades ultérieurs de compaction sont mal connus, notamment en raison de l'absence jusqu'à récemment d'outils techniques performants pour les étudier. La fibre de 30 nm forme une fibre de 300 nm qui est empaquetée pour finalement aboutir à la formation du chromosome métaphasique, stade ultime de compaction. En 1998, Ostashevski propose un modèle d'organisation en boucles définies par la séquence d'ADN ; dans ce modèle, deux types de régions de composition différente, les premières riches en G-C, les secondes riches en A-T, sont disposées alternativement. L'incompatibilité A-T / G-C engendrerait la formation de boucles dont la taille moyenne serait de 1-2 Mb (Ostashevsky, 1998).

L'organisation des chromosomes métaphasiques est complexe et dépend de leur séquence d'ADN et de leur organisation chromatinienne. L'un des modèles de référence est le modèle proposé par Laemmli en 1994, basé sur l'observation de la structure du chromosome métaphasique à l'aide de molécules fluorescentes. Ce modèle établit un lien entre la structure du chromosome et sa composition en bandes chromosomiques (Saitoh and Laemmli, 1994). Le chromosome métaphasique serait composé d'un squelette protéique sur lequel l'ADN s'ancrerait en formant des boucles (Earnshaw and Laemmli, 1983). Les séquences d'ADN permettant l'attachement au squelette sont des séquences riches en A-T, les Scaffold Attachment Regions ou SAR. La différence de coloration des bandes chromosomiques serait liée à la taille des boucles et à leur composition en ADN (Saitoh and Laemmli, 1994), mais pourrait également être définie par leur profil d'histones modifiées (Barski et al., 2007).

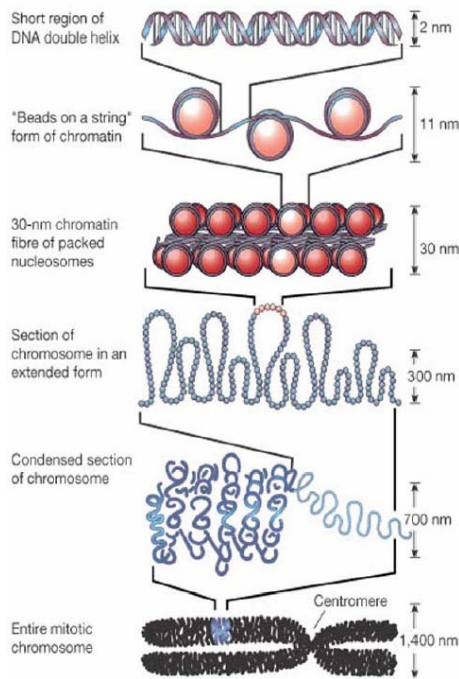
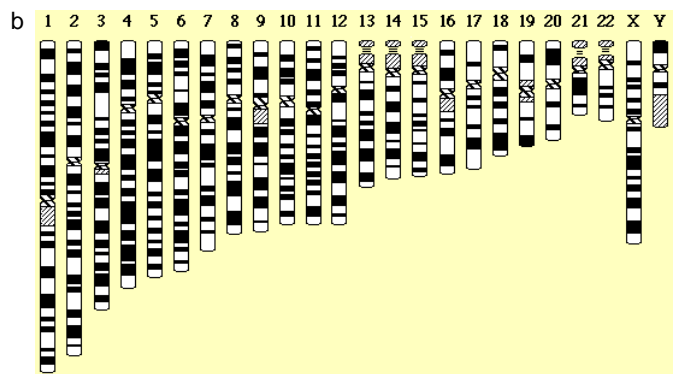
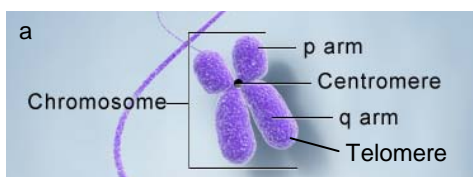


Figure 6 : Empaquetage de l'ADN ; organisation de l'ADN au sein de la structure de chromatine. Le niveau le plus faible d'organisation est le nucléosome ; au niveau d'organisation suivant, le nucléofilament est enroulé en fibre de 30nm de diamètre ; ces fibres sont ensuite repliées en structures d'ordre supérieur, jusqu'au stade de chromosome métaphasique. (Redrawn from ref. 41, with permission).
D'après Felsenfeld & Groudine, 2003

Chez l'homme, on compte 46 chromosomes : 22 paires d'autosomes et 2 chromosomes sexuels. Le chromosome métaphasique est divisé en deux bras, p et q, par le centromère (ou constriction primaire). Les extrémités des chromosomes sont constituées des télomères. Certains chromosomes portent aussi une constriction secondaire en position juxta-centromérique (1q12, 9q12, 16q12) ou juxta-télomérique (Yq12) (Figure 7).

Figure 7 : a) Organisation d'un chromosome métaphasique. b) Caryotype humain, indiquant l'organisation en bandes chromosomiques.



L'euchromatine et l'hétérochromatine

L'étude de la compaction du génome, par l'utilisation de colorants spécifiques, a permis de différencier deux types de chromatine : en 1928, le botaniste Emile Heitz décrit l'euchromatine (ou « chromatine vraie ») apparaissant modérément colorée en interphase au cours de laquelle elle se décondense, et l'hétérochromatine (ou « autre chromatine ») correspondant aux régions chromosomiques restant condensées, et donc colorées, en interphase. Au fur et à mesure de la caractérisation de ces 2 entités, plusieurs critères sont venus préciser ces différences : la composition en ADN, le statut chromatinién, le statut transcriptionnel (Henikoff et al., 2000),

(Jenuwein and Allis, 2001), mais également la chronologie de réplication (Hiratani and Gilbert, 2009) ou encore l'organisation spatiale dans le noyau (Cremer and Cremer, 2001).

Ainsi, l'euchromatine serait associée à des modifications chimiques et à des protéines favorisant une structure décompactée, accessible à divers facteurs de régulation notamment transcriptionnels, et est ainsi permissive à la transcription. A l'inverse, l'hétérochromatine est caractérisée par une composition en séquences génomiques et/ou en modifications chimiques et en protéines induisant une structure fortement compactée, globalement non permissive à la transcription, car peu accessible aux facteurs régulateurs. De plus, elle se réplique tardivement au cours de la phase S, et serait préférentiellement localisée en périphérie nucléaire.

I.2. Régulation de l'organisation et de la fonction de la chromatine – l'épigénétique

Chacune de nos cellules possède le même contenu génétique, puisque l'ADN, hérité de nos parents, se transmet au fil des divisions cellulaires à toutes les cellules, qui acquerront cependant des identités et des fonctions différentes au cours du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire. Quelle est alors la différence entre un neurone, une cellule immunitaire et une cellule cardiaque ? La différence est « épigénétique ».

En effet, si toutes les cellules de notre organisme ont le même nombre de gènes, seuls certains d'entre eux sont activés dans une cellule donnée. En fonction notamment du type cellulaire, certains gènes sont « verrouillés » afin d'empêcher leur expression. Essentielle au fonctionnement de la cellule, l'information sur le verrouillage ou le déverrouillage du génome n'est pas portée par la séquence d'ADN, mais se trouve au niveau de la chromatine. L'expression des gènes est ainsi modulée par des paramètres d'ordre épigénétique, qui dictent l'organisation de la chromatine au sein du noyau, et, lorsqu'ils sont hérités, permettent de propager l'identité et la diversité des types cellulaires au cours du développement d'un organisme.

I.2.1. L'épigénétique, définition

La chromatine permet de réguler les fonctions essentielles à la vie cellulaire. Il est donc nécessaire de contrôler sa formation, son maintien et sa transmission au cours des divisions cellulaires et des processus de différenciation. Ce contrôle est assuré par différents mécanismes responsables de la régulation de l'information dite épigénétique.

L'épigénétique représente l'étude des informations portées par la chromatine, réversibles et héréditaires lors des divisions cellulaires, et qui ne sont pas codées par la séquence d'ADN. L'ensemble de ces informations constitue l'épigénome.

Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur l'épigénome, cette définition s'est étendue au-delà de la stricte information portée par le nucléosome (ADN et histones), et aujourd'hui, différents niveaux d'information – depuis l'échelle du nucléosome jusqu'à l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau – sont considérés comme épigénétiques. Ainsi, dans sa définition moderne, le terme épigénétique désigne des paramètres, héréditaires au cours des divisions cellulaires, qui contribuent à la régulation d'états fonctionnels au sein d'une cellule sans affecter directement la séquence d'ADN (Ray-Gallet D, Gérard A, Polo S, Almouzni G, *Medecine/Sciences* 2005 ; 21 : 384-9).

Les mécanismes responsables de la mise en place de l'information épigénétique décrits à ce jour incluent :

- les modifications chimiques de l'ADN et des histones (méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones)
- l'incorporation de variants d'histones
- le remodelage de la chromatine
- la production de petits ARN non-codants / l'ARN interférence
- l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau

L'ensemble de ces « paramètres épigénétiques » définit un état de compaction de la chromatine et conditionne divers processus vitaux tels que la réplication, la transcription, la réparation ou encore la recombinaison.

La chromatine est une structure dynamique. La mise en place, et la régulation / modulation des informations épigénétiques est assurée par l'action d'enzymes et de complexes protéiques spécifiques, recrutés directement ou indirectement (via d'autres facteurs) sur leur site d'action. L'ensemble de ces acteurs interagit pour permettre une réorganisation locale ou globale de la chromatine et *in fine*, une régulation des diverses fonctions cellulaires énoncées ci-dessus.

I.2.2. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) sur le carbone C5 d'une cytosine (5-méthylCytosine). Cette réaction chimique est catalysée par des enzymes appelées ADN méthyltransférases (DNMT), à partir de S-adenosyl-méthionine (SAM) (Figure 8).

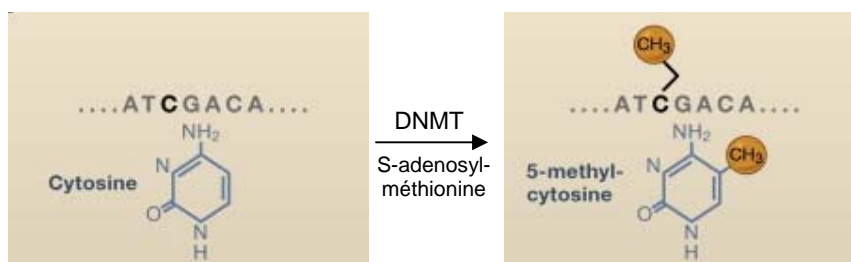


Figure 8 : Réaction de méthylation d'une cytosine au sein d'un dinucléotide CpG, catalysée par une DNMT à partir de SAM, d'après Bernstein BE, 2007

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu sur les dinucléotides CpG (c'est-à-dire lorsque la cytosine précède une guanine sur la séquence d'ADN), qui sont globalement peu abondants dans le génome, exceptés au niveau de courtes régions d'ADN appelées « îlots CpG ». Ces îlots CpG sont principalement retrouvés dans les régions promotrices des gènes (Ioshikhes and Zhang, 2000), et leur méthylation est essentielle pour les gènes soumis à l'empreinte parentale, et pour les gènes du chromosome X inactif chez les mammifères femelles. Cependant, la plupart des autres promoteurs n'est pas méthylée (Bird, 2002; Weber et al., 2007). Mis à part les promoteurs des gènes, d'autres régions du génome sont concernées par la méthylation de l'ADN : ce sont les régions hétérochromatiques, et en particulier l'ADN de l'hétérochromatine péri-centromérique qui est fortement méthylé.

La méthylation de l'ADN se produit dans les bactéries, les levures, les plantes et les animaux, cependant son rôle ainsi que les patrons de méthylation / le pourcentage de cytosines méthylées varient de manière importante selon les espèces et les organismes. Par exemple, la méthylation de l'ADN ne serait pas présente chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Schyzosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* (bien que chez cette dernière, les données de la littérature sont parfois contradictoires – ce qui pourrait être expliqué en partie par des différences de sensibilité entre les méthodes utilisées pour détecter la méthylation de l'ADN) (Hendrich and Tweedie, 2003; Lyko, 2001; Suzuki and Bird, 2008).

La méthylation de l'ADN est un processus essentiel pour le développement embryonnaire (Green et al., 2007), et de plus, des altérations de la méthylation sont liées à de nombreuses maladies humaines, y compris aux cancers (Egger et al., 2004) ; cet aspect sera développé dans la 3^{ème} partie de l'introduction.

D'autre part, il est à noter la description croissante de 5-hydroxyméthylcytosines, présentes notamment dans le génome des cellules souches embryonnaires de souris. L'hydroxylation des cytosines méthylées serait importante pour la différenciation normale, et serait impliquée dans les pathologies myéloïdes. Elle est catalysée par les protéines de la famille TET (Ten-Eleven Translocation), suggérant un rôle important de ces protéines dans les mécanismes de régulation épigénétique (Tahiliani et al., 2009), (Bernard OA et al., M/S oct 2009).

I.2.2.a. Les ADN méthyltransférases – DNMT

Il existe trois grandes familles d'ADN méthyltransférases chez les mammifères : DNMT1, DNMT2 et DNMT3. Elles présentent toutes une structure similaire, avec deux domaines distincts : une partie N-terminale variable responsable de leur localisation nucléaire et contenant des sites d'interaction protéine-protéine, et une partie C-terminale plus conservée contenant le domaine catalytique commun à toutes les DNMT ainsi qu'un domaine de fixation à l'ADN (Cheng and Blumenthal, 2008; Goll and Bestor, 2005; Leuba et al., 2004; Robertson, 2002) (Figure 9a).

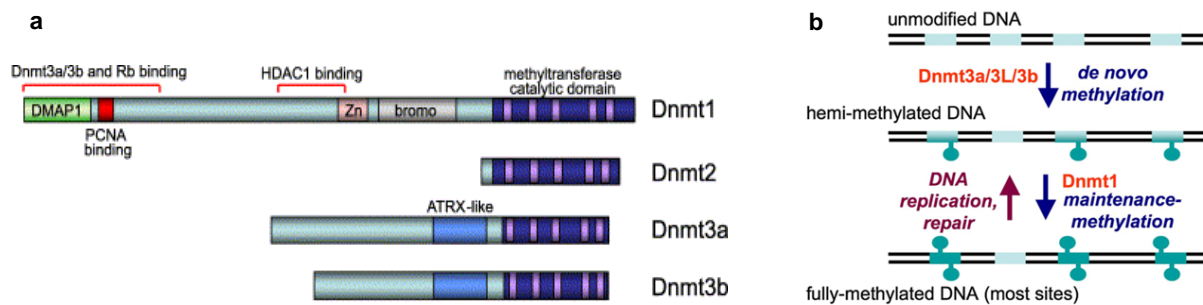


Figure 9 : a) Les principales DNMT, d'après Zlatanova J, 2004 ; b) méthylation de novo et de maintien, d'après Cheng X & Blumenthal RM, 2008

On peut distinguer 2 groupes de DNMT à activité ADN méthyltransférase : les DNMT de maintien (DNMT1) et les DNMT *de novo* (DNMT3a et DNMT3b).

Les DNMT de maintien

Elles permettent la méthylation de l'ADN préalablement hémi-méthylé (méthylé sur un seul des deux brins) ; au cours de la réplication, elles rétablissent le patron de méthylation du brin d'ADN néo-synthétisé (et donc non méthylé) en le méthylant.

DNMT1 est l'enzyme représentative de cette catégorie. Elle est présente dans les tissus somatiques (Bestor, 2000). En phase G1, elle est distribuée de manière uniforme dans le noyau. Au cours de la phase S, elle se relocalise dans des foyers correspondant à des sites majeurs de réplication de l'ADN (Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998). Les embryons DNMT1^{-/-} (dont le génome est fortement déméthylé) ne sont pas viables, suggérant l'importance de la méthylation de l'ADN au cours du développement embryonnaire (Jackson-Grusby et al., 2001), (Robertson, 2001).

Il existe plusieurs isoformes de DNMT1 résultant d'épissages alternatifs, qui présentent des tissu-spécificités et/ou des fonctions différentes : DNMT1b (Bonfils et al., 2000), DNMT1o (forme tronquée de DNMT1 exprimée uniquement dans l'oocyte (Cirio et al., 2008; Howell et al., 2001; Ko et al., 2005; Mertineit et al., 1998; Yu et al., 2009), Dnmt1p (ARN non-codant spécifique des spermatozoïdes qui interfère avec la machinerie de traduction et empêche la synthèse de DNMT1 (Ko et al., 2005; Mertineit et al., 1998)).

Les DNMT de novo

Elles méthylient les dinucléotides CpG non méthylés générant un ADN hémi-méthylé puis méthylé sur les 2 brins. L'altération de la méthylation due aux DNMT *de novo* serait impliquée dans les processus de prolifération, de différenciation cellulaire ainsi qu'au cours de la tumorigenèse. Les enzymes DNMT3A et DNMT3B, appartenant à la famille DNMT3, font partie de cette catégorie. Les protéines de la famille DNMT3 possèdent toutes en position N-terminale un domaine riche en cystéine, le domaine PHD (Plant Homeotic Domain) ou région ATRX-like. ATRX est un membre de la famille SWI2/SNF2 (complexe de remodelage de la chromatine), localisé dans les régions péri-centromériques (Gibbons et al., 2000).

Le transcrit Dnmt3a est ubiquitaire dans les tissus adultes, dans les cellules ES et au stade précoce de développement de l'embryon (J10.5) (Okano et al., 1998a). L'expression de DNMT3A semble indépendante du cycle cellulaire (Robertson et al., 1999) et se localise au niveau de foyers nucléaires distincts non associés aux foyers de réplication au cours de la phase S. On retrouve une colocalisation de ces foyers DNMT3A au niveau des régions hétérochromatiques en fin de phase S (Bachman et al., 2001).

Les souris Dnmt3a^{-/-} semblent normales à la naissance puis présentent un retard de développement et meurent au bout de 4 semaines. D'autre part, une étude très récente indique que DNMT3A serait recrutée à la chromatine via la reconnaissance de la lysine 4 non méthylée de l'histone H3 par son domaine ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), et pourrait alors établir une méthylation *de novo*. De manière intéressante, cette étude montre également une liaison mutuellement exclusive entre le domaine ADD de DNMT3A et le chromodomaine de HP1 α au niveau de l'extrémité N-ter de H3 (Otani et al., 2009).

Dans les tissus adultes, Dnmt3b est exprimée essentiellement au niveau des testicules, de la thyroïde et de la moelle osseuse (Okano et al., 1998a), (Robertson et al., 1999) (Xie et al., 1999). Sa distribution dépend du type cellulaire (Bachman et al., 2001). DNMT3B présente chez l'humain 5 isoformes produites par épissage alternatif : DNMT3B1-5 (Okano et al., 1998a), (Robertson et al., 1999), (Robertson, 2002).

Les souris Dnmt3b^{-/-} ne sont pas viables. De manière intéressante, l'analyse de la méthylation chez ces mutants a montré une forte hypométhylation des régions péri-centromériques au niveau des séquences satellites suggérant que ces régions sont les cibles de Dnmt3b. DNMT3B est mutée dans le syndrome ICF (Immunodeficiency Centromeric instability Facial anomalies), (Xu et al., 1999). Cette mutation provoque une hypométhylation des régions hétérochromatiques péri-centromériques (1q12, 9q12 et 16q12, composées de séquences satellites 2 et 3) générant une instabilité chromosomique (Jeanpierre et al., 1993).

Les autres DNMT

DNMT3L (DNMT3-like) appartient aussi à la famille DNMT3, mais bien qu'elle présente une grande homologie de séquence avec les autres DNMT, elle ne possède pas d'activité enzymatique. Elle est exprimée exclusivement dans les cellules germinales au moment de l'établissement de la méthylation *de novo* de l'ADN, et en particulier sur les gènes soumis à l'empreinte parentale (Bourc'his et al., 2001). DNMT3L est capable de réguler l'activité catalytique des deux autres membres de la famille DNMT3 mais pas de DNMT1 (Suetake et al., 2004), et serait régulée via la méthylation de son promoteur (Hu et al., 2008). DNMT3L interagit avec DNMT3A et DNMT3B, et serait capable de reconnaître la lysine 4 non méthylée de l'histone H3 (Ooi et al., 2007), suggérant qu'elle pourrait diriger la méthylation *de novo* sur ces régions (Ooi et al., 2009). Les souris déficientes en DNMT3L sont viables mais stériles (Bourc'his et al., 2001).

La protéine DNMT2 est la plus conservée et la plus représentée parmi de nombreuses espèces. Elle ne possède pas de domaine régulateur ni d'activité ADN méthyltransférase. De plus, la délétion du gène codant pour DNMT2 chez la souris n'a pas d'effet sur l'embryon. Son rôle ne serait donc essentiel ni pour la méthylation de l'ADN ni au cours du développement embryonnaire (Okano et al., 1998b). Chez la drosophile, Dnmt2 est décrite comme une protéine à la fois cytoplasmique et nucléaire, et présente une forte activité ARNt méthyltransférase (Schaefer et al., 2009). Toujours chez la drosophile, Dnmt2 contrôlerait le silencing (dépendant de l'histone méthyltransférase Suv4-20) des rétrotransposons dans les cellules somatiques, et l'intégrité des télomères (Phalke et al., 2009). Enfin, des traitements à l'azacytidine inhiberaient la méthylation de l'ARN au niveau des sites cibles de DNMT2 dans des lignées cellulaires tumorales humaines (Schaefer et al., 2009).

I.2.2.b. Méthylation de l'ADN et silencing

La méthylation de l'ADN permet le maintien de l'intégrité du génome et est impliquée dans la régulation spatio-temporelle de l'expression génique. Elle est corrélée à la répression transcriptionnelle, notamment pour les gènes tissu-spécifiques et les gènes soumis à l'empreinte parentale, et sa dérégulation a été impliquée dans diverses pathologies dont les cancers. D'autre part, l'incorporation dans l'ADN d'analogues non méthylables de la cytosine, tels que la 5-aza-2'-deoxycytidine, entraîne la déméthylation de l'ADN et l'expression de gènes jusqu'alors maintenus inactifs (Attwood et al., 2002). Les mécanismes impliqués dans la répression médiée par la méthylation de l'ADN seront abordés plus loin.

Si les DNMT sont responsables de la mise en place et du maintien de la méthylation de l'ADN, de nombreux facteurs, interagissant directement ou indirectement avec elles, seraient impliqués dans la signalisation moléculaire permettant notamment le bon ciblage de la méthylation par les DNMT (pour revue, (Ooi et al., 2009)).

I.2.3. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones composant la chromatine eucaryote sont connues depuis le 19^{ème} siècle (Kossel, 1884). Les 5 types d'histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 ont été observés pour la première fois en 1965 par Philips et Johns. Elles comptent parmi les protéines eucaryotes connues les plus conservées. En effet, elles sont retrouvées chez les animaux, les plantes, les eucaryotes inférieurs, et même récemment chez des archéobactéries, règne distinct des végétaux et des animaux (Wolffe and Kurumizaka, 1998), (Malik and Henikoff, 2003). Cette extrême conservation au cours de l'évolution traduit leur rôle essentiel dans la chromatine. Elles sont classées en deux familles : les histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) et les histones de liaison (H1) (Wolffe and Kurumizaka, 1998).

Les histones de cœur sont de petites protéines de poids moléculaires compris entre 11 et 22 kDa. Ce sont des protéines riches en résidus basiques (lysine et arginine) conférant à ces protéines des charges positives leur permettant de lier fortement l'ADN par des interactions électrostatiques (Clark and Kimura, 1990). Malgré une faible homologie de séquence, les structures secondaires et tertiaires des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 sont très similaires. Chaque histone est organisée en deux domaines. La partie globulaire centrale, ou « histone fold », est constituée d'une succession de trois hélices alpha reliées par deux courtes boucles. L'extrémité N-terminale est très labile et constituée d'une trentaine d'acides aminés basiques, ce qui la rend fortement chargée positivement (Arents et al., 1991); (Arents and Moudrianakis, 1995).

Les histones sont sujettes à des modifications post-traductionnelles, essentiellement au niveau de leurs queues N-terminales ; ce sont du moins les plus étudiées. En fonction du type de modification, le niveau de compaction de la chromatine va être modifié, par exemple en altérant les interactions ADN / histones, ce qui va en conséquence moduler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs régulateurs impliqués dans les grandes fonctions cellulaires.

Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant être mises en place au niveau des histones, parmi lesquelles l'acétylation (sur les lysines), la méthylation (sur les lysines et les arginines), la phosphorylation (sur les sérines et les thréonines), l'ubiquitinylation (sur les lysines), ou encore la sumoylation (sur les lysines) ; les histones peuvent être aussi ADP-ribosylées et glycosylées (Bhaumik et al., 2007), (Kouzarides, 2007). Seules l'acétylation et la méthylation seront détaillées ici.

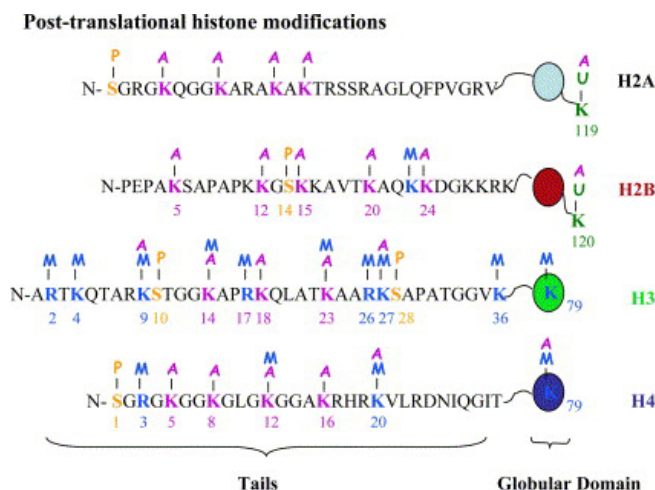


Figure 10 : Principales modifications post-traductionnelles décrites aux niveaux des histones H2A, H2B, H3 et H4. A, acétylation ; M, méthylation ; P, phosphorylation ; U, ubiquitinylation. D'après Santos-Rosa H, Caldas C, 2005

Des approches techniques récentes combinant ChIP et séquençage (ChIP-Seq) permettent désormais d'établir de véritables « cartes épigénétiques » de haute résolution (Barski et al., 2007). L'emplacement de différents paramètres épigénétiques peut ainsi être localisé précisément sur le génome, pour un type cellulaire ou un stade de développement donné (Araki et al., 2009; Rando and Chang, 2009; Wang et al., 2009) (Figure 11).

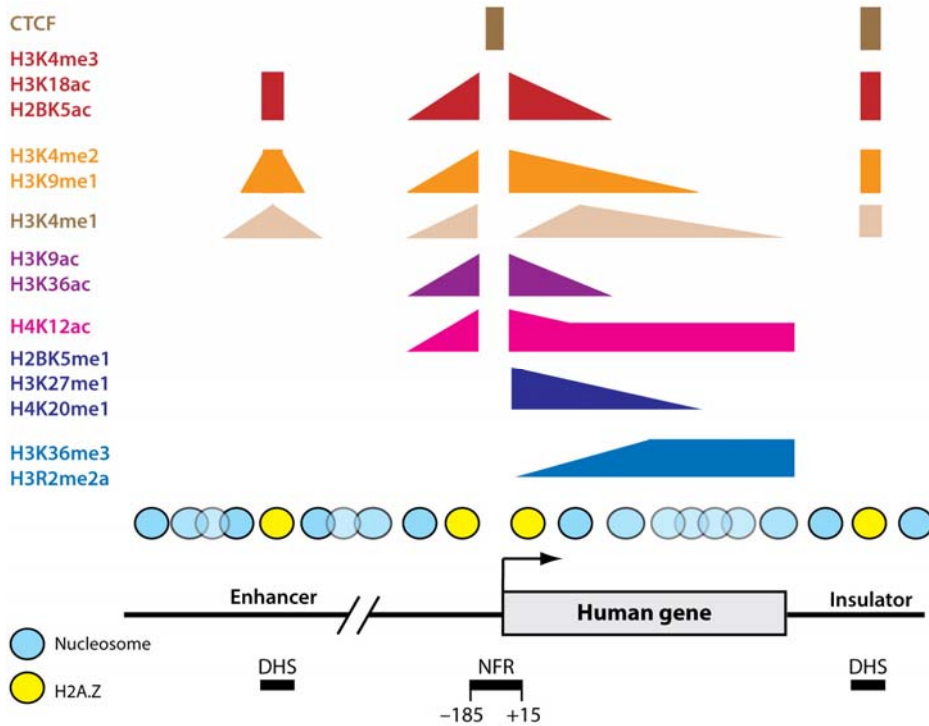


Figure 11 : Carte épigénétique caractéristique d'un gène actif chez l'homme. K, lysine ; R, arginine ; me1-3, mono-, di- et tri-méthylation, respectivement. D'après Rando OJ & Chang HY, *Annu Rev Biochem*, 2009

I.2.3.a. L'acétylation des histones

L'acétylation des histones correspond à l'ajout d'un groupement acétyl (COCH₃) sur les résidus lysine (K) des histones, à partir de l'acétyl Co-enzyme A. L'acétylation est un processus réversible, régulé par deux classes d'enzymes dont l'activité est antagoniste : les histones acétyltransférases (HAT), qui ajoutent un groupement acétyl, et les histones déacétylases (HDAC), qui l'enlèvent. Ainsi l'état d'acétylation des histones dépend de l'équilibre entre les activités enzymatiques antagonistes des HAT et HDAC (Figure 12).

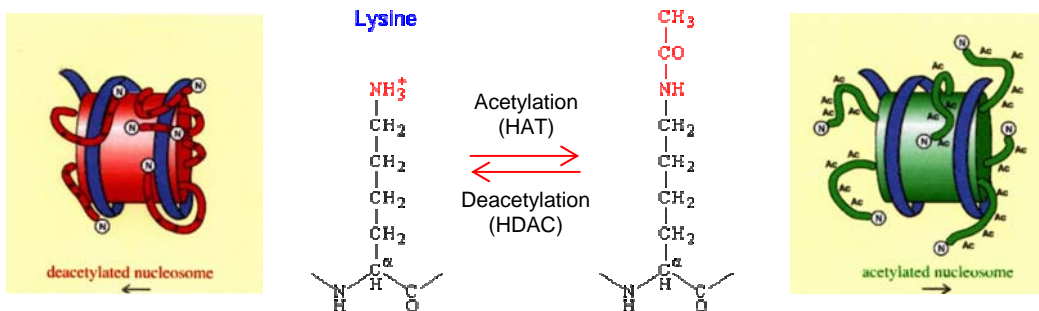


Figure 12 : Acétylation et déacétylation des lysines des histones. HAT, histone acétyltransférase ; HDAC, histone déacétylase. D'après <http://www.web-books.com/MoBio/Free/images/Ch4G1.gif> et <http://bricker.tcnj.edu/Amb/le9/Acy.jpg>

L'acétylation / déacétylation est ciblée sur des régions spécifiques (Strahl and Allis, 2000). Plus spécifiquement, des analyses « genome-wide » de localisation des HAT et HDAC sur le génome indiquent que ces deux enzymes seraient recrutées par l'ARNpolII sur les régions géniques actives, et que ce recrutement serait dirigé par la présence de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Wang et al., 2009). L'acétylation / déacétylation joue un rôle important dans la structure et la fonction de la chromatine (Shahbazian and Grunstein, 2007).

Le lien entre acétylation et activation transcriptionnelle a été suggéré pour la première fois en 1964 par Allfrey. De nombreux travaux montrent que les régions acétylées (histones H3 et H4) sont corrélées à l'activation de la transcription. A l'inverse les régions peu actives transcriptionnellement sont hypoacétylées (Turner, 2000). Il a été proposé que l'acétylation, en neutralisant les charges positives des lysines, diminuerait les liaisons électrostatiques entre l'ADN (chargé négativement) et les histones, avec comme conséquence une décompaction de la chromatine facilitant l'accessibilité de la séquence ADN correspondante aux facteurs de transcription (Workman and Kingston, 1998). D'autre part, l'acétylation constituerait un signal pour des protéines ayant de l'affinité pour la chromatine (telles que les protéines à bromodomaine), qui permettraient le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et conduirait donc à l'activation de la transcription (Strahl and Allis, 2000). De façon remarquable, une étude récente concerne la découverte que certaines protéines à bromodomaine peuvent lier deux marques d'acétylation sur une même histone via un unique bromodomaine (Moriniere et al., 2009).

L'acétylation n'est pas exclusivement corrélée à l'activation transcriptionnelle ; elle serait également mise en jeu dans la réplication et la réparation de l'ADN (Strahl and Allis, 2000) (Cheng and Blumenthal, 2008; van Attikum and Gasser, 2009; Zhang et al., 2009).

Les histone acétyltransférases - HAT

Six familles de HAT ont été décrites à ce jour : GNAT, MYST, P300/CBP, TAFII 250, les sous unités de TFIIC et la famille des coactivateurs des récepteurs nucléaires. Elles agissent généralement au sein de complexes protéiques impliquant notamment la machinerie de transcription. Ces enzymes ne semblent pas présenter de spécificité quant à la lysine qu'elles acétylent. D'autre part, l'activité acétyltransférase n'est pas uniquement restreinte aux histones puisque les HAT peuvent également acétyler des protéines non histones telles que des facteurs de transcription (comme le suppresseur de tumeur p53) ou des protéines chaperonnes (HSP) (Yang and Seto, 2007).

Les histone déacétylases - HDAC

Les histones déacétylases catalysent l'hydrolyse du groupement acétyl des résidus lysine acétylés. Chez les mammifères, 18 histones déacétylases ont été identifiées à l'heure actuelle. Ces enzymes sont classées en 4 familles, en fonction de leur homologie de séquence avec les HDAC de la levure *S. Cerevisiae*.

Les HDAC de classe I comprennent les HDAC 1, 2, 3 et 8. Elles sont ubiquitaires et ont une localisation nucléaire (Verdin et al., 2003).

Les HDAC de classe II sont subdivisées en 2 sous-classes : la sous-classe IIa, comprenant les HDAC 4, 5, 7 et 9, et la sous-classe IIb dans laquelle on retrouve les HDAC 6 et 10, qui possèdent deux domaines « déacétylase ». L'expression des HDAC de classe II est plus restreinte que celle des HDAC de classe I, suggérant un rôle plus spécifique, notamment au cours du développement et de la différenciation (Martin et al., 2007).

Les HDAC de classe III ou « famille des Sirtuines » comprennent 7 protéines apparentées à Sir-2 (Silent Information Regulator 2) : SIRT1-7. Il semble que seules SIRT1, 2, 3 et 5 possèdent une activité histone déacétylase ; cette activité est dépendante du NAD (Nicotinamide-Adénine-Dinucleotide) (Saunders and Verdin, 2007). SIRT2 pourrait présenter une spécificité pour la lysine 16 acétylée de l'histone H4 (Vaquero et al., 2006).

Les HDAC de classe IV, dont la seule répertoriée à ce jour est HDAC11 (Gao et al., 2002). Son expression est restreinte à certains tissus (rein, cœur, cerveau, muscle squelettique et testicule), suggérant des fonctions distinctes des autres HDAC.

Il est à noter que les inhibiteurs de HDAC (HDACi) présentent un grand intérêt clinique dans les traitements anti-tumoraux. Ces inhibiteurs seront abordés dans la partie 3 de l'introduction.

I.2.3.b. La méthylation des histones

La méthylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) sur les résidus lysine et arginine (des histones H3 et H4 principalement (Rice and Allis, 2001)). Les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés et les résidus arginine mono- ou di-méthylés (Figure 13). La méthylation est catalysée par les histone méthyltransférases (HMT) à partir de S-adénosyl-méthionine.

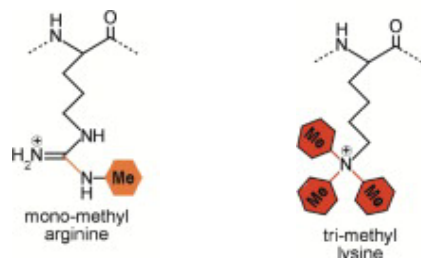


Figure 13 : La méthylation des histones sur les lysines et les arginines. Une arginine mono-méthylée et une lysine tri-méthylée sont représentées. *D'après Kubicek S, Jenuwein T, Cell 2004*

Contrairement à l'acétylation, la méthylation des parties N-terminale des histones ne modifie pas la charge du nucléosome. Par contre elle joue un rôle important dans le recrutement de facteurs régulant l'accessibilité de la chromatine.

La méthylation a une signification différente selon le résidu méthylé. Ainsi la méthylation des lysines 4 (Heintzman et al., 2007), 36 (Bannister et al., 2005) et 79 de l'histone H3 est corrélée avec l'activation transcriptionnelle (Kouzarides, 2007), alors que la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Bannister et al., 2001) et de la lysine 20 de l'histone H4 (Talasz et al., 2005; Vakoc et al., 2006) est associée à l'hétérochromatine, non permissive à la transcription (Noma et al., 2001), (Peters et al., 2002), (Schotta et al., 2004), (Peters and Schubeler, 2005) ; la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, quant à elle, est retrouvée notamment au niveau du chromosome X inactif, ou des gènes soumis à l'empreinte parentale (Boyer et al., 2006; Roh et al., 2006; Umlauf et al., 2004) et implique les régulateurs transcriptionnels de la famille Polycomb.

De même, la signification de la méthylation des histones dépendrait du contexte génomique (Table 1) :

Methylated histone	Location*	Transcriptional activity†	Transcriptional status‡
H3K4me3, H3K9me3	ORFs	Inducible	Dynamic
H3K9me3, H4K20me3	Pericentromeric heterochromatin	Constitutive	Silenced
H3K4me3, H3K27me3	Embryonic stem cell bivalent domains	Constitutive	Poised for transcription

*Where each dual modification is typically found in the genome.
†Whether the dual histone PTM is detected during transcription (inducible) or is present continuously (constitutive).
‡Whether the location of the dual histone PTM marks an inducible gene (dynamic), a silenced region, or a region that is currently transcriptionally repressed but can be activated (poised).

Table 1 : Signification de la méthylation des histones en fonction du contexte. *D'après Berger SL, Nature 2007*

Les histone méthyltransférases – HMT

Les histones méthyltransférases sont classées en deux groupes : les méthyltransférases de type I ou PRMT (Protein R (arginine) Methyltransferase), catalysant la méthylation des résidus arginines, et les méthyltransférases de type II ou HKMT (Histone K (lysine) Transferase), catalysant la méthylation des résidus lysine. Contrairement aux histone acétyltransférases, les histone méthyltransférases présentent une spécificité de résidus (Table 2).

Les histones méthyltransférases possèdent toutes un domaine SET (Su(var)3-0, Enhancer-of-zeste, Trithorax) hautement conservé, responsable de l'activité méthyltransférase (Jenuwein et al., 1998). La classification des HKMT est basée sur l'homologie de séquence avec les HMT de la levure et l'homologie de séquence des domaines SET entre eux, permettant de distinguer les familles SET1, SET2, SUV39, RIZ, et SUV4-20. La famille SET1 comprend les protéines de la famille Polycomb (qui seront détaillées plus loin) et Trithorax.

Histone and residue	Methyltransferase	Demethylase/deiminase	Function
H3R2	CARM1 (Mm, Hs)	-	
H3K4	- ySET1 (Sc) SET7/Set9 (Hs) MLL (Hs) Ash1 (Dm) Smyd3 (Hs)	PADI4 (Hs) - - - -	Activator/euchromatin Activator Activator Activator Activator
H3R8	- PRMT5	LSD1 (Hs) -	Repressor Repressor
H3K9	- SUV39h1/SUV39H1 (Mm, Hs) SUV39h2 (Hs) Clr4 (Sp) Dim5 (Nc) Kryptonite (At) G9a (Mm, Hs) Eu-HMTase1 (Hs) ESET/SETDB1 (Mm, Hs) E(z)/EZH2 (Dm, Hs) Ash1 (Dm)	PADI4 (Hs) - - - - - - - - -	DNA methylation/repressor/heterochromatin DNA methylation/heterochromatin Repressor/heterochromatin DNA methylation DNA methylation Imprinting/repressor Repressor Repressor/DNA methylation Repressor Activator Activator Activator
H3R17	CARM1 (Mm, Hs)	-	
H3R26	- CARM1 (Mm, Hs)	PADI4 (Hs) -	
H3K27	- E(z)/EZH2 (Dm, Hs) Ezh2 (Mm)	PADI4 (Hs) - -	Repressor X-chromosome inactivation/heterochromatin
H3K36	Set2 (Sc) NSD1 (Mm)	- -	Activator
H3K79	Dot1/DOT1L (Sc, Hs)	-	Repressor/DNA damage
H4R3	PRMT1	-	Activator
H4K20	- SET9 (Sp) Pr-SET7/Set8 (Hs, Dm) SUV4-20 (Hs) Ash1 (Dm) NSD1 (Mm)	PADI4 (Hs) - - - -	DNA damage Repressor Heterochromatin Activator
H1K26	EZH2 (Hs)	-	

The enzymes (species indicated in parentheses) are listed according to the histone residue they methylate. Known functions of each modification are shown in the fourth column. Mm, *Mus*

Table 2 : Spécificité des enzymes responsables de la méthylation et de la déméthylation des histones, et fonction(s) associée(s). *D'après Bannister AJ, Kouzarides T, Nature 2005*

La famille SUV39 comprend 4 membres : SUV39H1, SUV39H2, G9a et ESET. Les protéines de cette famille possèdent en position C-terminale un domaine SET de 130 acides aminés responsable de l'activité histone méthyltransférase, et en position N-terminale un motif chromodomaine qui leur permet de se lier aux lysines méthylées (Aagaard et al., 1999). Elles présentent une spécificité pour la lysine 9 de l'histone H3.

L'invalidation par knock-out de Suv39h1/2 chez la souris altère la viabilité cellulaire (mort des souris dans les stades tardifs du développement), induit une instabilité chromosomique (mauvaise ségrégation chromosomique), perturbe la spermatogenèse (hypogonadisme et perte de fertilité) et augmente le risque de tumorigenèse (Peters et al., 2001). Les souris doublement mutées développent des lymphomes B semblables aux lymphomes B malins non-Hodgkiniens humains. Cette étude montre le rôle crucial de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 au niveau de l'hétérochromatine péricentrique, médiée par SUV39H1/2, dans la protection de la stabilité du génome (Peters et al., 2001). De plus, elle dirige la méthylation de l'ADN au niveau des séquences répétées de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris (Lehnertz et al., 2003).

Les histone déméthylases – HDM

La méthylation des histones a longtemps été considérée comme une modification stable, du fait de l'absence de description d'enzymes capables d'enlever le groupement méthyl. La découverte récente des histones déméthylases a bouleversé la notion d'irréversibilité de la méthylation des histones (Lan et al., 2007). Par exemple, LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) est capable de déméthyliser la lysine 4 de l'histone H3, et participe ainsi à l'inhibition de la transcription (Lan et al., 2007). Depuis, d'autres protéines ont été identifiées comme histones déméthylases grâce à la présence d'un domaine LSD1 ou d'un domaine JmjC (Jumonji C) (Tian and Fang, 2007). Comme les HMT, ces enzymes possèdent certaines spécificités. Par exemple, LSD1 est capable de déméthyliser la lysine 4 de l'histone H3 quand elle est mono- ou di-méthylée, mais non quand elle est tri-méthylée. Aucune enzyme responsable de la déméthylation des arginines n'a encore été identifiée.

I.2.4. Les variants d'histone

Pour chaque histone, à l'exception de H4, il existe des « variants d'histone », qui sont codés par des gènes différents. L'incorporation de variants d'histones au sein du nucléosome introduit un degré supplémentaire de complexité. En effet, les variants d'histones peuvent induire des changements de structure du nucléosome et ainsi modifier les interactions entre l'ADN et les protéines. De plus, ces variants d'histones sont la cible de modifications post-traductionnelles.

Contrairement aux histones « classiques », l'incorporation des variants d'histones au sein du nucléosome peut avoir lieu en dehors de la phase de réplication de l'ADN. De plus, la localisation et l'expression des variants d'histones sont finement régulées selon le stade du développement ou le tissu considéré, suggérant qu'ils puissent avoir des fonctions précises, particulièrement importantes. A l'appui de cette hypothèse, de nombreuses pathologies humaines, telles que l'infertilité ou le cancer, sont associées à la perte de fonction de certains variants d'histones confirmant ainsi leur importance (Boulard et al., 2007).

Les variants d'histone sont classés sur la base de leur structure, de leur dépendance / indépendance de synthèse par rapport à la réplication et de leur spécificité tissulaire (Figure 14).

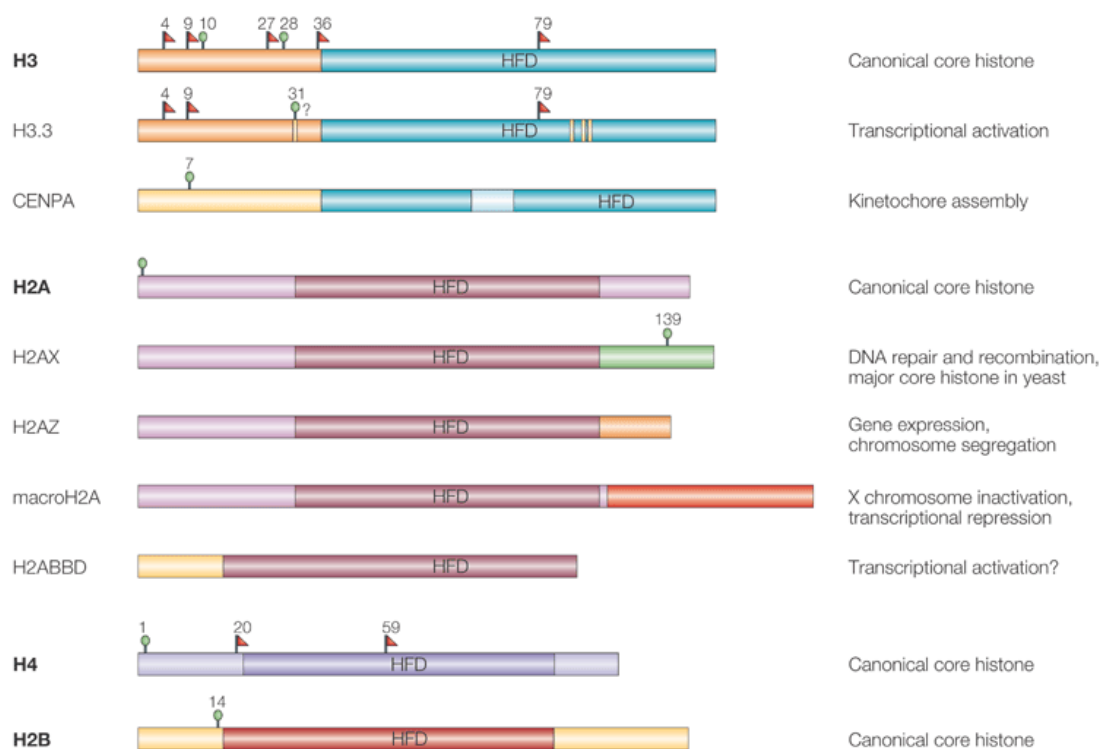


Figure 14 : Structure et fonction des principaux variants d'histone répertoriés à ce jour. Les variants sont indiqués sous leur histone canonique correspondante : nom, structure et fonction. Triangle rouge, méthylation ; rond vert, phosphorylation. *D'après Sarma K & Reinberg D, 2005*

En plus de ces principaux variants d'histone, il existe des variants qui sont exprimés uniquement dans le testicule : TH2A (Testis specific H2A), H2AL1 et H2AL2 (H2A-like 1 et 2) pour H2A (Rao et al., 1983), (Govin et al., 2007) ; TH2B (Testis specific H2B), TSH2B (Testis/Sperm specific H2B) et H2BFWT (H2B Family, member W, Testis specific) pour H2B (Sassone-Corsi 2002) ; et H3t (H3 testis specific) pour H3.

I.2.5. L'hypothèse du code histone

La mise en évidence d'une corrélation entre la combinaison de différentes modifications (au niveau de l'histone, du nucléosome ou du domaine nucléosomal) et certaines fonctions biologiques (transcription, réplication, réparation de l'ADN, recombinaison) a permis de proposer l'hypothèse du code histone (Strahl and Allis, 2000), (Turner, 2000), (Jenuwein and Allis, 2001) (Espada et al., 2007; Santos-Rosa and Caldas, 2005).

Selon ce modèle :

- la modification d'un résidu pourrait influencer la modification d'un autre résidu d'histone ; par exemple, sur l'histone H3 la méthylation de la lysine 9 et la phosphorylation de la sérine 10 s'inhibent mutuellement (Rea et al., 2000), la méthylation de la lysine 4 empêche celle de la lysine 9, tandis que sur l'histone H4 la méthylation de l'arginine 3 facilite l'acétylation des lysines 8 et 12 par p300 (Wang et al., 2001) (Figure 15).

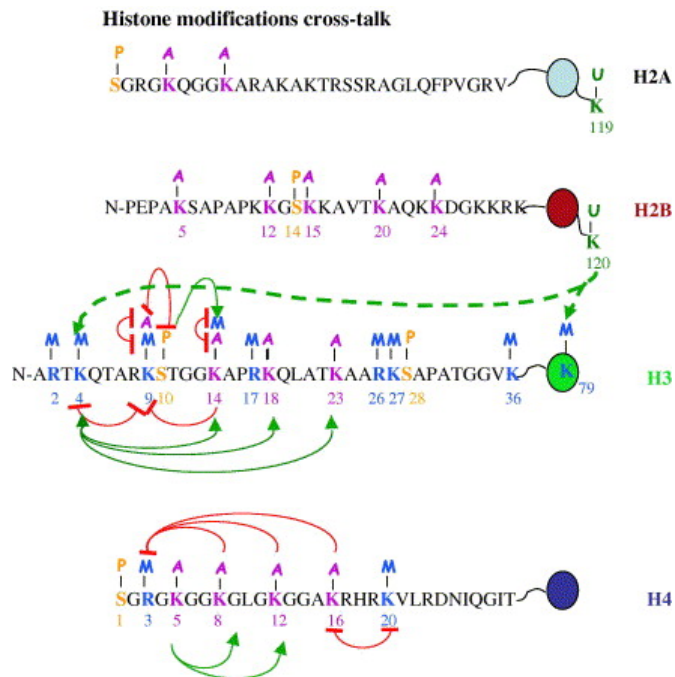


Figure 15 : Interactions entre différentes modifications post-traductionnelles. Les modifications "compatibles" (celles qui facilitent la mise en place d'autres modifications et/ou qui peuvent co-exister) sont représentées par des flèches vertes. Les modifications "incompatibles" (celles qui affectent négativement d'autres modifications et/ou qui ne peuvent pas co-exister) sont montrées en rouge. A, acétylation ; M, méthylation ; P, phosphorylation ; U, ubiquitylation. D'après Santos-Rosa H, Caldas C, 2005

- des combinaisons précises de modifications post-traductionnelles formeraient des signaux spécifiques pour le recrutement de facteurs protéiques (Strahl and Allis, 2000). Ainsi en fonction du type de modification post-traductionnelle des histones et selon les résidus modifiés, les facteurs recrutés sont différents (Jenuwein and Allis, 2001).

Les modifications post-traductionnelles des histones permettent le recrutement de facteurs protéiques pouvant agir de façon synergique ; ce recrutement s'effectue par le biais de motifs protéiques de reconnaissance spécifiques, comme par exemple les chromodomains (reconnaissant les résidus lysine méthylés) et les bromodomains (reconnaissant les résidus acétylés), présents dans certains facteurs de transcription et complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Le niveau de complexité et de variabilité du code histone est encore accru par l'incorporation de variants d'histone.

En accord avec cette hypothèse, de nombreux travaux ont permis de montrer l'importance des modifications post-traductionnelles des histones dans le contrôle des différentes fonctions biologiques (Strahl and Allis, 2000); (Turner, 2002); (Berger, 2002), (Munshi et al., 2009).

Lecture du code histone

Les modifications chimiques de l'ADN et des histones constituent des signaux pour le recrutement de protéines possédant des motifs de reconnaissance spécifiques des résidus modifiés (Strahl and Allis, 2000), (Turner, 2002). Grâce à ces motifs, ces protéines vont « lire » le code épigénétique et permettre son interprétation pour moduler des fonctions biologiques précises.

Ce chapitre abordera les protéines liant l'ADN méthylé et les protéines à chromodomaine.

I.2.5.a. Les protéines liant l'ADN méthylé : les MBP

Le signal « ADN méthylé » est lu par des protéines reconnaissant spécifiquement les dinucléotides CpG méthylés, les « Methyl-Binding Proteins » (MBP), qui recrutent des corepresseurs transcriptionnels pour former des structures chromatiniennes silencieuses. Chez les mammifères, 3 familles de MBP ont été décrites à ce jour (Sasai and Defossez, 2009) : la première famille comprend les protéines MBD1, MBD2, MBD4 et MeCP2, et lie l'ADN méthylé via le domaine MBD (Methyl-CpG Binding Domain) ; la deuxième famille comprend les protéines UHRF1 et UHRF2 qui lient l'ADN méthylé grâce à leur domaine SRA (SET and Ring finger-Associated domain) ; la troisième famille est formée de trois protéines à doigts de zinc : Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38 (Bogdanovic and Veenstra, 2009; Filion et al., 2006; Prokhortchouk et al., 2001).

Les premières identifiées et les plus décrites sont les protéines MBD (Bird and Wolffe, 1999) (Dhasarathy and Wade, 2008) (Bogdanovic and Veenstra, 2009) (Sasai and Defossez, 2009).

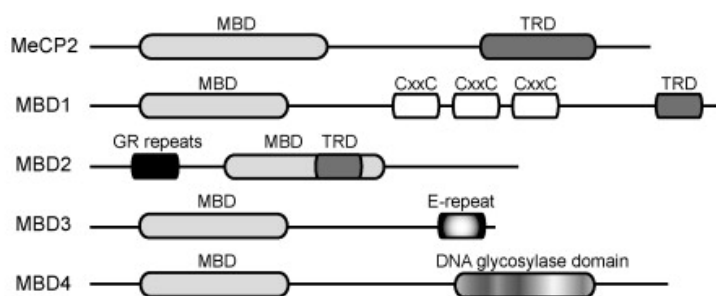


Figure 16 : Structure des MBD. MBD, Methyl Binding Domain ; TRD, Transcriptional Repression Domain ; CxxC, motif à doigt de zinc ; GR repeats, répétitions glycine / arginine. D'après Dhasarathy A, Wade PA, *Mutat Res*, 2008

- MECP2 (METHyl CpG binding Protein 2) est une protéine nucléaire de 53kD (Lewis et al., 1992), qui possède 2 domaines fonctionnels, le motif MBD responsable de la liaison à l'ADN méthylé et le motif TRD (Transcriptional Repression Domain) impliqué dans la répression de la transcription (Nan et al., 1993), (Nan et al., 1997), (Kaludov and Wolffe, 2000), (Hite et al., 2009). Cependant MECP2 est retrouvée comme étant souvent associée à des gènes transcriptionnellement actifs (Yasui et al., 2007). Elle serait également impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif (Young et al., 2005), et jouerait un rôle dans l'architecture de la chromatine (Georgel et al., 2003) notamment via la formation de boucles (« chromatine looping ») (Hite et al., 2009; Horike et al., 2005). Enfin, des mutations de MECP2 sont responsables du syndrome de Rett, une maladie neurodéveloppementale (Amir et al., 1999; Hite et al., 2009).

- En 1998, Hendrich et Bird ont identifié et caractérisé la famille MBD chez les mammifères. L'analyse des banques de données EST en recherchant le motif MBD a permis d'identifier 4 MBD, MBD1-4 en plus de MECP2 (Figure 15). Chez les mammifères, ces protéines sont ubiquitaires dans les tissus somatiques (Hendrich and Bird, 1998). Les gènes *MBD* peuvent

produire des transcrits alternatifs tissu-spécifiques ou produire des variants n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN méthylé (Hendrich and Bird, 1998).

- MBD1 est globalement localisée sur les régions euchromatiques mais se trouve enrichie au niveau de la région péri-centromérique du chromosome 1 (Fujita et al., 1999) et des centromères (Ng et al., 2000). La répression transcriptionnelle médiée par MBD1, MBD2 et MBD3 est associée à une activité histone déacétylase (Bogdanovic and Veenstra, 2009; Ng et al., 2000). MBD2 et MBD3 sont des sous-unités essentielles et mutuellement exclusives du complexe de remodelage Mi-2/NuRD (Bogdanovic and Veenstra, 2009; Feng and Zhang, 2001; Le Guezennec et al., 2006; Wade et al., 1999) ; il est à noter que MBD3 n'est pas capable de lier l'ADN méthylé (Saito and Ishikawa, 2002). MBD4 possède une activité de réparation spécifique de l'ADN méthylé via son motif catalytique T-G mismatch glycosylase (Hendrich et al., 1999), (Petronzelli et al., 2000), (Bogdanovic and Veenstra, 2009).

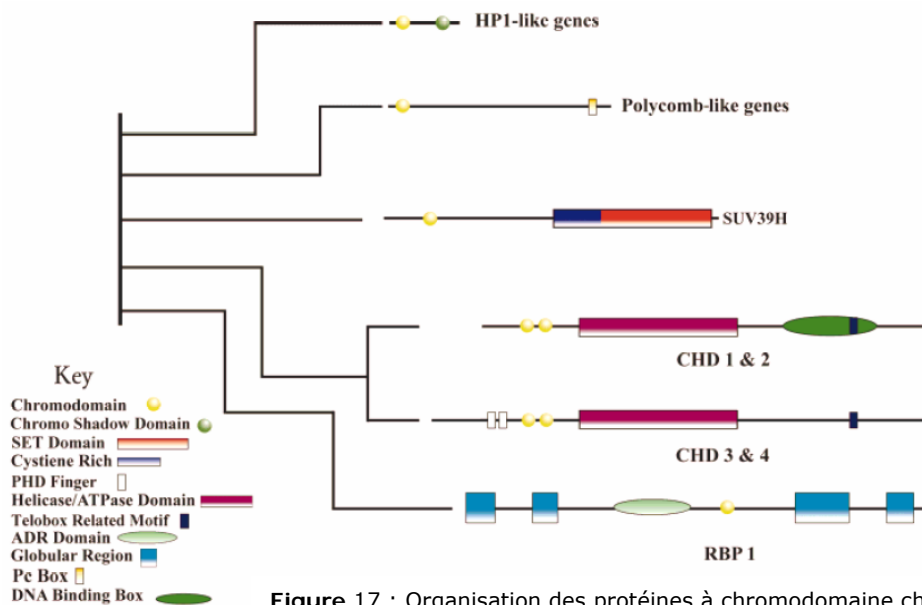
I.2.5.b. Les protéines à chromodomaine

Les chromodomaines (CHRomatin Organisation MODifier domain) n'ont été reconnus que récemment comme des motifs protéiques reconnaissant les résidus lysines méthylés ((Nielsen et al., 2002), (Min et al., 2003), (Fischle et al., 2003b)), mais ils avaient déjà été identifiés chez la drosophile au niveau des protéines HP1 et Polycomb (Paro and Hogness, 1991), (Pearce et al., 1992). Le chromodomaine est constitué d'une cinquantaine d'acides aminés hautement conservés au cours de l'évolution.

Le chromodomaine est souvent associé à des protéines ayant de l'affinité pour les régions hétérochromatiques, où la chromatine se trouve dans un état silencieux. Ces protéines interagissent avec des répresseurs de la transcription. Ainsi, la protéine HP1 est associée à l'hétérochromatine constitutive chez les mammifères (Saunders et al., 1993), (Wreggett et al., 1994) et Polycomb fait partie d'une famille de répresseurs de la transcription, identifiée chez la drosophile comme répresseurs stables des homéogènes (Orlando, 2003).

Cependant, le motif chromodomaine est également retrouvé dans des protéines associées à des fonctions activatrices de l'expression. Par exemple, chez la drosophile, la protéine MSL-3 porte un chromodomaine et est impliquée dans l'hyperactivation du chromosome X chez le mâle (Koonin et al., 1995), (Cavalli and Paro, 1998).

L'analyse fonctionnelle des protéines à chromodomaine chez les mammifères a permis de les classer en 5 familles : HP1, Polycomb, SUV39, CHD et RBP1 (Jones et al., 2000) (Figure 17 et figure 21). Après avoir abordé la famille SUV39, ce chapitre détaillera les protéines de la famille HP1 et Polycomb.



La famille SUV39

Comme décrit précédemment, les protéines de cette famille possèdent en position C-terminale un domaine SET responsable de l'activité histone méthyltransférase, et en position N-terminale un motif chromodomaine qui leur permet de se lier aux lysines méthylées (Aagaard et al., 1999). Elles présentent une spécificité pour la lysine 9 de l'histone H3.

Le chromodomaine servirait à la localisation de la protéine au niveau des régions hétérochromatiques, et en particulier il a été montré que la protéine SUV39H1 est retrouvée au niveau des régions centromériques et péri-centromériques chez les mammifères (Melcher et al., 2000).

La famille HP1

HP1 est une petite protéine nucléaire de 22 kDa, connue depuis les années 1970. C'est une protéine essentielle ; des mutants homozygotes pour HP1 chez la drosophile conduisent à la létalité au stade larvaire (Lu et al., 2000). HP1 est une protéine hautement conservée de la levure à l'Homme (Lomberk et al., 2006b).

En 2001, il a été montré pour la première fois que le chromodomaine de HP1 était capable de reconnaître et de lier avec une forte affinité, et de manière spécifique, la lysine 9 de l'histone H3 di- et tri-méthylée (Bannister et al., 2001), (Lachner et al., 2001) (Figure 21) ; le chromodomaine de HP1 ne semble pas pouvoir lier l'histone H3 méthylée sur la lysine 4 (Bannister et al., 2001).

Les protéines HP1 présentent toutes une structure commune ; elles sont composées de trois domaines distincts (Lomberk et al., 2006b) (Figure 18) :

- le chromodomaine est localisé dans la partie N-terminale de la protéine ; il est important pour

la liaison de HP1 à l'histone H3 di- ou tri-méthylée sur la lysine 9

- le domaine chromoshadow, localisé dans la partie C-terminale de la protéine, est impliqué dans l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de la protéine mais également dans l'interaction avec d'autres protéines
- la région « hinge » (charnière), localisée entre le chromodomaine et le domaine chromoshadow ; cette région contient un signal de localisation nucléaire et peut subir des modifications post-traductionnelles ; elle permet également la liaison à l'ARN.

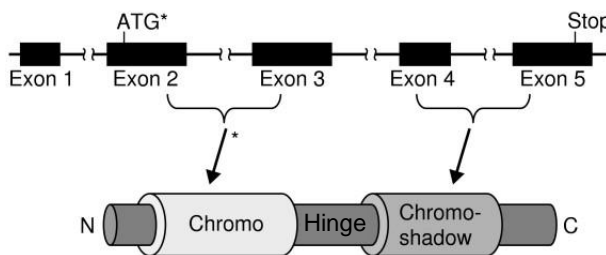


Figure 18 : Structure de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1). D'après Lomber G, Wallrath L & Urrutia R, *Genome Biol*, 2006

En plus du chromodomaine, les domaines chromoshadow et « hinge » seraient importants pour la localisation de la protéine, puisque la protéine HP1 délétée du domaine chromoshadow n'est plus capable de se localiser au niveau des régions hétérochromatiques (Powers and Eisenberg, 1993), et des mutations dans le domaine « hinge » altèrent les interactions et la distribution chromosomique de HP1 (Badugu et al., 2005).

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la protéine HP1 : HP1 α , HP1 β et HP1 γ , codées respectivement par les gènes *CBX5*, *CBX1* et *CBX3* (ChromoBoX genes). HP1 α et HP1 β ont une localisation hétérochromatique, notamment au niveau des régions péri-centromériques (Saunders et al., 1993), (Wreggett et al., 1994), (Furuta et al., 1997), alors que HP1 γ est présente dans les deux compartiments, euchromatine et hétérochromatine (Minc et al., 2000). Cette localisation différentielle serait régulée à la fois par des modifications post-traductionnelles et par des interactions avec d'autres protéines (Lomber et al., 2006a). La localisation d'HP1 dans les régions euchromatiques peut être associée à l'activation de la transcription (Hediger and Gasser, 2006).

Les protéines à chromodomaine comme SUV39 et HP1 jouent un rôle important dans la formation d'hétérochromatine et dans la répression de l'expression des gènes ; ces aspects seront développés plus loin.

La famille Polycomb

Les protéines de la famille Polycomb sont composées de plus de 300 acides aminés, et possèdent du côté C-terminal un motif Pc-box important pour leur fonction (pour revue, (Jones et al., 2000)). En 2002, il a été montré chez la drosophile que le chromodomaine de la protéine Polycomb avait la capacité de lier spécifiquement l'histone H3 méthylée sur la lysine 27 (Cao et al., 2002), (Czermin et al., 2002) (Figure 21). Les protéines de la famille Polycomb font partie

des complexes multi-protéiques PRC1 et PCR2 (Polycomb Repressive Complex 1/2) chez l'homme (Figure 19). Les protéines EZH1 et EZH2 présentent, en plus du chromodomaine, un domaine SET responsable de l'activité histone méthyltransférase du complexe PRC2 (pour revue, (Simon and Kingston, 2009)).

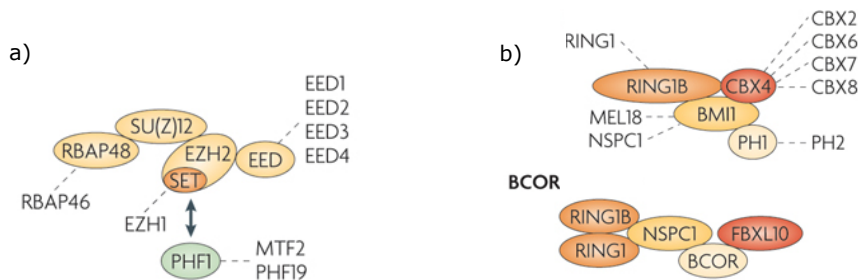


Figure 19 : Les complexes PRC (Polycomb Repressive Complex) humains. a) Le complexe PRC2. L'activité méthyltransférase est assurée par la sous-unité catalytique EZH2 qui contient le domaine SET. b) La famille PRC1 constituée de 2 complexes, PRC1 proprement dit et BCOR (BCL6 corepressor). Les traits pointillés indiquent les sous-unités alternatives du complexe ; la flèche indique une interaction protéique. *D'après Simon JA, Kingston RE, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) assurent le maintien d'un état chromatinien répressif régulé au cours du développement. Des centaines de gènes sont réprimés par les protéines Polycomb, dont des douzaines qui codent pour des régulateurs développementaux cruciaux dans des organismes allant de la plante à l'homme.

Elles ont été identifiées pour la première fois chez la drosophile, où elles sont nécessaires à la répression de l'expression des gènes *Hox* et au maintien de ces gènes dans un état silencieux au cours du développement (pour revue (Orlando, 2003)). Chez les mammifères, les protéines Polycomb sont notamment impliquées dans la répression des gènes du développement et des gènes soumis à l'empreinte et dans l'inactivation du chromosome X (Okamoto et al., 2004). Elles sont également nécessaires à l'hématopoïèse et au contrôle du cycle cellulaire (pour revue, (Schumacher and Magnuson, 1997)), et au développement des cellules B (Su et al., 2003) (Figure 20).

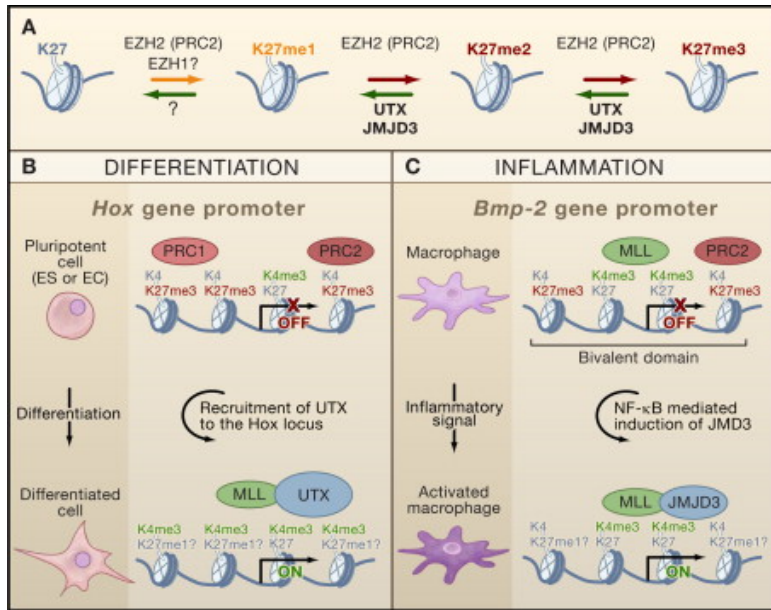


Figure 20 : Fonction des protéines Polycomb. A) Méthylation et déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. B) et C) Exemples de régulation transcriptionnelle médiée par les complexes PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressive Complex). D'après Swigut T, Wysocka J, Cell, 2007

Reconnaissance spécifique des lysines 9 et 27 de l'histone H3

Les acides aminés flanquant les lysines 9 et 27 de l'histone H3 sont conservés, et forment une séquence consensus ARKS (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002). La spécificité de liaison de HP1 et de Polycomb sur leur résidu respectif (Figure 21) pourrait être expliquée par la différence de la séquence d'acides aminés, encadrant la séquence consensus ARKS, reconnue et liée par ces protéines : la liaison de HP1 sur l'histone H3 méthylée sur la lysine 9 implique 6 acides aminés en position 5 à 10, alors que pour Polycomb, la liaison implique 9 résidus en position 20 à 28. La présence, au niveau de ces séquences, de résidus pouvant être modifiés post-transcriptionnellement (sérines 10 et 28 phosphorylables, lysine 23 acétylable) pourrait influencer la spécificité et/ou l'affinité de liaison pour les chromodomaines. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 empêcherait la liaison de HP1 et aboutirait à la perte de méthylation de la lysine 9 (Fischle et al., 2003a).

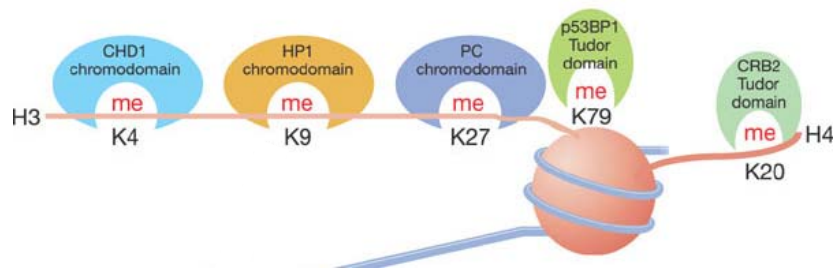


Figure 21 : Protéines liant les lysines méthylées des histones H3 et H4. Le domaine permettant la liaison à la lysine méthylée est indiqué pour chaque protéine. CHD1, chromodomain helicase DNA-binding protein 1 ; HP1, heterochromatin protein 1 ; PC, Polycomb protein ; p53BP1, p53-binding protein 1 ; CRB2, Cut5-repeat-binding protein 2. D'après Bannister AJ, Kouzarides T, Nature, 2005

Conclusion

Chaque nucléosome contient deux exemplaires de chacune des histones de coeur, et chacune de ces histones peut être modifiée post-traductionnellement par différents groupements chimiques et sur différents résidus, générant ainsi un vaste nombre de combinaisons possibles de ces modifications au sein de la chromatine. Si l'on ajoute à cela l'interconnexion des modifications entre elles, la complexité et la diversité des informations élaborées par ce code histone décuple de manière incroyable les possibilités de lecture et d'interprétation de l'information génétique portée par la séquence d'ADN.

I.2.6. Les complexes de remodelage de la chromatine

Comme leur nom l'indique, les complexes de remodelage vont agir sur la structure de la chromatine, en permettant le mouvement des nucléosomes le long de l'ADN. Ils peuvent déplacer un nucléosome en *cis* par glissement, en *trans* par transfert ou même réaliser l'éviction complète du nucléosome. Ainsi, ils vont spécialiser des régions de chromatine, et fournir une accessibilité régulée à l'ADN. Ces complexes multiprotéiques comportent une sous-unité ATPase, qui leur fournit l'énergie pour altérer les liaisons entre les histones et l'ADN, permettant le mouvement des nucléosomes (Becker and Horz, 2002) ; pour revue, (Clapier and Cairns, 2009).

Ainsi, les complexes de remodelage sont capables de moduler l'accès à l'ADN et constituent un autre mécanisme épigénétique agissant sur l'organisation des nucléosomes (Hogan and Varga-Weisz, 2007). Ils peuvent interagir avec de multiples partenaires et sont impliqués dans divers processus (Figure 22). D'autre part, des mutations dans certaines sous-unités de ces complexes peuvent provoquer des types particuliers de cancers, suggérant que ces sous-unités contribuent à des programmes transcriptionnels distincts qui régulent la croissance ou la différenciation cellulaire (Clapier and Cairns, 2009).

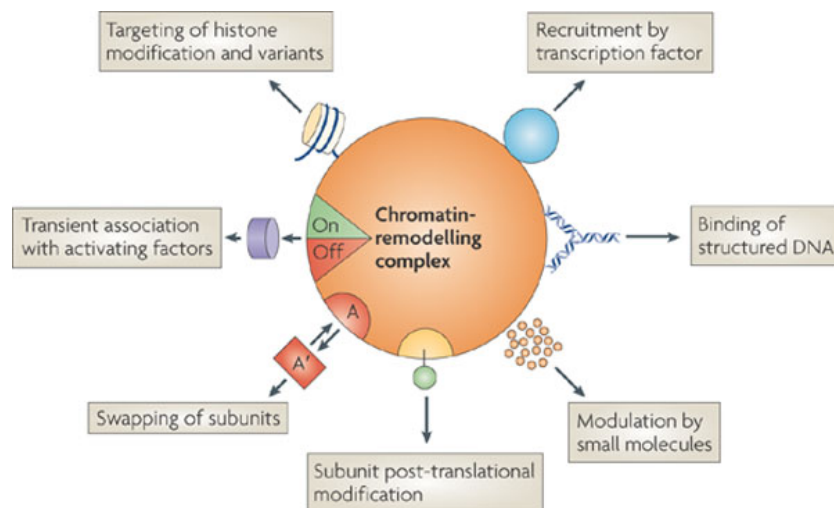


Figure 22 : Diversité structurale et fonctionnelle des complexes de remodelage de la chromatine pour assurer des combinaisons de mécanismes distincts. D'après Morrison AJ, Shen X, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009

Les facteurs de remodelage sont classés en quatre familles principales, en fonction de domaines additionnels présents au sein de l'unité contenant l'activité catalytique ATPase (Figure 23).

- La famille SWI/SNF (Switching defective/Sucrose NonFermenting) est caractérisée par la présence d'un domaine fonctionnel additionnel, un bromodomaine, capable de se lier aux histones acétylées. Les complexes SWI/SNF, à travers la lecture de ces marques épigénétiques, participent ainsi à l'activation de la transcription (Kasten et al., 2004). Cette famille ne semble pas impliquée dans l'assemblage de la chromatine. D'autre part, les nucléosomes remodelés par les complexes SWI/SNF sont liés par les histones méthyltransférases des complexes Ttithorax et Polycomb via leur domaine SET (Krajewski and Reese, 2009).

- La famille ISWI (Imitation Switch) possède quant à elle un domaine SANT (Swi3, Ada2, N-Cor, TFIIB) dans la sous-unité ATPase. Le domaine SANT serait un domaine de liaison à l'ADN et aux histones non modifiées (Boyer et al., 2004). Le complexe ISWI est impliqué dans la réplication de l'ADN ; ce complexe de remodelage se lie aux sites de réplication, grâce à son interaction avec la protéine de réplication PCNA, et participe à l'assemblage de la chromatine (Poot et al., 2005). La famille ISWI contient notamment le complexe NURF, qui reconnaît la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 (Wysocka et al., 2006).

- La famille CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding) se différencie des autres par la présence de deux chromodomains disposés en tandem au sein de la sous-unité ATPase. Ces chromodomains permettent par exemple l'interaction de CHD1 (la première protéine de la famille CHD identifiée) avec l'histone H3 méthylée sur la lysine 4, facilitant ainsi l'ouverture de la chromatine (Sims et al., 2005). Cependant, le complexe Mi-2/NURD (NUcleosome Remodeling and Deacetylation) contribuerait quant à lui à la répression transcriptionnelle des gènes ; il contient notamment HDAC1, HDAC2 et des protéines MBD (Kantor et al., 2003); (Denslow and Wade, 2007).

- La famille INO80-SWR1 (INOitol requiring 80 – Switch Related complex 1) ne possède pas de domaine particulier mais une séquence « espaceur » au sein de sa sous-unité ATPase. Le complexe INO80 est capable de se lier au variant d'histone γ H2AX enrichi au niveau des cassures double brins de l'ADN, et participerait ainsi à la réparation de l'ADN en favorisant le déplacement des nucléosomes (Cairns, 2004), (van Attikum et al., 2004), (Fritsch et al., 2004). Le complexe SWR1 est quant à lui impliqué dans l'incorporation du variant d'histone H2A.Z, en remplaçant les dimères H2A-H2B par des dimères H2A.Z-H2B (Korber and Horz, 2004).

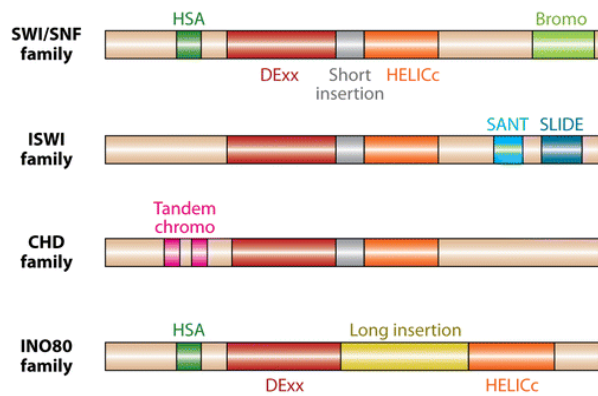


Figure 23 : Les familles de complexes de remodelage de la chromatine. Toutes présentent une sous-unité ATPase caractérisée par un domaine ATPase divisé en 2 parties, DExx et HELICc. HSA, Helicase-SANT ; SANT, Swi3/Ada2/N-Cor/TFIIB. *D'après Clapier CR, Cairns BR, Annu Rev Biochem, 2009*

L'implication des complexes de remodelage de la chromatine dans les cancers sera développé dans la 3^{ème} partie de l'introduction.

I.2.7. Les petits ARN

Les ARN non codants (ARNnc), c'est-à-dire des ARN ne codant pas pour des protéines, sont impliqués dans la structure de la chromatine et dans la régulation de l'expression des gènes, notamment via un mécanisme connu sous le nom d'« ARN interférence » (ou RNAi).

L'ARN interférence est un phénomène au cours duquel des petits ARNnc répriment une séquence homologue, soit au niveau transcriptionnel si cette séquence homologue est de l'ADN (on parle alors de TGS pour Transcriptional Gene Silencing), soit au niveau post-transcriptionnel si la séquence homologue est un ARN (il s'agit dans ce cas de PTGS pour Post Transcriptional Gene Silencing) (Figure 24). Ce processus a été particulièrement bien décrit chez les plantes et la levure (Moazed, 2009a; Moazed, 2009b; Verdel et al., 2009).

I.2.7.a. PTGS - Post Transcriptional Gene Silencing

La forme la plus courante de répression par RNAi a lieu dans le cytoplasme, au niveau post-transcriptionnel. Dans ce cas, l'ARN messager est produit mais il est soit rapidement dégradé, soit sa traduction est inhibée.

Les petits ARN impliqués dans le PTGS sont appelés siRNA (small interfering RNA) ou miRNA (Micro Interfering RNA) selon leur mode de production. Les siRNA proviennent de longs ARN double brins (ARNdb) alors que les miRNA sont produits à partir d'un ARN précurseur d'une centaine de nucléotides de long qui forme une structure en épingle à cheveux (Cullen, 2004). Cependant, les mécanismes par lesquels les siRNA et les miRNA induisent le PTGS sont les mêmes. Des ARNdb sont clivés en petits ARNdb par une RNase III, Dicer (Fire et al., 1998); (Bernstein et al., 2001). Grâce à l'énergie de l'ATP pour désappairer le duplexe, un seul brin de ces siRNA va être incorporé au complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) via sa liaison à la protéine Argonaute (Fagard et al., 2000); (Hammond et al., 2000). Le complexe RISC est

alors activé et est ciblé, par appariement de bases, vers un ARNm présentant une séquence homologue à celle du siRNA/miRNA. L'ARNm est ensuite clivé par une activité RNase contenue dans RISC. A noter, un appariement imparfait entre un petit ARN et sa séquence cible conduirait non pas à la dégradation de l'ARNm mais au blocage de sa traduction (Almeida and Allshire, 2005). D'autre part, il existerait une spécificité entre la protéine Argonaute mise en jeu et le type de siRNA pris en charge, qui permettrait, lors du transport des siRNA du cytoplasme vers le noyau, de cibler le silencing au sein de compartiments nucléaires particuliers (Guang et al., 2008).

I.2.7.b. TGS - Transcriptional Gene Silencing

Les mécanismes d'interférence par ARN peuvent également agir au niveau transcriptionnel. Il s'agit alors de TGS. Globalement, la voie qui permet de réprimer l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle permet également de modifier la chromatine et d'altérer sa structure et donc sa fonction. Les ARNdb clivés par Dicer en petits ARNdb vont cependant être intégrés au sein d'un autre complexe, RITS (RNA Induced Transcriptional Silencing) découvert chez *S.pombe* (Verdel et al., 2004). Le complexe RITS ainsi activé est ciblé vers l'ADN par appariement de bases où il induit des modifications épigénétiques de la chromatine, la rendant transcriptionnellement inactive (Matzke et al., 2001). Ce phénomène est particulièrement bien décrit chez *S.pombe* dans la mise en place de l'hétérochromatine (Verdel and Moazed, 2005); (Moazed, 2009a; Moazed, 2009b); (Verdel et al., 2009), et sera abordé plus loin.

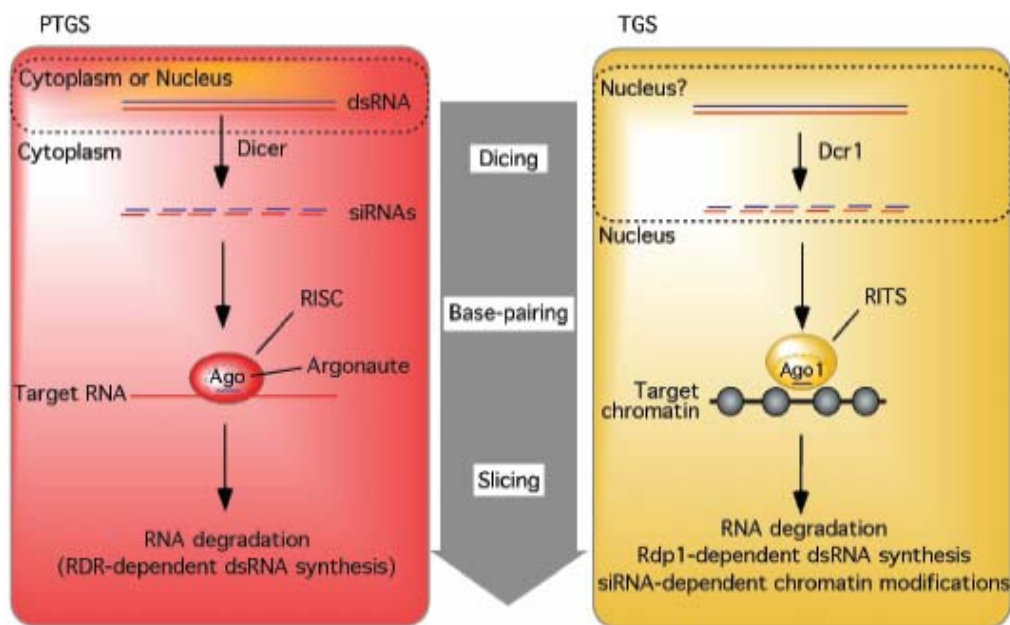


Figure 24 : PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) et TGS (Transcriptional Gene Silencing) impliquant les protéines Dicer (RNase III) et Argonaute. dsRNA, double strand RNA ; siRNA, small interfering RNA ; RISC, RNA Induced Silencing Complex ; RITS, RNA Induced Transcriptional Silencing ; Dcr (fission yeast), Dicer (nom générique) ; Ago1 (fission yeast), Ago (nom générique), Argonaute ; Rdp (fission yeast), RDR (nom générique), RNA-Directed RNAPolymerase. D'après Verdel A, *Int J Dev Biol*, 2009

Ces deux voies de silencing (PTGS et TGS) partagent des mécanismes communs, mais présentent néanmoins des différences importantes. Dans le PTGS, les siRNA dirigent la dégradation de l'ARN messager dans le cytoplasme, sans incidence épigénétique, puisqu'ils n'agissent pas directement sur le taux de transcription du gène cible. Par contre, le TGS agit dans le noyau, en association avec des modifications répressives de la chromatine qui peuvent être maintenues à travers les divisions cellulaires (Verdel et al., 2009).

1.2.8. Interactions entre les différents paramètres épigénétiques pour la régulation de l'organisation et des fonctions de la chromatine

Les différents paramètres épigénétiques présentés jusqu'à maintenant sont interconnectés et s'influencent mutuellement. Par exemple, des expériences d'immunoprécipitation (GST-pulldown) ont montré que DNMT3B interagissait avec HDAC1/2 (qui interagissent également avec DNMT1), HP1, SUV39H1 et hSNF2H (enzyme de remodelage de la chromatine) chez l'homme. Ces protéines colocalisent avec DNMT3B dans les régions hétérochromatiques (Geiman et al., 2004). D'autre part, la méthylation de l'ADN peut être directement contrôlée par l'histone méthyltransférase EZH2, du complexe Polycomb (Viré et al., 2006). Ces travaux mettent en évidence les liens entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

Enfin, Zofall et al. ont décrit une coopération entre le variant d'histone H2A.Z, la machinerie RNAi des facteurs hétérochromatiques dans la régulation de l'expression d'ARN anti-sens (Zofall M et al., 2009).

L'organisation et les fonctions de la chromatine résultent de l'interprétation d'une combinaison d'informations chimiques et de facteurs nucléiques ou protéiques étroitement intriqués, présents à un moment et à un endroit donné (Figure 25). Dans ce contexte, l'altération d'un des acteurs mis en jeu est susceptible d'entraîner une perturbation de l'ensemble de l'information destinée à la régulation de l'organisation et des fonctions de la chromatine.

Pour illustrer cette idée, Espada et al. ont montré que l'inactivation de *DNMT1* par knock-out provoquait une désorganisation nucléaire associée à une perturbation de certaines modifications d'histones (perte de la di- et tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et augmentation de l'acétylation). De plus, une perte d'interaction des HDAC et de HP1 avec l'histone H3 est observée au niveau des séquences satellites 2, suggérant que l'activité de DNMT1, via le maintien d'un statut chromatinien correct, est requise pour une bonne organisation des régions hétérochromatiques (Espada et al., 2004).

Post-translational histone modifications

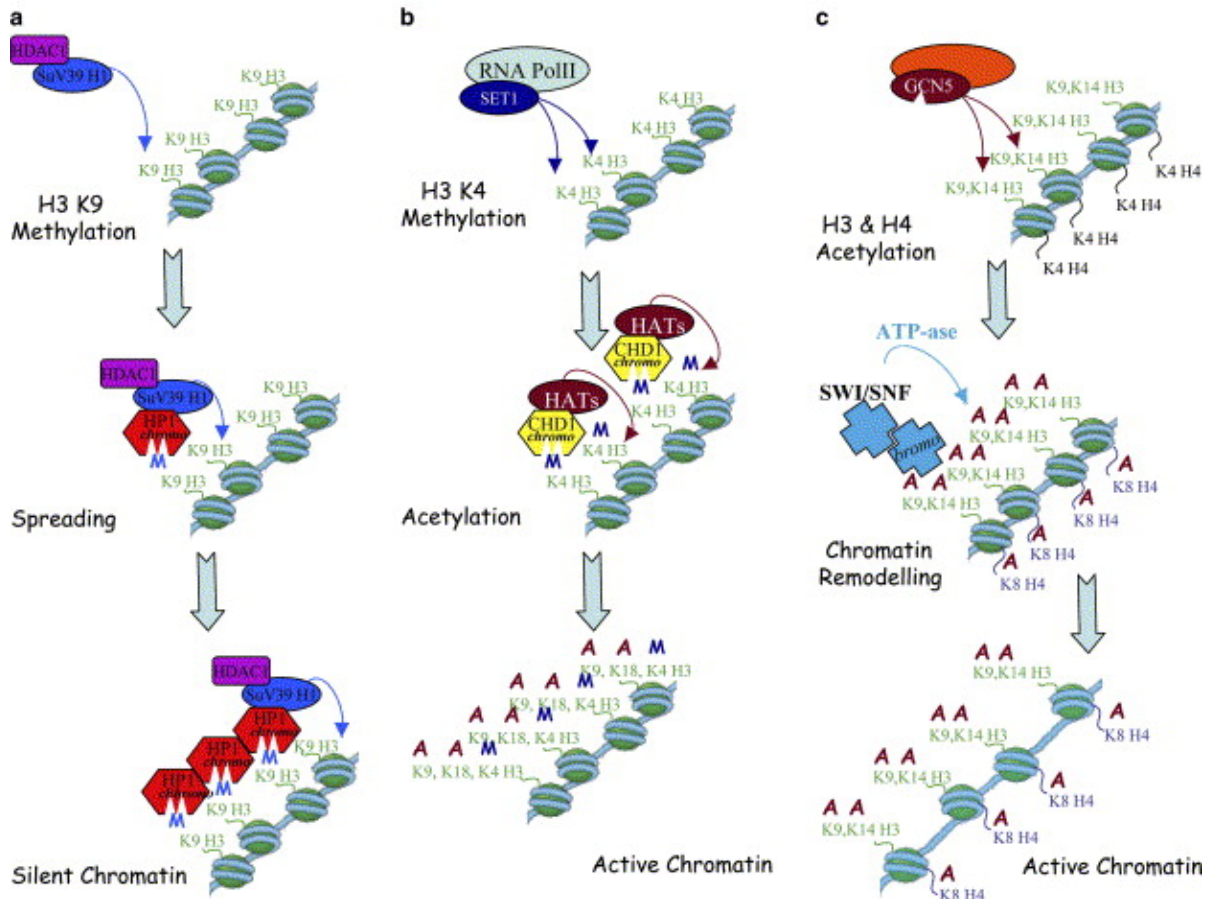


Figure 25 : Recrutement des protéines à bromo- ou chromodomaine par les modifications post-traductionnelles des histones. Implication de différents acteurs / mécanismes mis en jeu, aboutissant à différents états transcriptionnels. *D'après Santos-Rosa, Eur J Cancer, 2005*

Outre des interactions entre eux, les acteurs épigénétiques sont également capables d'interagir avec des régulateurs de la transcription ou des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (pRb), générant ainsi un vaste réseau de signalisation. C'est le cas par exemple de DNMT1 (Leuba et al., 2004) (Figure 26) et de DNMT3A/B, dont les interactions avec de nombreux facteurs de transcription joueraient un rôle crucial dans la méthylation ciblée de l'ADN (Hervouet et al., 2009).

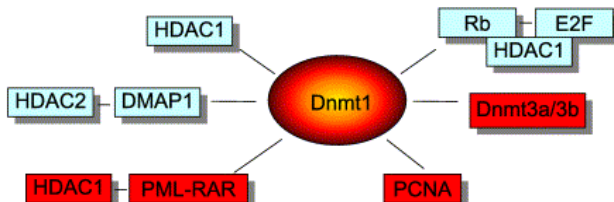


Figure 26 : Représentation schématique des interactions protéine-protéine rapportées entre DNMT1 et un certain nombre de protéines régulatrices. En rouge, les interactions qui modulent l'activité méthyltransférase de DNMT1. *D'après Zlatanova J et al., New Comprehensive Biochem, 2004*

Dans ce chapitre ont été abordés les paramètres épigénétiques qui agissent à l'échelle du nucléosome ou de la fibre de chromatine, pour réguler son organisation et ses fonctions. Ces paramètres incluent les modifications chimiques de l'ADN et des histones, ainsi que les protéines qui « lisent » ces modifications, les variants d'histone, les complexes de remodelage de la chromatine, et l'ARN interférence. Nous allons maintenant discuter d'un niveau supérieur de régulation épigénétique : l'organisation spatiale du génome dans le noyau.

II. Organisation spatiale du génome dans le noyau interphasique

II.1. Organisation spatiale et architecture nucléaire

II.1.1. Le concept d'architecture nucléaire

Le noyau cellulaire est à présent considéré comme un compartiment complexe et finement organisé au sein duquel les éléments tendent à occuper des positions non-aléatoires, définissant le concept d'architecture nucléaire. Le noyau est une structure extrêmement dynamique dans laquelle de nombreux composants vont rapidement et transitoirement interagir les uns avec les autres ((Taddei et al., 2004), (Espada and Esteller, 2007)).

L'architecture nucléaire résulte de l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle entre différents compartiments subnucléaires. Un compartiment subnucléaire est défini comme une région macroscopique qui présente des caractéristiques morphologiques et/ou fonctionnelles distinctes de ses voisines au sein du noyau (Misteli, 2005).

II.1.2. Les compartiments subnucléaires

Deux types de compartiments subnucléaires sont habituellement décrits : les corps nucléaires (nuclear bodies) et les territoires chromosomiques (Espada and Esteller, 2007).

Les corps nucléaires sont des régions subnucléaires de différentes tailles dépourvues de membrane lipidique et habituellement caractérisées par une composition définie en protéines. Le corps nucléaire le plus imposant est le nucléole, usine de biogenèse des ribosomes et site de transcription ARN polI-dépendante des ADNr. Il existe beaucoup d'autres corps nucléaires, parmi lesquels les corps de Cajal (potentiel site d'assemblage des snRNA) (Stanek and Neugebauer, 2004) et les corps PML (principales réserves de protéines promyélocytaires, de fonction inconnue) (Zhong et al., 2000).

Un exemple particulièrement surprenant fut la description d'« usines de transcription » (foyers riches en ARNpolII) dispersées dans le nucléoplasme des cellules mammifères (Iborra et al., 1996); (Jackson et al., 1998); (Osborne et al., 2004). Ainsi, plutôt que de recruter et

d'assembler la machinerie transcriptionnelle au niveau de gènes individuels relativement immobiles, les gènes seraient « actifs » et migreraient vers des sites de transcription pré-assemblés, partagés entre plusieurs gènes (Osborne et al., 2004).

Les territoires chromosomiques désignent la compartimentation spatiale non aléatoire des chromosomes dans le noyau interphasique. En 2001, Cremer et Cremer proposent un modèle d'organisation spatiale du génome dans lequel les chromosomes sont compartimentés en territoires distincts, les territoires chromosomiques, localisés de manière non aléatoire dans le noyau. De plus, ils relient la fonction des gènes à leur localisation nucléaire ; ainsi, la localisation d'un gène au sein d'un territoire pourrait influencer son accessibilité pour des facteurs régulateurs de la transcription (Cremer and Cremer, 2001).

La position des territoires chromosomiques dépendrait du type cellulaire et de la phase du cycle cellulaire (Brown et al., 1999); (Alcobia et al., 2000); (Alcobia et al., 2003). Ces territoires seraient des structures perméables, accessibles à différents facteurs nucléaires grâce à des canaux nucléoplasmiques.

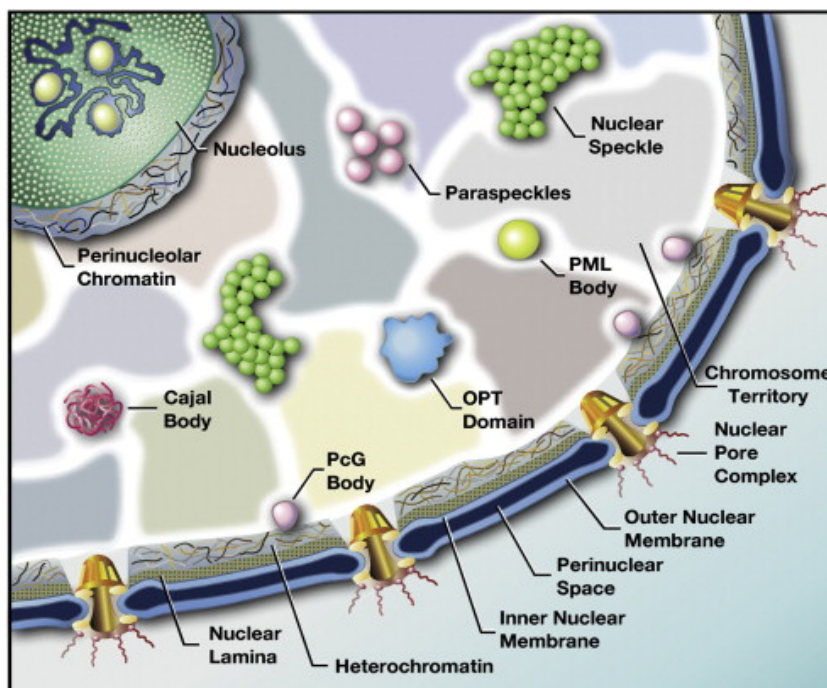


Figure 27 : "Nuclear neighbourhoods". Représentation du noyau d'une cellule de mammifère montrant certains des nombreux domaines, ou voisinages, identifiés jusqu'alors. D'après Zhao et al, *Curr Opin Genet Dev*, 2009

II.1.3. Organisation non-aléatoire des compartiments subnucléaires

Il existe de nombreux exemples montrant que le compartiment nucléaire est organisé de manière non-aléatoire (pour revue, (Espada and Esteller, 2007). Il a notamment été montré dans des noyaux de lymphocytes humains que la localisation nucléaire des chromosomes était corrélée à leur densité en gènes (Boyle et al., 2001). La localisation des territoires chromosomiques des chromosomes 18 et 19, de taille très proche (85 et 67 Mb respectivement) mais dont la densité en gènes est différente, a été analysée. De manière très

intéressante, le chromosome 18, pauvre en gènes, présente une localisation nucléaire périphérique alors que le chromosome 19, riche en gènes, est localisé en position centrale au sein du noyau (Croft et al., 1999). Ces observations ont été confirmées par l'équipe de Cremer (Cremer et al., 2003).

La question de savoir si le positionnement des compartiments nucléaires est héritable ou établi *de novo* à chaque cycle cellulaire reste posée. Si le positionnement des compartiments n'est pas exactement le même pour toutes les cellules dans un modèle particulier, il a cependant été montré comme étant spécifique du tissu ou du type cellulaire (Boyle et al., 2001); (Cremer et al., 2003); (Parada et al., 2004). Le positionnement post-division cellulaire non-aléatoire des compartiments doit résulter en une organisation fonctionnelle du noyau, et cette organisation spatiale est supposée être équivalente dans toutes les cellules d'un type cellulaire ou d'un tissu donné afin de maintenir une unité fonctionnelle (Espada and Esteller, 2007).

II.1.4. Les chromosomes sont des structures dynamiques

Bien que les chromosomes soient organisés en territoires distincts dans le noyau interphasique, les observations faites dans différents modèles biologiques indiquent que les chromosomes sont des structures dynamiques et que les régions chromosomiques individuelles peuvent être repositionnées vis-à-vis à la fois des structures nucléaires et des autres régions chromosomiques. Il est également désormais évident que le repositionnement de régions génomiques dans l'espace nucléaire est important pour la régulation de l'expression des gènes (Gasser, 2002). De récentes avancées technologiques permettent aujourd'hui l'identification à grande échelle des loci interagissant entre eux à travers le génome, et soulignent l'importance de telles interactions pour la régulation convenable des gènes. La possibilité que des réseaux spatiaux de loci génomiques existent dans le noyau (Kosak and Groudine, 2004) implique l'existence d'un niveau de régulation génique non encore exploré qui coordonne l'expression à travers le génome.

II.2. Organisation spatiale et activité transcriptionnelle

La régulation de l'expression des gènes implique des interactions entre la chromatine et des complexes protéiques, et la question actuelle est de savoir où et quand ces interactions se mettent en place dans le noyau. Il devient de plus en plus évident que l'activation ou le silencing de gènes peut être associé au repositionnement du locus par rapport aux compartiments nucléaires et aux autres loci génomiques (Figure 28). Dans le même temps, cependant, des contraintes structurales imposent des limites à la mobilité de la chromatine.

Un objectif majeur des études en cours pour comprendre l'influence potentielle de l'architecture nucléaire sur les fonctions nucléaires est d'identifier les principes qui gouvernent l'organisation spatiale du génome.

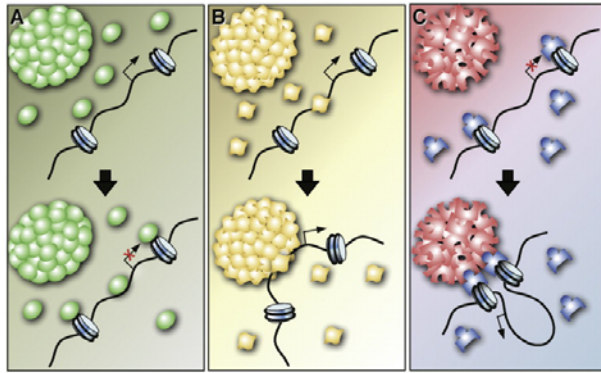


Figure 28 : Impact du voisinage nucléaire sur l'expression des gènes. (A) Des facteurs protéiques (vert) enrichis dans un voisinage nucléaire particulier pourraient diffuser vers les loci proches, affectant ainsi positivement ou négativement l'expression des gènes. (B) L'association d'un locus génique particulier avec un voisinage nucléaire pourrait être une conséquence de l'activation (ou de la repression) génique, plutôt que sa cause. (C) Les protéines (rouges) associées au voisinage nucléaire pourraient affecter de manière indirecte la transcription en combinaison avec d'autres facteurs protéiques (bleus) en stabilisant les interactions inter- / intra-chromosomiques, ou en protégeant les gènes associés des effets de l'hétérochromatine avoisinante. D'après Zhao et al, *Curr Opin Genet Dev*, 2009

II.2.1. Modèle de contraintes structurales sur la mobilité de la chromatine et les interactions gène-gène

La mobilité de la chromatine est soumise à différents niveaux de contraintes :

- l'organisation des chromosomes en territoires (aires de confinement)
- la polarité des territoires chromosomiques relative à la densité en gènes, puisque le positionnement de régions chromatiniennes pauvres en gènes vers la périphérie nucléaire signifie qu'elles présentent une chance plus faible de participer à des interactions interchromosomiques
- la tendance des régions chromatiniennes transcriptionnellement actives ou inactives à se regrouper dans l'espace tridimensionnel

II.2.2. Mouvements vis-à-vis de la périphérie ou de l'intérieur du noyau

II.2.2.a. Modèles d'étude artificiels dans les cellules vivantes

Afin de déterminer si les mouvements de la chromatine observés durant l'interphase sont corrélés à des changements dans l'expression des gènes, il faut pouvoir visualiser des loci individuels dans des cellules vivantes. Néanmoins, les techniques courantes d'hybridation de l'ADN ne pouvant pas être utilisées dans les cellules vivantes, la visualisation de séquences génomiques spécifiques *in vivo* requiert l'introduction de sites de liaison hétérologues, pour des protéines fluorescentes, à proximité du locus d'intérêt. Actuellement, le système le plus utilisé est le système GFP-lac repressor / lac operator (Lanctot et al., 2007) (Figure 29). Même si la pertinence physiologique de l'étude de larges domaines de gènes répétés en tandem a été discutée, cette technique a permis de faire avancer les connaissances concernant les relations entre les mouvements de la chromatine et la régulation génique (Tumbar and Belmont, 2001); (Carpenter et al., 2005); (Chuang et al., 2006); (Kumaran and Spector, 2008); (Finlan et al., 2008); (Reddy et al., 2008).

II.2.2.b. Mouvements vers l'intérieur du noyau et activité transcriptionnelle

Dans le modèle artificiel mis en place par Tumber & Belmont, l'insertion de l'activateur transcriptionnel de VP16 dans un site chromosomique inactif localisé en périphérie nucléaire provoque son activation transcriptionnelle et sa relocalisation en position plus centrale dans le noyau (Tumber and Belmont, 2001).

D'autre part, le repositionnement de gènes actifs vers le centre du noyau a été observé pour le locus *IGH* au cours de la différenciation lymphoïde B (Kosak et al., 2002), le locus *c-maf* dans les cellules T (Hewitt et al., 2004), *Mash-1* dans les cellules neuronales (Williams et al., 2006) ou encore *Cftr* dans les adénocarcinomes (Zink et al., 2004). Il est généralement admis que la périphérie nucléaire est un compartiment inactif, et que le repositionnement vers le centre du noyau est requis pour permettre une transcription efficace. Cependant, il n'y a pas toujours une corrélation stricte entre le mouvement à l'écart de la périphérie et l'activation génique. Ainsi le locus de l'interféron γ (*Ifng*) est détecté à la périphérie nucléaire quelque soit son activité transcriptionnelle (Hewitt et al., 2004). De plus, il a récemment été montré que si le locus de la β -globine chez la souris se relocalise vers l'intérieur du noyau au cours de la différenciation érythroïde, l'expression du gène précède le déplacement à l'écart de la périphérie nucléaire (Ragoczy et al., 2006). Inversement, l'analyse d'une région de 2Mb comprenant le gène *Mash-1* montre que la région entière est relocalisée vers l'intérieur du noyau des cellules neuronales exprimant *Mash-1*, même si certains des gènes de cette région ne sont pas exprimés dans ce type cellulaire (Williams et al., 2006).

II.2.2.c. Mouvements vers la périphérie nucléaire et répression transcriptionnelle

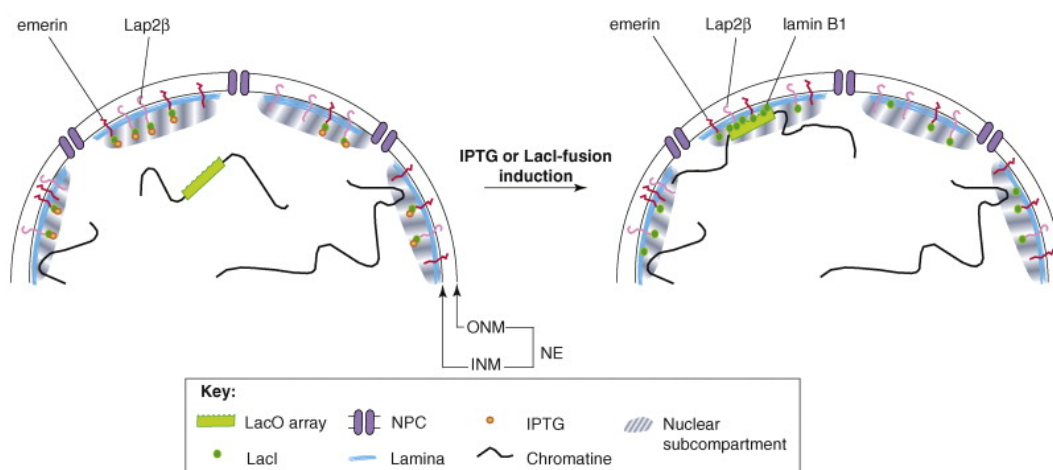


Figure 29 : Targeting genes to the nuclear envelope in mammals. In eukaryotic cells, the NE is a double membrane that separates the cytoplasm from the nucleoplasm. The NE is studded by large supramolecular channels, the NPCs. ONM, outer nuclear membrane ; INM, inner nuclear membrane. The lamina connects the NE with chromatin either directly through interactions with the core histones or indirectly through interactions with transcription factors and lamina-associated proteins such as Lap2 β and emerin. In the targeting systems described, different proteins of the INM, Lap2 β and emerin, or from the nuclear lamina, lamin B1, are fused to the Lac repressor (LacI). Upon withdrawal of IPTG or LacI-fusion induction, the binding of the LacI-INM or LacI-lamin proteins to the LacO arrays inserted at a particular genomic locus results in its re-positioning close to the nuclear envelope. D'après Ruault M et al., Trends in Genet, 2008.

Dans leur étude, Kumaran & Spector ont mis en place un système inductible qui cible le locus d'intérêt à la lamina nucléaire dans des cellules de mammifère vivantes. Après induction de l'expression, les composants de la machinerie transcriptionnelle sont recrutés sur le locus cible, et des transcrits naissants sont visualisés à la périphérie nucléaire. La cinétique d'induction transcriptionnelle est similaire à celle observée au niveau d'une région nucléaire interne. Ainsi, le locus ciblé à la périphérie nucléaire maintient ses compétences transcriptionnelles (Kumaran and Spector, 2008).

Reddy et al. ont également utilisé un système inductible de recrutement de gènes à la membrane nucléaire interne (INM), et ont évalué les conséquences de ce repositionnement sur l'activité génique dans des fibroblastes de souris. Les analyses par immuno-FISH 3D ont indiqué une accumulation de lamines et de protéines de la membrane nucléaire interne. Le recrutement des gènes à la membrane nucléaire interne peut conduire à leur répression transcriptionnelle. D'autre part, des expériences de DamID montrent que les loci des immunoglobulines à la périphérie nucléaire sont en contact avec les protéines de la lamina et de la membrane nucléaire interne. Les auteurs proposent que ces interactions moléculaires puissent être utilisées pour compartimenter et limiter l'accessibilité des loci des immunoglobulines aux facteurs de recombinaison et de transcription (Reddy et al., 2008).

Toujours dans un système équivalent, Finlan et al. montrent que la relocalisation de chromosomes humains vers la périphérie nucléaire en les recrutant à une protéine de la membrane nucléaire interne peut, de manière réversible, supprimer l'expression de certains gènes humains endogènes localisés à proximité du site recruté, ou même plus loin. Cependant, l'expression de beaucoup d'autres gènes n'est pas réduite, indiquant que la localisation à la périphérie nucléaire n'est pas incompatible avec une transcription active. La régulation de l'expression des gènes autour de la périphérie nucléaire serait dépendante de l'activité HDAC (Finlan et al., 2008).

D'autre part, des expériences de DamID ont montré que les domaines associés à la lamina nucléaire étaient caractérisés par un faible niveau d'expression, renforçant l'idée que la lamina nucléaire représenterait un environnement chromatinien répressif pour la transcription (Guelen et al., 2008).

Globalement, ces systèmes, bien qu'artificiels, fournissent une approche puissante pour étudier la dynamique de la fonction des gènes à la périphérie nucléaire dans des cellules vivantes. Cependant, l'ensemble de ces données indique qu'il est difficile d'établir une corrélation stricte et générale entre l'activité transcriptionnelle d'un gène et sa position vis-à-vis de la périphérie nucléaire. Ceci conforte l'idée selon laquelle un ensemble de paramètres est à prendre en compte pour définir le statut d'expression d'un gène (Takizawa et al., 2008). D'autre part,

Takizawa et al. soulignent la différence entre localisation à la périphérie nucléaire et association avec la périphérie nucléaire (Takizawa et al., 2008).

Par ailleurs, de récentes observations compliquent notre compréhension de la relation entre l'activation transcriptionnelle et le positionnement des gènes vis-à-vis de la périphérie nucléaire. En effet, chez la levure les pores nucléaires sont des sites de transcription importants (Figure 30), et les protéines associées aux pores nucléaires se lieraient préférentiellement aux gènes actifs (Casolari et al., 2004); (Schmid et al., 2006). Cependant il semble que ces observations ne soient pas incompatibles avec les propriétés répressives générales de la périphérie nucléaire, car une « frontière » protéique permettrait de séparer et de maintenir ces deux activités pour qu'elles n'interfèrent pas l'une avec l'autre (Ruault et al., 2008) (Figure 30).

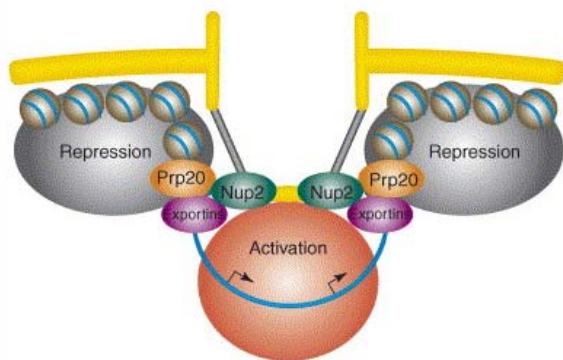


Figure 30 : Rôle fonctionnel des complexes du pore nucléaire (NPC). La présence de « frontières » permettrait de maintenir des domaines répressifs séparés de l'activité transcriptionnelle au niveau des NPC. Plusieurs facteurs de transport nucléaire et des protéines Nup auraient une fonction « frontière » par leur capacité à séparer les domaines chromatiniens actifs et répressifs. La boucle de chromatine au niveau du cercle rouge permettrait d'empêcher la propagation d'hétérochromatine depuis les régions répressives adjacentes. D'après Ruault M et al., *Trends in Genet*, 2008.

II.2.3. Mouvements vis-à-vis de l'hétérochromatine

Plusieurs études ont rapporté une corrélation entre le silencing de gènes et le positionnement intranucléaire à proximité d'hétérochromatine constitutive dans les cellules de mammifères. Il a été suggéré que ce type de répression transcriptionnelle pouvait être expliquée par une compétition entre les protéines de l'hétérochromatine et les activateurs transcriptionnels au niveau du locus cible (Brown et al., 1997a), ou par compaction de la chromatine médiée par les complexes de remodelages associés à l'hétérochromatine (Grigoryev et al., 2006). Des analyses de la différenciation cellulaire de la lignée hématopoïétique ont montré que l'activation génique était souvent associée au déplacement du locus à distance du compartiment hétérochromatique (Hewitt et al., 2004); (Delaire et al., 2004), et inversement que le silencing de gènes était corrélé au repositionnement du locus à proximité d'hétérochromatine constitutive (Brown et al., 1999); (Merkenschlager et al., 2004); (Su et al., 2004).

Le contexte chromosomique semble être également un déterminant important pour l'association entre des loci spécifiques et l'hétérochromatine, comme le montre une étude des loci de l' α -globine et de la β -globine humaines (Brown et al., 2001). Dans les lymphocytes, dans lesquels les deux loci sont silencieux, le locus de la β -globine - mais non celui de l' α -globine - se localise à proximité de l'hétérochromatine centromérique. Ces deux loci résident dans des régions du génome qui diffèrent de manière importante : le locus de l' α -globine se

trouve dans une région sub-téломérique qui se réplique précocement et qui contient des gènes ubiquitaires fortement exprimés, alors que le locus de la β -globine est empaqueté au sein d'une région AT-riche à réplication tardive qui contient des gènes dont l'expression est tissu-spécifique. Il est plausible que l'absence d'interaction entre le locus de l' α -globine et l'hétérochromatine reflète le besoin pour ses gènes voisins d'être exprimés, et dans ce cas ils exerceraient un effet dominant sur la localisation de la région génomique entière à distance de l'hétérochromatine.

Chez les eucaryotes, l'hétérochromatine est fréquemment située à proximité de l'enveloppe nucléaire. Cette localisation serait potentiellement importante voire nécessaire à sa fonction de régulation de l'expression génique (Andrulis et al., 1998); (Guelen et al., 2008). Kosak et al. montrent que les loci des gènes des immunoglobulines, inactifs dans les cellules lymphoïdes pro-T, sont préférentiellement situés à la périphérie nucléaire et colocalisés avec la lamine B, protéine de la membrane nucléaire interne. En revanche, ces mêmes loci sont situés en position centrale dans le noyau des cellules lymphoïdes pro-B (Kosak et al., 2002).

D'autre part, des travaux récents réalisés chez les mammifères et la drosophile montrent la formation d'une boucle corrélée à l'activité transcriptionnelle. Ces boucles permettraient d'isoler la chromatine de l'influence des domaines voisins et permettraient la concentration de facteurs protéiques localement. L'étude réalisée chez la souris concernant le locus beta-globine démontre clairement que cette boucle formée est nécessaire pour la transcription (pour revue, (Chambeyron and Bickmore, 2004).

II.2.3.a. « Gene kissing » et répression transcriptionnelle

Le développement des méthodes 3C (Chromosome Conformation Capture) et de ses dérivés (4C, 5C...) ont permis une avancée considérable dans l'étude des interactions entre loci génomiques (Figure 31).

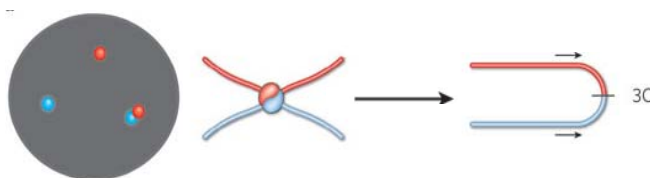


Figure 31 : Chromosome Conformation Capture (3C) : mise en évidence d'interactions inter- et intra-chromosomiques entre plusieurs loci (ici 1 bleu et 1 rouge). Etapes : crosslink de la chromatine, digestion enzymatique, ligation, reverse crosslink, analyse par PCR / qPCR. D'après Gondor A & Ohlsson R, Nature 2009

La co-localisation spatiale de loci situés sur différents chromosomes, ou à des sites distants au sein d'un chromosome, est un des exemples les plus frappants de l'organisation tridimensionnelle du génome. En raison de la faible probabilité que des loci distants co-localisent par chance dans le noyau, l'observation de ces « gene kissing » dans une grande proportion des noyaux est considérée comme hautement significative.

Un cas bien documenté de « gene kissing » concerne des gènes réprimés par les protéines du groupe Polycomb – des répresseurs transcriptionnels capables de maintenir la mémoire de l'état silencieux de gènes au cours des divisions cellulaires (Bantignies et al., 2003); (Francis and Kingston, 2001); (Sexton et al., 2009). La répression transcriptionnelle est réalisée via la liaison des protéines PcG aux PRE *en cis*. De manière intéressante, l'association spatiale entre ces loci n'est pas détectée dans un contexte « Polycomb null ». Les protéines PcG étant organisées en compartiments dans le noyau (Buchenau et al., 1998); (Saurin et al., 1998), ces données suggèrent que les gènes endogènes cibles de PcG pourraient s'associer physiquement au niveau des corps PcG, dédiés à leur régulation (Bantignies et al., 2003); (Sexton et al., 2009).

II.2.3.b. « Gene kissing » et activation transcriptionnelle

Les interactions « longue-distance » entre des régions génomiques sont également importantes pour l'activation génique (Tolhuis et al., 2002); (Lomvardas et al., 2006); (Osborne et al., 2004). Globalement, ces analyses indiquent une prédominance des interactions *en cis*; l'approche 4C (Chromosome Conformation Capture (3C) on chip) a également montré qu'un gène exposé à la surface de son territoire chromosomique (*Rad23a*) pouvait interagir avec des gènes localisés sur d'autres chromosomes, alors qu'un gène enfoui dans son territoire chromosomique (β -globine de souris) réalisait peu d'interactions interchromosomiques (Simonis et al., 2006). Ainsi deux loci qui interagissent *en cis* se trouvent plutôt à l'intérieur ou en surface du territoire chromosomique, mais non à l'extérieur; inversement les interactions *en trans* vont se produire entre deux loci se trouvant en surface ou à l'extérieur de leur territoire, mais non à l'intérieur (Gondor and Ohlsson, 2009) (Figure 32).

Ceci suggère que le positionnement d'un locus au sein de son territoire chromosomique est un déterminant important pour les interactions *en trans*. De manière intéressante, les interactions interchromosomiques détectées dans le cas de *Rad23a* impliquent préférentiellement des régions présentant une forte densité en gènes (Simonis et al., 2006). Cette observation suggère que le regroupement de chromosomes ou de segments chromosomiques denses en gènes vers l'intérieur nucléaire ((Croft et al., 1999); (Cremer et al., 2003); (Shopland et al., 2006)) servirait à faciliter les interactions entre des régions génomiques localisées sur des chromosomes différents.

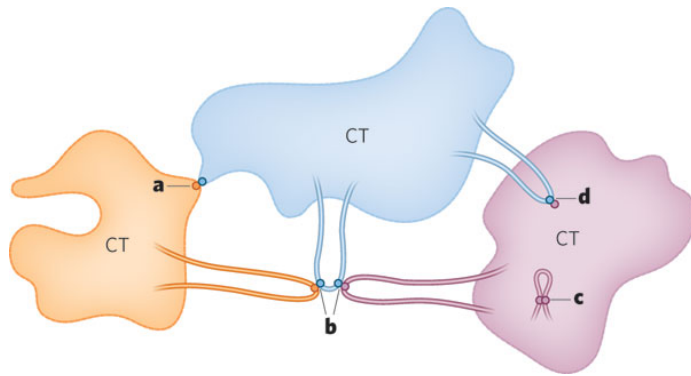


Figure 32 : Interactions inter- et intra-chromosomiques. a, An interchromosomal interaction between loci at the edge of the associated chromosome territories (CTs). b, Multiple long-range interactions with the interacting loci looping out of their CTs. c, An intrachromosomal interaction occurring within the CT. d, An interaction in which one locus loops into the CT of another chromosome to find its partner. *D'après Gondor A & Ohlsson R, Nature 2009*

Conclusion

L'organisation nucléaire semble refléter l'organisation fonctionnelle de la chromatine : l'environnement nucléaire d'un locus influence son activité transcriptionnelle, ou inversement, car il n'est toujours pas clairement établi si l'activité transcriptionnelle est la cause ou la conséquence de la (re)localisation nucléaire ; l'analyse du statut chromatinien du locus – lié à la fois à son activité transcriptionnelle et à sa localisation nucléaire – pourrait aider à éclaircir ce point.

Les mécanismes impliqués dans les interactions inter- ou intra-chromosomiques sont encore mal définis, mais certains facteurs protéiques, tels que l'histone méthyltransférase EZH2, l'insulateur CTCF ou les cohésines, ont été impliqués dans la formation de « looping » de la chromatine ((Parelho et al., 2008); (Wendt et al., 2008); (Hadjur et al., 2009); (Sexton et al., 2009), (Phillips and Corces, 2009)), et joueraient un rôle architectural essentiel dans ces interactions.

La chromatine est une structure incroyablement dynamique, et différents niveaux de régulation entrent en jeu, depuis l'échelle du nucléosome jusqu'à l'organisation spatiale du génome dans le noyau, et agissent de manière coordonnée afin d'assurer les fonctions cellulaires.

Nous allons maintenant nous attarder sur un « compartiment » nucléaire particulier : l'hétérochromatine. Après une description de sa structure et de sa localisation, nous aborderons sa formation, son maintien et son rôle dans le silencing de gènes.

III. L'hétérochromatine

Le compartiment hétérochromatinien est divisé en deux sous-types : l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive.

III.1. L'hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative peut être définie moléculairement comme des régions géniques transcriptionnellement silencieuses présentant une structure chromatinienne compactée. Son « état hétérochromatinien » est réversible, et elle garde la faculté de s'interconvertir en euchromatine selon le contexte spatial (changement de position vis-à-vis de la périphérie nucléaire en fonction des facteurs/signaux exogènes), temporel (stade de développement ou du cycle cellulaire), et parental (expression génique mono-allélique) (Trojer and Reinberg, 2007). L'hétérochromatine facultative est globalement caractérisée par une méthylation de l'ADN, une hypoacétylation des histones, et la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 médiée par les protéines du groupe Polycomb. Un composant ARN jouerait également un rôle important dans la mise en place et/ou le maintien de cette structure. Les régions génomiques qualifiées d'hétérochromatine facultative comprennent les gènes du développement (Cavalli, 2002) et de la différenciation, les loci génomique soumis à l'empreinte parentale et le chromosome X inactif chez les mammifères femelles. Elles incluent également des gènes réprimés localement, qui présentent cependant des caractéristiques épigénétiques différentes (Trojer and Reinberg, 2007).

III.1.1. L'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles

Les mammifères femelles possèdent deux chromosomes X, contre un seul pour les mâles. La compensation de dosage génique implique l'inactivation par hétérochromatinisation d'un des 2 chromosomes X dans les cellules somatiques (Avner and Heard, 2001). Le chromosome X inactif (Xi), également appelé Corpuscule de Barr, se localise à la périphérie du noyau (Barr and Bertram, 1949). Cet état inactif sera maintenu au cours des divisions cellulaires (Lyon, 1961).

Ce processus est initié par un locus présent au sein du chromosome X : le centre d'inactivation Xic, et implique deux ARN non codants antiparallèles : Xist (sens) et Tsix (antisens) (Brockdorff et al., 1991); (Brown et al., 1991); (Lee et al., 1995). Dans un premier temps, des modifications d'histones considérées comme activatrices, telles que la di- / tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, sont perdues. Des modifications répressives, notamment la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, apparaissent alors le long du Xi, (Plath et al., 2003); (Kohlmaier et al., 2004); (Heard, 2005). Finalement le variant d'histone macroH2A est incorporé au sein de la chromatine du Xi, suivi par la méthylation de l'ADN sur les promoteurs des gènes (Mermoud et al., 1999); (Marks et al., 2009); (Chow and Heard, 2009) (Figure 33).

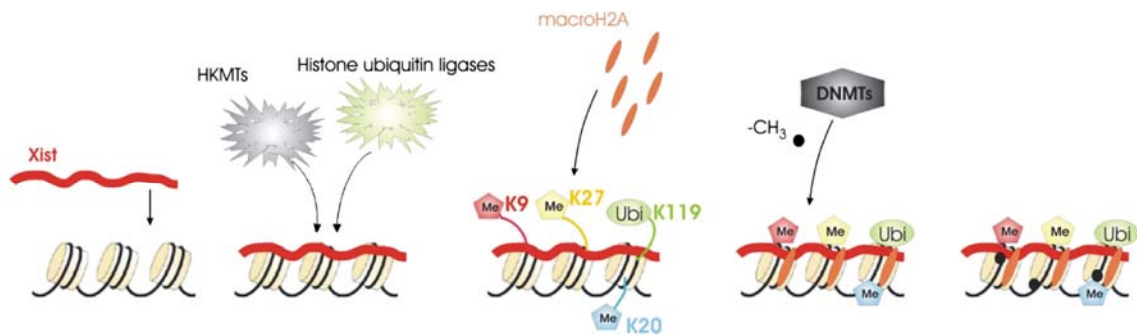


Figure 33 : Etablissement séquentiel de l'hétérochromatine facultative au niveau du chromosome X à inactiver chez les mammifères femelles. HKMTs, histone lysine méthyltransferase ; Me, méthylation ; Ubi, ubiquitinylation ; DNMT, DNA méthyltransferase. D'après Trojer P & Reinberg D, *Mol Cell*, 2007

III.1.2. L'empreinte parentale

L'empreinte génomique parentale est un ensemble de mécanismes génétiques et épigénétiques de contrôle transcriptionnel, résultant en l'expression mono-allélique de certains gènes en fonction de leur origine parentale. L'empreinte parentale des gènes est mise en place très tôt au cours du développement, à partir de la région de contrôle de l'empreinte (ICR) notamment par la méthylation de l'ADN (Santos and Dean, 2004). De manière intéressante, les ICR de l'allèle méthylé sur l'ADN sont marqués par la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et de la lysine 20 de l'histone H4 (Wu et al., 2006); (Delaval et al., 2007); (Regha et al., 2007); (Wagschal et al., 2008), des modifications caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive. Pannetier et al. montrent chez la souris que la mise en place de la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 est médiée par l'histone méthyltransférase SUV420H à partir de lysine 20 mono-méthylée de H4 mise en place par PR-SET7 ; par contre la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 n'impliquerait pas SUV39H (Pannetier et al., 2008).

Sur la centaine de gènes connus pour être régulés par des mécanismes d'empreinte, certains expriment des ARNnc qui sont impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes adjacents. L'un des exemples les plus connus est le locus IgF2R (Insulin like Growth Factor 2 Receptor), contenant trois gènes (IgF2R, Slc22a2 et Slc22a3) qui sont exprimés uniquement par l'allèle maternel. Un ARNnc appelé Air (Antisense of IgF2R) est transcrit à partir de l'allèle paternel ; il pourrait « décorer » ses gènes cibles et faciliter ainsi le recrutement de complexes répresseurs (Pauler et al., 2007).

III.2. L'hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive reste fortement compactée tout au long du cycle cellulaire, quel que soit le stade du développement et le tissu concerné, et est donc très peu accessible aux facteurs de transcription. Elle se réplique tardivement au cours de la phase S, et se localise préférentiellement en périphérie du noyau et du nucléole en interphase (Stahl et al., 1976); (Sparvoli et al., 1977). Elle présente une composition (en ADN et protéines) particulière.

L'hétérochromatine constitutive est formée principalement de séquences d'ADN courtes et répétées (alpha-satellites, satellites 2 et 3 chez l'homme ; satellites mineurs et majeurs chez la souris) (Rae and Franke, 1972), et est pauvre en gènes. Elle constitue des régions particulières du génome que sont les centromères, les péricentromères et les télomères des chromosomes. Chez l'homme, elle est également rencontrée au niveau des constriction secondaires présentes sur les chromosomes 1, 9, 16 et Y (bandes cytogénétiques 1q12, 9q12 et 16q12, et Yq12 respectivement).

L'hétérochromatine constitutive porte un épigénome spécifique caractérisé par un fort taux de méthylation de l'ADN, une hypoacétylation des histones, la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (Peters et al., 2003); (Lehnertz et al., 2003); (Schotta et al., 2004).

Bien que les mécanismes à l'origine de l'assemblage et du maintien de l'hétérochromatine constitutive ne soient pas clairement établis, le rôle de la protéine HP1 et des ARN interférents (RNAi) apparaît crucial. L'hétérochromatine constitutive joue un rôle important dans la stabilité génomique et dans le silencing de gènes, notamment via un phénomène connu sous le nom d'effet de position.

Après avoir décrit les séquences répétées, ainsi que les centromères, les régions péricentromériques et les télomères, ce chapitre traitera de la formation et du maintien de l'hétérochromatine constitutive et de son implication dans la régulation de l'expression (silencing) génique.

III.2.1. Les séquences répétées

Parmi les 98% de séquences non codantes, 75% sont soit des séquences uniques ou très peu répétées (20 % du génome) soit des séquences répétées (55 % du génome). Les séquences répétées, quant à elles, incluent d'une part des séquences répétées en tandem qui sont de grands blocs d'ADN (environ 10 % du génome humain), et d'autre part des séquences répétées dispersées (45 % du génome) (Figure 34).

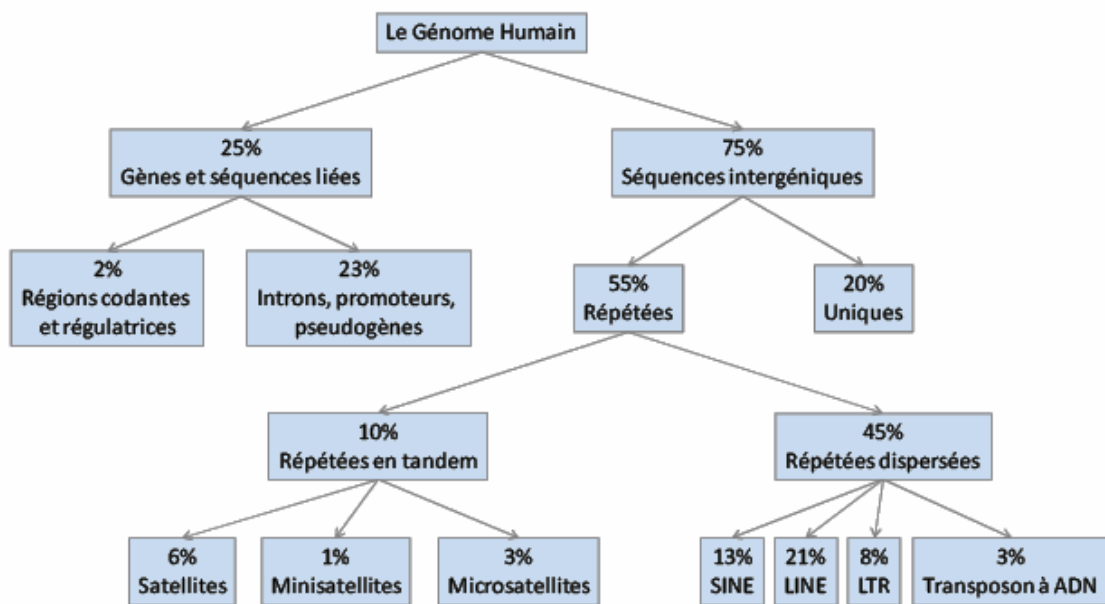


Figure 34 : Composition du génome humain. D'après Jasinsk & Krzyzosiak, 2004 ; adapté par Angeline Eymery

III.2.1.a. Les séquences répétées en tandem

Les séquences répétées en tandem, également appelées séquences satellites, représentent 10% du génome humain. Elles sont de taille variable et correspondent à des répétitions en *cis* d'un motif unitaire lui-même de longueur variable. Ainsi, selon la taille du motif et la longueur occupée par les répétitions, trois grandes catégories de séquences répétées en tandem peuvent se distinguer : les satellites, les minisatellites et les microsatellites, dont le motif répété est compris entre deux et plusieurs centaines de paires de bases.

Les satellites

Les satellites sont les séquences les plus représentées parmi les séquences répétées en tandem (Lee et al., 1997). Ils représentent en effet 6% du génome humain et sont divisés en six familles : les satellites alpha, beta, gamma, 1, 2, et 3 (Table 3).

	MOTIF	LOCALISATION
Alpha satellites	170pb	Centromères
Beta satellites	68 pb	Péricentromères 1, 3, 9, 13, 14, 15, 21, 22, Y
Gamma Satellites	220pb	Centromères 8, Y
Satellites 1	42pb	Péricentromères 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22
Satellites 2	5pb	Péricentromères 1, 2, 7, 10, 15, 16, 17, 22
Satellites 3	5pb	Péricentromères 1, 5, 10, 13, 13, 15, 17, 20, 21, 22, Y

Table 3 : Les séquences satellites, d'après Angeline Eymery.

Des précisions quant à leur séquence et à leur localisation seront apportées dans les chapitres suivants.

Les minisatellites

Outre les grands blocs d'ADN satellite, on trouve, dispersés dans le génome, des petits blocs de motifs répétés en série : les minisatellites. Ils représentent 1% du génome humain. Ils sont constitués d'un motif compris entre 6 et 100 pb. Il existe deux grandes catégories de minisatellites :

- Les séquences minisatellites hypervariables, qui présentent un haut degré de polymorphisme à la fois de la taille des unités répétées et du nombre de répétitions ; ces unités de répétitions, de 9 à 24pb, ont une séquence commune (GGGCAGGANG).

- Les séquences télomériques, composées d'un motif hexanucléotidique répété (TTAGGG) (Meyne et al., 1989); elles sont localisées au niveau des télomères et auraient pour rôle de protéger ces extrémités chromosomiques de la dégradation.

Les microsatellites

Les microsatellites représentent 3% du génome humain. Ce sont des répétitions d'un motif assez court, de 1 à 6 pb, répété un nombre limité de fois de telle sorte que la séquence totale n'excède généralement pas 150pb. Contrairement aux satellites et minisatellites, les microsatellites ne sont pas localisés à des endroits précis du génome, mais sont dispersés, et peuvent ainsi être présents au sein d'introns, d'exons ou d'autres types de séquences répétées (Li et al., 2004).

Le polymorphisme de ces microsatellites est lié au nombre de répétitions, à la taille des unités répétées mais également au motif répété. Les microsatellites constituent ainsi des marqueurs de choix pour établir des cartes génétiques. Ils sont également utilisés comme marqueurs pour l'identification d'individus, par exemple lors des tests de paternité.

Les microsatellites sont impliqués dans de nombreuses pathologies humaines. Par exemple, le syndrome du X fragile est associé à un grand nombre de répétitions CGG (entre 200 et 1000 fois) alors que les sujets sains en présentent un nombre réduit (entre 6 et 54 fois) (Lukusa and Fryns, 2008). D'autre part, l'insertion de triplets de microsatellites dans les régions codantes est associée à des pathologies neurodégénératives (Bowater and Wells, 2001).

III.2.1.b. Les séquences répétées non-satellites

Certaines séquences répétées ont été identifiées par séquençage des centromères et des régions péri-centromériques. Ces séquences non-satellites sont présentes dans les régions centromériques (Choo, 1997) et on les retrouve de façon ponctuelle dans l'ensemble du génome (Kurnit et al., 1984).

III.2.1.c. Les éléments répétés dispersés

Les éléments répétés dispersés sont communément appelés transposons. Le terme transposon caractérise des séquences d'ADN pouvant se déplacer dans le génome. Ce déplacement se fait soit sous forme ADN (Transposons à ADN), soit sous forme ARN (Rétroéléments à LTR, SINE, LINE). Dans ce dernier cas, le déplacement est appelé rétrotransposition. Chez les vertébrés, la plupart des éléments transposables connus sont des rétroéléments (93% des séquences répétées dispersées) qui sont dispersés dans les introns et à proximité des gènes. Les rétroéléments non LTR ont été classés en fonction de leur longueur : les éléments de quelques centaines de nucléotides ont été appelés SINE (Short INterspersed Elements), ceux de plusieurs milliers de nucléotides LINE (Long INterspersed Elements) (Lander et al., 2001).

LINE

Les rétroéléments LINE ont une longueur comprise entre 6 et 8kb et ils représentent 21% du génome humain. Ce sont des rétroéléments autonomes (ils codent eux-mêmes pour leur propre transposition). Il existe trois familles de LINE : LINE1, LINE2 et LINE3, mais seul LINE1 est actif ; c'est le plus représenté (17% du génome humain). Les éléments LINE, bien que dispersés, sont préférentiellement localisés dans les séquences riches en AT (Lander et al., 2001); (Kazazian, 2004). On en retrouve dans les centromères.

En rétrotransposant, certains éléments LINE1 (20 à 60 éléments fonctionnels) (Sassaman et al., 1997) peuvent créer des mutations dans les lignées germinales ou somatiques, générant diverses pathologies constitutionnelles ou acquises. Ainsi, l'insertion d'une séquence LINE1 dans le gène APC a par exemple été observée dans le cancer du colon (Miki et al., 1992).

SINE

Les rétroéléments SINE sont des éléments courts, dont la taille varie entre 100 et 300 pb, non autonomes. Il existe trois familles de SINE : Alu, Mir et Ther2/Mir3. Seul l'élément Alu, qui est spécifique des primates, est actif. Cet élément de 300 pb représente à lui seul 10% du génome humain. Les éléments SINE sont préférentiellement localisés dans les régions riches en GC (Lander et al., 2001).

Rétroélément à LTR

Les rétroéléments à LTR (Long Terminal Repeat), sont composés de longues répétitions terminales qui contiennent les éléments régulateurs nécessaires à la transcription. Ces éléments autonomes possèdent les gènes gag et pol qui codent pour la protéase, la reverse transcriptase, la RNaseH et l'intégrase. Ils se différencient des rétrovirus par l'absence de gène env nécessaire à la formation de l'enveloppe. Il existe une grande variété de rétroéléments à LTR mais seule la famille ERV (Endogenous RetroVirus), spécifique des vertébrés, est active. Contrairement aux séquences SINE et LINE, la distribution des rétroéléments à LTR est plutôt homogène au sein du génome (Lander et al., 2001).

Les transposons à ADN

Les transposons à ADN ressemblent aux transposons bactériens. Ils possèdent des séquences terminales répétées inversées et codent pour la transposase. Comme les rétroéléments à LTR, les transposons à ADN sont répartis de manière homogène dans le génome (Lander et al., 2001).

Les séquences répétées composent les centromères, les régions péri-centromériques / constriction secondaires, et les télomères. Il est à noter que, de manière très intéressante, ces séquences peuvent être transcrites dans certaines conditions (réponse cellulaire au stress, développement, différenciation, cycle cellulaire, sénescence, cancers) (Eymery et al., 2009a) (Eymery et al., 2009b).

III.2.2. Les centromères

Le centromère est une structure chromosomique particulière, définie en cytogénétique comme la constriction primaire du chromosome. C'est au niveau du centromère que se forme le kinétochore, complexe protéique responsable de l'attachement des microtubules au chromosome au cours de la mitose et de la méiose. Le kinétochore participe au maintien de la cohésion des chromatides sœurs jusqu'à l'anaphase, et assure le déplacement des chromosomes à chaque extrémité de la cellule. A ce titre, il représente un des points clés du contrôle du cycle cellulaire en mitose : l'absence de fixation d'une chromatide sœur sur le fuseau mitotique, ou un attachement inapproprié, conduit à un arrêt de la mitose et à l'apoptose. Ces fonctions sont cruciales pour assurer une bonne ségrégation des chromosomes au cours du cycle cellulaire (Smith, 2002); (Liu et al., 2003); (Vagnarelli et al., 2008); (Allshire and Karpen, 2008); (Santaguida and Musacchio, 2009).

III.2.2.a. Les séquences répétées centromériques

Les centromères sont constitués de larges blocs de séquences répétées de la famille des séquences satellites, de séquences répétées non-satellites et d'éléments transposables comme les LINE.

Le clonage de plusieurs centromères humains a permis d'en dégager une structure générale (Choo, 1997). Les alpha-satellites sont les séquences les plus abondantes dans le centromère, et sont y toujours présentes. La famille alpha-satellites compte au moins 53 sous-familles, principalement localisées dans le domaine central du centromère, et formant de larges blocs, entre lesquels peuvent s'insérer d'autres séquences satellites (satellites 1, 2 et 3) (He et al., 1998b), (He et al., 1998a). Certaines des sous-familles alpha-satellites sont spécifiques d'un centromère (par exemple D1Z5), d'autres sont présentes sur plusieurs chromosomes (par exemple D1Z27). Le centromère est composé de 1500 à plus de 30000 copies d'une répétition

en tandem de séquences alpha-satellite (171pb). La longueur des centromères peut aller de 240kb à 5Mb d'ADN (Csink and Henikoff, 1998), (Murphy and Karpen, 1998) , (Lo et al., 1999), (Amor et al., 2004) (Figure 35).

Par ailleurs, les chromosomes 8 et X sont également constitués de gamma-satellites (Lin et al., 1993); (Lee et al., 1995). Même si les séquences consensus diffèrent pour ces deux chromosomes, un motif de 20pb est particulièrement conservé (TCAGGGGGACGTTGAGG CAG) ainsi que 8 motifs tétramériques ((G/C)AGG).

III.2.2.b. Paramètres épigénétiques et protéines centromériques

Bien que les alpha-satellites soient présents dans tous les centromères, ces séquences ne seraient pas essentielles pour la formation d'un centromère actif : il existe dans la littérature plusieurs cas décrivant la formation de néo-centromères fonctionnels en absence de séquences alpha-satellites (Barry et al., 1999); (Blennow et al., 1994); (du Sart et al., 1997); (Voullaire et al., 1993).

Des paramètres épigénétiques et des protéines spécifiques joueraient ainsi un rôle déterminant dans la centromérisation, c'est-à-dire dans la détermination / l'identité des centromères. En effet, un certain nombre de protéines impliquées dans la structure ou la fonction du centromère ont été identifiées : CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I et Mis12 notamment (Figure 35). D'autre part, l'hétérochromatine péricentromérique et l'ARN interférence joueraient un rôle important (Folco et al., 2008); (Kagansky et al., 2009).

CENP-A est un variant de l'histone H3 spécifique des centromères, dont la fonction est essentielle pour la ségrégation des chromosomes (Howman et al., 2000). CENP-A lie les séquences alpha-satellites à la surface du centromère (Ando et al., 2002). C'est une protéine conservée (Allshire and Karpen, 2008); (Santaguida and Musacchio, 2009).

Cependant l'histone H3, globalement di-méthylée sur sa lysine 4, reste présente au niveau de la chromatine centromérique. L'organisation de la chromatine centromérique est complexe : H3 est présente sur la face interne du centromère, là où les chromatides soeurs sont jointes, alors que CENP-A est localisée sur la face externe, là où se forme le kinétochore (Sullivan and Karpen, 2004). Le kinétochore est un complexe protéique relativement bien conservé au cours de l'évolution. Chez l'Homme, il regroupe des protéines fondatrices telles que CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I et Mis12 (Figure 35). Ce complexe est localisé sur le centromère tout au long du cycle cellulaire (Allshire and Karpen, 2008); (Santaguida and Musacchio, 2009).

CENP-B se localise au niveau du centromère en se liant à un motif spécifique de 17pb, la CENP-B box, présente dans les alpha-satellites humains et les satellites mineurs murins (Masumoto et al., 1989) (Sugimoto et al., 1998). Elle provoque le repositionnement des nucléosomes autour

de la région CENP-B box (Yoda et al., 2000). CENP-B jouerait un rôle important pour la formation de centromères *de novo*, puisque des séquences satellites alpha-satellite ne possédant pas la CENP-B box ne peuvent pas former des centromères (Ohzeki et al., 2002).

CENP-C n'est ciblée sur le centromère que lorsque CENP-A est présente (Howman et al., 2000); (Fukagawa, 2004).

D'autres protéines sont retrouvées au niveau du centromère, certaines présentes de façon transitoire (CENP-E, CENP-F, INCENP, MAD1/2L1, BUB1, TBC1D1), et d'autres jouant un rôle dans l'organisation de la chromatine, la régulation de la transcription ou l'activité des protéines dépendantes de la chromatine (Choo, 2000), (Aagaard et al., 1999) : l'ADN topoisomerase II, des protéines HMG (High Mobility Group), HP1 (heterochromatin Protein 1), SUV39H1 et la PARP (Poly ADP ribosyl Transferase) (Fukagawa, 2004).

L'inactivation par knock-out de SUV39H1 engendre des défauts mitotiques sévères et une instabilité génomique (Aagaard et al., 2000), suggérant un rôle important de SUV39H1 dans le contrôle de l'organisation des chromosomes au cours de la mitose. SUV39H1 et HP1 forment un complexe au niveau des centromères, et seraient donc impliquées dans l'organisation de leur structure chromatinienne, même si ces 2 protéines sont majoritairement retrouvées au niveau des régions péri-centromériques (Aagaard et al., 1999). La présence de HP1 est régulée au cours de la mitose par la kinase Aurora B, qui en phosphorylant H3 sur la sérine 10 provoque la dissociation de HP1 de l'hétérochromatine (Hirota et al., 2005).

D'autre part, des études récentes indiquent que l'hétérochromatine péri-centromérique serait nécessaire au recrutement de CENP-A sur les centromères chez la levure (Folco et al., 2008). L'ARNi ne serait pas requis pour l'assemblage du kinétochore, mais servirait à diriger la formation d'hétérochromatine (Kagansky et al., 2009).

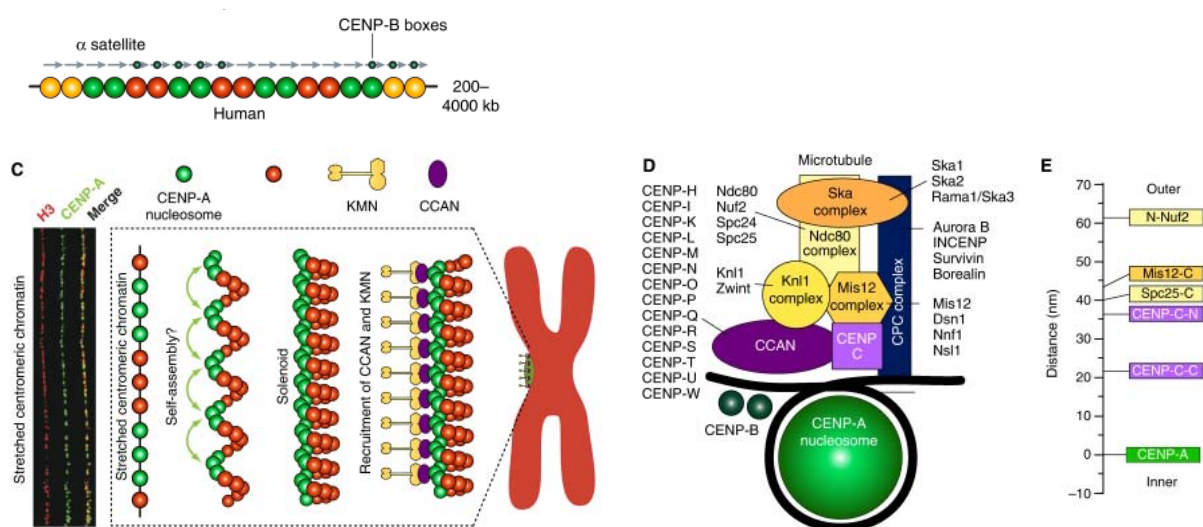


Figure 35 : Organisation des centromères. Les nucléosomes contenant CENPA sont représentés par les ronds verts, et ceux contenant H3, par les ronds rouges. D'après Santaguida & Musacchio, EMBO J, 2009

III.2.3. Les régions péricentromériques

Les régions qui entourent le centromère sont appelées hétérochromatine péricentrique, hétérochromatine péricentromérique ou encore péricentromères. Chez l'homme, l'hétérochromatine dite péricentromérique est également retrouvée au niveau de constriction secondaires présentes sur certains chromosomes. C'est le cas des chromosomes 1, 9 et 16 qui portent une constriction secondaire juxta-centromérique (bande cytogénétique q12), et du chromosome Y dont la constriction secondaire juxta-télocentromérique est également localisée en position q12. Les constriction secondaires sont composées en majorité de séquences d'ADN répétées de type satellites.

III.2.3.a. Les séquences répétées péricentromériques

Les péricentromères humains sont composés de trois types majeurs de séquences répétées : les satellites 1, 2 et 3 (Table 4). Tagarro et al ont déterminé en 1994 la composition des régions péricentromériques à l'aide d'amorces spécifiques de ces séquences satellites (Tagarro et al., 1994). La localisation de ces séquences a pu être établie par hybridation *in situ*.

Les satellites 1 sont composés d'un monomère de 42pb comprenant 2 parties. Le satellite IA (A) de 17pb, de séquence conservée et le satellite IB (B) de 25pb plus variable. Ces 2 séquences sont répétées en tandem ABABA (Prosser et al., 1986), (Tagarro et al., 1993). Ces séquences se distinguent des satellites 2 et 3 par leur résistance à différentes enzymes de restriction (Frommer et al., 1982). Les satellites 1 sont retrouvés au niveau des régions péricentromériques des chromosomes 3, 4 et 13 (Tagarro et al., 1994).

Les satellites 2 et 3 (2% et 1.5% du génome) sont beaucoup plus abondants que les satellites 1 (0.5%) (Jones et al., 1974); (Gosden et al., 1975); (Mitchell et al., 1979). Les satellites 2 et 3 sont composés d'un motif pentamérique GGAAT (Mitchell et al., 1979); (Frommer et al., 1982); (Prosser et al., 1986); (Hollis and Hindley, 1988). Les répétitions de ce pentamère sont espacées par des séquences spécifiques : CATCATCGA(A/G)T pour les satellites 2, et CAACCCGA(A/G)T pour les satellites 3 (Table 4). Les satellites 2 sont retrouvés majoritairement au niveau des régions 1q12 et 16q12 mais sont présents également en 9q12 et sur les péricentromères des chromosomes 2, 7, 10, 15, 17 et 22. Les satellites 3 sont localisés de façon préférentielle sur la région 9q12 avec des sites mineurs sur la région 1q12, ainsi que sur les péricentromères des chromosomes 5, 10, 17, 20, 21, 22 et Y (Tagarro et al., 1994).

Ces localisations ayant été établies par hybridation *in situ*, une technique relativement peu sensible, il n'est pas exclu que d'autres chromosomes puissent également être enrichis, dans une moindre mesure, en séquences satellites 2 et 3.

De plus, les régions péricentromériques des chromosomes 9, 1 et 3 sont également composés de beta-satellites, constitués de monomères de 68bp riches en GC (46%) mais hautement divergents (Agresti et al., 1989); (Cooper et al., 1992); (Meneveri et al., 1993).

	Types de satellites	Séquences
Centromères	Alpha satellites (171pb)	CTTCTGTCTAGTTTTTATATGAAGATATCCCGTTTCCAACCAAG GCCTCAAAGCGGTCCAAATATCCACAAGCTGATTCTACAAAA GAGTGTTCAAAAGTCTCTATGAAAAGGAAGTTCAACTCTG TGAGTTGAATGTATACATCACAAAGAAGTTCTGAGAATG
Péricentromères	Satellites 1 (42pb)	(ACTTTC/GATATTTTATGT) (ACAAGTATAATA(C/T)A(C/T)ATTTGGGT)
	Satellites 2 (5pb)	(CGAATGGAAT) ₂ + (CAT) _{1 ou 2}
	Satellites 3 (5pb)	(GGAAT) _n +/- (CAACCCGA(C/A)T)

Table 4 : Les séquences centromériques et péricentromériques humaines, d'après Angeline Eymery.

III.2.3.b. Paramètres épigénétiques et protéines péricentromériques

L'hétérochromatine constitutive péricentromérique est caractérisée par un fort taux de méthylation de l'ADN, une hypoacétylation des histones, la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4. De plus, les protéines SUV39H et HP1 sont particulièrement enrichies dans ces régions. (Peters et al., 2003); (Lehnertz et al., 2003); (Schotta et al., 2004). Un rôle de l'ARNi pour diriger la formation d'hétérochromatine est également décrit (Kagansky et al., 2009).

La tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est catalysée par les enzymes SUV39H1/2 à partir d'un état de méthylation intermédiaire, la lysine 9 mono-méthylée de H3. Une question majeure est de savoir comment l'état de méthylation intermédiaire reconnu par les protéines SUV39H1/2 est mis en place et ciblé au bon endroit et au bon moment. Loyola et al. montrent que l'histone H3K9 méthyltransférase SETDB1 s'associe avec le complexe chaperon HP1alpha/CAF1 (chromatin assembly factor 1). Ce complexe mono-méthyle la lysine 9 de l'histone H3 non-nucléosomique. Ainsi, le complexe HP1alpha/CAF1/SETDB1 fournit probablement H3K9mono-méthylée en vue d'une consécutive tri-méthylation par SUV39H1/2 au niveau des régions péricentromériques. La connexion de CAF1 avec la réplication de l'ADN, de HP1alpha avec la formation de l'hétérochromatine et de SETDB1 avec H3K9me1 suggère un mécanisme hautement coordonné pour assurer la propagation de H3K9me3 à l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la réplication de l'ADN (Loyola et al., 2009); (Quivy et al., 2008).

D'autre part, une nouvelle modification d'histone, la tri-méthylation de la lysine 64 de l'histone H3, a été décrite comme fortement et transitoirement enrichie au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique lors du développement ; elle est associée aux séquences répétées et aux régions génomiques inactives. Cette modification pourrait aider à protéger les nucléosomes dans un état répressif approprié durant le développement (Daujat et al., 2009).

III.2.3.c. Rôle des péricentromères - cohésion des chromatides sœurs

Les péricentromères jouent un rôle crucial lors de la mitose, dans la cohésion des chromatides sœurs. En effet, les péricentromères constitueraient le dernier point d'attachement des chromatides sœurs entre elles, du moins chez la souris (Guenatri et al., 2004).

Les péricentromères conservent l'adhésion des chromatides sœurs jusqu'au début de l'anaphase, via les complexes de cohésine. Le complexe multiprotéique de cohésine est composé de 4 sous unités : SMC1 (Structural Maintenance of Chromosomes), SMC3, SCC1 (également appelée rad21) et SCC3 (Sister Chromatid Cohesion) (Losada 2007). A la transition métaphase-anaphase, la dégradation de la cohésine permet la dissociation des chromatides sœurs et leur migration vers des pôles opposés. Des expériences réalisées chez *S.pombe*, la souris et l'Homme indiquent qu'HP1 est impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs (Bernard et al., 2001); (Peters et al., 2001); (Inoue et al., 2008), en permettant une bonne localisation de certaines protéines du complexe de cohésine. Cependant, dans les cellules de mammifère, la voie SUV39H-HP1 ne serait pas nécessaire pour le recrutement et la protection mitotique des cohésines au niveau des centromères (Koch et al., 2008).

D'autre part, l'hétérochromatine péricentromérique serait nécessaire au recrutement de CENP-A sur les centromères chez la levure (Folco et al., 2008).

III.2.3.d. Rôle des constriction secondaires

Les fonctions exactes des constriction secondaires sont mal connues. Cependant, on sait que la région péricentromérique du chromosome 9 joue un rôle important au cours du choc thermique (Jolly et al., 2002). Cette étude montre que lors du choc thermique, le facteur HSF1 (Heat Shock Factor 1) est recruté rapidement et de façon réversible au niveau de granules de stress localisées sur la bande 9q11-q12 (composée en majorité de séquences satellites 3). De plus, et de manière très intéressante, le stress thermique conduit à la transcription de séquences satellites 3 de l'hétérochromatine 9q12. Ces travaux révèlent la présence d'une activité transcriptionnelle des séquences répétées au cours d'un stress tel que le choc thermique (Jolly et al., 2004); (Rizzi et al., 2004); (Eymery et al., 2009a).

Si le rôle fonctionnel de ces transcrits satellites 3 est inconnu, plusieurs hypothèses sont envisagées. Le fait que les transcrits satellites 3 synthétisés dans les cellules soumises à un choc thermique restent dans le noyau à proximité du locus 9q12 suggèrent leur implication dans la protection du locus 9q12, et/ou dans la régénération de la structure de la chromatine de ce locus après le stress (Jolly et al., 2004). Ils pourraient également être impliqués dans la structure de l'hétérochromatine (Kloc et al., 2008). Ainsi, l'activation transcriptionnelle des régions péricentromériques pourrait représenter un moyen de modifier transitoirement l'organisation structurale et fonctionnelle du noyau (Eymery et al., 2009a).

III.2.3.e. Polymorphisme des constriction secondaires

Dès l'apparition des techniques cytogénétiques de bandes chromosomiques, les cytogénéticiens constatent que les bandes d'hétérochromatine 1q12, 9q12 et 16q12 sont de taille éminemment variable d'un individu à l'autre. De plus, elles peuvent subir des remaniements de structure (inversion péricentrique par exemple), sans aucune conséquence phénotypique apparente (Magenis et al., 1978). Ces polymorphismes chromosomiques transmis de manière mandélienne posent cependant la question d'éventuelles répercussions indirectes sur la stabilité génétique de ces régions.

De nombreux travaux ont ainsi cherché à établir des corrélations avec une prédisposition à développer des tumeurs (Atkin, 1977; Atkin and Baker, 1977). Mais ils se sont finalement arrêtés faute de pouvoir tirer une conclusion définitive quant à la définition de groupes à risque tumoral.

III.2.4. Les télomères

Les télomères sont des structures chromosomiques situées aux extrémités des chromosomes. Dès 1938, Muller individualise le rôle primordial du télomère dans la stabilité des chromosomes (Muller, 1938). En 1939, Barbara Mc Clintock montre, chez le maïs, que les télomères ont pour fonction la protection du chromosome contre les recombinaisons et les fusions, suggérant une structure particulière des télomères.

III.2.4.a. Structure du télomère

La structure de base du télomère a été étudiée pour la première fois chez *Tetrahymena thermophila*. Les télomères sont composés d'un motif de base (TTGGG) répété un grand nombre de fois (Blackburn and Gall, 1978). Chez l'homme, le télomère est composé du motif TTAGGG répété de 250 à 15 000 fois (Morin, 1989), (Moyzis et al., 1988). Le télomère peut être subdivisé en 2 parties :

- la partie télomérique composée de la répétition du motif TTAGGG
- la partie subtélomérique composée de séquences répétées et des TAR (Telomere Associated Proteins)

Chez la levure, la jonction télomère / euchromatine contient une séquence consensus de réplication. La structure générale du télomère est très conservée parmi les différentes espèces suggérant une fonction cellulaire conservée importante.

III.2.4.b. Les protéines télomériques

Parmi les protéines associées aux télomères chez l'homme, on retrouve deux protéines, TRF1 et TRF2 (T2A3G Repeat Factor- 1 et 2) possédant un domaine hélice-boucle-hélice permettant la liaison avec la répétition TTAGGG (Chong et al., 1995), (Broccoli et al., 1997). Ces deux protéines sont impliquées dans le contrôle *in vivo* de la longueur du télomère.

La télomérase joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du télomère (Greider, 1996). En effet, l'ARN polymérase n'étant pas capable de répliquer correctement les extrémités 3' des chromosomes, une partie des séquences télomériques est perdue à chaque réplication. La télomérase permet le maintien de la taille du télomère en ajoutant des répétitions TTAGGG par un mécanisme de « reverse transcription » (Morin, 1989). Elle est constituée d'un complexe multiprotéique associé à un composant ARN (TERC) (Bianchi and Shore, 2008).

La télomérase est exprimée dans les cellules germinales et les cellules souches. Son expression est éteinte dans les cellules somatiques. Ainsi, les télomères se raccourcissent progressivement au cours des divisions cellulaires. Lorsque le télomère atteint une taille critique, la cellule entre en sénescence. L'érosion du télomère fait partie des caractéristiques du vieillissement cellulaire.

III.2.4.c. Statut épigénétique du télomère

Les télomères humains et murins présentent une disposition particulière des nucléosomes décrite depuis 1994 (Tommerup et al., 1994). Ce n'est que relativement récemment que les modifications des histones ont été analysées sur les télomères de mammifères. Ils sont enrichis en tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, mise en place par les enzymes SUV39H1/2, et liée par HP1 (Garcia-Cao et al., 2004). Ils présentent également une méthylation de l'ADN et une tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4, et impliqueraient la machinerie d'ARN interférence (Schoeftner and Blasco, 2008); (Schoeftner and Blasco, 2009) (Figure 36).

De plus, la perte du statut hétérochromatinien des télomères provoque leur élongation (Garcia-Cao et al., 2004). Ces résultats montrent que les modifications épigénétiques du télomère peuvent altérer la fonction télomérique.

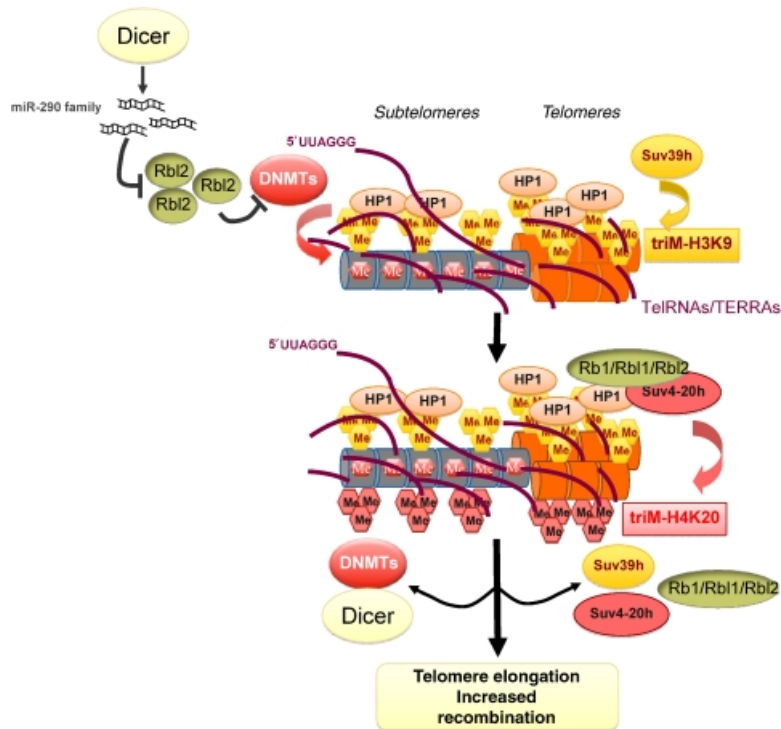


Figure 36 : Assemblage de l'hétérochromatine télomérique et subtélomérique.
D'après Schoeftner, Blasco, EMBO, 2009

III.3. Formation et maintien de l'hétérochromatine

III.3.1. Rôle de HP1 dans la formation et le maintien de l'hétérochromatine

III.3.1.a. HP1 et SUV39H

Plusieurs observations ont permis de proposer un modèle de formation de l'hétérochromatine (péri)centromérique, impliquant la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, SUV39H et HP1. Tout d'abord, SUV39H1 et SUV39H2 sont localisés préférentiellement au niveau de l'hétérochromatine (péri)centromérique (O'Carroll et al., 2000); (Rice et al., 2003). Ensuite, HP1 se lie de manière spécifique à l'histone H3 dont la lysine 9 est tri-méthylée, au niveau des régions hétérochromatiques (Lachner et al., 2001), (Bannister et al., 2001). Enfin, la perte d'activité de SUV39H1 conduit à une absence de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, ainsi qu'à la perte de localisation d'HP1 au niveau des péricentromères (Bannister et al., 2001); (Schotta et al., 2002).

Ainsi, le modèle proposé est le suivant : SUV39H1 méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3 à partir du substrat lysine 9 mono-méthylée, elle-même mise en place par l'enzyme G9a (Rea et al., 2000), (Lachner et al., 2001), (Rice et al., 2003) ; ceci génère un site de haute affinité pour la protéine HP1 (Bannister et al., 2001), (Lachner et al., 2001) ; HP1 peut alors recruter SUV39H (ou d'autres facteurs), qui va tri-méthylé la lysine 9 des histones H3 voisines, permettant le recrutement de HP1 sur les sites voisins, et ainsi de suite. Selon ce

modèle, HP1 médierait ainsi la propagation de l'hétérochromatine sur les séquences adjacentes (Figure 37).

Une étape préalable impliquant les HDAC a été proposé : l'acétylation et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 étant mutuellement exclusives, la déacétylation de la lysine 9 de H3 par les HDAC serait requise pour sa méthylation par SUV39H (Sims et al., 2003). Cette idée est renforcée par le fait que SUV39H1 a la capacité d'interagir avec les HDAC1/2/3 (Vaute et al., 2002). Les auteurs suggèrent que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par SUV39H serait une conséquence de son recrutement par les HDAC.

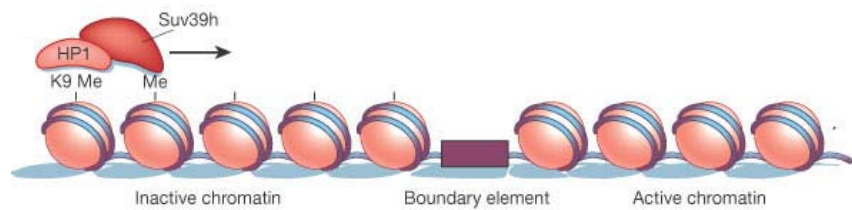


Figure 37 : Modèle de propagation de l'hétérochromatine médiée par HP1.
D'après Felsenfeld & Groudine, Nature, 2003

La localisation préférentielle de la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, de SUV39H1/2 et de HP1 au niveau des péri-centromères par rapport aux centromères, peut s'expliquer par la proportion beaucoup plus faible de H3 qui est en partie remplacée par le variant d'histone CENP-A au niveau du centromère (Jacobs et al., 2001). Ainsi il y a plus de H3-lysine 9 à méthyler au niveau des régions péri-centromériques qu'au niveau des centromères, donc plus de SUV39H1/2 recrutés sur ces régions, et comme cela génère plus de H3-lysines 9 tri-méthylées, il y aura plus de HP1 venant se lier.

III.3.1.b. HP1 et SUV4-20H

En 2004, Schotta et al. montrent que, comme la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 est enrichie au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique, et que la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par SUV39H est requise pour la mise en place de la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4. Schotta et al. identifient alors deux nouvelles histone méthyltransférases, SUV4-20H1 et SUV4-20H2, qui se localisent à l'hétérochromatine péri-centromérique, et qui tri-méthylent spécifiquement la lysine 20 de l'histone H4. La capacité de SUV4-20H à interagir avec HP1 suggère un mécanisme séquentiel pour établir la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et de la lysine 20 de l'histone H4 au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique (Schotta et al., 2004).

Par une approche pointue, Souza et al. identifient clairement HP1 comme le partenaire d'interaction principal de SUV4-20H2, et proposent donc que SUV4-20H2 soit recruté à l'hétérochromatine péri-centromérique via sa liaison avec HP1. De plus, l'étude par FRAP des

propriétés dynamiques de SUV420H2 et de HP1 dans des cellules vivantes indiquent que les protéines HP1 sont extrêmement mobiles, alors que SUV420H2 reste fortement lié à l'hétérochromatine péri-centromérique. Ainsi, SUV420H2 pourrait être recruté à l'hétérochromatine en interagissant avec HP1, et serait ensuite maintenu de manière stable sur ses sites de liaison, d'une façon indépendante de HP1 (Souza et al., 2009).

III.3.1.c. HP1, SUV39H et DNMT

Cette fois-ci, c'est une connexion entre la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones, lors de la répression transcriptionnelle chez les mammifères, qui est suggérée par Fuks et al. Ils montrent que DNMT3A et DNMT1 peuvent interagir directement avec SUV39H1 et HP1beta (Fuks et al., 2003a). Ainsi, sur la base du modèle précédent, la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par SUV39H1 permet le recrutement de HP1 ; les capacités des DNMT à interagir avec SUV39H1 et HP1 entraînent leur recrutement au niveau de l'hétérochromatine, où elles vont pouvoir méthyler l'ADN au niveau des régions méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 ; l'ADN méthylé peut ensuite être lié par la protéine MeCP2, et sachant qu'elle a la capacité de recruter une activité histone méthyltransférase, elle peut à son tour favoriser la méthylation des histones.

Ce processus séquentiel couplant la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones pourrait propager un état chromatinien inactif stable (Fuks et al., 2003a). La chronologie de ces séquences n'est pas clairement établie, et deux modèles sont proposés :

- Dans le premier cas, les DNMT seraient recrutées par la protéine SUV39H ou HP1 sur les régions du génome contenant une chromatine préalablement méthylée sur la lysine 9 de l'histone H3, signifiant que l'activité histone méthyltransférase de SUV39H1 est requise pour la méthylation de l'ADN par les DNMT.
- Dans le deuxième cas, c'est la méthylation de l'ADN qui influencerait la méthylation des histones ; cette hypothèse est confortée par le fait que MeCP2, via son domaine MBD, peut recruter une activité méthyltransférase au niveau de la région ADN méthylée concernée (Fuks et al., 2003b).

Cependant, des expériences chez la souris seraient plutôt en faveur du premier cas (Lehnertz et al., 2003). Ces auteurs montrent un lien physique et fonctionnel entre Dnmt3b et Suv39h/HP1 : dans les cellules sauvages, Dnmt3b interagit avec HP1alpha et est concentré au sein de foyers hétérochromatiques, alors que dans des cellules double mutantes pour Suv39h, Dnmt3b perd cette localisation. Ces cellules présentent un profil de méthylation de l'ADN altéré des séquences satellites péri-centromériques, mais pas des autres séquences répétées. Au contraire, la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique n'est pas affectée dans des cellules simple mutantes pour Dnmt1 ou double mutantes pour Dnmt3a/Dnmt3b.

Ainsi, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 médiée par Suv39h semble diriger la méthylation de l'ADN des séquences satellites majeures, au niveau de l'hétérochromatine péracentromérique.

III.3.1.d. Interactions entre les différents acteurs

Les protéines HP1 peuvent interagir avec d'autres protéines par le biais de leur domaine « chromoshadow », notamment avec des répresseurs transcriptionnels. Il s'est également avéré que DNMT1 pouvait interagir avec HDAC1 (Fuks et al., 2000) et HDAC2 (Rountree et al., 2000). D'autre part, le complexe de remodelage de la chromatine Mi-2/NURD contient notamment HDAC1, HDAC2 et des protéines MBD (Kantor et al., 2003); (Denslow and Wade, 2007). La méthylation de l'ADN et la déacétylation peuvent donc faire partie d'un même mécanisme de répression.

Les protéines MBD ont la capacité d'interagir avec un grand nombre de partenaires : ont été décrites des interactions MBD, HDAC (HDAC1/2) (Ng et al., 1999), complexes de remodelage de la chromatine (MeCP2/SIN3, MBD2-3/Mi2-NuRD, MBD2/SIN3) (Wade et al., 1999), (Knoepfler and Eisenman, 1999), facteurs impliqués dans l'assemblage de la chromatine au cours de la réplication (MBD1/CAF1p150) (Reese et al., 2003) ou HMT (MBD1/SUV39H1) (Fujita et al., 2003) (Li et al., 2006); (Wysocka et al., 2006), et miRNA (Guil and Esteller, 2009).

III.3.2. L'ARN interférence

Chez *S.pombe*, la formation de l'hétérochromatine dépend de la production de petits ARN complémentaires à l'ADN centromérique (Reinhart and Bartel, 2002) par la machinerie RNAi. Ces petits ARN médieraient le recrutement d'activités modifiant la chromatine, telles que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Volpe et al., 2002), permettant la liaison de protéines silenciers (Hall et al., 2002) au niveau du site de nucléation. Un modèle général de propagation est proposé (pour revue, (Grewal and Moazed, 2003). Volpe et al ont montré que des transgènes insérés dans l'hétérochromatine constitutive devenaient actifs transcriptionnellement en absence de Dicer, Argonaute ou RdRp chez *S.pombe* (Volpe et al., 2002).

Verdel et al ont par la suite purifié et caractérisé un nouveau complexe multiprotéique, RITS (RNA Induced Initiation of Transcriptional Silencing), qui relie directement la production de siRNA par Dicer à l'hétérochromatine (Verdel et al., 2004). En effet ce complexe contient une protéine à chromodomaine Chp1 liant les centromères (Partridge et al., 2002) et Ago1 (homologue de Argonaute). Les auteurs proposent que le complexe RITS joue un rôle analogue à RISC, en médiant la formation d'hétérochromatine au niveau de régions spécifiques. Ils montrent que :

- le siARN purifié est homologue aux séquences centromériques ciblées par RISC
- les mutants Dicer n'ont plus de siARN au niveau du complexe inactif
- Ago1 et Chp1 lient les centromères
- Dicer, Ago1 et Chp1 sont nécessaires pour la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la liaison de SWI6 (HP1) au niveau des centromères

Ils suggèrent donc un modèle dans lequel RITS médie la formation d'hétérochromatine soit par une interaction ARN/ARN avec les ARN transcrits au niveau des centromères soit une interaction ARN/ADN avec l'ADN centromérique. La liaison de Chp1 par le biais du chromodomaine sur la lysine 9 de l'histone H3 méthylée stabiliserait l'interaction de RITS avec la chromatine. Ainsi chez *S.Pombe*, RITS utiliserait les siARN dérivés des transcrits centromériques pour guider sa localisation au niveau des répétitions centromériques où il induit la formation d'hétérochromatine (Verdel et al., 2004), (Buhler and Moazed, 2007); (Verdel et al., 2009).

Motamedi et al. ont identifié un 2^{ème} complexe nécessaire à la formation d'hétérochromatine au niveau des centromères : le « RNA-Directed RNA polymerase Complex » (RDRC). Les complexes RITS et RDRC constituent deux composants critiques de la voie RNAi.

Ces mécanismes sont conservés chez les plantes, et pourraient l'être également chez les animaux, comme le suggèrent des travaux montrant des voies endogènes impliquant des siRNA dirigés contre des séquences répétées, chez la drosophile et les mammifères (Verdel et al., 2009). Pal-Bhadra et al. montrent que chez la drosophile, le silencing hétérochromatique et la localisation de HP1 seraient dépendants de la machinerie RNAi (Pal-Bhadra et al., 2004). D'autre part, des cellules souches embryonnaires de souris déficientes pour Dicer présentent des défauts de différenciation et de silencing centromérique (Kanellopoulou et al., 2005).

Dans une lignée cellulaire hybride homme-poulet contenant le chromosome 21 humain, la perte d'expression de Dicer conduit à l'accumulation d'ARN centromériques et péri-centromériques. Cette accumulation d'ARNnc conduit à la séparation prématurée des chromatides soeurs et finalement à la mort cellulaire (Fukagawa et al., 2004). Enfin, de manière intéressante, une corrélation inverse entre le taux d'ARN péri-centromérique et l'expression de Dicer a été décrite chez la souris (Terranova et al., 2005).

L'absence de détection de ces petits ARN dans d'autres systèmes cellulaires pourrait simplement refléter leur faible niveau d'expression. En effet, les cellules de mammifères ne possèdent pas de système d'amplification tels que l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RDRP) présente chez la levure (Bouzinba-Segard et al., 2006).

III.4. Hétérochromatine et silencing génique par effet de position (PEV)

L'hétérochromatine constitutive peut réprimer l'expression de gènes par la formation et le maintien d'une structure hétérochromatinienne sur le gène cible. Ce phénomène est également décrit sous le nom d'effet de position (PEV, Position Effect Variegation), car l'extinction d'expression observée a la particularité d'être complète dans certaines cellules et absente dans d'autres se traduisant par un profil d'expression en mosaïque.

On distingue l'effet de position en *cis*, qui réfère à la répression d'un gène suite à sa juxtaposition à l'hétérochromatine par réarrangement ou transposition (Reuter et al., 1982), (Hartmann-Goldstein, 1967), (Zhimulev et al., 1988). Ce phénomène, notamment observé chez la drosophile, est associé à une propagation d'hétérochromatine sur les régions adjacentes. L'effet de position en *trans* désigne la répression d'un gène résultant de son recrutement à proximité de l'hétérochromatine dans un compartiment nucléaire où la concentration locale en facteurs de silencing est élevée (Henikoff et al., 1995), (Cockell and Gasser, 1999).

Chez la drosophile, HP1 est associée de façon prédominante aux régions chromosomiques connues pour provoquer le silencing de gènes au cours de réarrangements chromosomiques. Des mutations dans le gène *Su(var)2-5*, qui code pour la protéine HP1, ont pour conséquence de supprimer l'effet PEV (Eissenberg et al., 1990); (Ebert et al., 2006).

III.4.3.a. Silencing - effet de position en *cis*

Un exemple particulièrement bien étudié de cet effet de position est celui du gène *White+*, qui code pour une protéine responsable de la pigmentation rouge des yeux de la drosophile. Lorsque ce gène est juxtaposé à proximité d'un bloc d'hétérochromatine, il présente un niveau d'expression considérablement diminué, induisant un phénotype en mosaïque blanc-rouge (Eissenberg et al. 1990). Ce phénomène d'inactivation génique en *cis*, a été attribué à une propagation de l'hétérochromatine sur les séquences euchromatiques adjacentes (Weiler and Wakimoto, 1995).

L'existence d'un phénomène identique est prouvée chez les mammifères (Walters et al., 1996); (Francastel et al., 1999). L'expression des transgènes varie en fonction du site d'intégration : diminuée, voire absente quand le transgène est situé à proximité d'un centromère, elle peut être levée par insertion d'un enhancer ou d'un LCR (Locus Control Region), ou par relocalisation du transgène à distance de l'hétérochromatine (Francastel et al., 1999).

D'autre part, l'hétérochromatine télomérique de la levure est capable d'induire un silencing transcriptionnel par un mécanisme d'effet de position, le TPE (Telomere Position Effect) (Fourel et al., 1999). L'hétérochromatine formée au niveau de sites de nucléation spécifiques

(séquences silencer ou ADN répété) se propagerait grâce au recrutement d'enzymes modifiant les histones et de protéines structurales de l'hétérochromatine (Sir2, Sir3, Sir4, Swi6/HP1) (Grewal and Elgin, 2002), (Jenuwein and Allis, 2001), (Hoppe et al., 2002), (Rusche et al., 2002), (Luo et al., 2002). Ce complexe répresseur permettrait ainsi la formation d'un environnement répressif silencieux.

III.4.3.b. Silencing - effet de position en trans

Le mutant brown (brown dominant, bwD) est un cas bien décrit de PEV chez *D. melanogaster*, dans lequel une inversion chromosomique apporte un bloc d'hétérochromatine d'environ 2Mb dans le locus *brown* (Henikoff et al., 1995). L'allèle mutant, *bwD*, exerce un effet répressif dominant sur l'allèle homologue *brown* sauvage, résultant en une expression qui est limitée à moins de 2% des cellules dans l'œil. A la fois l'allèle muté et l'allèle sauvage sont plus fréquemment associés à l'hétérochromatine centromérique dans le noyau des cellules qui portent le réarrangement que dans ceux des cellules sauvages (Csink and Henikoff, 1996); (Dernburg et al., 1996), suggérant l'existence d'un effet PEV en *cis* et en *trans*. L'analyse du locus muté bwD présente une structure cytologique inhabituellement dense, et la protéine HP1 est retrouvée au niveau du locus muté. L'allèle muté engendre un effet de position en *trans* sur le locus sauvage porté par le chromosome homologue. Ce locus sauvage ne présente pas de structure cytologique inhabituelle et ne lie pas la protéine HP1 (Belyaeva et al., 1997). L'effet dominant de l'effet de position observé pour cette mutation est causé par la liaison des 2 loci suggérant qu'un contact entre les 2 loci est requis pour cet effet PEV (Talbert et al., 1994) (Csink and Henikoff, 1996) (Dernburg et al., 1996).

Dans un modèle de différenciation des cellules T et d'activation des cellules B on assiste à un repositionnement dynamique de gènes spécifiques vis-à-vis de foyers hétérochromatiques, en fonction de leur activité transcriptionnelle (Brown et al., 1997a), (Brown et al., 1999). La protéine Ikaros, facteur de transcription spécifique du système lymphoïde, semble jouer un rôle important dans cette réorganisation. Il se localise au niveau de foyers nucléaires hétérochromatiques, est redistribué de façon dynamique au cours du cycle cellulaire et colocalise avec les gènes inactifs (Brown et al., 1997a), (Brown et al., 1999). Ikaros est par ailleurs impliqué dans le recrutement du facteur de remodelage NuRD au niveau de l'hétérochromatine par le biais de l'interaction avec Mi2. Ce complexe contient HDAC1 et HDAC2, suggérant donc un rôle potentiel dans les phénomènes de répression de l'expression génique et le recrutement de ces complexes dans des compartiments de silencing (Kim et al., 1999).

D'autres études montrent un rôle des histones déacétylases dans la formation de ces foyers d'hétérochromatine (Taddei et al., 2001). Ces données montrent que la répression transcriptionnelle de certains gènes est étroitement corrélée à leur rapprochement vers des foyers d'hétérochromatine péricentromérique et à la mise en place de codes histones répressifs.

L'hétérochromatine s'organise donc dans l'espace nucléaire sous forme de foyers, en association avec des protéines réprimant la transcription.

Conclusion

L'hétérochromatine peut exercer une répression de l'expression génique par la formation et le maintien d'une structure hétérochromatinienne sur le gène cible. Cette répression peut être médiée par propagation de la structure hétérochromatinienne sur les régions codantes adjacentes ou par séquestration de ces régions au sein de compartiments hétérochromatiques répressifs. Les compartiments hétérochromatiques peuvent se comporter comme des réservoirs de facteurs ayant une activité sur la chromatine. Le fait d'avoir des gènes situés à leur proximité grâce à des facteurs spécifiques peut permettre l'établissement d'un statut chromatinien répressif permettant le silencing à long terme et le maintien du ciblage vers ces compartiments.

Afin d'assurer une fonction particulière, les séquences génomiques n'ont pas forcément besoin d'être transcrites et traduites. En effet, les régions d'hétérochromatine constitutive jouent un rôle fondamental dans l'intégrité génomique et le silencing génique. Ainsi, les séquences génomiques utiles et fonctionnelles ne sont pas restreintes aux seuls gènes.

Partie 2 : Ontogenèse et oncogenèse B

Les lymphomes B malins non-Hodgkiniens (LMNH) constituent un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde B, et résultent de l'accumulation de cellules bloquées à différents stades de maturation. Leur diversité est le reflet de la variété des fonctions de la cellule lymphocytaire normale et de la complexité des phénomènes de sa maturation. Ainsi, avant de parler des lymphomes, il convient de décrire rapidement les principales étapes du processus d'ontogenèse.

II. L'ontogenèse B

L'hématopoïèse constitue un processus multi-étapes marqué par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques totipotentes en progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes, à l'origine de l'ensemble des cellules matures circulantes. Les progéniteurs lymphoïdes génèrent les lymphocytes B, les lymphocytes T, et les lymphocytes NK (Natural Killer).

La première phase de la lymphopoïèse B, indépendante de l'antigène, se déroule dans la moelle osseuse. Après une étape transitionnelle périphérique, la phase finale de maturation, dépendante du contact antigénique, se produit dans les organes lymphoïdes secondaires. La lymphopoïèse B est contrôlée par un réseau complexe de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, propres à chaque étape (Figure 38).

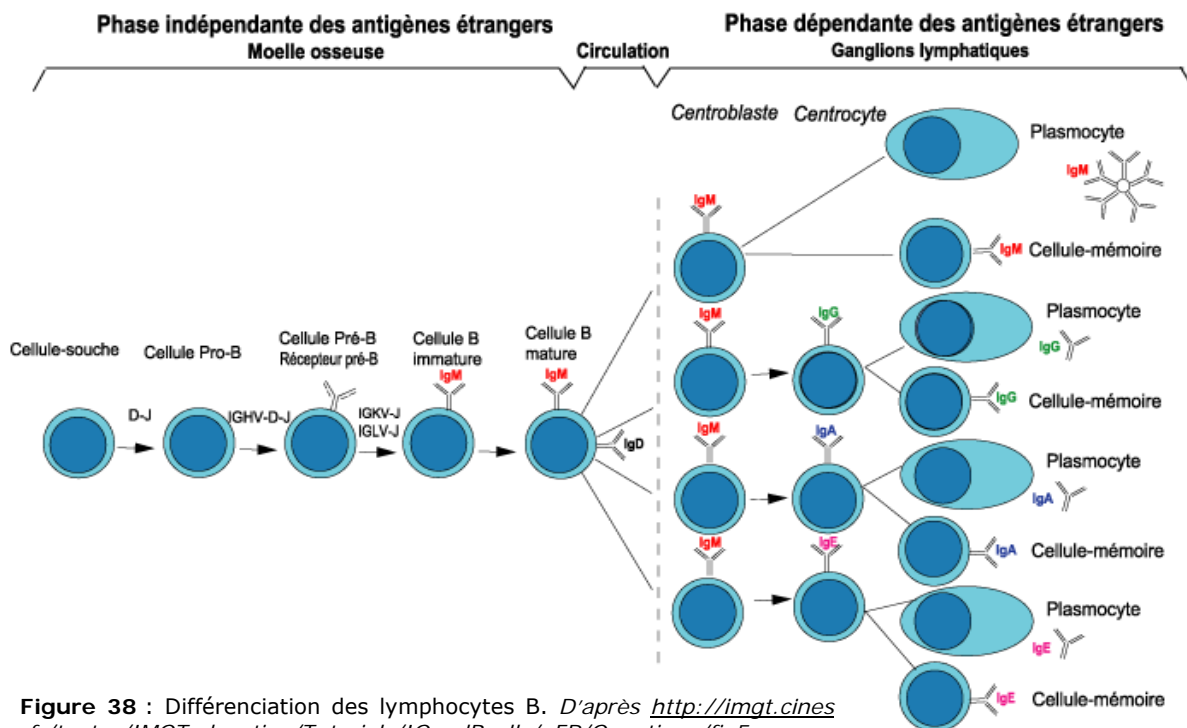


Figure 38 : Différenciation des lymphocytes B. D'après <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/FR/Genetique/fig5.png>

Le rôle de l'ontogenèse B est de générer une importante variété de cellules B possédant des récepteurs antigéniques de répertoire étendu et de très grande affinité, soit sécrétés par les plasmocytes, cellules effectrices de la réponse immune humorale, soit localisés à la surface des lymphocytes B mémoires (Figure 38). La diversité de ce répertoire découle de la capacité remarquable des lymphocytes B et T à introduire et tolérer des modifications somatiques de leur génome, lors de trois réarrangements génétiques distincts : la recombinaison V(D)J, les mutations somatiques et la commutation de classe. Ces modifications constituent un modèle unique de plasticité physiologique du génome. Elles induisent des cassures double-brin de l'ADN et mettent secondairement en jeu des mécanismes de réparation, nécessaires à la préservation de l'intégrité du génome.

II.1. La recombinaison V(D)J

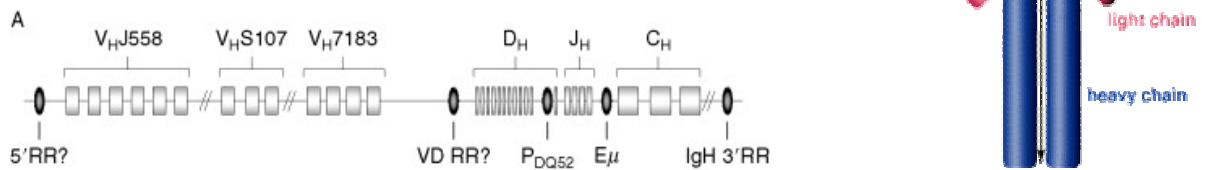
Lors des premières étapes de la différenciation lymphocytaire B, les gènes codant pour les chaînes d'immunoglobuline subissent des réarrangements juxtaposant un segment V (variable), un segment J (Jonction) et parfois un segment D (diversité). Les réarrangements V(D)J aboutissent à la production de gènes d'immunoglobuline fonctionnels et constituent le premier processus permettant la génération d'une grande diversité de lymphocytes B formant le répertoire B.

La recombinaison V(D)J est un mécanisme de recombinaison site-spécifique (le seul connu chez les eucaryotes supérieurs). Ce mécanisme repose sur la reconnaissance et la coupure de sites spécifiques de l'ADN double brin par les recombinases RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Gene 1/2), puis sur la ligation de l'ADN réarrangé par des complexes protéiques de réparation du système NHEJ. La réparation de l'ADN au niveau de la jonction des segments génère des imprécisions nucléotidiques locales, augmentant la diversité des immunoglobulines produites (Schatz et al., 1992).

II.1.1. Organisation du locus V(D)J

Chez l'homme, trois loci codent pour les chaînes d'immunoglobulines : IGH (14q32) code pour les chaînes lourdes, IGK (2p11) et IGL (22q11) pour les chaînes légères kappa et lambda, respectivement. Le locus IGH regroupe 123 à 129 segments variables V, 27 segments de diversité D, 7 segments de jonction J et 11 segments constants C. Chaque segment C code pour une région constante μ , δ , γ (1 à 4), ϵ et α (1 et 2). Les loci IGK et IGL ne possèdent pas de segment D. Les gènes d'immunoglobuline subissent un réarrangement des segments V-J pour les IGL et V-D-J pour les IGH. La recombinaison des segments V, (D) et J est contrôlée par des éléments cis-régulateurs (promoteurs et puissants enhancers), et produit un gène fonctionnel qui est transcrit (figure 39).

Figure 39 : Organisation du locus *IgH* murin (d'après Perlot & Alt, *Adv Immunol*, 2008) et structure d'une immunoglobuline (d'après <http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/tutorials/antibody/structure.html>).



II.1.2. Mécanismes de recombinaison V(D)J

La recombinaison V(D)J a lieu au niveau de séquences spécifiques, les RSS (Recombination Signal Sequence), adjacentes à chaque segment V, D et J. Elles sont composées d'une séquence heptamère et d'une séquence nonamère, séparées par des séquences non conservées « espaceurs » de 12 ou 23pb. La recombinaison a lieu uniquement entre deux séquences RSS contenant un espaceur différent, c'est-à-dire entre une séquence RSS-12pb et une séquence RSS-23pb (Tonegawa, 1983). Suite à la coupure de l'ADN au niveau de la jonction heptamère/segment codant, les extrémités des segments codants vont former une structure en épingle à cheveux (Figure 40).

La recombinaison V(D)J est initiée par les recombinases RAG1 et RAG2, facteurs lymphoïdes nécessaires à la recombinaison. Ce sont des endonucléases qui permettent la reconnaissance et le clivage de la séquence RSS, l'ouverture de la structure en épingle à cheveu et la jonction des segments codants au cours de la recombinaison. Des souris invalidées par knock-out pour les gènes *RAG* ne peuvent plus recombiner les gènes d'immunoglobulines et ne produisent plus de lymphocytes B matures ou de cellules T (Mombaerts et al., 1992), (Shinkai et al., 1992). Les gènes *RAG* ne possèdent pas d'introns et sont très conservés.

Suite au clivage, les recombinases restent associées aux segments codants et forment un complexe « post-clivage » permettant la ligation des segments codants par le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining) (Figure 40). Ce processus constitue le principal mécanisme de réparation des cassures double brin des cellules somatiques, en l'absence de séquence homologue, surtout en phase G1 du cycle cellulaire.

Les facteurs participant à ce processus NHEJ incluent le complexe protéine kinase dépendante de l'ADN ou DNA-PK, l'endonucléase Artemis, le complexe ADN ligase IV / XRCC4 (Xray Cross Complementing Group 4), le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 et le variant d'histone H2AX phosphorylé (Critchlow et al., 1997), (Paull et al., 2000), (Jung et al., 2006) (Figure 40). Le complexe DNA-PK est composé de la sous-unité catalytique DNA-PK_{CS} et de l'hétérodimère Ku. La sous-unité DNA-PK est une sérine/thréonine kinase dépendante de l'ADN impliquée dans la

détection des lésions de l'ADN. Cette kinase est capable d'auto-phosphorylation et possède de nombreux substrats comme Ku70, Ku80 et XRCC4. La phosphorylation de ces substrats participe à la régulation de la réparation des cassures double-brin (pour revue, (Lees-Miller and Meek, 2003)). Les souris mutées pour cette enzyme sont immunodéficientes car bloquées pour la recombinaison V(D)J. L'activation de DNA-PKcs induit la phosphorylation d'Artemis. Le complexe DNA-PKcs-Artemis permet l'ouverture des joints codants et l'excision par coupure de quelques nucléotides (Rooney et al., 2003; Rooney et al., 2002). L'hétérodimère Ku (Ku70/Ku80) lie l'ADN double-brin coupé ou l'ADN simple brin et les structures en épingles à cheveux. Ku aide à la liaison du complexe ADN ligase IV/XRCC4 au niveau des bouts francs.

L'ouverture de ces segments codants est accompagnée de la génération d'imprécisions nucléotidiques (délétion ou insertion):

- insertion « non-templated » : jusqu'à 15 nucléotides (N) sont ajoutés par l'enzyme TdT (Terminal déoxynucléotidylTransferase) au niveau des jonctions codantes ; cette insertion se produit uniquement au stade précoce du développement du lymphocyte B, stade où la TdT est exprimée et où a lieu la recombinaison V(D)J (Li et al., 1993).
- insertion « templated » : quelques nucléotides P (palindromique) complémentaires à l'extrémité de la jonction codante sont ajoutés pour former des bouts francs et permettre à la ligation d'avoir lieu.

L'étape finale de ligation des segments est assurée par le complexe ADN ligase IV / XRCC4 qui se fixe sur les bouts francs. Elle génère le joint codant et le joint signal, ce dernier étant éliminé (Figure 40). La coordination de la coupure et de la ligation permettrait d'éviter les coupures uniques qui ne pourraient être recombinaisonnées, et qui laisseraient donc une cassure double brin dans l'ADN. L'ensemble de ces modifications nucléotidiques des segments codants constitue une nouvelle source de diversification du répertoire au niveau de la jonction entre les segments V, (D) et J.

II.1.3. Contrôle de la recombinaison VDJ

Le réarrangement séquentiel et ordonné des segments V, (D) et J nécessite une régulation spatio-temporelle rigoureuse, à la fois tissu-spécifique (réarrangement des Ig pour les précurseurs lymphoïdes B uniquement) et locus-spécifique (la chaîne lourde est réarrangée avant la chaîne légère, la chaîne kappa avant lambda). De plus, le principe de l'exclusion allélique doit être respecté (un seul allèle fonctionnel productif). Cette régulation dynamique est orchestrée par des modifications de la relocalisation spatiale nucléaire des loci, de l'expression des recombinases et de l'accessibilité de la chromatine.

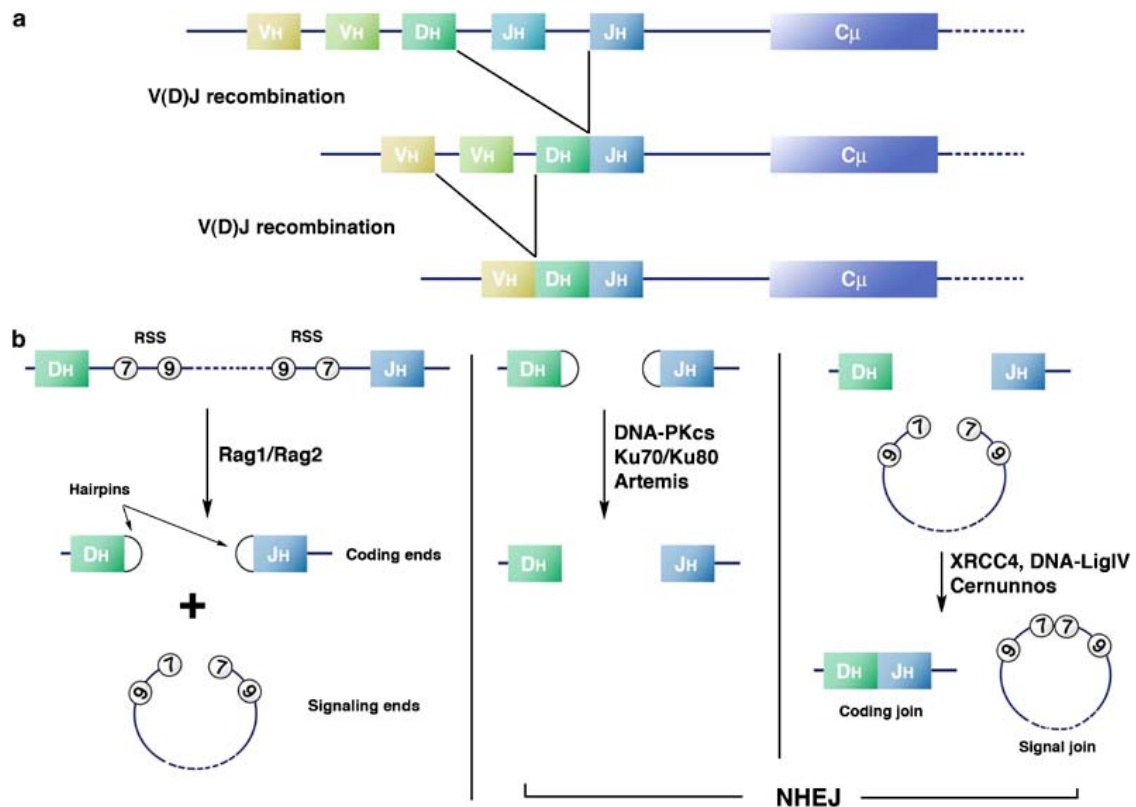


Figure 40 : Recombinaison V(D)J. a) Représentation schématique du locus IGH et du processus de recombinaison V(D)J. b) Les trois étapes de la recombinaison V(D)J, détaillées dans le texte. D'après Soulas-Sprauel, *Oncogene*, 2007

II.1.3.a. Expression contrôlée des recombinases

Les recombinases sont exprimées spécifiquement dans les cellules lymphoïdes au cours du réarrangement V(D)J. Le niveau d'expression de RAG2 est contrôlé par la phosphorylation de sa thréonine-490 par la cycline cdc2, qui conduit à sa dégradation (Lin and Desiderio, 1995).

Dans la lignée B, l'activité des recombinases dépend d'un élément en cis, l'activateur ERag, situé à 22 kb en amont de RAG2 et nécessaire pour induire l'expression de RAG1 et de RAG2 (Hsu et al., 2003). Les facteurs de transcription E2A (E47) et FOXP1 se fixent sur cet activateur ERag et contrôlent l'expression des recombinases (Hu et al., 2006). Par ailleurs, le facteur de transcription c-MYB, non spécifique de lignée, interagit avec PAX5, aboutissant à l'activation du promoteur de RAG2 (Kishi et al., 2002).

II.1.3.b. Accessibilité des séquences RSS

Le réarrangement V(D)J dépend également de l'accessibilité du locus IGH, et plus particulièrement des séquences RSS. Seule une faible fraction des séquences RSS est accessible aux recombinases, en fonction du type cellulaire (B ou T) et du type de locus (IGH puis IGL pour les cellules B) effectuant la recombinaison. L'inaccessibilité des séquences RSS serait due à l'état chromatinien et aux protéines se liant aux RSS. Ces séquences doivent être activement ouvertes pour la recombinaison.

Contrôle épigénétique

L'accessibilité de la chromatine pour la recombinaison dépend notamment des modifications chimiques de l'ADN et des histones. L'ADN des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines est méthylé dans les tissus non lymphoïdes, alors qu'il devient hypométhylé lors de l'initiation de la recombinaison dans les cellules lymphoïdes (Mostoslavsky et al., 1998). De plus, chez la souris, le taux d'acétylation des histones augmente parallèlement à la recombinaison V(D)J (McMurry and Krangel, 2000); (Johnson et al., 2003). La lysine 9 de l'histone H3 du locus V_H est méthylée dans des lignées non-B mais pas dans les cellules B.

Plus récemment, Liu et al. montrent que RAG2 se lie à la lysine 4 di- ou tri-méthylée via son domaine PHD, et que cette liaison est nécessaire pour une recombinaison efficace (Liu et al., 2007). Dans le même temps, Matthews et al. précisent la spécificité de liaison de RAG2 pour la forme tri-méthylée de la lysine 4 de l'histone H3, et montrent que la mutation du motif de reconnaissance de RAG2 pour H3K4me3 affecte sévèrement la recombinaison V(D)J. De même, la réduction du niveau de H3K4me3 conduit à une diminution de la recombinaison V(D)J *in vivo*. D'autre part, un motif essentiel à la reconnaissance de H3K4me3 par RAG2 est retrouvé muté chez des patients présentant des syndromes d'immunodéficience (Matthews et al., 2007).

L'accessibilité des séquences RSS aux recombinases nécessite également un remodelage de la chromatine. La recombinaison dépend par exemple de la position des nucléosomes par rapport aux séquences RSS : l'« encombrement » physique sur les séquences RSS inhiberait la fixation des recombinases (Baumann et al., 2003). D'autre part, le remplacement de l'histone H3 méthylée sur la lysine 9 par le variant H3.3 pourrait faciliter l'accessibilité de la chromatine du locus V(D)J pour la recombinaison au stade pro-B (Johnson et al., 2004). Le complexe de remodelage SWI/SNF serait recruté au locus IGH par un processus enhancer-dépendant, et ce recrutement serait essentiel pour générer l'accessibilité aux recombinases (Osipovich et al., 2009).

Des données récentes montrent la recombinaison préférentielle, récurrente, de certains segments VH au sein d'une même famille VHS107. L'acétylation des histones H3 et H4, le faible taux de diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et l'hypométhylation de l'ADN encadrant les séquences RSS sont observés uniquement au niveau de ces segments VH fréquemment réarrangés. Ces facteurs sont à l'origine d'un environnement permissif ciblé pour la recombinaison et démontrent le potentiel inégal de réarrangement VH au sein d'une même famille (Espinoza and Feeney, 2007).

Rôle des facteurs de transcription

Le rôle de PAX5 (Paired box protein 5), facteur de transcription impliqué dans la différenciation des lymphocytes B, apparaît essentiel dans la régulation de la recombinaison (Cobaleda et al., 2007). Au cours de la recombinaison V(D)J on assiste à une perte de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 concomitante avec l'expression de PAX5. Son expression est nécessaire et

suffisante à la perte de la méthylation. Par ailleurs, l'interaction de PAX5 avec les recombinaisons déclenche le clivage des séquences RSS du segment VH (Zhang et al., 2006).

D'autres facteurs de transcription contrôlant la lymphopoïèse B sont impliqués dans la régulation de l'accessibilité aux recombinaisons, tels que E2A et EBF (Early B cell Factor) (Romanow et al., 2000), STAT5 (Bertolino et al., 2005), et le facteur régulateur des interférons IRF4/MUM1 (Ma et al., 2006).

II.1.3.c. Transcription germinale antisens

En 2004, des études réalisées chez la souris ont montré pour la première fois l'implication d'un transcrit germinale antisens génique et intergénique de la région IGH-V (famille J558), produit au stade pro-B au moment où la recombinaison V-DJ s'effectue (Bolland et al., 2004).

La présence concomitante de transcrits V_H sens et antisens pourrait créer un ARN double brin, cible du système ARN interférence, et pourrait recruter des histones méthyltransférases comme EZH2 (Bolland et al., 2004), qui est nécessaire pour le réarrangement des segments V_H (Su et al., 2003). Alternativement, ces transcrits pourraient être le reflet d'une chromatine accessible. Ils seraient donc simplement une conséquence de l'ouverture de la chromatine au cours de la recombinaison. Une dernière possibilité enfin, serait la formation d'un état hétérochromatinien médié par ces transcrits double-brin limitant alors l'accessibilité des segments V aux recombinaisons, au niveau de l'allèle non réarrangé.

D'autre part, la réduction de SWI/SNF dans les cellules pro-B inhibe la transcription antisens à travers l'ensemble des clusters IGH, soulignant le rôle important de SWI/SNF dans l'ouverture initiale de la chromatine (Osipovich et al., 2009).

II.1.3.d. Relocalisation spatiale des loci

Dans les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules non-B, le locus *IGH* est positionné à la périphérie nucléaire, environnement considéré comme répressif pour la chromatine (Kosak et al., 2002). La lamine, protéine de la membrane nucléaire, s'associe aux séquences distales V_HJ558, dans les progéniteurs lymphoïdes murins (Yang et al., 2005). Au stade pro-B, le locus *IGH* migre en position plus centrale, à l'intérieur du noyau, où l'environnement est considéré comme permissif pour la transcription et la recombinaison (Kosak et al., 2002) (Figure 41). Après recombinaison D_HJ_H, le locus *IGH* se replie en forme de boucle (Figure 42) (Roldan et al., 2005). L'analyse de la structure du locus *IGH* par FISH 3D suggère que ce repliement est dirigé par le régulateur de la transcription PAX5, et facilite la recombinaison entre les segments VH distaux et les segments DHJH (Fuxa et al., 2004); (Sayegh et al., 2005).

La recombinaison coordonnée des loci d'Ig homologues serait importante pour l'exclusion allélique. Hewitt et al. montrent que les allèles homologues des Ig s'apparient à un stade spécifique qui reflète les patrons de recombinaison de ces loci. L'introduction de cassures d'ADN sur un des allèles d'Ig induit le repositionnement ATM-dépendant de l'autre allèle à l'hétérochromatine péricentromérique. ATM, activé par l'allèle clivé, agit en *trans* sur l'allèle non clivé pour empêcher une recombinaison bi-allélique, et des cassures ou translocations chromosomiques (Hewitt et al., 2009).

Des résultats similaires ont été démontrés pour le locus IG κ (Figure 41) (Roldan et al., 2005). Au stade pro-B, le repositionnement dynamique nucléaire du locus IG κ de la périphérie vers le centre, s'accompagne d'une acétylation de l'histone H3 et d'une méthylation de la lysine 4 de H3. L'allèle tardivement répliqué est localisé au niveau de foyers hétérochromatiniens, en association avec Ikaros et HP1- γ (Goldmit et al., 2005). Cette association entre l'hétérochromatine et l'allèle non productif est également observée dans les lymphocytes B activés, alors que l'allèle transcrit est localisé à distance de l'hétérochromatine (Skok et al., 2001); (Fuxa et al., 2004).

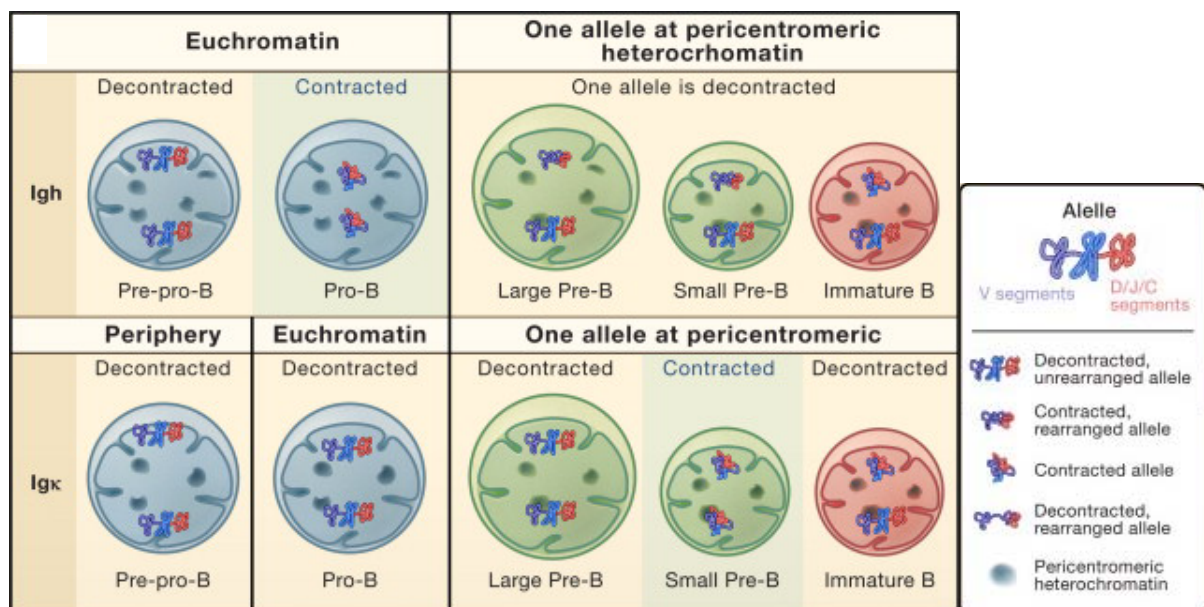


Figure 41 : Localisation et conformation des loci IgH et Igk au cours du développement lymphocytaire. D'après Jhunjunwala, *Cell*, 2009

Ces études suggèrent que les modifications épigénétiques des loci des Ig constituent des événements moléculaires précoces et permettent de diriger la recombinaison vers les loci appropriés suivant le principe de l'exclusion allélique. Ce processus de régulation actif restreint l'initiation du réarrangement à un seul allèle et permet le maintien d'une spécificité monoallélique pour le BCR. Concernant le locus *IGH*, l'exclusion allélique s'accompagne d'un rétrocontrôle inhibiteur sur le segment V_HD_HJ_H réarrangé. En effet, la déacétylation de la lysine 9 de l'histone H3 du segment V_H, médiée par la signalisation du pré-BCR, bloque l'accès/l'ouverture du second allèle (Johnson et al., 2004).

Ainsi, la réorganisation spatiale dynamique des loci des Ig joue un rôle crucial dans l'initiation de la recombinaison V(D)J et dans le processus d'exclusion allélique (Jhunjhunwala et al., 2009).

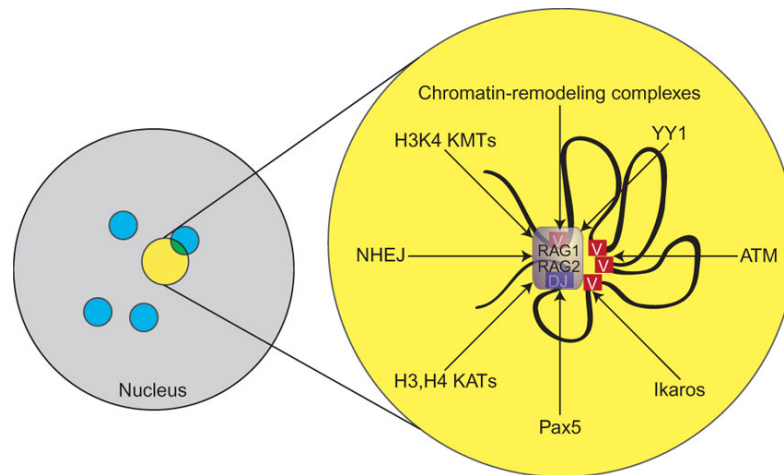


Figure 42 : Dans le noyau (cercle gris), la machinerie de recombinaison V(D)J pourrait exister en tant que compartiment subnucléaire spécialisé localisé en position centrale dans le noyau (cercle jaune). Ce compartiment serait probablement distinct des "usines de transcription" (cercles bleus). A droite, vue agrandie d'une usine de recombinaison V(D)J. Les boucles noires représentent le locus IGH. Les facteurs probablement enrichis dans cette usine. KMTs, lysine methyltransferases ; KATs, lysine acetyltransferases. D'après Matthews & Oettinger, *Nat Immunol*, 2009

Le développement lymphoïde B précoce est orchestré par un réseau élaboré de facteurs de transcription et de régulateurs transcriptionnels ubiquitaires ou lymphocyte-spécifiques (PU.1, Ikaros, BCL11A, E2A, EBF, FOXP1 et PAX5), et de récepteurs de cytokine (IL7-R, Flk2/Flt3). L'activation de l'ensemble de ces facteurs s'effectue selon un mode hiérarchisé et combinatoire, par l'intermédiaire de circuits complexes.

La recombinaison V(D)J conduit à l'expression d'une chaîne légère qui s'associe à la chaîne lourde μ membranaire pour former une IgM de surface, ou BCR (B Cell Receptor), caractérisant le lymphocyte B immature. Il est à noter que seule une faible proportion de cellules B immatures échappe au processus de sélection négative, qui permet d'éliminer les cellules autoréactives pour les antigènes du soi.

Les lymphocytes B immatures ayant échappé à l'apoptose et porteurs d'une IgM de membrane quittent la moelle osseuse et transitent par voie sanguine et lymphatique pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires. Cette étape de migration s'accompagne d'une maturation des lymphocytes B définis comme cellules B transitionnelles.

La phase de transition des cellules B est marquée par la perte de sensibilité à la sélection négative par le BCR, la migration dans les follicules lymphoïdes spléniques et l'acquisition d'une sensibilité aux signaux induits par les lymphocytes T. Seules 10% des cellules B transitionnelles échappent à l'apoptose. La maturation du lymphocyte B est caractérisée par la coexpression en surface d'une IgM et d'une IgD, possédant le même domaine variable, donc la même spécificité antigénique. Cette coexpression provient d'un épissage alternatif du segment VDJ

soit sur le gène μ , soit sur le gène δ (Preud'homme et al., 2000). Cette phase met en jeu deux voies de signalisation fondamentales pour la survie et la différenciation de ces cellules B : la signalisation via le BCR et la signalisation via le BAFF-R (BAFF receptor).

Une fois arrivées au sein des organes lymphoïdes secondaires, les cellules B vont poursuivre leur maturation pour générer des lymphocytes B immunocompétents : les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes. Cette phase est dépendante de l'antigène. Deux processus génétiques fondamentaux, initiés par l'expression de la protéine AID (Activation Induced cytidine Deaminase), vont permettre une diversification des immunoglobulines produites : les mutations somatiques et la commutation de classe.

II.2. Les mutations somatiques

Le répertoire des immunoglobulines est accru au cours de la réponse immune par accumulation de mutations somatiques dans les régions variables des gènes *IGH* et *IgL*. Ces événements surviennent à un taux de 1/1000pb par cycle au sein des centres germinatifs des follicules lymphoïdes, et se produisent dans une zone de 1,5 kb en aval du promoteur (Storb et al., 1998).

Le processus de mutations somatiques est initié par la protéine AID, et nécessite les interactions CD40/CD40L (ligand) et le contact avec l'antigène. AID déamine les cytidines en uraciles, générant des mésappariements U:G, qui sont pris en charge par le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MSH2, MSH6, Exo1 et UNG), en association avec une ADN polymérase introduisant des erreurs. Ce processus aboutit à l'introduction de mutations ponctuelles dans la région variable V (pour revue, (Honjo et al., 2004), qui vont modifier, et notamment renforcer l'affinité du récepteur pour l'antigène.

Les gènes d'immunoglobuline possédant 98 à 100% d'identité avec la séquence germinale sont considérés comme non mutés. Dans le cadre d'un lymphome, ce statut non muté détermine l'origine de la cellule lymphomateuse comme naïve (ou pré-centre germinatif), alors que le caractère muté des Ig (homologie de séquence $\leq 98\%$) indique que la cellule lymphomateuse est issue du centre germinatif ou d'un stade post-centre germinatif (post-CG).

II.3. La commutation de classe

La commutation de classe va interchanger la partie constante (ou isotype) de l'Ig, générant une Ig de même spécificité mais de fonction effectrice différente. La commutation d'isotype au niveau du locus *IGH* implique des signaux de recombinaison spécifiques, les séquences S (switch), situées en 5' de chaque gène constant de la chaîne lourde (sauf Cd, exprimé par épissage alternatif). Cette commutation de classe se produit dans les lymphocytes matures (exprimant une Ig de surface de type IgM ou IgMD) en contact avec un antigène dans le centre

germinatif des follicules lymphoïdes. Contrairement à la recombinaison V(D)J, la commutation de classe est spécifique d'une région. Elle a lieu dans les introns et n'influence pas le cadre de lecture. Les régions S sont constituées de séquences de 1 à 12 kb, composées de la répétition en tandem d'un pentamère (GAGCT et GGGGT) ou d'une séquence de 49pb (Stavnezer, 1996).

La commutation de classe est contrôlée par les cellules T, différentes cytokines et les interactions CD40-CD40L (Vanasse et al., 1999), et implique des mécanismes épigénétiques (Chowdhury et al., 2008). Cette recombinaison n'est pas initiée par RAG1 et RAG2, mais les étapes finales de rapprochement des extrémités et de ligation utilisent la même voie que la recombinaison V(D)J, à savoir le complexe DNA-PK (Manis et al., 2002). Ce processus fait aussi appel à l'enzyme AID dans les premières étapes de la commutation de classe (pour revue, (Honjo et al., 2004). AID induit la production d'une recombinase qui génère des cassures double-brin dans la région S, qui sont ensuite prises en charge et réparées par le système NHEJ.

Si les mécanismes du processus de commutation de classe restent encore mal connus, leur compréhension est cruciale, du fait de l'implication des séquences S en tant que site de point de cassure au cours de certaines translocations chromosomiques dans les lymphomes.

A l'issue de la maturation dans le centre germinatif, le lymphocyte achève sa différenciation soit en plasmocyte, sécréteur d'anticorps, soit en cellule B mémoire, recirculant et assurant, en cas de contact antigénique, une production d'anticorps de haute affinité caractéristique de la réponse immune secondaire. Les mécanismes qui permettent à la cellule une différenciation dans l'une ou l'autre de ces voies sont mal connus.

Conclusion

Les étapes successives de prolifération et de sélection clonale aboutissent à la formation d'un lymphocyte B mature, dont les immunoglobulines, non autoréactives et de forte affinité avec l'antigène, ont accompli les processus de mutations somatiques et de commutation de classe. L'activité intense d'expansion clonale associée aux cassures double brin de l'ADN (induites par les mutations somatiques et la commutation de classe) constituent autant de facteurs de risque génétique pour l'ontogénie B. Les erreurs de réparation de l'ADN constituent une source importante de réarrangements chromosomiques aberrants et conduisent à la genèse de nombreuses translocations. En effet, les gènes d'Ig sont la cible de réarrangements dans 50% des cas de lymphomes B.

II. Les lymphomes malins non-Hodgkiniens

II.1. Définition et classification

Les lymphomes regroupent l'ensemble des proliférations lymphoïdes clonales malignes. Leur incidence est chiffrée à 20 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux (Fisher and Fisher, 2004).

Les Lymphomes malins non-Hodgkiniens (LMNH) constituent un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde. Ce sont des entités clinico-biologiques complexes qui résultent de l'accumulation de cellules bloquées à différents stades de maturation. Leur diversité est le reflet de la variété des fonctions de la cellule lymphocytaire normale et de la complexité des phénomènes de sa maturation. Chaque lymphome possède donc les caractéristiques du stade de maturation auquel il se développe (Figure 43).

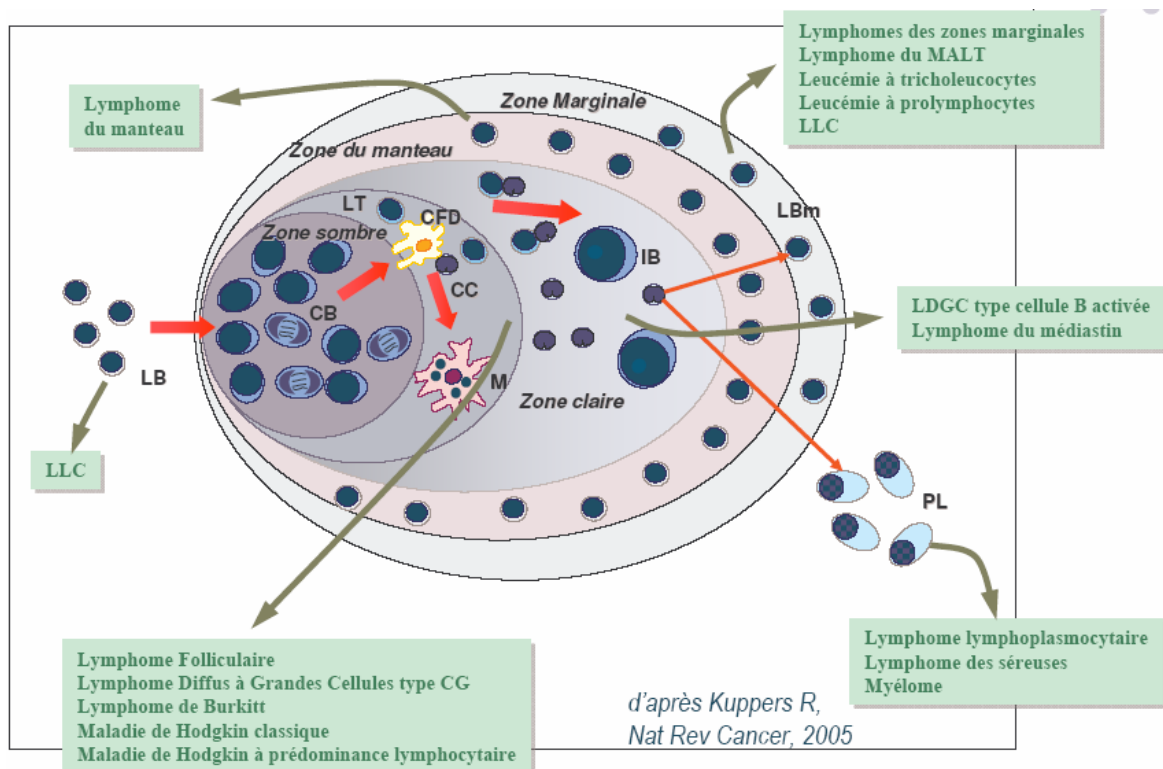


Figure 43 : Diversité des lymphomes. D'après Kuppers, Nat Rev Cancer, 2005

C'est notamment sur ces critères que repose la classification actuelle des lymphomes (OMS 2008). Chaque entité est définie selon une association de critères cliniques, morphologiques, phénotypiques, génétiques et moléculaires. Le principe de cette classification est basé sur une approche diagnostique cohérente et reproductible, et intègre la notion selon laquelle chaque entité constituerait la contrepartie tumorale d'un lymphocyte normal bloqué à un stade de différenciation donné. Cette classification offre une nomenclature standardisée et de ce fait un

langage commun, utilisable par les biologistes et cliniciens. La validité de cette classification est confirmée par de nombreuses études cliniques. L'identification précise d'une entité constitue l'étape clé pour la prise en charge thérapeutique ultérieure du patient.

On observe un intérêt croissant pour une classification moléculaire des lymphomes, que ce soit transcriptomique ou épigénétique. Ainsi des profilings d'expression génique réalisés dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL, Diffuse Large B-cell Lymphoma) ont révélé des sous-types moléculaires distincts, notamment les « Germinal Center B-cell like- » (GCB-) et les « Activated B-cell like- » (ABC-) DLBCL, qui proviennent de différents stades de différenciation / maturation lymphocytaire B, utilisent des mécanismes oncogéniques distincts, et diffèrent dans leur réponse aux chimiothérapies (Alizadeh et al., 2000; Dunleavy et al., 2009; Lenz et al., 2008; Rosenwald et al., 2002; Rosenwald et al., 2003; Staudt and Dave, 2005). Avec les signatures moléculaires nouvellement disponibles, il est maintenant possible d'évaluer le rôle de voies de signalisation spécifiques au sein de sous-groupes de lymphomes, en particulier pour les DLBCL (Feuerhake et al., 2005; Monti et al., 2005). Ainsi plusieurs des gènes exprimés de manière caractéristique dans les ABC-DLBCL sont des gènes cibles connus de NF- κ B (Davis et al., 2001; Staudt and Dave, 2005).

Le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) contrôle un programme d'expression génique impliqué dans la réponse immunitaire lymphocytaire, et est requis pour l'activation et la prolifération des lymphocytes (Karin et al., 2002; Karin and Lin, 2002; Schulze-Luehrmann and Ghosh, 2006). La voie de signalisation NF- κ B est également impliquée dans la survie de cellules B malignes : NF- κ B est activé de manière constitutive dans la majorité des cas de ABC-DLBCL, qui présente une survie moins bonne – comparé au sous-type GCB-DLBCL – après traitement par des chimiothérapies standards (Davis et al., 2001; Feuerhake et al., 2005). NF- κ B pourrait contribuer au mauvais pronostic de ces patients en contrant l'action de la chimiothérapie via son contrôle de l'expression de gènes régulateurs de la mort cellulaire (gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques). Il pourrait ainsi jouer un rôle crucial dans la transformation maligne et la progression tumorale dans ces tumeurs, et constitue donc une cible thérapeutique prometteuse (Davis et al., 2001; Feuerhake et al., 2005; Li and Verma, 2002). A ce propos, plusieurs molécules inhibitrices, dont l'inhibiteur du protéasome bortezomib, ont la capacité d'inhiber la voie NF- κ B et d'améliorer le traitement des patients ABC-DLBCL (Dunleavy et al., 2009; Lam et al., 2008).

D'autre part, la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans les cancers en réprimant potentiellement un large spectre de gènes. Les patrons aberrants de méthylation ne sont pas aléatoires, mais tumeur-spécifiques, et peuvent influencer le profil d'expression génique. Par exemple, la méthylation aberrante des gènes *p57 (KIP2)*, *p15 (INK4B)*, *DAPK*, *SHP1* et *p73* est un événement fréquent dans les hémopathies malignes lymphoïdes. La classification tumorale pourrait alors prendre en compte le profil de méthylation de l'ADN.

Des études prometteuses de profiling de méthylation de l'ADN ont ainsi comme objectif de déterminer des signatures épigénétiques (Martin-Subero et al., 2009a; Rahmatpanah et al., 2006).

Dans la suite de cette partie, nous nous focaliserons sur les mécanismes génétiques de la lymphomagenèse B, les lymphomes T ne représentant que 15% des LMNH sous nos latitudes.

II.2. Génétique des lymphomes malins non-Hodgkiniens – LMNH

L'étude cytogénétique et moléculaire occupe aujourd'hui une place importante dans l'étude des lymphomes, compte tenu des progrès qu'elle permet dans la connaissance des mécanismes de développement de ces tumeurs, de la valeur diagnostique de ces anomalies et de leurs implications pronostiques.

II.2.1. Chromosomes et cancers

Dès 1914, Boveri suggère un lien entre anomalie chromosomique et cancer : il postule que le caractère héritable des cellules cancéreuses peut provenir de perturbations de la distribution des chromosomes (Boveri, 1914). La découverte du chromosome Philadelphie (Ph) en 1960 chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique constitue le premier exemple d'anomalie chromosomique acquise, spécifique d'une tumeur donnée (Nowell and Hungerford, 1960). Dans les années 1970 se développe une nouvelle discipline, la génétique chromosomique. Ainsi, le chromosome Ph s'est avéré résulter d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22, la $t(9;22)(q34;q11)$ (Rowley, 1973).

Dans les années 1980, l'analyse des caryotypes sur de grandes séries de patients met en évidence la grande diversité des réarrangements chromosomiques dans les tumeurs : ces réarrangements sont soit des anomalies de nombre (gains, pertes de chromosomes entiers) soit des anomalies de structure, équilibrées ou déséquilibrées (translocations, inversions, insertions, délétions, duplications...). La signification clinique de ces réarrangements est importante dans les hémopathies malignes. Les anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes sont classées en 2 catégories, primaires et secondaires.

Les anomalies primaires regroupent les anomalies présentes dès le diagnostic et tout au long de la maladie. Ces anomalies parfois uniques sont pour la plupart équilibrées. Certaines anomalies primaires sont spécifiques d'un type de pathologie donnée, et possèdent donc une grande valeur diagnostique. Elles joueraient ainsi un rôle critique dans le déclenchement de la maladie (Heim et al., 2001).

Les anomalies secondaires concernent pour la plupart des anomalies de nombre et de structure, souvent complexes et déséquilibrées, et pouvant apparaître au cours de l'évolution

de la maladie. Elles ne sont pas présentes comme anomalies uniques, mais sont surajoutées aux anomalies primaires. Les anomalies secondaires ne sont pas spécifiques d'un type de pathologie, mais ne sont cependant pas aléatoires. Elles confèreraient à une cellule tumorale, à un instant donné, un avantage en terme de prolifération / survie / résistance (sélection de type Darwinien).

La plupart des anomalies secondaires décrites dans les hémopathies malignes sont également retrouvées dans les tumeurs solides. Leur absence de spécificité et leur fréquence soulignent leur rôle prépondérant lors de la phase de progression tumorale, et suggèrent l'existence de mécanismes communs mis en jeu au cours du développement tumoral.

II.2.2. Anomalies primaires et lymphomagenèse

II.2.2.a. Analyse chromosomique

Diverses anomalies chromosomiques non liées au hasard et limitées aux cellules lymphoïdes B ont été décrites. Plus de la moitié d'entre elles mettent en jeu les gènes d'immunoglobulines (*IGH* en 14q32, *IGK* en 2p12 et *IGL* en 22q11) en les juxtaposant à un oncogène : *BCL2* en 18q21, *CCND1* en 11q13, ou *MYC* en 8q24. Ces anomalies chromosomiques peuvent résulter d'erreurs dans les mécanismes de recombinaison génétique mis en jeu lors de la différenciation lymphoïde, et seraient alors des événements de survenue précoce dans la genèse de ces tumeurs. La plupart de ces translocations ont été clonées, le site de cassure dans les gènes Ig localisé et les proto-oncogènes associés identifiés (Table 5).

Entité	Translocation Ig	Gène impliqué	Fréquence
Leucémie lymphoïde chronique	t(14;19)(q32;q13)	BCL3	< 1%
	t(2;14)(p13;q32)	BCL11A	< 1%
	t(18;22)(q21;q11)	BCL2	< 1%
	t(11;14)(q13;q32)	CCND1	2%
Lymphome du manteau	t(11;14)(q13;q32)	CCND1	> 95%
Lymphome folliculaire	t(14;18)(q32;q21)	BCL2	85%
	(3;14)(q27;q32)	BCL6	5-10%
	t(1;22)(q22;q11)	FcγR2B	rare
Lymphome de Burkitt	t(8;14)(q24.1;q32)		80%
	t(8;22)(q24.1;q11)	c-MYC	15%
	t(2;8)(p11;q24.1)		5%
Lymphome B diffus à grandes cellules	t(3;V)(q27;V)	BCL6	30-40%
	t(14;18)(q32;q21)	BCL2	15%
	t(3;14)(p21;q32)	FOXP1	rare
	t(14;15)(q32;q12)	BCL8	rare
MALT	t(1;14)(p22;q32)	BCL10	? 10%
	t(14;18)(q32;q21)	MALT1	rare

Lymphome splénique de la zone marginale (SMZL)	t(7;14)(q21;q32) t(2;7)(p12;q21)	CDK6	rare
Myélome	t(11;14)(q13;q32)	CCND1	20%
	t(4;14)(p16;q32)	FGFR3/MMSET	20%
	t(14;16)(q32;q23)	c-MAF	5%
	t(14;20)(q32;q12)	MAF-B	2%
Lymphome B divers	t(9;14)(p13;q32) *	PAX5	?
	t(6;14)(p21.1;q32)	CCND3	?
	t(1;14)(q21;q32)	BCL9	rare
	t(10;14)(q24;q32)	NFKB2	rare
	t(12;14)(q24;q32)	BCL7A	rare

Table 5 : Principales translocations récurrentes impliquant les loci IGH, IGK ou IGL.

* remarque : précédemment décrite dans les lymphomes lymphoplasmocytaires, il s'avère que la t(9;14) *IGH/PAX5* est rare et non spécifique de cette hémopathie. Elle est détectée dans certains cas de lymphomes de la zone marginale ou B diffus à grandes cellules (Poppe et al. 2005 ; Cook et al. 2005). Adapté de Willis (Willis and Dyer 2000) par Christine Lefebvre.

Différents sites de cassure ont été observés sur les gènes IGH. Ces sites corrént avec les sites de recombinaison physiologiques conduisant à la production d'un gène d'immunoglobuline fonctionnel, suggérant l'implication d'erreurs de recombinaison V(D)J comme mécanisme potentiel dans la genèse des translocations.

Certaines translocations définissent des entités clinico-biologiques au sein des lymphomes malins, comme la t(14;18)(q32;q21) pour les lymphomes folliculaires. Cette association « spécifique » d'une translocation chromosomique avec une maladie doit cependant être nuancée. Une anomalie peut, en fonction du contexte chromosomique de la cellule, être considérée comme primaire et entité-spécifique, ou comme secondaire. L'exemple typique est la t(8;14)(q13;q32). Isolée, elle signe le lymphome de Burkitt ; associée à une t(14;18)(q32;q21) ou une t(11;14)(q13;q32), elle prend valeur d'anomalie secondaire et accompagne la transformation histologique d'un lymphome de bas grade vers un lymphome de haut grade de malignité. Il en est ainsi pour la majorité des translocations ou anomalies primaires des lymphomes.

II.2.2.b. Conséquences moléculaires des anomalies primaires

La caractérisation moléculaire des translocations chromosomiques primaires a permis d'identifier de nombreux gènes cibles (Tableau). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans des voies de signalisations majeures pour le maintien de l'homéostasie (lymphocytaire), telles que la régulation de l'apoptose, de la prolifération ou de la lymphopoïèse B. La dérégulation des fonctions de ces gènes joue donc un rôle clef dans l'initiation du processus tumoral.

Lymphome folliculaire et translocation t(14; 18)(q32;q21) - BCL2

Le lymphome folliculaire (FL) représente 20% des cas de lymphomes B. Environ 85% des lymphomes folliculaires sont associés à une t(14;18)(q32;q21), entraînant la juxtaposition du gène *BCL2* (B-cell lymphoma 2) en 18q21.3 avec les gènes *IGH* (Willis and Dyer, 2000).

La translocation conduit à la dérégulation de l'expression de *BCL2*. *BCL2* est une protéine impliquée dans le contrôle de l'apoptose (Chao and Korsmeyer, 1998), (Cory and Adams, 2002). *BCL2* maintient l'intégrité de la membrane mitochondriale en bloquant le relargage d'activateurs apoptotiques comme le cytochrome c (Kluck et al., 1997), et empêche ainsi l'activation des caspases et donc l'apoptose. *BCL2* régule également la progression des cellules dans le cycle cellulaire en favorisant le passage en G0 (Vairo et al., 1996).

Le rôle oncogénique de *BCL2* a été mis en évidence dans des modèles murins transgéniques où *BCL2* est surexprimée dans les LT ou les LB. Les souris surexprimant *BCL2* présentent une hyperplasie des follicules spléniques et développent des lymphomes B à grandes cellules, d'évolution très rapide. L'activation secondaire de *MYC* par translocation chromosomique a pu être démontrée dans ces tumeurs (McDonnell et al., 1989); (McDonnell and Korsmeyer, 1991).

La dérégulation de *BCL2* est également un facteur de chimiorésistance. L'hyper-expression de *BCL2* rend les tumeurs réfractaires à de nombreuses drogues *in vitro* et *in vivo* (Sartorius and Krammer, 2002); (Schmitt et al., 2000).

L'analyse des profils d'expression génique a permis de mettre en évidence une « signature transcriptomique » propre aux différents types de lymphomes. Ainsi les LLC et LM folliculaires ont un profil différent des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) mais présentent un profil semblable aux lymphocytes B normaux au repos, pour les gènes dont l'expression est modifiée au cours du cycle cellulaire. Cette similitude peut être mise en relation avec le caractère peu proliférant de ces deux types de lymphomes. D'autre part, les LM folliculaires présentent une signature caractéristique des cellules du centre germinatif (pour les gènes *BCL6*, *A-myb*, *CD10*, *CD138*) (Alizadeh et al., 2000), confirmant l'origine de ces cellules tumorales. L'équipe de Freedman met cependant en évidence des différences d'expression entre les cellules de LM folliculaires et les cellules normales des centres germinatifs (Husson et al., 2002). Ils observent en particulier la surexpression de certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, le contrôle de la lymphopoïèse B et les interactions cellulaires, parallèlement à la baisse d'expression de gènes impliqués dans l'adhésion. De façon intéressante, la plupart de ces gènes sont localisés dans des régions chromosomiques fréquemment réarrangées dans les lymphomes folliculaires.

Ces études mettent donc en évidence des profils transcriptionnels spécifiques des différents sous-types de lymphomes. Ce type d'approche permettra par la suite de définir et de mieux comprendre la physiopathologie de ces tumeurs (progression tumorale, gènes impliqués).

Lymphomes B diffus à grandes cellules et anomalies de la bande 3q27 - BCL6

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) représentent 30 à 40% des cas de lymphomes diagnostiqués dans les pays occidentaux. Il constitue une entité hétérogène sur le plan clinique et biologique. Les réarrangements de *BCL6* ont été initialement décrits dans les DLBCL et constituent l'anomalie cytogénétique la plus fréquente de ces tumeurs (35 à 40% des cas) (Bastard et al., 1994). L'association récurrente de translocations affectant la bande 3q27 et plus particulièrement le gène *BCL6/LAZ3* (*lymphoma-associated zinc finger on chromosome 3*) a également été observée dans près de 15% des lymphomes folliculaires (Bastard et al., 1994).

Le gène *BCL6* peut être juxtaposé soit à côté d'éléments enhancers des gènes d'immunoglobuline soit sous le contrôle de promoteurs d'autres gènes. *BCL6* code pour une protéine nucléaire de 706 acides aminés contenant 6 doigts de zinc et un domaine de répression de la transcription, le domaine POZ (Pox viruses and zinc finger) (Chang et al., 1996), (Deweindt et al., 1995). *BCL6* est exprimée dans la plupart des tissus et cellules, en particulier dans les lymphocytes B des centres germinatifs (Bajalica-Lagercrantz et al., 1997), (Cattoretti et al., 1995). *BCL6* est un répresseur de la transcription jouant un rôle important dans le développement lymphocytaire B (Schebesta et al., 2002), (Ye et al., 1997). Elle bloque la différenciation des lymphocytes B des centres germinatifs en réprimant l'expression du gène *BLIMP* dépendant de STAT3 (Reljic et al., 2000). La répression de *BCL6* permet la différenciation terminale des lymphocytes en plasmocytes ou lymphocytes B mémoires. *BCL6* peut interagir avec HDAC1, suggérant une répression des gènes cibles de *BCL6* par modification du statut chromatinien de ces gènes (Dhordain et al., 1998). Ainsi la dérégulation de *BCL6* lors de la lymphomagenèse pourrait participer à l'altération du code histone contrôlant l'expression des gènes de la différenciation B.

Une des hypothèses du rôle oncogénique d'une anomalie chromosomique mettant en jeu *BCL6* serait que, suite à la translocation chromosomique, la protéine agisse comme un répresseur constitutif de la transcription, notamment en recrutant une activité histone déacétylase sur un promoteur cible, promoteur du gène *BLIMP* par exemple, empêchant ainsi la différenciation plasmocytaire des lymphocytes B matures (Deweindt et al., 1995).

Lymphome de Burkitt et translocation t(8;14) – c-MYC

Le lymphome de Burkitt est caractérisé sur le plan cytogénétique par un réarrangement chromosomique de *c-MYC*. Dans 80% des cas, il s'agit d'une translocation t(8;14)(q24.1;q32), juxtaposant le gène *c-MYC* au gène *IGH*. Ces translocations conduisent à la dérégulation de *c-MYC*, contrôlée par les éléments activateurs des gènes d'Ig. Les réarrangements de *c-MYC* sont également détectés dans d'autres sous-types de lymphome, en tant qu'anomalie secondaire, par exemple dans le lymphome folliculaire, le lymphome B diffus à grandes cellules, le lymphome du manteau, le myélome ((Yano et al., 1992); (Avet-Loiseau et al., 2001); (Michaux et al., 2004); (Mossafa et al., 2006).

MYC fonctionne à la fois comme un activateur et un inhibiteur de la transcription participant au contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. MYC se lie au niveau de séquences consensus de l'ADN (E-box) sous la forme d'hétérodimères MYC-MAX, pour activer la transcription. MAX peut également former un hétérodimère avec MAD et exercer un effet antagoniste répresseur sur les mêmes séquences E-box. L'activation ou la répression de la transcription implique également des complexes coactivateurs/HAT ou corépresseurs/HDAC, recrutés respectivement par les hétérodimères MYC-MAX ou MAD-MAX. La fixation compétitive de MYC ou de MAD avec MAX régule l'expression des gènes cibles de MYC. L'analyse sur biopuce de l'expression de gènes induits par c-MYC a permis d'identifier 53 gènes, dont certains impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (cycline B1, CDC2L1 et cycline E-BP1) ou la réparation de l'ADN (MSH2, BRCA1) (Menssen and Hermeking, 2002).

MYC joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération des cellules normales en favorisant leur engagement et leur maintien dans le cycle cellulaire (de Alboran et al., 2001) et en conservant l'intégrité des télomères par augmentation de l'activité de la télomérase (Wu et al., 1999).

La dualité fonctionnelle de MYC suggère que l'effet oncogénique observé *in vivo* est le résultat d'un équilibre entre ses effets prolifératifs et pro-apoptotiques. La survie de cellules dont l'expression de MYC est augmentée passe donc par l'acquisition d'anomalies additionnelles anti-apoptotiques. La surexpression de MYC peut également induire une instabilité génomique (aneuploïdie, chromosomes multicentriques, cassures chromosomiques, amplifications) et une hypersensibilité aux agents provoquant des cassures de l'ADN (Felsher and Bishop, 1999).

Conclusion

L'analyse cytogénétique et moléculaire des anomalies chromosomiques primaires montre leur rôle important dans l'initiation de la tumorigenèse. Caractéristiques des sous-types tumoraux, elles dérégulent l'expression d'oncogènes engendrant ainsi des perturbations cellulaires. Nombre d'entre elles, pour la plupart équilibrées, ont été clonées et les voies moléculaires mises en jeu caractérisées. Cependant, ces anomalies ne suffisent pas au développement tumoral ((McDonnell and Korsmeyer, 1991); (Callanan et al., 1996)), comme démontré par la présence d'une t(14;18) chez des personnes saines. Ceci suggère donc la nécessité d'anomalies chromosomiques additionnelles pour le développement d'un phénotype tumoral. De fait, les caryotypes des lymphomes malins sont dans 90% des cas très complexes (plus de trois anomalies) avec la présence d'anomalies chromosomiques secondaires non aléatoires, récurrentes et pertinentes pour la progression tumorale. Parmi ces anomalies secondaires, celles touchant le chromosome 1 surviennent particulièrement fréquemment.

II.2.3. Anomalies secondaires et progression tumorale

Seuls 10 à 15% des LMNH présentent une anomalie chromosomique unique (Yunis et al., 1987); (Offit et al., 1991). Les anomalies secondaires sont donc plutôt la règle. Elles sont multiples et variées, associant généralement des anomalies de nombre et de structure. En ce qui concerne les anomalies de nombre, certains groupes de tumeurs sont plutôt associés à une perte (lymphomes à cellules du manteau), et d'autres à un gain (lymphomes folliculaires, lymphomes diffus à grandes cellules) de chromosomes. Parmi les anomalies de nombre les plus fréquentes, citons les trisomies X, 7, 12, 3, 18, 21. Les anomalies 1q21-23 arrivent en tête des anomalies de structure secondaires (17%), suivies par les cassures en 6q21-25 (14%) et les anomalies du bras court du chromosome 1 (1p32, 13%) (Offit et al., 1991).

II.2.3.a. Analyse chromosomique

Modèle des lymphomes folliculaires

En 1987, Yunis pose les bases du processus de progression tumorale associé à la présence d'anomalies secondaires surajoutées. Il analyse 71 cas de lymphomes centro-folliculaires de différents grades, et indique que 70% des anomalies secondaires trouvées sont récurrentes. Les anomalies chromosomiques secondaires les plus fréquentes sont les duplications 1q ou 12q (30%), les trisomies X et 7 (23%) et les anomalies de la bande 1p36 (21%). Ainsi Yunis récapitule les principales anomalies secondaires associées à la translocation t(14 ;18) et établit pour la première fois une corrélation entre anomalie secondaire surajoutée, sous-type histologique et évolution de la maladie :

- t(14;18) isolée : maladie indolente
- trisomie 7 ou 12 avec délétion 6q (6q22q25) : histologie plus agressive
- trisomie 3, 18 et 21 : lymphome folliculaire à grandes cellules
- les dup2p, del13q et HSR semblent conférer un pronostic particulièrement mauvais avec une réponse thérapeutique nulle ou mauvaise et une très faible survie.

Dès 1987, Yunis propose alors sur la base du caryotype un modèle de progression tumorale dans les lymphomes folliculaires où les anomalies chromosomiques secondaires constitueraient des facteurs critiques pour l'évolution de la tumeur. Il ajoute que ces anomalies sont communes à tous les cancers et pourraient expliquer les dérégulations cellulaires dans les cellules malignes (Yunis, 1987). Les travaux ultérieurs, dont certains faisant appel à l'hybridation génomique comparative (CGH), ont conforté ses résultats (Avet-Loiseau et al., 1997), (Bentz et al., 1996).

II.2.3.b. Mécanismes moléculaires de la progression tumorale

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression tumorale restent encore peu compris. Le rôle oncogénique des translocations secondaires équilibrées dans l'acquisition du

phénotype malin complet a été démontré à travers les exemples de coopération oncogénique entre BCL2 et MYC [t(14;18)+t(8;14)] et entre la cycline D1 et MYC [t(11;14)+t(8;14)]. Le caractère le plus souvent complexe des réarrangements secondaires par gain ou perte de matériel chromosomique, rend difficile l'identification de gènes cibles.

Rôle des translocations secondaires – modèle du lymphome folliculaire

L'association étroite de la t(14;18) aux lymphomes folliculaires démontre son rôle prépondérant dans la genèse de ces tumeurs. Cependant, la seule présence de cette translocation ne semble pas suffisante, comme le montrent d'une part la détection de cette translocation par PCR chez des sujets sains (Limpens et al., 1995) et d'autre part l'observation de quelques cas de transformation d'un lymphome folliculaire de bas grade avec une t(14;18) en un lymphome de haut grade de malignité ou même en leucémie aiguë lymphoblastique, contemporaine de l'acquisition secondaire d'une t(8;14) (Thangavelu et al., 1990). Des souris co-exprimant les transgènes *MYC* et *BCL-2*, ont une hyper-prolifération des cellules pré-B et développent des hémopathies lymphoïdes à un taux nettement plus important, démontrant la coopération entre ces 2 oncogènes (Strasser et al., 1990). BCL2 peut également coopérer avec la protéine de fusion PML-RAR α pour induire le développement de leucémies aiguës promyélocyaires (Kogan et al., 2001). Ceci suggère donc une coopération oncogénique lors de la transformation maligne.

Rôle des pertes et gains de matériel chromosomique

Depuis les travaux de Knudson sur l'inactivation obligatoire en 2 temps des deux allèles d'un gène dit suppresseur de tumeur comme nécessaire à la tumorigenèse, les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse par perte de fonction sont mieux connus (Knudson, 1971). Toutefois, les bases mécanistiques des délétions ne sont pas connues. Les chefs de file de ce processus d'oncogenèse ont été les gènes *Rb* (13q14) et *p53* (17p13), puis le gène *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated* - 11q23), appartenant plus précisément au groupe des gènes « Caretaker » et/ou « Gatekeeper ». Ces trois régions représentent des régions chaudes de délétions / réarrangements dans les lymphomes et les myélomes multiples (MM) comme dans les autres tumeurs solides. La zone minimale de délétion 13q dans les LLC ne concerne pas *Rb* mais des gènes codant pour des micro-ARN (MiR-15a et miR-16-1) situés en 13q14.3. Cette région est délétée dans les LLC (Calin et al., 2002). L'analyse par microarrays de l'expression des micro-ARN dans des cellules B normales et des cellules LLC révèle une signature transcriptionnelle spécifique des micro-ARN pouvant jouer un rôle pronostique et participer à la tumorigenèse (Calin et al., 2002).

Les anomalies les plus fréquentes dans l'évolution des lymphomes folliculaires sont les gains de matériel génétique (trisomies X, 7, 12, gains de 1q,...) (pour revue, (Knutsen, 1997). Parmi ces anomalies, nous nous intéressons particulièrement aux anomalies du bras long du chromosome 1.

II.2.3.c. Anomalies 1q (*pour revue, (Fournier et al., 2007), en annexe*)

Les anomalies du chromosome 1 sont parmi les plus fréquentes dans les cancers (20%). Ces réarrangements peuvent se présenter comme des translocations équilibrées ou des remaniements déséquilibrés (dérivés de translocations, duplications, délétions). Ils concernent soit le bras court du chromosome 1 conduisant alors le plus souvent à une perte de matériel génétique, soit le bras long avec le plus souvent gain de matériel.

Les anomalies 1q n'ont en général aucun caractère de spécificité : on les observe aussi bien dans les tumeurs solides communes et les sarcomes que dans les hémopathies malignes myéloïdes ou lymphoïdes (B/T, aiguës/chroniques). Elles sont donc considérées plutôt comme des anomalies secondaires. Les trisomies 1q surviennent tard au cours de l'évolution de la maladie et seraient donc impliquées dans la progression tumorale (Brodeur, 1996); (Atkin, 1986). Cependant, des trisomies 1q partielles ou totales ont été rapportées comme anomalies primaires uniques au cours de certaines tumeurs du sein (Pandis et al., 1992), de syndromes myélodysplasiques (Fonatsch et al., 1991), de leucémies aiguës lymphoblastiques (Morris et al., 1984), de lymphomes (Gagos et al., 1995).

Notre équipe s'est focalisée sur l'exploration moléculaire et les conséquences pathogéniques des réarrangements 1q dans les lymphomes. La mise en évidence de l'implication du récepteur de faible affinité FcGR2B (Callanan et al., 2000a) dans l'évolution des lymphomes folliculaires et la fréquence élevée des réarrangements affectant l'hétérochromatine 1q12 (Le Baccon et al., 2001a) dans les lymphomes B et les myélomes, constituent deux nouvelles pistes oncogéniques potentiellement importantes au cours de la progression tumorale dans les hémopathies B.

Anomalies 1q et LMNH

Au sein des hémopathies malignes, les anomalies 1q sont particulièrement fréquentes dans les LMNH. L'équipe de J. Whang-Pheng a été la première à avoir souligné cette fréquence et à définir 2 zones critiques de duplication allant de 1q12 à 1q31 ou de 1q21 à 1q31 (Douglass et al., 1980). Les grandes séries publiées par la suite ont confirmé le caractère récurrent de ces anomalies (Koduru et al., 1987); (Offit et al., 1991); (Yunis, 1987); (Offit et al., 1991).

Leur fréquence moyenne est de 17 à 20% dans les lymphomes folliculaires et les DLCL (Cigudosa et al., 1996), 39% des lymphomes de la zone marginale (Dierlamm et al., 1996), et 27 à 50% des lymphomes de Burkitt (Juneja et al., 1990), (Koduru et al., 1987). Les données d'hybridation génomique comparative (CGH) confirment ces résultats. Dans une série de 32 LM B diffus à grandes cellules (de haut grade de malignité), les gains 1q représentent la seconde anomalie la plus fréquente après la trisomie X (41%), avec les délétions 6q (38%) (Monni et al., 1996).

Le réarrangement 1q représente l'anomalie de structure la plus fréquente (40% des cas) au sein des caryotypes anormaux de myélome (Dewald et al., 1985). Ces anomalies sont des délétions du bras court 1p, des duplications/translocations déséquilibrées du bras long 1q. Ces anomalies s'observent chez des patients en phase avancée de leur maladie suggérant que ces anomalies joueraient un rôle dit secondaire dans la progression tumorale (Sawyer et al., 1998a).

Notre équipe a montré que 90% des anomalies 1q, détectées sur le caryotype des patients porteurs d'un myélome, ciblent l'hétérochromatine 1q12. L'un d'entre eux présentait même jusqu'à 6 copies surnuméraires d'hétérochromatine 1q12 en FISH interphasique (Le Baccon et al., 2001a). La fréquence de ces anomalies 1q et le caractère récurrent du point de cassure au sein de l'hétérochromatine 1q12 suggèrent l'implication pathogénique de l'hétérochromatine 1q12 au cours de la progression tumorale de ces tumeurs.

Anomalies 1q et tumeurs solides

Les anomalies 1q ne sont pas spécifiques des hémopathies lymphoïdes. On retrouve un gain partiel ou total du bras long du chromosome 1 dans 15% à 30% des tumeurs du sein, des ovaires, des poumons, des mélanomes, des neuroblastomes et des tumeurs de Wilms (Mertens et al., 1997). De façon intéressante, on retrouve des gains spécifiques des bandes 1q11-q21 et 1q23-24 dans les tumeurs du sein et 1q10-q11 et 1q21-22 dans les tumeurs de l'ovaire (Deger et al., 1997), (Mertens et al., 1997).

Dans les carcinomes hépatocellulaires, l'analyse à haute résolution du profil génomique permet de détecter jusqu'à 90% de gain 1q (Midorikawa et al., 2004; Midorikawa et al., 2006); (Steinemann et al., 2006). Une étude cytogénétique portant sur 111 cas d'hépatoblastomes dont 55 avec anomalies clonales, montre 20 cas de translocations déséquilibrées impliquant des points de cassure en 1q12-21 (Tomlinson et al., 2005).

Ces gains 1q sont actuellement considérés comme conférant une signification pronostique défavorable, une croissance tumorale accélérée et/ou un potentiel métastatique accru, dans de nombreux sous-types de tumeurs solides.

Par exemple, dans les cancers du sein, où leur fréquence atteint 40%-60% par analyse CGH (Tirkkonen et al., 1998); (Zudaire et al., 2002), le gain 1q (trisomie 1q totale) est corrélé à un volume initial augmenté et à un pronostic défavorable (Zudaire et al., 2002). De plus, l'analyse comparative du génotype de tumeurs primitives et de leurs métastases a permis de mettre en évidence que la seule différence significative était le gain de matériel 1q et plus particulièrement des bandes 1q21-q23 (Gronwald et al., 1997) suggérant le caractère secondaire de ces anomalies 1q. La présence d'une anomalie 1q est également associée au potentiel métastatique des adénocarcinomes des voies digestives supérieures (van Dekken et al., 2006) et des cancers de prostate (Torrington et al., 2007).

II.2.3.d. Analyse moléculaire des anomalies 1q

La fréquence des anomalies 1q dans les hémopathies malignes B et leur caractère secondaire, suggèrent qu'elles jouent un rôle pathogène important dans la lymphomagenèse. De plus, le clonage de translocations impliquant la région 1q21 (Le Baccon et al., 2001a) a permis d'identifier plusieurs gènes cibles potentiellement impliqués dans le contrôle de la progression tumorale, parmi lesquels *AF1q* (dont nous reparlerons dans la troisième partie de l'introduction), *BCL9*, *MUC1*, *FCGR2B* (mis en évidence par notre équipe (Callanan et al., 2000b), et *IRTA1/2*.

Les approches développées récemment combinant du profiling génomique, épigénomique et transcriptomique permettent des progrès considérables dans l'identification de nouveaux gènes cibles et dans la mise en évidence de signatures spécifiques de sous-types tumoraux (Martin-Subero et al., 2009b).

Cas particulier : l'hétérochromatine constitutive 1q12

Le site majeur de cassure 1q dans les LMNH cible l'hétérochromatine constitutive péricentromérique 1q12 (Le Baccon et al., 2001a). 39% des cassures 1q (17/44) dans les LMNH et 89% des cassures 1q (31/35) dans les MM se localisent dans la bande 1q12. Ces translocations impliquent de nombreux partenaires (9 pour les LMNH et 23 pour les MM). On retrouve cependant des partenaires récurrents : les sites accepteurs 4p16 dans les lymphomes (3 cas), 16q11 et 22p11 dans les myélomes (4 et 3 cas respectivement).

Les réarrangements concernant la région 1q12 sont tous déséquilibrés, conduisant à un gain total ou partiel d'un bras long 1q et juxtaposant, de façon aberrante, l'hétérochromatine 1q12 à des régions codantes euchromatiques. L'hétérochromatine 1q12 est aussi retrouvée dans une translocation impliquant la région télomérique du chromosome 4 (4p16) avec une délétion des séquences répétées télomériques (8/12 cas cassures 1q12). Cette étude met en évidence pour la première fois l'implication potentielle de l'hétérochromatine 1q12 dans la pathogenèse des lymphomes et des myélomes, et souligne l'importance de la bande 1q12 comme site « pathogénique ».

Si des mécanismes génétiques d'amplification 1q12 ont récemment été proposés (Sawyer et al., 2009), les mécanismes oncogéniques sous-jacents restent actuellement inexpliqués mais sont probablement étroitement liés aux rôles de l'hétérochromatine dans la régulation épigénétique des fonctions du génome. L'hétérochromatine constitutive, de par sa structure et sa fonction, pourrait constituer une nouvelle voie de dérégulation de l'expression génique, par des mécanismes épigénétiques, dans les hémopathies B. Plusieurs hypothèses sont envisagées :

- une première possibilité repose sur le recrutement par l'hétérochromatine de facteurs de la transcription et/ou dans certains cas, de leurs gènes cibles, entraînant leur répression. Ce type de régulation a été décrit pour le régulateur de transcription Ikaros, impliqué dans le contrôle de la lymphopoïèse B précoce (Brown et al., 1997a). Il existe donc un lien fonctionnel entre la localisation nucléaire de l'hétérochromatine constitutive (et donc de la bande 1q12) et sa capacité à exercer sa fonction de régulation négative sur l'expression génique. La présence d'un domaine 1q12 surnuméraire pourrait modifier la localisation de ces domaines au sein du noyau et par conséquent moduler l'expression génique à son voisinage ;

- une deuxième possibilité concerne la juxtaposition de la bande 1q12 avec des séquences euchromatiques sur les chromosomes partenaires, qui rappelle l'effet de position bien caractérisé chez la drosophile (Henikoff et al., 1995).

Conclusion

Les anomalies primaires dans les hémopathies malignes sont bien caractérisées sur le plan cytogénétique et moléculaire. Ainsi, la translocation t(14;18) signe le lymphome folliculaire et dérégule l'expression de *BCL2* par juxtaposition de ce gène à la séquence enhancer des gènes *IGH*. Cette dérégulation de *BCL2* altère la balance apoptose/survie en faveur de la survie pour les cellules tumorales. Les anomalies secondaires sont moins bien caractérisées et ne présentent en général pas de spécificité vis-à-vis du type de tumeurs. Les mécanismes découlant des dérégulations provoquées par ces anomalies secondaires restent donc à déterminer. De façon surprenante, la découverte de l'implication de l'hétérochromatine constitutive comme mécanisme pathologique potentiel de progression tumorale modifie la perception (génétique et moléculaire) des mécanismes de progression tumorale. En effet, jusqu'à présent, l'analyse des translocations a révélé deux grands mécanismes principaux de dérégulation : l'expression constitutive d'une protéine normale par juxtaposition à une séquence activatrice forte de la transcription, et la production de protéines hybrides ayant de nouvelles propriétés par formation de gènes de fusion (leucémies). L'implication de l'hétérochromatine soulève la possibilité d'un nouveau mécanisme pathologique, basé sur une dérégulation épigénétique aboutissant potentiellement à la répression de l'expression de gènes cibles.

A l'heure actuelle, nous disposons de très peu de données concernant l'implication de ce type de mécanisme dans des modèles, normaux ou pathologiques, de cellules humaines. Leur étude tend cependant à se développer à travers la caractérisation épigénétique de certaines anomalies chromosomiques acquises dans les cellules tumorales humaines, et en particulier, dans les leucémies, avec les dérégulations épigénétiques provoquées par les protéines de fusion PML-RARA ou MLL (histone méthyltransferase spécifique de la lysine 4 de l'histone H3). Le développement de ces connaissances ouvre un nouveau champ de recherche, l'épigénétique, dans l'étude des processus tumoraux.

Partie 3 : Epigénétique et cancers

Les perturbations épigénétiques sont de plus en plus décrites dans les cancers, où elles contribueraient à la dérégulation de l'expression de gènes et à l'instabilité génomique. Cependant la question se pose de savoir si les perturbations épigénétiques observées sont une cause ou une conséquence des mécanismes de dérégulation mis en jeu dans les cancers. Dans cette dernière partie de l'introduction, quelques concepts novateurs et originaux sur l'origine des cancers seront exposés, avant de présenter les perturbations épigénétiques majeures décrites dans les cancers et plus spécifiquement dans les hémopathies malignes ; enfin les perspectives d'innovation thérapeutique seront abordées.

I. De l'origine épigénétique des cancers : « epigenetic progenitor of cancer » ?

Le cancer est perçu comme un groupe hétérogène de désordres présentant des propriétés biologiques différentes marquées, causées par une série de changements génétiques sélectionnés de manière clonale, impliquant des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. Cependant, des données récentes suggèrent que le cancer pourrait avoir une base commune, générée par l'altération épigénétique polyclonale de cellules souches / progénitrices. C'est le modèle d'« epigenetic progenitor of cancer » que proposent Feinberg et al. (Feinberg et al., 2006). Le fait que des changements épigénétiques soient retrouvés aussi précocement dans la tumorigenèse – ou même dans les tissus normaux avant l'apparition des tumeurs – incite à réfléchir sur un rôle amont des cellules progénitrices, avant l'initiation apparente du changement génétique. Ainsi, la cellule souche est de plus en plus reconnue comme la cible potentielle d'événements initiateurs de la transformation maligne (Pardal et al., 2003); (Feinberg et al., 2006). Des changements épigénétiques précoces pourraient expliquer beaucoup des propriétés hétérogènes qui sont communément associées à la croissance tumorale, à l'invasion, aux métastases et à la résistance aux thérapies. Un modèle de survenue des cancers en trois étapes est proposé pour intégrer l'idée de ces événements épigénétiques précoces : une perturbation épigénétique des cellules progénitrices, une mutation initiatrice, et une plasticité génétique et épigénétique (Feinberg et al., 2006) (Figure 44).

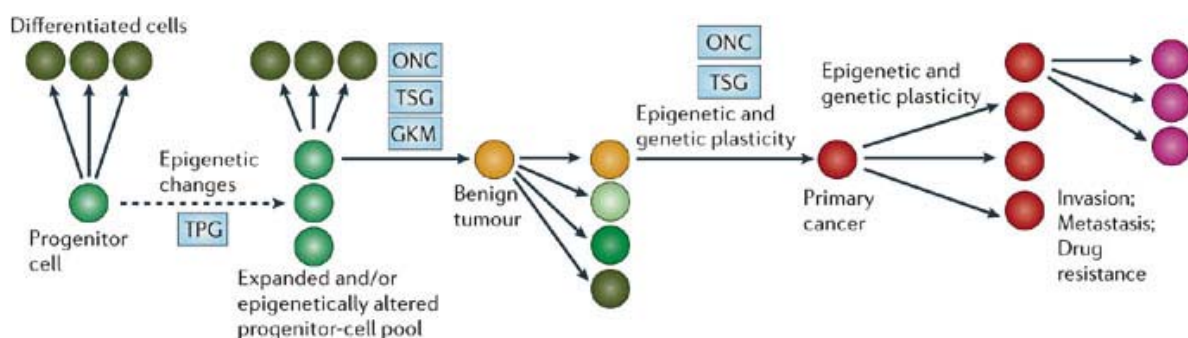


Figure 44 : "The epigenetic progenitor model of cancer". TPG, Tumour Progenitor Genes ; GKM, GateKeeper Mutation ; TSG, Tumour-Suppressor Gene ; ONC, oncogene. D'après Feinberg et al., Nat Rev, 2006

Dès 1994 et surtout depuis les cinq dernières années, de nombreux travaux ont suggéré l'existence de « cellules souches cancéreuses » (CSC), qui correspondraient à une petite fraction de cellules au sein des tumeurs capables de former de nouvelles colonies *in vitro* ou d'initier une nouvelle tumeur suite à leur injection dans un hôte *in vivo* (Al-Hajj et al., 2003; Cariaty and Purushotham, 2008; Graziano et al., 2008; Kasper, 2008; Lapidot et al., 1994; Lee et al., 2008; Takaishi et al., 2008). Tout comme les « vraies » cellules souches, les CSC ont une capacité d'auto-renouvellement, sont hautement proliférantes, et peuvent se différencier. Cependant il devient évident que les CSC ne seraient pas gouvernées par le même type de régulation génétique que les cellules souches normales (Clarke, 2005). La compréhension de l'évidence actuelle qui considère le silencing épigénétique comme un mécanisme de régulation entre les cellules souches normales et cancéreuses augmentera les chances de mieux les cibler via des thérapies spécifiques (Mathews et al., 2009).

II. Perturbations épigénétiques dans les cancers

L'hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs (conduisant à la perte de l'expression de ces gènes) (Table 6) et l'hypométhylation globale du génome (entraînant une instabilité génomique), sont des caractéristiques générales des cellules cancéreuses ((Deng et al., 2006); (Lopez-Serra et al., 2006); (Irizarry et al., 2009); pour revue, (Mulero-Navarro and Esteller, 2008)). De façon remarquable, les gènes sujets à l'hyperméthylation et au silencing épigénétique dans les cancers correspondent en grande partie à des gènes réprimés par la voie Polycomb (H3K27me3), dans les compartiments souches embryonnaires (Ohm et al., 2007; Schlesinger et al., 2007; Widschwendter et al., 2007).

Gene or gene product	Function	Tumor type
Rb	Cell-cycle regulation	Retinoblastoma
APC	Wnt signal transduction	Colorectal and other cancers
p14/ARF	Cell-cycle regulation	Colorectal cancer
p15/CDKN2B	Cell-cycle regulation	Leukemias
p16/CDKN2A	Cell-cycle regulation	Various cancers
BRCA1	DNA repair	Breast, ovarian cancer
VHL	Tumor suppressor ^a	Renal cell cancers
hMLH1	DNA mismatch repair	Colorectal, gastric, endometrial cancers
ER- α	Estrogen receptor- α	Breast, colorectal, other cancers

^aLoss of control for oxygen-regulated angiogenesis. APC, adenomatosis polyposis coli; ARF, alternative reading frame; BRCA1, breast cancer 1, early onset; CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16, inhibits CDK4); CDKN2B, cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4); ER- α , estrogen receptor- α ; hMLH1, human mutL homolog 1; Rb, retinoblastoma; VHL, vonHippel-Lindau tumor suppressor.

Table 6 : Principaux gènes hyperméthylés dans les cancers. *D'après Baylin, 2005*

L'altération du profil de modifications post-traductionnelles des histones émerge également comme un marqueur des cellules tumorales. Ainsi, la comparaison entre tissus normaux et tumoraux a mis en évidence une perte de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 et une

perte de la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 dans des cellules cancéreuses, notamment dans les lymphomes (Fraga et al., 2005); (Van Den Broeck et al., 2008). Des altérations du profil global des modifications d'histones pourraient également avoir un intérêt pronostique. En effet, des analyses d'immunohistochimie indiquent que les patrons de diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et d'acétylation de la lysine 18 de l'histone H3 peuvent prédire la survie de patients atteints de cancer de la prostate (Seligson et al., 2005). Toujours dans ces cancers, la perte de méthylation de l'ADN et l'hypo-acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 s'accroissent avec la progression tumorale (Mohamed et al., 2007). Le niveau d'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 serait également un facteur important dans les cancers du poumon où il pourrait être prédictif de la survie des patients (Barlesi et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec le fait que les enzymes de modification de la chromatine ont une activité dérégulée dans différents cancers (Esteller, 2006). Les conséquences de ces altérations de modifications globales d'histone sur l'expression des gènes ne sont pas étudiées.

Barski et al. montrent par ailleurs que les points chauds de cassures chromosomiques semblent associés à un profil particulier de modifications d'histone (enrichissement en H3K4me3) et à la liaison de CTCF (Barski et al., 2007). Pour rappel, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est reconnue et liée par la recombinase RAG, qui génère des cassures double brin de l'ADN lors du processus de recombinaison V(D)J, événement à haut risque pour la cellule.

La perte de fonction de certains variants d'histones a également été décrite dans le cancer (Boulard et al., 2007). Par exemple, les souris p53^{-/-} déficientes ou haplo-insuffisantes en H2AX développent des lymphomes B montrant des translocations chromosomiques ciblant les loci *IGH* et *cMyc* (Bassing et al., 2003).

D'autre part, plusieurs travaux décrivent l'implication des protéines du groupe Polycomb dans les cancers (Valk-Lingbeek et al., 2004). Dans un modèle de cancer pulmonaire, la suppression par siRNA de l'expression des histone méthyltransférases EZH2, G9A, SETDB1 et SUV39H1 – qui sont surexprimées dans les cellules immortalisées et transformées – conduit à une diminution de la prolifération cellulaire, et induit l'apoptose (suppression de G9A et SUV39H1) ou un arrêt du cycle en G1 (suppression de EZH2). Ainsi les histone méthyltransférases pourraient représenter des cibles thérapeutiques intéressantes (Watanabe et al., 2008).

Enfin, le rôle des complexes de remodelage dans les cancers est relativement bien étudié (pour revue, (Wang et al., 2007); (Clapier and Cairns, 2009)). Par exemple, la surexpression de la protéine MTA1-3 (metastasis-associated proteins), composante du complexe NuRD, est associée à un comportement cellulaire invasif dans de nombreux cancers. Des mutations spécifiques du gène *SMARCA4*, codant pour une protéine appartenant au complexe SWI/SNF, ont été décrites dans les cancers du sein, du poumon, du pancréas et de la prostate. Une grande attention a été portée à une autre sous-unité du complexe SWI/SNF, *SMARCB1*, qui

joue un rôle critique dans la régulation du cycle cellulaire. Le complexe SWI/SNF interagissant physiquement avec des suppresseurs de tumeurs et des oncoprotéines connus (RB, BRCA1, c-MYC, MLL), des mutations de ses sous-unités pourraient affecter ces liaisons, et donc les voies de signalisation associées (Wang et al., 2007); (Weissman and Knudsen, 2009). D'autre part, la perte d'expression du suppresseur de tumeur SNF5 (sous-unité de SWI/SNF) est corrélée avec une faible survie des patients atteints de mélanome (Lin et al., 2009).

Dans la plupart des cas, le défi futur est d'identifier les gènes cibles qui se trouvent dérégulés en conséquence de mutations des complexes de remodelage. Il faudra également déterminer comment ils contribuent au développement tumoral afin de pouvoir designer des thérapies adaptées (Clapier and Cairns, 2009).

III. Perturbations épigénétiques dans les hémopathies malignes

III.1. Organisation spatiale du génome et translocations chromosomiques

L'organisation spatiale non-aléatoire du génome dans le noyau est récemment apparue comme un facteur pouvant contribuer à la formation des translocations chromosomiques ; ceci a été mis en évidence grâce à des études corrélatives de la localisation des partenaires fréquents de translocation (Meaburn et al., 2007). Les cellules de lymphome murin sont caractérisées par la présence de combinaisons variées de translocations entre les chromosomes 12, 14 et 15 (Liyanage et al., 2000). L'analyse de la position de ces chromosomes dans le noyau interphasique de lymphocytes normaux montre qu'ils forment des clusters de manière non-aléatoire, générant une proximité spatiale entre eux, et favorisant probablement des réassociations illégitimes (Parada and Misteli, 2002).

Des observations similaires ont été rapportées pour plusieurs autres translocations, incluant les chromosomes 5 et 6 dans les hépatomes murins (Parada et al., 2004), et les translocations t(9;22) BCR-ABL et t(15;17) PML-RAR chez l'homme (Neves et al., 1999). Un des meilleurs arguments en faveur d'un rôle de la proximité spatiale dans la détermination des partenaires de translocation provient d'analyses dans le lymphome de Burkitt (Roix et al., 2003); ces analyses montrent que la proximité spatiale de *MYC* vis-à-vis de ces trois partenaires possibles de translocation, *IGH*, *IGK* et *IGL*, est directement corrélée aux fréquences de survenue de chacune de ces translocations, observées chez les patients. De plus, Osborne et al. montrent que lors de l'induction « immediate early » de gènes dans les lymphocytes B murins, alors que les gènes se relocalisent rapidement au sein des usines de transcription, *Myc* est préférentiellement recruté au sein de la même usine de transcription que le locus *Igh*, fortement transcrit. *Myc* et *Igh* étant les partenaires de translocation les plus fréquents dans les plasmacytomes et les lymphomes de Burkitt, ces résultats impliquent un lien direct entre l'organisation interchromosomique non-aléatoire des gènes transcrits au sein des usines de

transcription, et l'incidence de translocations chromosomiques spécifiques (Osborne et al., 2007).

Ces données indiquent que les translocations semblent se produire préférentiellement entre des chromosomes qui se trouvent dans une étroite proximité spatiale – dictée par leur arrangement non-aléatoire – dans le noyau en interphase. Ce scénario correspond au modèle « contact-first » (Figure 45). Cependant, une autre hypothèse est proposée, dans laquelle les cassures double brin se produiraient d'abord, et les extrémités clivées diffuseraient à travers le noyau jusqu'à ce qu'elles trouvent d'autres cassures double brin non-réparées avec lesquelles elles formeraient une translocation ; c'est le modèle « breakage-first » (Figure 45).

Le modèle « contact-first » est attractif parce qu'il expliquerait l'occurrence préférentielle bien établie de certaines translocations dans les tumeurs d'un type de tissu donné (Mitelman et al., 2004). Chez la souris par exemple, les translocations entre les chromosomes 5 et 6 sont fréquentes dans les cellules d'hépatome, mais non dans les cellules de lymphome, qui elles sont souvent caractérisées par une t(12;15). Or, les paires de chromosomes 5-6 sont souvent observées dans les hépatocytes mais non dans les lymphocytes, dans lesquels les paires 12-15 sont fréquentes (Parada et al., 2004). Ces observations, en accord avec la notion de tissu-spécificité de l'organisation spatiale, renforcent l'évidence d'un rôle de la proximité spatiale – et donc de l'organisation spatiale du génome dans le noyau – dans la formation des translocations, et favorisent ainsi le modèle « contact-first ». De plus, elles permettraient d'expliquer le fait que certaines translocations soient associées à un type de tumeurs donné.

Le modèle « contact-first » implique que la formation des translocations soit limitée aux chromosomes du voisinage et que les extrémités cassées des chromosomes ne puissent pas diffuser librement à travers le noyau, ce qui constituerait probablement également un mécanisme important de protection du génome. L'inaptitude des extrémités cassées des chromosomes à parcourir le noyau empêcherait leur interaction, et leur association illégitime, avec des lésions survenant aléatoirement et en permanence dans le noyau des cellules. Des facteurs cellulaires maintenant les extrémités chromosomiques en place – et ainsi limitant leur aptitude à bouger dans le noyau – seraient importants pour la protection de l'intégrité du génome. L'existence de tels facteurs a été mise en évidence par knock-down de la protéine se liant aux extrémités de l'ADN, Ku80 ; ce knock-down conduit à une perte de l'immobilité positionnelle des extrémités chromosomiques cassées qui leur permet de parcourir l'espace nucléaire (Soutoglou et al., 2007); (Soutoglou and Misteli, 2008); (Misteli and Soutoglou, 2009).

Il est également clair que la probabilité de la survenue de cassures double brin diffère à travers le génome, et que certaines régions subissent des cassures avec une fréquence significativement supérieure à d'autres (Soutoglou and Misteli, 2008); (Misteli and Soutoglou, 2009).

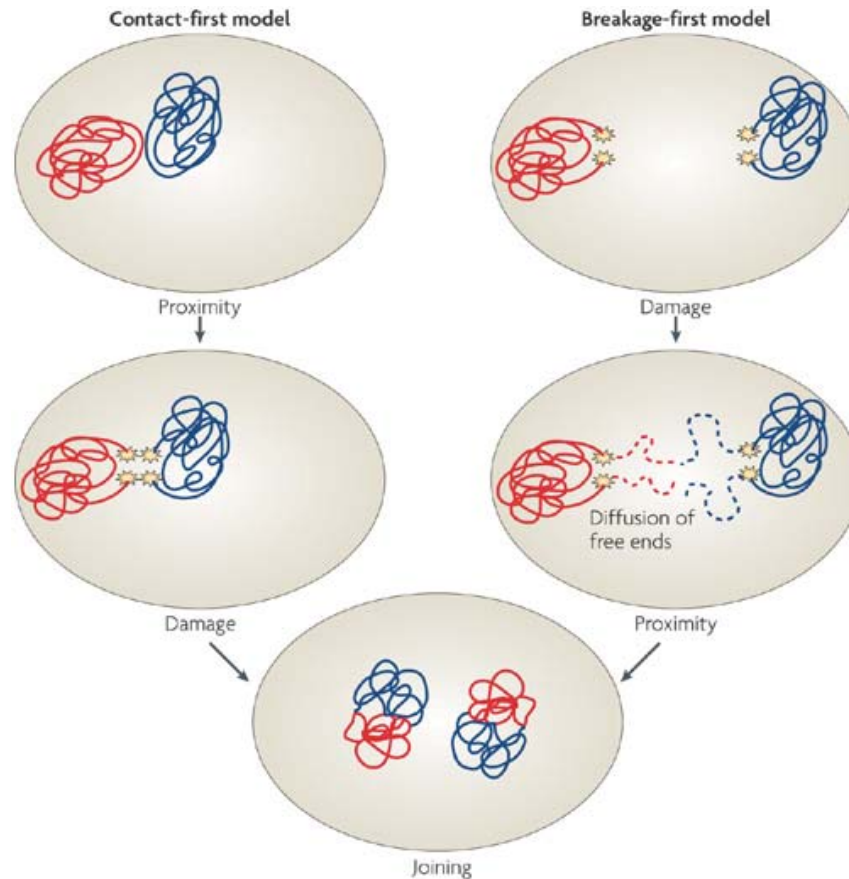


Figure 45 : Deux modèles de formation des translocations chromosomiques ont été proposés : le modèle "contact first" et le modèle "breakage first". D'après Misteli & Soutoglou, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009

Par ailleurs, Mathas et al. ont entrepris d'étudier les mécanismes de formation des translocations et de transformation des ALCL (Anaplastic Large Cell Lymphoma), en analysant des ALCL soit porteurs soit non-porteurs de la t(2;5) caractéristique (Mathas et al., 2009). Ils observent que certains gènes entourant les points de cassure sur les chromosomes 2 et 5 sont dérégulés à la fois dans les ALCL avec et dans les ALCL sans la translocation caractéristique. Ainsi, la dérégulation de ces gènes ne serait pas une conséquence de la t(2;5). Ils montrent également que les régions du point de cassure présentent une proximité spatiale au sein de l'espace nucléaire dans des cellules négatives pour la t(2;5), et que cette proximité pourrait prédisposer à l'induction de la t(2;5) (Mathas et al., 2009).

III.2. Gènes cibles des translocations chromosomiques et perturbations de l'épigénome

Les translocations chromosomiques peuvent affecter directement ou indirectement des activités épigénétiques (DNMT / HDAC / HMT) en les « mis-dirigeant » sur des gènes cibles qui ont une action directe ou indirecte sur l'organisation et la fonction du génome, posant la

question de leur signification pathologique. C'est le cas des protéines de fusion résultant de certaines translocations chromosomiques présentes dans les leucémies aiguës.

III.2.1. Protéines de fusion et méthylation de l'ADN

La formation du gène de fusion *PML-RARA* constitue un exemple d'implication indirecte de la méthylation de l'ADN. Il est issu de la fusion du gène *RARA* (récepteur alpha à l'acide rétinoïque) et du gène *PML*, consécutive à la translocation t(15;17). Cette fusion est spécifiquement observée dans les leucémies aiguës promyélocytaires, et aboutit à la production d'un facteur de transcription oncogénique hybride. La protéine de fusion produite comprend le domaine de liaison à l'ADN et au ligand acide rétinoïque de *RARA* et le domaine de *PML* responsable de l'interaction protéique. L'expression ectopique de *PML-RARA* bloque la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. En absence d'acide rétinoïque, l'hétérodimère *RAR/RXR* recrute le complexe répresseur *NcoR/HDAC*, suggérant une fonction dans le silencing des gènes cibles (Minucci and Pelicci, 1999), (Xu et al., 1999). La présence d'acide rétinoïque dissocie le complexe et permet l'association de *RAR* avec des co-activateurs de la transcription comme les *HAT* (Lee et al., 2001).

Le blocage de la différenciation par l'oncoprotéine *PML-RARA* serait dû au silencing constitutif des gènes répondant à l'acide rétinoïque impliqués dans la différenciation. En 2002, DiCroce et al montrent que l'oncoprotéine *PML-RARA* recrute de façon aberrante des ADN méthyltransférases (*DNMT1* et *DNMT3A*) sur le promoteur du gène *RARβ2* (Figure 46). Ces enzymes méthylent le promoteur et l'exon 1 du gène. Ces sites méthylés constitueraient un signal pour d'autres protéines (*MBD*) qui recruteraient par la suite des *HDAC*, notamment *HDAC1*. La conséquence de ce recrutement serait la compaction de la chromatine dans cette région et le silencing du gène cible (Di Croce et al., 2002). Le traitement des cellules tumorales par la trichostatine A et la 5-azacytidine est capable de « réverser » ce phénomène de silencing et permet la réexpression du gène *RARβ2* et l'induction de la différenciation. Ces travaux montrent donc une action directe des mécanismes épigénétiques dans les leucémies aiguës promyélocytaires et la possibilité de « réverser » le mécanisme de silencing par l'action synergique de 2 molécules à visée thérapeutique.

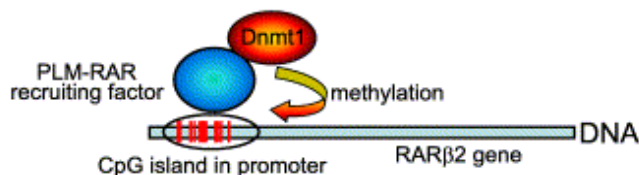


Figure 46 : Méthylation aberrante de la région promotrice du gène *RARβ2*. Le facteur de transcription oncogénique *PML-RAR* se lie aux îlots CpG du promoteur et réprime sa transcription à travers le recrutement d'ADN méthyltransférases qui méthyle les îlots CpG. D'après Zlatanova J et al., *New Compr Biochem*, 2004

III.2.2. Protéines de fusion et activité histone méthyltransférase

A titre d'exemple, le gène *MLL* (Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia) – cible récurrente de réarrangements dans les leucémies aiguës (LA) – code pour une protéine

capable de lier l'ADN, possédant une activité histone méthyltransférase dirigée sur la lysine 4 de l'histone H3, et régule positivement l'expression des gènes *HOX*. L'activité histone méthyltransférase de MLL est systématiquement absente des protéines de fusion leucémiques (résultant de translocations chromosomiques ciblant MLL dans les LA) (Krivtsov and Armstrong, 2007). De plus un certain nombre des partenaires de fusion de MLL interagissent avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Par exemple la protéine AF4, partenaire de fusion de MLL au cours de la translocation t(4;11)(q21;q23), interagit avec l'histone méthyltransférase responsable de la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3, DOT1L. Dans les cellules leucémiques exprimant la protéine de fusion MLL-AF4, cette interaction est maintenue et aboutit à la méthylation aberrante de la lysine 79 de l'histone H3 au niveau de gènes cibles de MLL (Krivtsov et al., 2008). En accord avec ce résultat, les profils globaux de méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (ChIP-chip) distinguent les cas de LAL portant des réarrangements MLL des cas non-réarrangés pour MLL. De plus, la suppression de l'expression de DOT1L inhibe l'expression de cibles critiques de la protéine de fusion MLL-AF4 (Krivtsov et al., 2008). Des mécanismes similaires sous-tendent la leucémogénèse MLL-AF10-dépendante, chez la souris (Okada et al., 2005).

L'importance physiopathologique de la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 est désormais établie dans d'autres modèles leucémiques. Par exemple, la protéine de fusion CALM-AF10, codée par la t(10;11)(p13;q14) observée dans les LA, acquiert la capacité (via la partie AF10) d'interagir avec hDOT1L. Cette interaction aboutit à l'hyperméthylation de la lysine 79 de l'histone H3 au niveau des loci *Hoxa5*, et à leur dérégulation transcriptionnelle. Ceci serait un événement déterminant pour la leucémogénèse CALM-AF10-dépendante (Broske et al., 2009). De plus, la protéine de fusion CALM-AF10, en interférant avec l'interaction AF10-dépendante de hDOT1L avec la chromatine, réduit également le taux global d'histone H3-lysine 79 méthylée dans les cellules leucémiques. Ces cellules sont plus susceptibles aux dommages à l'ADN et montrent une instabilité génétique accrue (Broske et al., 2009).

L'ensemble de ces travaux identifie l'histone méthyltransférase hDOT1L comme cible thérapeutique potentielle dans un sous-groupe de LA.

III.3. Méthylation de l'ADN

Les cancers en général, y compris les hémopathies malignes, sont caractérisés par une perturbation du méthylome. La comparaison de la méthylation génomique entre cellules normales et cellules tumorales a montré une hypométhylation globale de l'ADN au cours de la progression tumorale dans les leucémies aiguës myéloïdes (AML) (Pfeifer et al., 1988), ainsi que dans les leucémies lymphoïdes chroniques (CLL) (Wahlfors et al., 1992). Plus tard, la méthylation d'un grand nombre de gènes a été analysée dans les hémopathies malignes et comparée aux cellules normales (Chim et al., 2002). La plupart des gènes analysés sont des

gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la différenciation et la signalisation. De manière générale, une certaine spécificité de l'altération de la méthylation pour le type de pathologie est retrouvée, avec par exemple, une hyperméthylation de p15 dans les néoplasies myéloïdes (AML) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (ALL) (30-90% et 53-100%, respectivement) alors que p16, qui est rarement impliquée dans ces pathologies, est fréquemment méthylée dans les lymphomes malins (15-73%).

Les études actuelles bénéficient des technologies microarrays, qui permettent l'analyse systématique des séquences méthylées sur l'ensemble du génome. Plusieurs études indiquent l'existence de profils de méthylation de l'ADN (« méthylome ») spécifiques de sous-types histologiques, au sein des lymphomes B (Martin-Subero et al., 2009a; O'Riain et al., 2009; Rahmatpanah et al., 2006). Ces études permettent d'évoquer un rôle pour la méthylation de l'ADN au cours de la lymphomagenèse, même si son rôle dans la progression tumorale reste pour l'instant moins clair (O'Riain et al., 2009).

A titre d'exemple, l'étude par microarray du méthylome de 43 échantillons tumoraux issus de patients atteints de lymphomes B à petites cellules (FL, SLL, MCL), suivie d'une analyse non-supervisée a permis de distinguer 3 patrons différentiels de méthylation des îlots CpG (sur 256 îlots CpG informatifs), 1 groupe caractérisé par l'absence d'hyperméthylation des îlots CpG (les cas de MCL, essentiellement), et deux autres groupes montrant une hyperméthylation des îlots CpG, comprenant, respectivement, les B-CLL/SLL et les FL/hyperplasies lymphoïdes bénignes. L'impact de la méthylation de l'ADN sur l'expression des gènes n'a pas été évalué en détail dans cette étude (Rahmatpanah et al., 2006). Les auteurs n'excluent pas l'hypothèse que les profils de méthylation de l'ADN observés soient le reflet de l'origine ontogénétique des cellules lymphomateuses étudiées (c'est-à-dire issues du pré-centre germinatif pour les MCL et certains CLL, et issue du centre germinatif pour les FL par exemple) plutôt que la cause ou la conséquence du processus de transformation cellulaire.

Une étude très élégante (Illumina Bead array – 1505 CpG sur 807 promoteurs humains), sur une cohorte relativement grande de patients (83), a récemment identifié 56 gènes, méthylés *de novo* dans tous les sous-types de lymphomes. Fait remarquable, cette liste de gènes est enrichie en gènes de types cellules souches embryonnaires (cibles Polycomb). Ceci évoque la possibilité que les cellules lymphomateuses dérivent d'un compartiment de type cellule souche lymphoïde, ou bien qu'elles acquièrent ces caractéristiques au cours de la lymphomagenèse (Martin-Subero et al., 2009a). L'hypothèse d'une origine « type cellule souche » est également évoquée pour les carcinomes.

Une étude quantitative (sur plateforme Illumina) du méthylome de 164 patients atteints de FL, comparés à 20 échantillons contrôles, a récemment été publiée (O'Riain et al., 2009). Des données cliniques, transcriptomiques (Dave et al., 2004) et d'array-CGH (SNP-array) (O'Riain

et al., 2009) étaient disponibles pour l'ensemble des cas. Le niveau de méthylation des gènes était globalement plus élevé dans les FL comparés aux contrôles, ce qui a permis de les distinguer nettement par « clustering hiérarchique ». En accord avec l'étude du groupe de Siebert (Martin-Subero et al., 2009a), les cibles Polycomb étaient significativement sur-représentées dans la liste de gènes hyperméthylés dans les FL (la liste totale comprend 199 loci correspondant à 133 gènes). Comme évoqué pour d'autres cancers (Keshet et al., 2006), la corrélation inverse, relativement faible, entre hyperméthylation des îlots CpG et expression génique serait en faveur de l'implication d'un mécanisme « instructif » de modification des profils de méthylation génique plutôt que d'un mécanisme aléatoire de répression transcriptionnelle agissant au niveau de gènes isolés. Aucune association entre niveau de méthylation et survie n'a pu être identifiée. Pour 10 patients, la méthylation de l'ADN a pu être étudiée au diagnostic et au moment de la transformation histologique en DLBCL. Les patrons de méthylation différaient de ceux des cellules B normales, mais étaient quasi identiques aux deux temps. Ceci suggère que les perturbations de la méthylation de l'ADN sont des événements survenant précocement au cours de la lymphomagenèse (O'Riain et al., 2009). Enfin la nécessité de mener des études intégrées méthylome / transcriptome, sur des cellules lymphomateuses triées comparés aux contrôles, est (à juste titre) soulignée par les auteurs (O'Riain et al., 2009).

IV. Thérapies épigénétiques

Le rôle important des altérations des mécanismes épigénétiques dans la genèse ou la progression de certains cancers, et le fait que les modifications épigénétiques soient réversibles ont conduit au design et au développement de drogues « épigénétiques » à visée thérapeutique (Ting et al., 2006). Les deux principales classes de drogues sont les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et les inhibiteurs des histone déacétylases (HDACi) (Mulero-Navarro and Esteller, 2008).

Certaines molécules agissant sur l'épigénome sont déjà utilisées dans le traitement de pathologies non cancéreuses telles que l'hypertension (Hydralazine) (Rich et al., 1983), l'arythmie cardiaque (Procainamide) (Windle et al., 1987) et les maladies épileptiques (Acide valproïque) (Strolin Benedetti et al., 1984). Elles sont désormais reconsidérées pour une utilisation dans les traitements thérapeutiques des cancers.

IV.1. Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN

Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (ou agents hypométhylants de l'ADN) sont divisés en deux classes : les analogues nucléosidiques et les analogues non-nucléosidiques.

Les analogues nucléosidiques ont un cycle cytosine modifié attaché soit à un ribose, soit à un désoxyribose. Ils sont métabolisés par des kinases qui les convertissent en nucléotides pour

l'incorporation dans l'ADN (ou l'ARN). Lors de la réplication de l'ADN, les DNMT forment un complexe intermédiaire avec le cycle de la cytidine, au sein duquel lequel le S-adenosyl-L-méthionine (Ado-Met / SAM) est incorporé. Dans le cas d'un complexe DNMT / cytidine normale, la DNMT est relarguée suite au transfert du groupement méthyl sur le carbone C5 de la cytidine ; mais dans le cas d'un complexe DNMT / analogue nucléosidique, la modification du carbone C5 empêche le relargage de la DNMT et résulte en la formation d'un complexe covalent, empêchant ainsi la méthylation ultérieure du génome, et résultant finalement en une hypométhylation des brins d'ADN nouvellement synthétisés (Yoo and Jones, 2006); (Kristensen et al., 2009). Ainsi, la méthylation de l'ADN est censée être inhibée une fois les analogues nucléosidiques incorporés dans l'ADN. Pour être efficaces, les analogues nucléosidiques doivent donc être utilisés dans des cellules en prolifération, qui vont les incorporer lors de la réplication de leur ADN (Figure 47). Les analogues nucléosidiques incluent notamment la 5-azacytidine (5-aza-CR), la 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR / decitabine), la 5-fluoro-2'-deoxycytidine, la 5,6-dihydro-5-azacytidine et la zebularine (Table 7).

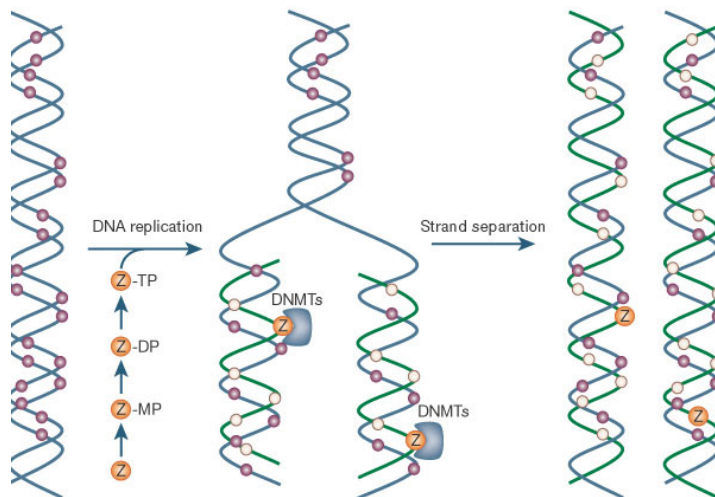


Figure 47 : Incorporation de 5-aza-2'-deoxycytidine dans l'ADN au cours de la réplication, et formation d'un complexe covalent avec les DNMT, inhibant la méthylation de l'ADN. Ronds violets, cytosines méthylées ; ronds blancs, cytosines non-méthylées. D'après Egger, *Nature*, 2004

Seules la 5-azacytidine et la 5-aza-2'-deoxycytidine ont été approuvées par la FDA (Food & Drug Administration) pour les hémopathies malignes, et sont en cours d'évaluation thérapeutique (Kaminskas et al., 2005); (Issa et al., 2005); (Fenaux, 2005); (Fenaux et al., 2009). Les études cliniques utilisant ces agents hypométhylants apportent des résultats prometteurs, en particulier dans les myélodysplasies, dans lesquelles le promoteur du gène p15 est fréquemment hyperméthylé (Fenaux, 2005); (Boulwood and Wainscoat, 2007); (Fenaux et al., 2009). Ceci est en accord avec le rôle important des DNMT (DNMT1) dans le compartiment souche hématopoïétique (Broske et al., 2009), et avec la présence de perturbations globales du méthylome dans les MDS au diagnostic et au cours de la progression vers la LAM (Figuerola et al., 2009); (Fandy et al., 2009); (Jiang et al., 2009). De plus, ces perturbations se corrigent, pour une partie, chez les patients sous traitement 5-azacytidine / HDACi (entinostat) (Figuerola et al., 2009). En revanche, la « réponse épigénétique » ne serait pas prédictive de la réponse clinique (Fandy et al., 2009). L'analyse intégrée des caractérisations génétiques (Delhommeau et al., 2009) et épigénétiques ((Figuerola et al., 2009); (Fandy et al., 2009); (Jiang et al.,

2009)) permettront de comprendre comment ces événements interagissent pour diriger la pathogénèse et la progression des MDS.

Name	Chemical nature	Clinical status
Azacitidine	Nucleoside analogue	Approved myelodysplastic syndrome Phases I, II, III
Decitabine	Nucleoside analogue	Approved myelodysplastic syndrome Phases I, II, III
Zebularine	Nucleoside analogue	Not yet in clinical trial
5-fluoro-2'-deoxycytidine	Nucleoside analogue	Phase I
(-)-epigallocatechin-3-gallate	Non-nucleoside analogue	Phases I, II
Hydralazine	Non-nucleoside analogue	Phases I, II, III
RG 108	Non-nucleoside analogue	Phase

Table 7 : Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, et leur statut clinique. D'après Kristensen et al., *Eur J Pharmacol*, 2009

Les analogues non-nucléosidiques sont, quant à eux, de petites molécules inhibitrices qui pourraient s'avérer plus utiles que les analogues nucléosidiques en clinique, du fait qu'ils inhibent la méthylation de l'ADN en se liant directement au site catalytique des DNMT, sans incorporation dans l'ADN (Yoo and Jones, 2006) (Table 7).

IV.2. Les inhibiteurs des HDAC (HDACi)

L'autre classe majeure, les inhibiteurs des HDAC (HDACi), est divisée en quatre groupes : les acides gras à chaîne courte, les acides hydroxamides, les tétrapeptides cycliques et les benzamides. Ces inhibiteurs, ainsi que leurs HDAC cibles sont indiqués Figure 48.

Pendant une période, il y a eu moins d'études cliniques sur les HDACi en raison d'effets toxiques fréquemment observés (Garcia-Manero and Issa, 2005). Néanmoins, ils ont fait la preuve de leur potentiel anti-tumoral (Table 8). Le traitement de cellules leucémiques par HDACi provoque l'apoptose, la différenciation ou l'arrêt de la croissance cellulaire.

Le seul inhibiteur de HDAC approuvé par la FDA est le vorinostat (Zolinza; Merck, Whitehouse Station, NJ), ou Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), dans le traitement des CTCL (Cutaneous T-cell lymphoma) (Garcia-Manero et al., 2008); (Lane and Chabner, 2009). D'autres HDACi sont actuellement en essais cliniques, que ce soit dans les tumeurs solides ou dans les hémopathies malignes, parmi lesquels la trichostatine A (TSA), inhibiteur naturel des HDAC ((Garcia-Manero et al., 2008); (Blumenschein et al., 2008); (Duvic et al., 2007)), le depsipeptide, l'entinostat, l'acide valproïque et le phénylbutyrate (Yoo and Jones, 2006); (Kristensen et al., 2009); (Lane and Chabner, 2009).

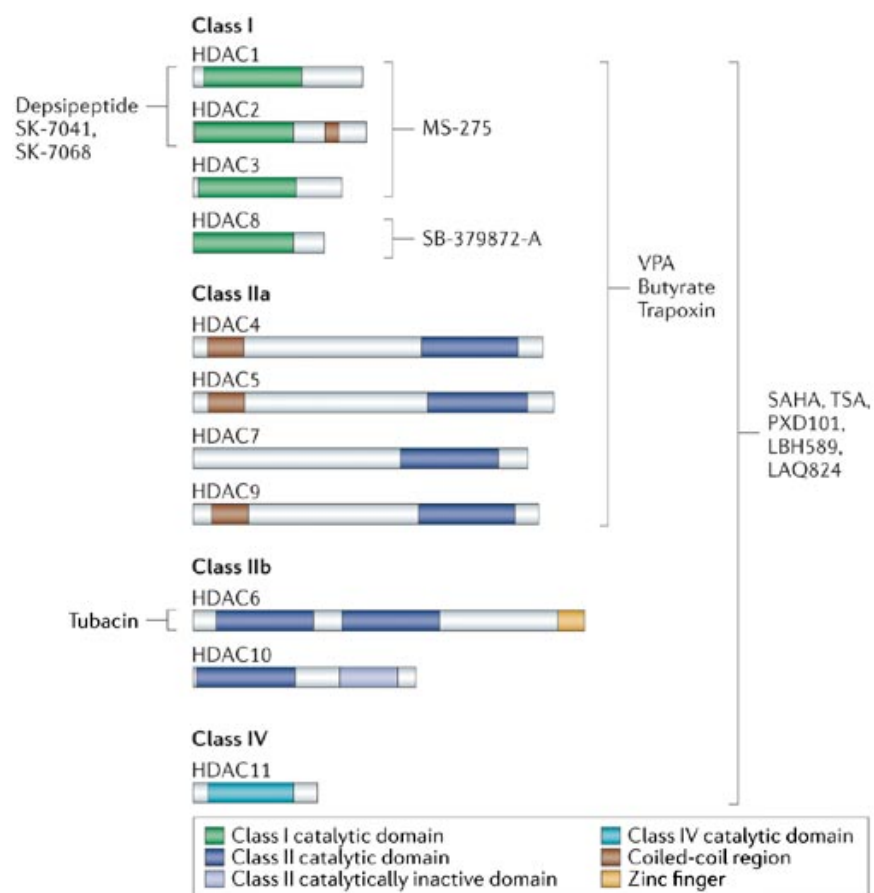


Figure 48 : HDAC et HDACi. Les différentes classes de HDAC (histone deacetylase) et leurs inhibiteurs. D'après Bolden et al., *Nat Rev Drug Discov*, 2006

Name	Chemical nature	Clinical status
Sodium phenylbutyrate	Short-chain fatty acid	Phases I, II
Sodium butyrate	Short-chain fatty acid	In clinical trial
Valproic acid	Short-chain fatty acid	Phases I, II
OSU-HDAC42	Short-chain fatty acid	Not yet in clinical trial
Trichostatin A	Hydroxamic acid	Not in clinical trial
Vorinostat	Hydroxamic acid	Approved (CTCL) Phases I, II, III
Panobinostat	Hydroxamic acid	Phases I, II, III
Belinostat	Hydroxamic acid	Phases I, II
Romidepsin	Cyclic peptide	Phases I, II
Entinostat	Benzamide	Phases I, II
MGCD-0103	Benzamide	Phases I, II

Table 8 : Inhibiteurs des HDAC, et leur statut clinique. D'après Kristensen et al., *Eur J Pharmacol*, 2009

Dans leur étude, Wu et al. rapportent les effets du traitement par le depsipeptide, un inhibiteur de HDAC, de lignées cellulaires cancéreuses de poumon, de colon et de pancréas. Ils observent que ce traitement supprime l'expression des histone méthyltransférases G9A et SUV39H1, ce qui résulte en une diminution de H3-lysine 9 di- et tri-méthylée autour des promoteurs des gènes anormalement réprimés. De plus, à la fois le recrutement de HP1 et la liaison de DNMT1 aux promoteurs de ces gènes sont significativement réduits dans les cellules traitées au depsipeptide (Wu et al., 2008). SUV39H1 est également affectée par un double traitement d'inhibiteurs de HDAC et de la méthylation de l'ADN dans l'étude de Lakshmikuttyamma et al. (Lakshmikuttyamma et al., 2009).

IV.3. Perspectives

In vitro, l'administration conjointe d'HDACi et d'agents hypométhylants de l'ADN a démontré l'activité synergique de ces deux drogues à de faibles doses pharmacologiques et justifie l'évaluation clinique de cette association prometteuse (Garcia-Manero et al., 2006); (Gore et al., 2006); (Kristensen et al., 2009). Ainsi, de nouvelles stratégies combinant des agents hypométhylants à la chimiothérapie et/ou aux molécules antitumorales (par ex l'Imatinib), voire aux micro-ARNs pourraient constituer les approches thérapeutiques de demain (Esquela-Kerscher and Slack, 2006); (Saito and Jones, 2006); (Boulwood and Wainscoat, 2007); pour revue, (Mulero-Navarro and Esteller, 2008).

Cependant, il faut rester prudent quant aux effets globaux des traitements non-spécifiques tels que la 5-aza-2'-deoxycytidine ou le SAHA, car des modifications épigénétiques non-spécifiques peuvent conduire au silencing ou à l'activation de nombreux gènes (Feinberg et al., 2006). Avec le temps, il devrait être possible d'adapter les thérapies épigénétiques pour les cibler sur une modification donnée ou sur un gène cible, notamment en utilisant des facteurs de transcription conçus pour une cible (Jouvenot et al., 2003), ou des miRNA (Poy et al., 2004); (Wang et al., 2009).

L'ARN interférence étant reconnu comme un mécanisme efficace d'inhibition séquence-spécifique de l'expression génique, son intérêt a conduit à un formidable développement dans le champ de la recherche biomédicale où il émerge comme un outil diagnostique et thérapeutique (Shrey et al., 2009). Les microARN (miRNA), une classe de petits ARN endogènes, ont de multiples fonctions au cours du développement du poumon, et une expression anormale de miRNA pourrait conduire à la tumorigenèse pulmonaire. Les profils d'expression différents de miRNA dans les cancers du poumon, et leur stabilité dans le sérum, en font de nouveaux potentiels biomarqueurs diagnostiques et pronostiques. Ils seraient également des candidats thérapeutiques très attractifs, notamment de par leur spécificité de cible, leur stabilité *in vivo* et leur absence de toxicité apparente (Wang et al., 2009).

Conclusion

Les exemples de dérégulations épigénétiques observés dans les cancers sont en pleine explosion, reflétant l'importance de ces mécanismes dans l'initiation et/ou la progression tumorale. Ces exemples concernent aussi bien les modifications chimiques de l'ADN et des histones et leurs protéines régulatrices, que les variants d'histone, les complexes de remodelage, les petits ARN ou encore l'organisation spatiale du génome. Les paramètres épigénétiques peuvent ainsi être utilisés comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques. De plus, la notion de réversibilité de ces paramètres en fait des cibles thérapeutiques particulièrement attractives.

ARGUMENTAIRE

PROJET

PROJET / ARGUMENTAIRE

Les hémopathies malignes forment un groupe hétérogène de tumeurs. Ce sont des proliférations anarchiques de cellules arrêtées à différents stades de maturation au cours du processus de différenciation hématopoïétique, et se développant dans différents tissus (moelle osseuse, organes lymphoïdes ou autres). Ces tumeurs représentent plus de 10% des cancers mais leur incidence, en particulier celle des lymphomes non-hodgkiniens, augmente à un taux alarmant, proche de 4% par an.

Nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la leucémogénèse sont basées en grande partie sur des études moléculaires de translocations chromosomiques spécifiques ainsi que sur des analyses génomiques et transcriptomiques à haut débit. Bien que ces approches aient apporté des progrès remarquables dans l'identification de nouveaux marqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques dans les leucémies aiguës et chroniques, les avancées pour les lymphomes B non-hodgkiniens restent pour l'instant moins évidentes.

Ainsi de nouveaux concepts et de nouvelles approches expérimentales sont requis pour progresser rapidement dans la caractérisation de ces entités. La description de perturbations épigénétiques dans les cancers, où elles contribueraient à la dérégulation de l'expression de gènes et à l'instabilité génomique, est aujourd'hui en pleine explosion. L'exploration de ce nouveau champ de recherche offre des perspectives d'innovation diagnostique, pronostique et thérapeutique considérables.

L'information épigénétique est définie comme l'information réversible et héritable qui n'est pas directement codée par la séquence d'ADN ; elle comprend par exemple les modifications chimiques de l'ADN (méthylation) ou des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...), et est étroitement liée aux fonctions du génome sous-jacent, notamment à sa transcription. Cette information épigénétique est finement contrôlée par des complexes enzymatiques régulant par exemple le taux d'acétylation des histones (HAT/HDAC), ou de méthylation de l'ADN (DNMT) (Jenuwein and Allis, 2001); (Turner, 2002); (Turner, 2007); (Kouzarides, 2007).

La dynamique des mécanismes épigénétiques contrôlant l'expression des gènes les rend plus enclins à souffrir d'environnements inappropriés et par définition plus vulnérables à la génération d'erreurs que le génome lui-même. De plus, parce que l'information épigénétique est transmissible, leur altération pourrait jouer un rôle particulièrement critique dans la transformation cellulaire maligne. Inversement, leur nature réversible offre une opportunité intéressante pour le développement de nouvelles drogues anti-cancéreuses.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à la caractérisation des mécanismes génétiques et plus récemment épigénétiques sous-tendant la lymphomagenèse, en se focalisant sur un modèle particulier – celui des réarrangements chromosomiques qui affectent la région d'hétérochromatine constitutive du chromosome 1 humain (bande cytogénétique 1q12). Ces anomalies sont remarquablement fréquentes dans les lymphomes, les myélomes, les leucémies aiguës et également dans certaines tumeurs solides (sein, ovaire, poumon...) ((Busson-Le Coniat et al., 1999); (Le Baccon et al., 2001a); (Itoyama et al., 2002); (Fournier et al., 2007)). Ceci suggère fortement un rôle pathologique important pour ces anomalies, et l'existence de mécanismes oncogéniques dépendant de l'hétérochromatine constitutive dans ces maladies.

L'hétérochromatine constitutive représente une forme particulière d'hétérochromatine, retrouvée essentiellement au niveau des centromères et péricentromères, des télomères, et des constriction secondaires présentes sur certains chromosomes (1q12, 9q12, 16q12 et Yq12). Ces régions sont enrichies en séquences répétées (alpha-satellites, satellites 2 et 3) et pauvres en gènes. Elles présentent des caractéristiques épigénétiques spécifiques : ADN fortement méthylé, code histone « répressif » (histones hypoacétylées et tri-méthylées sur des résidus spécifiques comme les lysines 9 et 20 des histones 3 et 4, respectivement), présence de HP1 (Heterochromatin Protein 1).

Outre son rôle dans la régulation de la stabilité du génome, l'hétérochromatine constitutive participe au silencing de gènes dans de nombreuses espèces, par un phénomène connu sous le nom d'« effet de position ». Ce phénomène de répression génique consécutif au rapprochement physique / spatial des gènes à l'hétérochromatine au sein du noyau serait dû à la propagation en *cis* ou en *trans* d'hétérochromatine sur l'euchromatine avoisinante.

Ainsi, chez les mammifères la répression transcriptionnelle stable (« deep silencing ») de certains gènes spécifiques de lignées est étroitement corrélée à leur rapprochement à des foyers d'hétérochromatine (péri)centromérique formant des compartiments nucléaires répressifs, et à leur enrichissement en marques épigénétiques répressives (Grogan et al., 2001); (Brown et al., 1997a); (Brown et al., 1999); (Su et al., 2004); (Francastel et al., 2001). Les données les plus récentes indiquent que ces mêmes mécanismes dépendants de l'hétérochromatine régulent d'autres processus épigénétiques complexes tels que l'exclusion allélique ciblant les loci des gènes d'immunoglobulines (Goldmit et al., 2005) et du récepteur à l'antigène du lymphocyte T (TCR), ou encore le contrôle de l'expression mono-allélique de certains loci portant des gènes codant pour des cytokines (Grogan et al., 2001).

En tenant compte du rôle clé de l'hétérochromatine constitutive dans la régulation tissu- et allèle-spécifique de l'expression des gènes, il est tout à fait raisonnable de proposer l'hypothèse de la dérégulation de ces mécanismes fondamentaux dans les cellules cancéreuses. En accord avec cette hypothèse, des données récentes identifient la

dérégulation de l'organisation de l'hétérochromatine constitutive – perte de la modification H4K20me3 en particulier – comme une anomalie fréquente et commune à toutes les cellules cancéreuses (Fraga et al., 2005). Les conséquences pathologiques de ce phénomène restent à déterminer.

A travers un modèle original, celui des réarrangements chromosomiques impliquant l'hétérochromatine constitutive riche en satellites 2 du chromosome 1 humain (bande cytogénétique 1q12) dans les lymphomes B malins, notre laboratoire – et mon travail de thèse en particulier – s'intéresse à cette problématique. Les remaniements de l'hétérochromatine 1q12 montrent des caractéristiques structurales uniques : ils conduisent tous à des gains totaux ou partiels 1q – incluant la région d'hétérochromatine constitutive 1q12 - ainsi qu'à la formation de jonctions hétérochromatine / euchromatine aberrantes.

Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux parties :

Dans une première partie, je me suis attachée à caractériser l'impact des réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 sur l'organisation et les fonctions de la chromatine, au niveau d'une région génique anormalement juxtaposée à l'hétérochromatine 1q12 suite à une translocation $t(1;2)(q12;p13)$ dans une lignée cellulaire modèle de lymphome B, CH1 ; deux autres cas de lymphome présentant des anomalies 1q12 viennent également compléter cette étude.

Dans une deuxième partie, j'ai contribué à la réalisation d'une étude pilote de profiling transcriptionnel sur des cas de lymphomes B porteurs ou non d'anomalies de l'hétérochromatine constitutive 1q12, par puces Affymetrix U133 plus 2.0 (J de Vos - Montpellier), avec comme objectif de mettre en évidence des gènes nouveaux dérégulés dans ces pathologies, et d'évaluer l'intérêt des profils transcriptionnels associés à ces réarrangements, par exemple comme marqueurs pronostiques ou diagnostiques dans les lymphomes.

MATERIELS & METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Cellules et échantillons de patients

I.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

I.1.1. Lignées cellulaires

La lignée CH1 a été établie à partir d'un patient de 37 ans atteint d'un lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL). Le caryotype de ce patient (CJL) a été étudié à trois reprises durant sa maladie, au moment du diagnostic en 1995, puis 6 mois après du fait d'une non réponse au traitement par Chloraminophène, et enfin en première rechute, 37 mois après le diagnostic (Table 1). Le malade est décédé 7 mois après en phase évolutive après échec de multiples lignes thérapeutiques (soit 43 mois après le diagnostic).

Le caryotype au diagnostic était complexe avec la $t(14;18)(q32;q21)$ caractéristique des lymphomes folliculaires et de nombreuses anomalies additionnelles dont une translocation complexe $t(3;3;1)(q27;q1?3;p34)$ impliquant potentiellement le gène *BCL6*. Six mois après, le caryotype reste inchangé, avec cependant la présence de sous-clones traduisant un processus d'évolution tumorale. La $t(1;2)(q12-21;p23)$ déséquilibrée apparaît lors de la première rechute 37 mois après le diagnostic. Elle apparaît contemporaine de l'addition de matériel à l'extrémité du bras long du chromosome 4 et de la délétion 6q. Fait intéressant, il existe un sous-clone minoritaire, présentant non pas un $der(2)t(1;2)(q12-21;p23)$, mais un $der(5)t(1;5)(q12-21;q35)$ traduisant une certaine « fragilité » de la région 1q12-21 chez ce malade. La tumeur ganglionnaire prélevée à la rechute (37 mois) a été greffée sur souris immunodéficiente SCID (M. Jacrot au laboratoire). Le caryotype effectué sur le tissu prélevé lors du premier passage SCID (29/6/1998) montre un caryotype identique à celui de la rechute (Table 1).

La lignée CH1 a ensuite été établie *in vitro* par T. Bonnefoix à partir d'une tumeur SCID prélevée au quatrième passage (2/11/1998). Le caryotype de cette tumeur n'a pas été effectué. Le premier contrôle cytogénétique de la lignée CH1 (15/6/1999) montre la co-existence du clone d'origine (1^{er} passage SCID) et de clones plus remaniés comportant en particulier des anomalies additionnelles des 11p, 12p ou des clones tétraploïdes. Le tissu implanté sur souris SCID semble rester plus stable comme le montre le résultat du caryotype au 7^{ème} passage SCID (23/3/1999) (Table 1). La lignée est depuis contrôlée avant chaque utilisation. Son caryotype reste relativement stable avec en particulier, la conservation des anomalies majeures telles que les $t(14;18)$, $der(2)t(1;2)$, $t(3;3;1)$ sur tous les passages contrôlés. Ses principales caractéristiques cytogénétiques, affinées par une étude en FISH multi-couleurs sont données dans la Table 1. La lignée CH1 porte donc une anomalie 1q12

déséquilibrée – une translocation der(2)t(1;2)(q12;p22) – ayant pour conséquence la présence d'un domaine 1q12 surnuméraire.

Prél	Statut	Caryotype
G	Fev1995 D	50,XY,t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),+5,+8,add(13)(q31),t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)(q32;q21),+M1[15]/46,XY[2]
G	Août 1995 /E (6)	49,XY,t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),+5,+8,add(13)(q31),t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)(q32;q21),+M1[2]/50,idem,+5[5]/52,idem,+Y,+5,+20[2]
G	Mars 1998 /R (37)	49,XY,+X,der(2)t(1;2)(q21;p25),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),add(4)(q35),del(6)(q16q27),+8,t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)(q32;q21)[7]/49,idem,der(1)add(1)(qter)del(1)(p34),der(2)t(1;2)(q12;p25),del(3)(q21),der(5)t(1;5)(q21;qter),13,+mar[2]/46,XY[1]
Tumeur SCID 1 ^{er} passage	Juin 1998	49,XY,+X,der(2)t(1;2)(q21;p25),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),add(4)(q35),del(6)(q16q27),+8,t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)(q32;q21)[32]/46,XY<3>
Tumeur SCID 7 ^{ème} passage	Mars 1999	46,XY,der(2)t(1;2)(q21;p25),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),add(4)(q35),del(6)(q16q27),add(12)(p13),t(14;18)(q32;q21),der(16),-18,+der(18)t(14;18) [10]
Lignée CH1	Juin 1999	46,XY,der(2)t(1;2)(q21;p25),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),add(4)(q35),del(6)(q16q27),t(14;18)(q32;q21),der(16),18,+der(18)t(14;18)[5]/?92,idemx2[2]/46,idem,t(1;22)(q21;q11)[1]/46,idem,t(1;22)(q21;q11),add(11)(p?15),add(12)(p13)[2] var
CH1	Août 1999	44,XY,der(1)t(1;22)(q21;q11),der(2)t(1;2)(q21;p25),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),add(4)(q35),del(6)(q16q27),add(11)(p?15),add(12)(p13),t(14;18)(q32;q21)der(14;21)(q10;q10),-16,-18,+der(18)t(14;18),-21,-22 / 88,idemx2
CH1	Dec 1999 Mars 2000 Avr1 2002	après M-FISH 46,XY,der(1)t(1;22)(q21;q11),der(2)t(1;2)(q12;p22),t(3;3;1)(q1?3;q27;p34),der(4)t(2;4)(p23;q3?5),der(5)t(5;11)(q35;?),t(6;11)(q1?6;p1?3),der(8;12)(q10;q10),t(14;18)(q32;q21)der(14;21)(q10;q10),add(16)(p22),-22

Table 1 : Comparaison des caryotypes du patient CJL, de la tumeur SCID et de la lignée CH1. Abréviations : D, diagnostic ; R, rechute ; E, maladie en évolution ; G, ganglion. Le temps (mois) séparant le diagnostic et la rechute est indiqué entre parenthèses.

La lignée BL136 issue d'un lymphome de Burkitt nous a été fournie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de Lyon. Cette lignée porte une anomalie 1q12 déséquilibrée – une duplication dup(1)(q12q41) – ayant pour conséquence la présence d'un domaine 1q12 surnuméraire (Table 2).

La lignée B593 a été obtenue par greffe hétérologue sur souris immunodéficiente nude (B593) d'un lymphome folliculaire transformé (M. Jacrot). La lignée a ensuite été établie *in vitro* (T. Bonnefoix). Elle présente une translocation équilibrée t(1;22)(q22;q11) secondaire à une t(14;18)(q32;q21) (Table 2).

Lignée	Source	Histologie	Caryotype
CH1	Equipe7- INSERM U823	DLBCL	44,XY,del(1)(p34),der(1)t(1;22)(q21;q11), der(2)t(1;2)(q12;p22) ,der(3),der(4)t(2;4)(p23;q3?5),der(5)t(5;11)(q35;?),t(6;11)(q1?6;1?3),der(8;12)(q10;q10), t(14;18)(q32;q21) t(14;21)(q10;q10),ins(16;16)(q?;q?q?), -22
BL136	CIRC	BL	46,XY, dup(1)(q11q41) ,add(4)(q35), t(8;14)(q24;q32) ,add(15)(qter)
B593	Equipe7- INSERM U823	FL/DLBCL	47,X,Y,t(1;22)(q24;q11),+7,t(8;14;18)(q24;q32;q21),t(9;15)(?p21;q23), del(16)(q21q24)[14]

Table 2 : Caryotype et origine des lignées lymphoïdes malignes. FL, lymphome folliculaire ; DLCL, lymphome diffus à grande cellules ; BL, lymphome de Burkitt. CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon ; Equip7-INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble.

I.1.2. Conditions de culture

Les cultures se font en atmosphère à 5% de CO₂, 100% d'humidité et à 37°C. Les cellules sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 Medium (Gibco), antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine), acides aminés non essentiels (1%) et pyruvate de sodium (1%). Ce milieu est complété avec du sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF 10% pour B593, 20% pour BL136) ou du sérum humain décomplémenté (10% pour CH1). L'absence de contamination des lignées cellulaires par les mycoplasmes est testée régulièrement.

- Pour l'obtention de métaphases, 10.10⁶ cellules sont incubées pendant une nuit (17h) en présence de colchicine à 0,01µg/ml final.
- Pour les analyses RT-qPCR et ChIP sur les cellules CH1 traitées la TSA (Trichostatin A) et/ou à la 5-aza-2'-deoxycytidine, les cellules (0,5.10⁶/ml) sont incubées à 37°C avec 50ng/ml de TSA pendant 6h et/ou avec 0,5microM de 5-aza-2'-deoxycytidine pendant 6 jours, et diluées si besoin en cours de traitement.
- Pour les analyses FISH 3D sur les cellules CH1 et BL136 traitées la TSA et/ou à la 5-aza-2'-deoxycytidine, les cellules (0,5.10⁶/ml) sont incubées à 37°C avec 50ng/ml de TSA pendant 24h ou 48h (BL136) ou pendant 3j ou 6j (CH1) et/ou avec 0,5microM de 5-aza-2'-deoxycytidine pendant 48h (BL136) ou pendant 6j (CH1), et diluées si besoin en cours de traitement.

I.2. Lymphocytes B normaux

Les lymphocytes B du sang périphérique ont été obtenus à partir de donneurs sains, et triés par sélection positive sur colonnes immuno-magnétiques anti-CD19 (CD19 Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). La pureté des cellules a été évaluée par double marquage anti-CD19/anti-CD3 analysé par cytométrie en flux. Les lymphocytes B au repos ont été soit utilisés directement, soit activés *in vitro* par du CD40L à 0,5 microg/ml pendant 48h en milieu RPMI complet 10% SVF (cf conditions de culture ci-desus).

I.3. Sélection des échantillons de patients pour l'étude du profil d'expression génique – 1^{ère} série (10 échantillons)

Parmi les échantillons tumoraux disponibles dans la collection « Lymphomes » de la tumorotheque du CHU de Grenoble (Pr D. Leroux), nous avons sélectionné 10 échantillons de DLBCL (6 avec anomalie 1q12, 4 sans anomalie 1q) parfaitement caractérisés sur le plan histo-morphologique (confirmation du diagnostic et classification moléculaire selon C. Hans), phénotypique, cytogénétique et FISH et pour lesquels nous disposons de matériel cryopréservé de bonne qualité et en quantité suffisante (culots de cellules en DMSO). Quatre de ces 10 échantillons font partie du panel des 121 cas de lymphomes B étudiés par FISH avec le panel de sondes 1q10-1q23. Deux autres cas font partie du panel des 80 DLBCL caractérisés sur le plan clinique, cytogénétique moléculaire et immunohistochimique (classification moléculaire de C. Hans). Il est important de noter que le choix des échantillons s'est orienté selon la disponibilité et la qualité du matériel, et non sur une sélection selon la classification moléculaire immunohistochimique.

Le dernier critère de choix reposait sur la proportion suffisante de cellules clonales (>60%), au sein de la tumeur ; l'organisation du recueil des échantillons de la tumorotheque nous permet de connaître précisément ce paramètre, puisque la suspension congelée est le reliquat de celle analysée par CMF au diagnostic (Dr MC Jacob). Les résultats de CMF sont confrontés à l'estimation faite en immunohistochimie (Dr B Fabre).

II. Obtention de métaphases, technique cytogénétique

Les cellules (lymphocytes B normaux, tumoraux et lignées cellulaires) cultivées en présence de colchicine sont centrifugées 5 min à 2000 rpm à TA. Le culot est cassé puis remis en suspension par ajout goutte à goutte d'une solution hypotonique (chlorure de potassium 0,075M) préalablement chauffé à 37°C. La suspension est incubée 20 min à 37°C puis centrifugée 5 min à 2000 rpm à 4°C). Le culot est ensuite fixé deux fois à 4°C par 10 ml, puis une fois par 4,5 ml de mélange méthanol/acide acétique (3:1 V/V). Les culots peuvent être conservés à -20°C dans le fixateur. Après une nuit à 4°C dans le fixateur, la suspension est centrifugée. Le culot repris dans quelques gouttes de fixateur est étalé sur des lames sèches et propres. La qualité de l'étalement est contrôlée au microscope.

Les lames (métaphases) sont ensuite utilisées pour établir le caryotype (dénaturation en bandes R) (Laboratoire de Génétique Onco-hématologique, Pr. Leroux), pour l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) et la détection de l'ADN méthylé.

III. FISH sur préparation cytogénétique

III.1. Marquage des sondes par Nick-translation

Les sondes sont marquées par des nucléotides (dUTP Green/Red) par la technique de Nick-Translation avec le Kit Abbott, selon les indications du fournisseur. Le mélange (dUTP Green/Red, dTTP, dNTP, tampon, enzymes et ADN) est incubé pendant 4h à 15°C. La réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 10 minutes. La taille des fragments obtenus est vérifiée par électrophorèse d'un aliquot de 1µl, sur un gel 0,8% agarose/ BET pendant 10 à 15 minutes. Une taille optimale des fragments est d'environ 200pb. La sonde marquée est conservée à -20°C.

III.2. Précipitation et dénaturation des sondes

Lors de l'utilisation des sondes de taille supérieure à 10kb, les conditions d'hybridation sont celles d'une hybridation *in situ* compétitive. Un excès d'ADN compétiteur (x30 à x100) (ADN cot-1, GIBCO BRL) permet de réduire le bruit de fond généré par l'hybridation des séquences répétées présentes dans les sondes de grande taille. La sonde (200ng pour les BAC) est précipitée pendant 30 min à -80°C en présence d'ADN compétiteur (cot-1 humain (Gibco BRL) dont la quantité varie suivant la sonde utilisée), de 10 µg d'ADN de sperme de saumon, de 1/10^{ème} du volume en Acétate de Sodium 2,5N et de 2,5 volumes d'éthanol 100% glacé. Après centrifugation 30 min à 14000 rpm à 4°C, le culot est repris dans 10 µl de tampon d'hybridation (25% de TE 10:1 / 50% de formamide / 20% de dextran sulfate / 0.5 x SSPE / 0.5 x SSC pH 5.3). Pour les sondes commerciales, la reconstitution s'effectue en diluant la sonde avec de l'eau stérile et du tampon d'hybridation fourni avec la sonde, selon les indications du fournisseur. Les sondes sont dénaturées pendant 10 min à 73°C et préhybridées par incubation à 37°C pendant 30 min.

III.3. Traitement, dénaturation des lames et hybridation

Les lames sont traitées à la RNase A (100 µg/ml) pendant 1h à 37°C, puis rincées dans 3 bains de 2X SSC et déshydratées dans une série de bains d'alcools 70%, 85% et 100%, 2 min chacun. L'ADN chromosomique est dénaturé 1 min 30 secondes à 80°C dans une solution de dénaturation (70% formamide/2X SCC), puis déshydraté dans des bains successifs d'éthanol glacé 70%, 85% et 100%. Les sondes sont déposées sur les lames, recouvertes d'une lamelle scellée à la colle « Rubber Cement ». L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 37° C dans une atmosphère saturée en 2X SCC.

III.4. Lavages et montage

Deux lavages « rapides » (protocole Abbott) sont effectués pour éliminer la sonde en excès : 2 min dans du 0.4xSSC / 0.3% Tween 20 à 73°C, puis 1 min dans 2xSSC / 0.1% Tween 20 à température ambiante. Les lames sont séchées et contre-colorées avec 20 µl de solution d'antifade (Vectashield de VECTOR) contenant du DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole 2 µg/ml).

III.5. Lecture et interprétation

La lecture et l'interprétation se font à l'aide d'un microscope à fluorescence (ZEISS Axiophot) (lampe HB 100W) avec un objectif à immersion x100. Le microscope est équipé avec une caméra CCD (Coupled Charge Device) et le logiciel Isis (Metasystems) est utilisé pour l'acquisition et l'analyse des métaphases. 40 mitoses sont analysées sur la lame.

IV. FISH sur noyaux interphasiques fixés en 3D

IV.1. Préparation des noyaux pour analyse 3D

Les cellules ($2 \cdot 10^6$) sont resuspendues dans 2 ml de nuclei buffer (5mM Hepes pH8, 50 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 0.05% Tween20) et 30 µl de RNase à 10 mg/ml, et incubées pendant 10 min à TA. Elles sont ensuite perméabilisées dans 0,25% de Triton X-100 pendant 10 min à 4°C, puis incubées pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont alors fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% sous agitation, puis la réaction est arrêtée avec 30 ml de Tris-HCl 100 mM pendant 10 min. Les noyaux sont récupérés par centrifugation 10 min à 500g à TA. Le culot est resuspendu dans du PBS 1X et les noyaux (100000) sont déposés par cyto-centrifugation (cytospin à 750 rpm, 5 min) sur une lame prétraitée au Vectabond (Vector). Les lames sont conservées dans du PBS 1X/0.01% azide de sodium à 4°C au maximum 1 mois.

IV.2. FISH 4 couleurs sur noyaux interphasiques 3D

IV.2.1. Préparation de la sonde

La sonde (200ng de sonde BAC RP11-401N16 ou RP11-7707 + 1,5 µl de sonde pUC1.77) est précipitée pendant 30 min à -80°C en présence de d'ADN compétiteur (cot-1 humain (Gibco BRL)), de 10 µg d'ADN de sperme de saumon, de $1/10^{\text{ème}}$ du volume en Acétate de Sodium 2,5N et de 2,5 volumes d'éthanol 100% glacé. Après centrifugation 30 min à 14000 rpm à 4°C, le culot est repris dans 7µl de tampon d'hybridation du kit « chromosome 2 alpha satellite probe » de chez AQUARIUS (ref : LPE002R) et 3µl de sonde chromosome 2 alpha satellite rouge du même kit.

IV.2.2. Préparation des lames

Les lames sont perméabilisées 20 min dans un bain 0,5% Triton X-100 / 0,5% saponine (SIGMA)/ PBS 1X sous agitation, puis rincées en 2X SSC 5 min sous agitation, et bloquées 30 min à 37°C avec 150 µl de lait écrémé 3% / 2X SSC. Les lames sont équilibrées 10 min en 2X SSC, puis quelques minutes en 50% formamide ultra-pure (25ml) / 2X SSC.

IV.2.3. Dénaturation de la sonde et des lames

La sonde est dénaturée 10 min à 73°C puis mise en préhybridation 20 à 30 min à 37°C. Les lames sont dénaturées 5 min à 86°C en 70% formamide / SSC 2X (80-100 µl/lame), puis immédiatement trempées dans les bains successifs à 70%, 85% et 100% d'EtOH glacé, 2 min chacun. La sonde est déposée sur les lames, recouvertes d'une lamelle scellée à la colle « Rubber Cement ». L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 37° C en chambre humide.

IV.2.4. Lavages et montage

Deux lavages rapides sont effectués pour éliminer la sonde en excès : 2 min dans du 0,4X SSC / 0,3% Tween 20 à 73°C, puis 2 min dans 2X SSC / 0,1% Tween 20 à température ambiante. Les lames sont séchées et contre-colorées avec 20 µl de solution d'antifade (Vectashield de VECTOR) contenant du DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole 2 µg/ml).

IV.2.5. Acquisition et analyse des images

3D images of labelled cell nuclei were acquired in a wide-field epifluorescence mode using an Axiovert200M microscope (Zeiss) equipped with a 63x/1.4 plan-apochromat oil immersion lens, a piezoelectric stage and a cooled CCD camera CoolSnap HQ2 (Roper). The 15 µm stacks were registered in four colours with an axial step of 0.2 µm and processed by iterative deconvolution with the measured PSFs and Meinel algorithm (MetaMorph, Roper Scientific). The resulting images were then thresholded and the 3D distances between the barycentres of FISH signals were quantified using the 4D-Viewer software package (Roper). Statistical analysis was performed with the Statview package using the Kolmogorov-Smirnoff and Kruskal-Wallis tests of significance.

IV.3. Immuno-FISH sur noyaux 3D

IV.3.1. Immunofluorescence (IF)

Les noyaux sont perméabilisés 5 minutes en 0,5% Triton X-100 / 0,5% saponine / PBS 1X, puis lavés 2 x 5 min en PBS 1X. Ils sont ensuite bloqués 30 min à 37°C en chambre humide en PBS 1X / 5% BSA (200µl), et incubés 1h à 37°C en chambre humide avec l'Ac primaire 1/100 en PBS 1X / 1% BSA (100µl). Après 3 lavages de 5 min en PBS 1X / 0,1% Tween 20,

les noyaux sont incubés 30 min à 37°C en chambre humide avec l'Ac secondaire 1/200 couplé au fluorochrome en PBS 1X / 1% BSA (100µl). Les lames sont ensuite lavées 3 x 5 min en PBS 1X / 0,1% Tween 20, 1 x 5 min en PBS 1X, puis égouttées et montées avec DAPI / Vectashield (20µl à 1µg/ml), délicatement pour ne pas écraser les cellules.

IV.3.2. FISH

- La lame est rincée en PBS 1X, post-fixée en PFA 4% (Sigma) pendant 3 min, et perméabilisée en Triton X-100 0,1% / PBS 1X pendant 3 min. La lame est ensuite équilibrée 2 min en 0,1M Tris-HCl pH7, lavée 2 x 2 min en 2X SSC, puis déshydratée en bain d'EtOH 70%, 85% et 100% à 4°C, 2 min chaque.
- Les sondes sont dénaturées 10 min à 73°C, puis préhybridées 30 min à 37°C. Les lames sont dénaturées 2 min à 76°C (plaque chauffante) en 70% formamide / 2X SSC, 80-100µl / lame + lamelle, puis immédiatement trempées dans les bains d'EtOH à 70%, 85% et 100% glacé, 2 min chaque.
- La sonde est déposée sur les lames, recouvertes d'une lamelle scellée à la colle « Rubber Cement ». L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 37° C en chambre humide.
- 3 lavages successifs sont réalisés : 30 min en 2X SSC à 37°C, 30 min en 1X SSC à TA, et 30 min en 0,5X SSC à TA.
- Les lames sont séchées et contre-colorées avec 20 µl de solution d'antifade (Vectashield de VECTOR) contenant du DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole 2 µg/ml).

IV.3.3. Acquisition des images 3D par microscopie confocale

Les noyaux sont analysés à l'aide d'un microscope confocal inversé (LSM 410 Zeiss), muni de lasers Hélium/Néon (émission à 543 et 633 nm), d'un laser Argon (émission à 488 et 514 nm), d'un objectif à grande ouverture numérique (63 x ; NA=1.4) à immersion à huile et de trois photomultiplicateurs indépendants. Le logiciel LSMPC (Zeiss) gère l'acquisition des images. La résolution est de 0.2 µm dans le plan focal et de 0,1 µm dans le plan axial donc l'acquisition de chaque noyau s'effectue par sections optiques sériées avec un intervalle de 0.2 µm. Les données obtenues correspondent à des voxels (200 nm x 100 nm x 100 nm). 50 noyaux ont été étudiés.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statview, avec les tests Kolmogorov-Smirnoff et Kruskal-Wallis, comme indiqué (Barki-Celli et al., 2005).

V. Méthylation de l'ADN sur chromosomes mitotiques (Réalisée par L. Barki)

V.1. Dénaturation des chromosomes : traitement aux UV (12W)

Les préparations métaphasiques sont irradiées par une lampe UV dans un bain de PBS1x pH 7 à une distance de 21cm pour les métaphases normales et 11cm pour les métaphases tumorales pendant 16-17h30 à température ambiante.

V.2. Détection de l'ADN méthylé

Après dénaturation les lames sont immergées dans un bain de paraformaldéhyde 1% 10 min à 4 degrés. Après trois lavages de 5mn dans le tampon PBS1x les métaphases sont bloquées dans le tampon PBS 1x modifié (PBS1x, 0.3% BSA fractionV, 0.1% Tw20) pendant 15 min sans agitation. La détection de l'ADN méthylé est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-5Methylcytosine (A. Niveleau) dilué au 1/5ème dans le tampon PBS modifié pendant 1 heure à 37 degrés. Après deux lavages de 5 min dans du tampon PBS modifié la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris couple au FITC (fluorescéine isothiocyanate, DAKO) pendant 45 min à 37 degrés. Les lames sont lavées trois fois dans le tampon PBS1x. Les lames sont séchées et contre-colorées avec une solution d'antifade (Vectashield de VECTOR) contenant du DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole 0,5 mg/ml).

V.3. Lecture, acquisition des images

L'analyse se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence (ZEISS Axioscop) (lampe HB 100W) avec un objectif à immersion x100. Le microscope est équipé avec une caméra CCD (Coupled Charge Device) utilisant le logiciel SmartCapture (Vysis, Voisins le Bretonneux, France). 20 mitoses sont analysées.

VI. Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

La technique de N-ChIP (native chromatin IP) est préférable pour étudier les modifications post-traductionnelles des histones, mais n'est pas adaptée à l'étude de protéines liant la chromatine, pour laquelle la X-ChIP (cross-linked chromatin IP) sera utilisée.

VI.1. ChIP sur chromatine native (N-ChIP)

VI.1.1. Préparation de la chromatine

Les cellules ($20 \cdot 10^6$) sont lysées dans du tampon RIPA (Tris 1M pH8, NP-40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, NaCl 150mM, DTT 1mM, TSA 100 ng/ml, EDTA, eau) pendant 20min, puis centrifugées 10min à 20 000g à 4°C. Les culots sont repris dans du RIPA puis soniqués à 150 puis à 100 joules pour fragmenter la chromatine, et incubés 1h sur glace. Les échantillons

sont centrifugés 10min à 20 000g à 4°C, et les surnageants sont récupérés. La qualité de la fragmentation de la chromatine est contrôlée par migration d'1µg de chromatine sur gel d'agarose 1% 30 min à 100V. Les fragments obtenus forment un smear entre 500pb et 800pb.

VI.1.2. Pré-clear de la chromatine

La chromatine est incubée avec des billes de protéine A/G-sépharose à 50%, préalablement saturées en ssDNA et BSA, à 4°C pendant 15 min sous rotation. Après centrifugation 2min à 300 rpm, le surnageant est récupéré et la chromatine est dosée à 260/280 nm.

VI.1.3. Immunoprécipitation de la chromatine

Chaque IP est réalisée à partir de 50 µg de chromatine. Le nombre total d'IP pouvant être effectué est déterminé en fonction de la quantité totale de chromatine obtenue. En plus des IP, de la chromatine doit être gardée pour l'input, et pour le contrôle négatif (mock IP : IP avec Ac isotype contrôle ou H₂O). La chromatine est immunoprécipitée par 7,5 µg d'anticorps (par IP) O/N à 4°C sous rotation. Le lendemain, les échantillons sont incubés avec les billes de protéine A/G-sépharose 15 min à 4°C sous rotation, puis centrifugés 1 min à 1000 rpm. Le surnageant (fraction « unbound ») est jeté. Le culot de billes (fraction « bound ») est lavé 3 fois en RIPA. Avant le dernier lavage et pour chaque IP différente, ainsi que pour l'input et le mock IP, les billes sont séparées en 2 fractions : une fraction protéique (1/2 IP) pour valider l'IP par WB, et une fraction génomique pour analyser les séquences enrichies dans les IP, par qPCR. Les fractions protéiques sont lavées et reprises dans du tampon de charge 2X, sauf pour les input, puis stockées à -20°C. Après le 3^{ème} lavage en RIPA, 2 éluions successives des fractions génomiques sont réalisées dans le tampon d'éluion (NaHCO₃ 50mM, SDS 1%) pendant 15min sous rotation. Après centrifugation 2min à 3000 rpm à TA, les surnageants des 2 éluions sont récupérés et poolés.

VI.1.4. Extraction de l'ADN

La chromatine est traitée par la protéinase K pendant 30min à 50°C. L'ADN est extrait par phénol/chloroforme puis chloroforme/iso-amyl. La phase aqueuse est récupérée et l'ADN précipité avec du glycogène, 1/10^{ème} de volume d'Acétate de Sodium 2,5N et 2 volumes d'EtOH 100% glacé, O/N à -20°C. Après centrifugation 25min à 20 000g à 4°C, les culots sont lavés en EtOH 70% glacé et centrifugés 10 min à 20 000g. Enfin, les culots séchés sont resuspendus dans un volume adapté de Tris-EDTA 10:1. Les ADN sont dosés et dilués à une concentration finale de 5 ng/µl dans H₂O pour l'analyse en PCR quantitative.

VI.2. ChIP sur chromatine fixée (X-ChIP)

VI.2.1. Cross-link et lavages des cellules

Les cellules ($20 \cdot 10^6$) sont fixées en 1% formaldéhyde (dans le milieu de culture) 10min à 37°C, puis la réaction de cross-link est stoppée en ajoutant 125mM final de Glycine (incubation 5 min à TA). Après centrifugation 5min à 260g à TA, les cellules sont lavées en PBS 1X froid 5 min à 260g à 4°C, puis en WASH I (0,25% Triton X-100, 10mM EDTA, 0,5mM EGTA, 10mM HEPES, 1mM PMSF, inhibiteurs de protéases) 10 min sur glace, et enfin en WASH II (200mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, 10mM HEPES) 10 min sur glace. Après chaque lavage, les cellules sont centrifugées 5min à 260g à 4°C.

VI.2.2. Lyse des cellules et fragmentation de la chromatine

Pour lyser les cellules, le culot est resuspendu et incubé 2h à 4°C dans le tampon de lyse (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris). La chromatine est ensuite fragmentée par sonication pour obtenir des fragments dont la taille se situe entre 500pb et 800pb ; l'efficacité de la sonication est vérifiée par migration de 1 µg de chromatine sur un gel d'agarose 1% 30 min à 100V. 2 centrifugations successives 5min à 20000g à 4°C sont réalisées, et les surnageants récupérés.

VI.2.3. Dosage, pré-clear et IP de la chromatine

Les échantillons sont dosés à 260nm et à 280nm. Le pré-clear est réalisé en incubant la chromatine avec les billes de protéine A/G-sépharose (préalablement saturées en ssDNA et BSA) 30min à 4°C sous rotation. Après centrifugation 5 min à 1500g à 4°C, le surnageant est récupéré. Chaque IP est effectuée sur environ 50 µg de chromatine en dilution buffer (0,01% SDS, 1,1% Triton, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris pH8 167mM NaCl, 1mM PMSF, inhibiteurs de protéases) avec 10µg (à ajuster) d'anticorps, O/N à 4°C sous rotation.

VI.2.4. Lavages, élution et reverse crosslink

Le lendemain, les échantillons sont incubés avec les billes de protéine A/G-sépharose 1h à 4°C sous rotation. Après centrifugation 5min à 1500g à 4°C, le surnageant (fraction « unbound » est jeté et le culot de billes (fraction « bound ») est gardé. Les billes sont lavées 1 x en RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 0,1% SDS, 0,5% NaDoc, 1% NP40), 1 x en HI Salt (500mM NaCl, 50mM Tris pH8, 0,1% SDS, 1% NP40), 1 x en LiCl (250mM LiCl, 50mM Tris pH8, 0,5% NaDoc, 1% NP40), 2 x en Tris-EDTA. Pour chaque lavage, les échantillons sont incubés 10min à 4°C sous rotation, et centrifugés 5min à 1500g à 4°C. Avant le dernier lavage en TE, les billes sont séparées entre fraction protéique (1/2 IP) pour la validation de l'IP par WB, et la fraction ADN. Après le dernier lavage, les échantillons protéiques sont repris dans du Sample Buffer 2X (sauf l'input), et les échantillons ADN sont élués 2 fois 15min à TA

sous rotation dans l'élution buffer. Les surnageants sont poolés. Le reverse crosslink s'effectue dans 200mM final de NaCl O/N à 65°C.

VI.2.5. Traitements RNase-pK, extraction et précipitation de l'ADN

La digestion à la protéinase K / RNase s'effectue en EDTA 10mM / Tris pH6,5 40mM, avec 20µg/mL de RNase 30 min à 37°C, puis avec 1mg/mL de protéinase K 2h à 37°C.

L'ADN est extrait par phénol/chloroforme puis chloroforme/isoamyl. La phase aqueuse est récupérée et l'ADN précipité avec du glycogène, 1/10^{ème} de volume d'Acétate de Sodium 2,5N et 2 volumes d'EtOH 100% glacé, O/N à -20°C. Après centrifugation 25min à 20 000g à 4°C, les culots sont lavés en EtOH 70% glacé et centrifugés 10 min à 20 000g. Enfin, les culots séchés sont resuspendus dans un volume adapté de Tris-EDTA 10:1. Les ADN sont dosés et dilués à une concentration finale de 5 ng/µl dans H₂O_mQ pour l'analyse en PCR quantitative.

Antibody	Reference	Type
H3K9me3	Millipore (07-523)	Polyclonal
H3K27me3	Millipore (07-449)	Polyclonal
H4K20me3	Millipore (07-749)	Polyclonal
H4ac	Millipore (06-598)	Polyclonal
HP1 α	Euromedex (2HP-2G9-AS)	Monoclonal
HP1 β	Euromedex (1MOD-1A9-AS)	Monoclonal
HP1 γ	Euromedex (2MOD-1G6-AS)	Monoclonal

Table 3 Anticorps utilisés pour les analyses ChIP.

VII. Lysats cellulaires et Western-blot

VII.1. Extraction protéique à l'urée

Les lysats protéiques totaux sont extraits à l'urée 8M à partir de 5 millions de cellules. Les cellules sont lavées en PBS 1X froid, et centrifugées 5 minutes à 1200 rpm à +4°C. Le culot est repris dans 1ml de PBS 1X froid (5.10⁶ cellules / tube), puis centrifugé 5 minutes à 1200 rpm à +4°C. Après avoir casser le culot, ajouter 100µl d'urée 8M à TA. Homogénéiser et incubé 5 minutes à TA. Les échantillons sont ensuite soniqués sur glace, puis incubé 10 minutes à TA. Après centrifugation 5 minutes à 13000 rpm à +4°C, le surnageant (contenant l'extrait protéique) est récupéré, et conservé à -80°C de préférence. Le dosage protéique est effectué avec la méthode BCA (Pierce, Rockford, IL, USA).

VII.2. Western-blot

Après dénaturation 5 min à 95°C, les lysats protéiques (15µg) sont déposés sur un gel à 15% polyacrylamide (pour étudier les protéines de faible PM, entre 10kDa et 25 kDa) en conditions

dénaturantes, et migrent par électrophorèse environ 1h30 à 150V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA) pendant 1h à 100V. La membrane est bloquée dans une solution de lait 5% en PBS-Tween20 0,1% pendant 30min, puis incubée O/N à 4°C avec l'anticorps primaire en lait 5% / PBS-Tween20 0,1%. Après 3 lavages de 10 min en PBS-Tween20 0,1%, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase en lait 5% / PBS-Tween20 0,1% pendant 1h à TA (Table 4). Après 3 lavages de 10 min en PBS-Tween20 0,1%, la membrane est révélée par chimioluminescence (kit Covalight, Covalab, France).

Antibody	Reference	Type	Dil Ac I	Dil Ac II
H3K9me3	Millipore (07-523)	Polyclonal	1/1000	1/2000
H3K27me3	Millipore (07-449)	Polyclonal	1/1000	1/2000
H4K20me3	Millipore (07-749)	Polyclonal	1/500	1/2000
H4ac	Millipore (06-598)	Polyclonal	1/1000	1/2000
HP1 α	Euromedex (2HP-2G9)	Monoclonal	1/2000	1/2000
HP1 β	Euromedex (1MOD-1A9)	Monoclonal	1/2000	1/2000
HP1 γ	Euromedex (2MOD-1G6)	Monoclonal	1/2000	1/2000
tubuline	Sigma	Monoclonal	1/5000	1/5000

Table 4 : Anticorps utilisés en western-blot.

VIII. Extraction et purification des acides nucléiques

VIII.1. Extraction d'ADN génomique

Les cellules sont suspendues dans la solution d'extraction (Tris-HCl 0.1M pH 7.4 / EDTA 10mM pH 8 / NaCl 0.1mM / SDS 0.5% / Protéinase K 100 μ g/ml) et incubées O/N à TA sous rotation. La solution est extraite plusieurs fois avec un mélange de phénol/chloroforme (1/1), puis avec un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). L'ADN est précipité par 1/10^{ème} de volume d'Acétate de Sodium 2,5N et 2 volumes d'EtOH 100% glacé, récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur, rincé dans de l'éthanol 70%, séché puis dissous dans du tampon TE (Tris-HCl 10mM pH 7.4 / EDTA 1mM pH 8). L'ADN est dosé par spectrométrie UV à 260 nm, et sa qualité est vérifiée par migration sur un gel 0.8% d'agarose.

VIII.2. Extraction des ARNs

Les ARN totaux sont extraits à partir des lignées cellulaires par la technique TRIzol/Chloroforme (Invitrogen, Life Technologies). Le culot cellulaire (5.10⁶ cellules) est resuspendu dans le TRIzol + chloroforme, puis l'ARN est précipité en isopropanol, et repris dans de l'H₂O à une concentration de 2 μ g/ml. L'ARN est contrôlé sur Agilent 2100 Bioanalyzer et quantifié sur NanoDrop (Thermo Scientific).

XIX. Analyses par qPCR et RT-qPCR ((Reverse Transcription)-quantitative Polymerase Chain Reaction)

L'ARN (1 µg) est « reverse transcrit » en utilisant le kit Superscript III Invitrogen, dans un appareil PCR Biometra.

Les PCR quantitatives sont réalisées en utilisant le SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), sur l'appareil Stratagène MX3000P. Les ADNC et ADN ChIP sont amplifiés au cours de 40 cycles (15s à 95°C et 1min à 95°C), après dénaturation 10 min à 95°C. La courbe de dissociation est ensuite établie (1min à 95°C puis 30s à 60°C et 15s à 95°C). Les différents primers utilisés sont listés dans la table 5.

Pour les analyses d'expression des gènes, la quantification est effectuée sur des courbes standards, et le gène U6 est utilisé comme gène contrôle pour la normalisation des données d'expression.

Pour les analyses ChIP, l'enrichissement est quantifié en normalisant l'IP sur l'Input, selon la formule : $(IP/Input = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-[Ct(IP)-Ct(Input)]})$.

Gene/Sequence	Forward primer	Reverse primer
ChIP		
<i>EXOC6B_1</i>	ATCTCCTTCTGGTGGACCT	TGTGGCTCGCTAAACATTTG
<i>EXOC6B_2</i>	ATTTGGGTCCAAAGCATCAC	TACCAAAAACCCCCAGAACAA
<i>EXOC6B_3</i>	GCCTGGCCTGTGTTTTCTAA	TAAGATCCCCTGACGCAGTT
<i>EXOC6B_4</i>	CAAAGGATGGGATGCCAAAGG	TCCAGAGGAGGATTTGGTTTG
<i>CYP26B1_5</i>	TCTTTTCTCCTTCCCAGGT	CCCTAAGGCACAGTTTCGAG
<i>CYP26B1_6</i>	CAGACGGACGAGATGAGACA	GAAGCCAAGCAGGCACCTAAG
<i>CYP26B1_7</i>	GACTGGGGTGCACCTTTGTT	AACCCACCAGCTTGACTCAC
<i>CYP26B1_8</i>	GTTCAAGACGCATTTGTTGG	GAATTGGACACCGTGTGG
<i>ZNF638_9</i>	ACGTCTGTCTATCCCAAGGTT	CCCTATGGCAATGATGTGTG
<i>ZNF638_10</i>	TTGCCATAGGGATCAAAGG	AGTGAGGGAAGATTGCACCA
<i>ZNF638_11</i>	TGAAGGCACAAATGATCAGG	GGTTCTGTGCCTGTCTCTC
<i>ZNF638_12</i>	AGCTCTTTGGAGGCGGTA	TATGCCCTACCCGACTAACAGC
<i>MXD1_13</i>	TGGGGACTCAACCTACCAAG	TGGCAAACCAAGCTACACTG
<i>MXD1_14</i>	CATCATCGTAGCTGGGAGGT	TCGTGCTCCTTCCTTGTTC
<i>MXD1_15</i>	CTCCCAATCGCACAAAGTGTA	TATCCCCGACTCACCATCTC
<i>GMCL1_16</i>	CTGGCACTTGAGAGGAAAGG	CCTGGGCTTCCCTTAACATGA
<i>GMCL1_17</i>	ATCCAGCATATCGCCTCATC	TGGGCCTGTGCTAAGCTAGT
<i>GMCL1_18</i>	TTGACAGGGTGAATGTGGAA	GTGAAAATGCGGAACACCT
<i>GMCL1_19</i>	CCCCAAGATGAGGATGAGAA	TACTCTGCGGCTACCCACTT
<i>Aak1_20</i>	AATAGGGAGCAGCAAAGCAA	CCTCTCGAGGTTGAAATCTG
<i>Aak1_21</i>	AACGGATCGAGACTGACACC	CTTCTCGCTTCCATTTTCCAGC
<i>Aak1_22</i>	CCTGATACCGTCCAAGTGCT	TGCCACTTTCAGCATCATC
<i>GFPT1_23</i>	TGACTGTAAAGCCCCAAAGG	ATTCCTCCTCTACCCCTCCA
<i>GFPT1_24</i>	GGTCTTAGCCTGCTGACTGC	TGGCCCAGTTGAGGAACCTAC
<i>Ig1</i>	CTCTCCCTGCAGTGACCTTC	TCAGGGACAGCCTGAACTCT
<i>Ig2</i>	CTTAGGGGTGCTTGCTTCTG	GCTCCTCCTGTCTGTTCTGG
<i>Satellite II</i>	TGAATGGAATCGTCATCGAA	CCATTTCGATAATTTCCGCTTG
<i>GAPDH</i>	GCTCTCTGCTCCTCTGTTC	CTTCAGGCCGTCCTAGC
RT-Q-PCR		
<i>EXOC6B</i>	TCCTGCGAGAGATCGAGAGC	GTCGTGATTACGGATACGAGTTT
<i>CYP26B1</i>	AGTTTGTGGACAATGCTTCTCC	CCTTGCTGCTCTCAATGAGGA
<i>ZNF638</i>	ATGTCGAGACCAGGTTTAATCC	GTTAGGTGCTCGTGGCCTTT
<i>MXD1</i>	CAGAAAAGCCGTTACCCAAATC	CGTCAGAGTCGCTCACACTG
<i>RY1</i>	AATGGGATTTGCCTCCTTTGAC	TCATGTACTGCCTGTACTTCCTC
<i>GMCL1</i>	ACTGGAGATTCCTGACCAGAAC	CCAAAATGGCAACAACCTGACT
<i>Aak1</i>	TCAGAAGGGTCTACGTGGAAT	CCTTGGGTTGATTGAAAGCCTG
<i>GFPT1</i>	GGGGCACTGAAAATCAAAGA	TTATCCACCAAAGCCAGAGG
<i>ARHGAP25</i>	GAACGATGTCTCAAGACTTGCG	TCCCTTGGAGTCACAGGCTT
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

Table 5 Primer pairs used for ChIP analyses or RT-Q-PCR as indicated.

X. CGH-array (Comparative Genomic Hybridization sur puce)

L'analyse « genome-wide » des changements de nombre de copie d'ADN des cellules CH1 et BL136 a été réalisée en utilisant une puce de haute résolution contenant 240000 sondes (Human genome CGH array 244K, Agilent), comme décrit (Jardin et autres., 2009). La digestion a été effectuée selon les recommandations du fournisseur des puces. L'ADN tumoral a été marqué par la cyanine-5 (Cy5) et l'ADN de référence (pool d'ADN normaux, Promega, Madison, WI) a été marquée par la cyanine-3 (Cy3). L'analyse et l'extraction d'image des puces ont été effectuées avec le logiciel Agilent Feature Extraction 9.5.3.1. L'analyse de données a été exécutée avec le logiciel d'Agilent CGH-Analytics 3.4.27. La classification comme gain ou perte a été basée sur l'algorithme ADM-2 implémenté dans CGH-analytics (seuil 6) et sur une inspection visuelle des ratios \log_2 . Les données ont été passées en revue pour les sites chromosomiques fréquemment affectés pour des variations physiologiques de nombre de copie (CNV), en utilisant la comparaison avec la base de données « genomic variants » (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

XI. Profiling transcriptionnel – puces Affymetrix

L'ARN des 10 échantillons de patients porteurs d'un DLBCL, sélectionnés pour l'analyse transcriptomique a été extrait selon la technique TRIzol/Chloroforme. L'ARN est quantifié et contrôlé sur Agilent 2100 Bioanalyzer.

Le profil transcriptionnel de ces 15 échantillons a été réalisé à l'Institut de Recherche Biologique de Montpellier (Dr J. de Vos), sur une puce commerciale oligonucléotidique pangénomique Affymetrix U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), comportant 54675 sondes, correspondant à 39000 gènes humains ou séquences codantes humaines.

Les techniques de marquage et d'hybridation sont réalisées selon les indications du fournisseur. L'hybridation est analysée par un scanner, qui génère une valeur brute unique d'intensité du signal pour chaque sonde (fichier .DAT). Les intensités des signaux sont ensuite moyennées générant un fichier de valeurs moyennées (fichier .CEL). Pour chaque échantillon, chaque gène peut être exprimé (P=Présent) ou non (A=Absent).

Nous avons réalisé une analyse supervisée des données transcriptomiques des 10 échantillons, afin de détecter une éventuelle expression différentielle de gènes entre les cas de DLBCL avec anomalie 1q12 et les cas de DLBCL sans anomalie 1q. Le logiciel Array Assist (Stratagene) permet de grouper ces échantillons (6 échantillons avec anomalie 1q12 vs 4 sans anomalie 1q), de normaliser les valeurs moyennées mesurées (module MAS5), d'effectuer une transformation logarithmique de ces valeurs. Il permet également de réaliser un tri, pour éliminer les gènes absents ou présents une seule fois sur les 10 échantillons (élimination du gène dont le nombre de P pour les 10 échantillons est inférieur à 3). Ce logiciel propose également un choix de tests de comparaison des valeurs normalisées entre

les groupes : dans notre étude, le test non paramétrique de Mann-Whitney est retenu, car il est applicable pour un faible nombre d'échantillons et adapté aux distributions hétérogènes, telles qu'observées dans les cancers. A ce stade, on obtient, pour chaque gène, une valeur p de probabilité de différence d'expression entre nos deux groupes.

L'analyse de l'expression différentielle des gènes nécessite par un tri par le « Fold Change » (FC). Le Fold Change correspond à la valeur du ratio entre la moyenne des signaux (moyenne d'expression des gènes) des échantillons d'un groupe (1) sur la moyenne des signaux des échantillons d'un autre groupe (2) ($FC = \text{Moy.Groupe1} / \text{Moy.Groupe2}$). Les gènes surexprimés dans le groupe 1 correspondent aux gènes sous-exprimés dans le groupe 2.

La sélection finale des gènes les plus différentiellement exprimés entre les cas de DLBCL avec anomalie 1q12 et les cas DLBCL sans anomalie 1q est donc basée sur un double tri : valeur du FC et du p : pour affiner cette sélection, nous avons choisi un $FC \geq 3$ et un $p < 0.02$.

Le regroupement hiérarchique des données et les dendrogrammes sont réalisés à l'aide des logiciels Cluster® et Treview® (Eisen et al. 1998). Le logiciel Cluster® groupe entre eux les échantillons qui ont le profil d'expression le plus proche parmi différents gènes et les gènes qui ont le profil d'expression le plus proche parmi différents échantillons. La même équipe a également créé le logiciel TreeView® qui permet de visualiser les données sous forme d'une matrice colorée où chaque ligne représente un gène et chaque colonne représente un échantillon. Le niveau d'expression de chaque gène est représenté par une couleur attribuée en fonction de la valeur médiane calculée sur l'ensemble des échantillons. Les gènes dont la valeur est inférieure à la médiane sont représentés en vert, ceux dont la valeur est supérieure à la médiane sont représentés en rouge et ceux dont la valeur est égale à la médiane sont représentés en noir. De plus, la similarité entre deux gènes ou échantillons est représentée par un arbre ou dendrogramme dont la longueur de chaque branche est proportionnelle à la distance entre deux points.

RESULTATS

DISCUSSION

CONCLUSION

PERSPECTIVES

RESULTATS / DISCUSSION

Partie I : Caractérisation d'un réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans une lignée modèle de lymphome B

Article : « Aberrant heterochromatin foci and gene deregulation due to satellite DNA anomalies in human lymphoma »

en révision à EMBO Molecular Medicine

I.1. Résumé de l'article

Les perturbations épigénétiques contribuent à la dérégulation de l'expression de gènes et à l'instabilité génomique dans les cancers. L'exploration de ce champ de recherche, aujourd'hui en pleine explosion, offre des perspectives d'innovation diagnostique, pronostique et thérapeutique considérables. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à la caractérisation des mécanismes génétiques et plus récemment épigénétiques sous-tendant la lymphomagenèse, en se focalisant sur un modèle particulier – celui des réarrangements chromosomiques qui affectent la région d'hétérochromatine constitutive du chromosome 1 humain (bande cytogénétique 1q12). Ces anomalies sont remarquablement fréquentes dans les lymphomes, les myélomes, les leucémies aiguës et également dans certaines tumeurs solides (sein, ovaire, poumon...). Ceci suggère fortement un rôle pathologique important pour ces anomalies, et l'existence de mécanismes oncogéniques dépendant de l'hétérochromatine constitutive dans ces maladies. Dans ce cadre, nous avons entrepris de caractériser un réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans une lignée modèle de lymphome B.

Dans ce travail, nous démontrons pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphome B. Les conséquences majeures de ces anomalies sont des « appariements » intra-chromosomiques à longue distance entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 transloqué et le domaine d'hétérochromatine centromérique, formant ainsi des foyers hétérochromatiques aberrants qui se trouvent relocalisés vers la périphérie nucléaire. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la dérégulation de l'expression de gènes, dont certains sont de nouvelles cibles pertinentes dans les lymphomes. En effet, le réarrangement 1q12 décrit ici, et ses foyers hétérochromatiques aberrants associés, sont liés à une down-régulation coordonnée de l'expression de certains gènes, parmi lesquels *MXD1* et *GMCL1* qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la signalisation MYC et P53, respectivement. De telles perturbations sont remarquables, et n'avaient pas encore été décrites dans le cadre de réarrangements chromosomiques dans les tumeurs humaines.

En résumé, nous proposons que les anomalies de l'hétérochromatine constitutive 1q12 correspondent à une nouvelle classe de réarrangement chromosomique ayant le potentiel, via des mécanismes à longue distance dépendants de l'hétérochromatine, de perturber profondément l'organisation et la fonction des gènes.

I.2. Article

Aberrant heterochromatin foci and gene deregulation due to satellite DNA anomalies in human lymphoma

Alexandra Fournier ^{1,2,11}, Anne Florin ^{1,2,3,11}, Christine Lefebvre ^{1,2,3}, Leila Barki ^{1,2}, Kassambara Alboukadel ^{1,2}, Florence de Fraipont ^{1,2,4}, Samuel Duley ^{1,2}, Sieme Hamaidia ^{1,2}, Juliana Ribeyron ^{1,2}, Rémy Gressin ^{1,2,5}, Alicia Lajmanovich ^{1,2,6}, Thierry Bonnefoix ^{1,2,6}, Stéphanie Chauvelier ^{1,2}, Martin Figeac ⁷, Jean-Pierre Kerckaert ⁷, John de Vos ⁸, Yves Usson ⁹, Katia Delaval ¹⁰, Alexei Grichine ^{1,2}, Claire Vourc'h ^{1,2}, Saadi Khochbin ^{1,2}, Robert Feil ¹⁰, Dominique Leroux ^{1,2,3}, Mary B. Callanan ^{1,2,3,12}

¹ INSERM, U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38706, France

² Université Joseph Fourier-Grenoble I, Institut Albert Bonniot, UMR-S823, Grenoble, France

³ Cellular and Molecular Hematology Unit, Plateforme hospitalière de génétique moléculaire des tumeurs, Department of cell biology and pathology, Pôle de biologie, CHU de Grenoble, Cedex 9 France

⁴ UF Cancérologie Biologique et Biothérapies, Pôle de Biologie, CHU Grenoble, BP 217 38043, Grenoble cedex 09, France

⁵ Pôle de Cancérologie et d'Hématologie, CHU de Grenoble, BP 217 38043, Grenoble cedex 09, France

⁶ Pôle recherche, CHU de Grenoble, BP 217 38043, Grenoble cedex 09, France

⁷ INSERM U837, Université de Lille2 - IFR 114 and Institut pour la Recherche sur le Cancer, Lille, France

⁸ INSERM U847, 34295 Montpellier, France

⁹ Laboratoire TIMC, Equipe RFMQ, CNRS UMR 5525, 38706, La Tronche Cedex, France

¹⁰ Institute of Molecular Genetics, CNRS UMR-5535 and University of Montpellier II, 34293 Montpellier, France.

Running title: Aberrant heterochromatic foci and lymphomagenesis

Keywords: 1q12 satellite II DNA / heterochromatin foci / gene deregulation / lymphoma

¹¹ Contributed equally to this work

¹² Corresponding author: Mary B Callanan, Team "Oncogenic pathways in the haematological malignancies" Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) – Université Joseph Fourier Research Centre, U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38706, France

Telephone: (33) 476549584, Fax (33) 4765499425. E-mail: mary.callanan@ujf-grenoble.fr

Character count: 49,860

Abstract

Epigenetic perturbations are increasingly described in cancer cells where they are thought to contribute to deregulated gene expression and genome instability. Here, we report the first evidence, that a distinct category of chromosomal translocation observed in human tumours – those targeting 1q12 satellite DNA - can directly mediate such perturbations by promoting the formation of aberrant heterochromatic foci. By detailed investigations of a 1q12 translocation to chromosome 2p, in a case of human B cell lymphoma, aberrant heterochromatic foci were shown to be localised to the nuclear periphery and to arise as a consequence of long range intra-chromosomal looping between the translocated 1q12 and chromosome 2 centromeric regions. Remarkably, adjacent 2p sequences became enriched in repressive histone modifications, including H4K20me3 and H3K9me3, and were bound by HP1, indicative of heterochromatin spreading to these sites. These structural changes were associated with aberrant spatial localisation and deregulated expression of a number of cancer-relevant 2p genes. Our data support the hypothesis that constitutive heterochromatin rearrangements contribute to tumourigenesis by perturbing gene organisation and function via long range epigenetic mechanisms.

Introduction

Cancer initiation and progression are increasingly recognised as multistep processes that involve the acquisition of both genetic and epigenetic perturbations (Feinberg et al., 2006). In particular, genetic aberrations such as chromosomal translocations encoding oncogenic fusion genes have been intensely studied and have led to groundbreaking advances in the identification of novel oncogenic signalling pathways and therapeutic targets, as well as serving as important cancer biomarkers (Rabbitts, 2009). In addition, we and others have described a novel category of chromosomal aberration that involves constitutive heterochromatin derived from human chromosome 1 (cytogenetic band 1q12) (Busson-Le Coniat et al., 1999; Itoyama et al., 2002; Le Baccon et al., 2001). These rearrangements are particularly frequent in tumours of hematopoietic, mesenchymal and epithelial origin, thereby arguing in favour of a role for constitutive heterochromatin-linked oncogenic mechanisms in these disorders (Fournier et al., 2007). Although an attractive hypothesis no study to date has addressed this question.

Constitutive heterochromatin is a specialised compartment within chromatin that is found primarily at centromeres, telomeres and the pericentric regions of certain chromosomes. It is composed of gene-poor, repetitive DNA sequence (alpha satellite, satellite II and III) that shows distinct epigenetic features *i.e.* late-replication, high levels of DNA methylation and “repressive” histone modifications such as histone H4 lysine 20 (H4K20me3) and histone H3 lysine 9 (H3K9me3) trimethylation that mediate heterochromatin formation and recruitment of maintenance proteins such as HP1 (Grewal and Jia, 2007). Evidence also exists for an RNA component in heterochromatin formation (Bernstein and Allis, 2005; Grewal and Jia, 2007).

Apart from its role in the control of genomic stability, constitutive heterochromatin influences the regulation of gene expression in numerous species through a mechanism known as “position effect”. This phenomenon results from a little-understood process of

heterochromatin ‘*cis*’ or ‘*trans*’ spreading into adjacent euchromatin and which induces gene repression (Grewal and Jia, 2007). This mechanism also appears to operate in mammalian cells. For example, during lymphoid development, stable transcriptional repression of certain lymphoid-specific genes is tightly correlated to their association with constitutive heterochromatin and acquisition of repressive histone modifications (Brown et al., 1999; Brown et al., 1997; Grogan et al., 2001; Su et al., 2004). It is also emerging that spatial positioning of genes with respect to constitutive heterochromatin and to the nuclear periphery constitutes additional complex epigenetic mechanisms that contribute to ‘positional’ gene regulation during development and cellular differentiation (Finlan et al., 2008; Kumaran and Spector, 2008; Reddy et al., 2008). Whether such mechanisms are deregulated in human tumours has not been investigated in any detail.

No study has investigated the potential pathological consequences of the presence of altered 1q12 constitutive heterochromatin on gene expression and on chromatin organisation in either haematological or solid tumours. In this context, we set out to perform the first detailed genetic and epigenetic characterisation of a 1q12 rearrangement in a human tumour. A novel unbalanced t(1;2) translocation that we had observed in a case of human B-cell lymphoma was selected as the study model.

Results

Translocations targeting 1q12 satellite DNA in human B-cell lymphoma provoke long-range intrachromosomal interactions that lead to the formation of aberrant heterochromatic foci at the nuclear periphery

As a first step to investigate the consequences of constitutive 1q12 heterochromatin rearrangements, we selected as a model system a human B lymphoma line, CH1, that harbours a novel t(1;2)(q12;p13) translocation (Barki-Celli et al., 2005). This unbalanced translocation involves juxtapositioning of a large block of 1q12 satellite II-rich sequence to

the chromosome 2p arm (Figure 1A, arrow). In keeping with reported cytogenetic observations of similar rearrangements in other tumours, karyotyping (not shown) and FISH in our lymphoma case showed that the translocated 1q12 region remained cytologically condensed (Figure 1A), thus suggesting that it maintained a heterochromatic conformation. In agreement with this, immunofluorescence detection of methylated DNA on mitotic chromosomes revealed dense methylation on the normal and the translocated 1q12 region but not on the normal chromosome 2 (Figure 1B). Furthermore, immuno-FISH revealed clear co-localisation of 1q12 FISH signals – including translocated 1q12 region - with heterochromatin foci enriched in H3K9me3 (Figure 1C). This confirmed that translocated 1q12 retained epigenetic hallmarks of constitutive heterochromatin. The spatial proximity and nuclear organisation of the 1q12 and centromere 2 constitutive heterochromatin domains were then examined by FISH in 3D-preserved nuclei (Figure 1D, left panel). Strikingly, distance measurements between 1q12 (green) and chromosome 2 centromere (red) FISH signals revealed dramatically increased spatial proximity of these two heterochromatic domains on the derivative chromosome 2 compared to the same regions on the respective normal chromosomes (Figure 1D middle panel; Kolmogorov-Smirnoff test, $p < 0.0001$). Indeed, in some cells distance measurements could not be performed as FISH signals were too close to be resolved. This indicated that 1q12 heterochromatin rearrangements are associated to long-range intra-chromosomal interactions that drive the formation of aberrant constitutive heterochromatin foci (aHCF) composed of 1q12 and centromere 2 constitutive heterochromatin (Figure 1D, right panel). Furthermore, since pairing between these heterochromatic regions was observed in unsynchronised CH1 lymphoma B cells, it is likely that these associations are sustained during a considerable part of interphase. In addition, no evidence for continued association of these heterochromatic regions was visible from inspection of CH1 metaphases (data not shown) thereby suggesting that these aberrant heterochromatic foci reassemble following cell division. Importantly, formation of aberrant

heterochromatic foci was not seen in lymphoma B cells without 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements, or in normal B cells (Figure 1D and data not shown). We next assessed whether the formation of such aberrant heterochromatic foci might be associated to perturbed nuclear organisation. Remarkably, 3D immuno-FISH in the lymphoma B cells presenting the aberrant heterochromatin foci (CH1 tumour B cells) revealed that they were abnormally relocalised to the nuclear periphery compared to the normal chromosome 2, which maintains a more central position (Figure 1E).

Aberrant heterochromatic foci are associated to long-range propagation of H4K20me3, H3K9me3 and HP1 binding in adjacent euchromatin

We next investigated the potential consequences of the presence of aberrant heterochromatin foci on chromatin organisation and function in lymphoma B cells. For this, we set out to perform detailed ChIP to ‘repressive’ heterochromatin marks on 2p sequences that were brought into close physical or spatial proximity to aberrant heterochromatin foci in CH1 lymphoma B cells. To identify these sequences, high resolution array-CGH and FISH were performed, in order to precisely map the 1q12 / 2p junction (Figure 2A and B). This pinpointed the 1q12 / 2p breakpoint to coordinate 72,760,219 on normal chromosome 2 (which corresponds to intron 6 of the *EXOC6B* gene), located in chromosome band 2p13. In addition, array-CGH also identified a partial 2p duplication event (Figure 2A). FISH analysis confirmed the 2p breakpoint location and revealed that this 2p duplication event corresponded to a ‘mirror image’ duplication of a 33.5 Mb region of 2p13 material, on the der(2) chromosome (Figure 2B). Thus, in genetic terms, the t(1;2) observed in CH1 cells resulted in juxtapositioning of intron 6, of a duplicated copy of the *EXOC6B* gene, in the reverse orientation, to 1q12 constitutive heterochromatin (Figure 2B and C). This genetic complexity was not entirely unexpected, since duplication events are quite frequent at the acceptor sites for 1q12 heterochromatin translocations in lymphoma and myeloma (Sawyer et al., 2005;

Sawyer et al., 1998). Our specific interest, for the purposes of this study, was to understand the impact of aberrant heterochromatic foci on chromatin structure and gene expression in adjacent euchromatin. Based on the 2D-FISH and genetic mapping, we reasoned that the 1Mb region localised immediately adjacent to the 1q12 / 2p breakpoint was likely to be particularly informative for ChIP analyses since it was expected to constitute the ‘stem’ of the putative loop structure required to form the aberrant heterochromatin foci (Figure 2C). With this in mind, we performed detailed, site-specific, quantitative ChIP analyses over a total of 14 sites dispersed over this 1 Mb 2p region and at satellite II repeat sequence (Figure 2C and 3A). *GAPDH* was assayed as a control euchromatic region (Figure 3A and B) (primer details, Table SII). Specifically, we determined enrichment for the histone modifications H3K9me3, H4K20me3 (2 key histone modifications associated to condensed constitutive heterochromatin), H3K27me3 (associated to silenced euchromatin) and global H4 acetylation (tetra-acetylated H4, at K5, K8, K12, K16), as a marker for euchromatin. The 2p sites examined included the 3’ region of the *EXOC6B* gene, the proximal promoter regions and exons 1 and 2, of the *CYP26B1* and *ZNF638* genes, respectively, and two intergenic sequences (ig1 and ig2, both localized between *CYP26B1* and *ZNF638*) (Figure 3). ChIP was performed on native (histone modifications, Figure 3A) or fixed (HP1, Figure 3B) chromatin. Strikingly, Q-ChIP in the lymphoma B cells showing aberrant heterochromatin foci (CH1), compared to control cells, revealed marked enrichment of H3K9me3 and/or H4K20me3 over all 2p sequences tested within this 1 Mb region (Figure 3A). This was not due to global increases in these histone modifications which by western blotting were not changed (not shown). Of note, satellite II sequence (enriched in chromosome band 1q12, see Figure 1A) was also highly enriched in both H3K9me3 and H4K20me3 in the lymphoma B cells with aberrant heterochromatin foci compared to the control cells. Highest enrichment levels for these histone modifications were observed at the 3’ end of the *EXOC6B* gene (primer pairs 2 and 4) and at the 5’ promoter regions of the *ZNF638* gene (primer pairs 9 and 10, for

example). This was highly evocative of propagation either *in cis* or *in trans* of heterochromatin marks across these 2p sequences. These propagation effects did not appear to target all 2p sequences equally. For example, enrichment levels for H3K9me3 and H4K20me3 at the *CYP26B1* gene were lower than those observed at the adjacent *EXOC6B* or *ZNF638* genes. Likewise, enrichment for H3K9me3 was higher at Ig2 compared to Ig1 while neither site showed enrichment for H4K20me3 (Figure 3A, far right panel). For H3K27me3, enrichment could be observed at the *EXOC6B* gene (Figure 3A) in the lymphoma B cells presenting the aberrant heterochromatin foci (CH1), compared to control lymphoma cells, but this became less marked at the neighbouring genes (Figure 3A). In view of the highly consistent abnormal enrichment patterns observed for H3K9me3 and/or H4K20me3 across all of the 2p sequences tested, it was logical to probe for HP1 binding at the same sites. For this, cross-linked ChIP to all 3 HP1 isoforms (α , β and γ) was performed in the lymphoma B cells showing aberrant heterochromatic foci (CH1) compared to control cells (B593) (Figure 3B, HP1 α and γ ; Figure S1, HP1 β). Strikingly, all of the examined sequences including the *CYP26B1* gene promoter, showed marked enrichment of both HP1 α and HP1 γ (Figure 3B). HP1 β enrichment was less pronounced or equivalent in CH1 compared to B593 cells (Figure S1). As for histone modifications, this was not due to global increases in HP1 levels which by western blotting were unchanged (data not shown). Of note, DNA methylation analyses did not reveal aberrant methylation status, at least at the *CYP26B1* and *ZNF638* genes (data not shown). Taken together, these data indicate that aberrant heterochromatin foci induce abnormal, long distance propagation of repressive heterochromatin marks along adjacent chromatin.

Aberrant heterochromatic foci and heterochromatin spreading mediate extensive gene deregulation in B-cell lymphoma

The formation of aberrant heterochromatic foci coupled to abnormal enrichment of adjacent 2p sequences in repressive heterochromatin marks (H4K20me3, H3K9me3 and HP1), and repositioning of the rearranged chromosome 2 to the nuclear periphery, could affect the expression of at least those genes brought into close proximity to heterochromatin. To assess this question, global gene expression profiling was performed in the lymphoma B cells presenting the aberrant heterochromatin foci (CH1), compared to control lymphoma cells (B593), by using U133 2.0 Affymetrix gene chip arrays. For the reasons outlined above, we focused our differential gene expression analysis on a 5 Mb 2p interval (including the 1 Mb 2p region analysed by ChIP) likely to be either physically or spatially positioned into the proximity of aberrant heterochromatin foci (Figure 4A). In order not to overestimate gene expression perturbations in CH1 cells compared to B593 cells, care was taken to adjust 2p gene expression values for copy number prior to normalisation to the control gene U6. Remarkably, this analysis, combined with RT-Q-PCR validation, identified 16 differentially expressed 2p genes in CH1 compared to B593 cells (Figure 4B). A striking finding was that both down and up-regulation of gene expression (11 and 5 genes, respectively) could be observed over relatively short genomic regions. Of particular interest was identification of the coordinate downregulation of 4 genes (*MXD1*, *RY1*, *GMCL1*, *ANXA4*), all co-localised to a 250 kb 2p region, in CH1 compared to B593 or normal B cells (Figure 4B and Figure S2). Importantly, two of these genes encode proteins that are implicated in the control of either MYC (*MXD1* - MAX dimerization protein 1) or P53 (*GMCL1* - Germ Cell Less 1) function, and are thus of potential clinical relevance. Intriguingly, these 4 coordinately down-regulated genes were flanked by the *LOC400960*, *AAK1* and *GFPT1* genes, which all showed up-regulation in CH1 compared to control lymphoma or normal B cells (Figure 4B and Figure S2, and data not shown). This suggested that certain genes or gene neighbourhoods might ‘escape’ repression or, alternatively, that individual genes show differential sensitivity / thresholds to heterochromatin-mediated perturbations. To investigate this further, the

promoter regions of the *MXDI* and *GMCLI* genes (down-regulated) compared to the *AAK1* and *GFPT1* genes (up-regulated) were analysed by ChIP, in order to assess H4K20me3, H3K9me3, H3K27me3 and H4ac enrichment. Remarkably, all 4 gene promoter regions, irrespective of expression status, showed similar enrichment profiles for H3K9me3 and H4K20me3 i.e. higher levels in CH1 cells compared to B593 (particularly at the *GMCLI* and *GFPT1* promoters) (Figure 4C). H3K27me3 levels, as seen previously (Figure 3A), were more variable across promoters, but enrichment profiles were broadly similar, at least for the *MXDI* and *GMCLI* genes i.e. higher levels in CH1 cells compared to B593 (Figure 4C). Taken together, these data again indicated that gene-specific thresholds and/or additional higher-order chromatin regulation, such as gene positioning in the nucleus, are likely to be the determining factors for susceptibility to heterochromatin-mediated transcriptional perturbations in tumour cells presenting aberrant heterochromatin foci.

Deregulated lymphoma-relevant 2p genes show abnormal spatial positioning with respect to aberrant heterochromatic foci

The transcriptional deregulation patterns, associated to the 1q12 constitutive heterochromatin / 2p translocation were highly reminiscent of those observed for endogenous genes in *Drosophila* and human cells (Finlan et al., 2008; Kumaran and Spector, 2008; Reddy et al., 2008), in which positional proximity to heterochromatin and/or the nuclear periphery leads to variable reductions in the transcriptional activity of individual genes (and not others), but does not always give rise to gene silencing. We thus examined, by FISH, the spatial positioning of the non-affected original copy and the breakpoint proximal copies of the *GMCLI*, *MXDI* and *AAK1* genes, which we had found to undergo transcriptional deregulation (Figure 5A and B). Strikingly, despite being located at over 67 Mb from the der(2) centromere, in linear genomic distances, breakpoint proximal copies of the *GMCLI*, *MXDI* (hybridised by BAC probe RP11-401N16) and *AAK1* genes (hybridised by BAC probe RP11-7707), were found to be

located significantly closer to chromosome 2 centromeric heterochromatin on the der(2) chromosome (high proportion of FISH signals at $< 1.5 \mu\text{m}$ from the der(2) chromosome centromere domain), compared to un-affected copies of the same genes on either the der(2) or normal 2 chromosomes (Figure 5B, $p < 0.0001$ by the Kruskal-Wallis test (KW)). This provided further evidence that 1q12 satellite II DNA rearrangements induce long-range intra-chromosomal interactions and that these interactions could involve not only 1q12 and derivative chromosome 2 centromeric heterochromatin domains, but gene sequences as well (Figure 5B). Interestingly, a tendency towards differential organisation of the RP11-401N16 (contains *MXDI*, *GMCLI* – both underexpressed genes) and RP11-7707 BACs (contains *AAKI* – an overexpressed gene), relative to centromere 2 heterochromatin was observed (more distances in the $> 2 \mu\text{m}$ interval for the RP11-7707 BAC, Figure 5B). Even though statistical analysis by the KS test (Kolmogorov-Smirnoff) did not show this to be significant ($p=0.26$), it suggests that further fine scale differences in the three dimensional nuclear organisation of these genes are influencing their susceptibility to constitutive heterochromatin-dependent gene deregulation. Collectively, these data indicate that abnormal intra-chromosomal spatial positioning of genes to aberrant heterochromatin foci constitutes an additional, major higher-order chromatin perturbation associated to 1q12 satellite DNA rearrangements in lymphoma B cells.

Discussion

We demonstrate, for the first time, that 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements which are frequently and non-randomly observed in human cancer, mediate profound epigenetic perturbations. Major consequences of these anomalies are long-range intra-chromosomal ‘pairing’ of translocated 1q12 and centromeric heterochromatin domains, thereby forming aberrant heterochromatic foci that become delocalised to the nuclear periphery. These foci are associated to long-range propagation of repressive histone

modifications and HP1 into adjacent euchromatin, and to dysregulation of gene expression, affecting novel lymphoma-relevant targets. These perturbations are striking and have not been previously reported for any chromosomal rearrangement in human tumours.

The organisation of genes and chromosomes within the nucleus is currently emerging as a key factor controlling lineage-specific gene expression during cellular differentiation or programmed genome rearrangements in B and T lymphocytes (Takizawa et al., 2008). It is also becoming apparent that deregulation of this organisation may play a role in human disease. For instance, in the immunodeficiency centromeric instability facial anomalies (ICF) syndrome, a DNA methylation deficiency syndrome, it has been shown that DNA hypomethylation at restricted sites in the genome can lead to extensive changes in nuclear organization away from the original site of the epigenetic change (Matarazzo et al., 2007). In the present work, we show that 1q12 satellite II DNA rearrangements are associated to long-range deregulation of multiple genes and to the formation of aberrant constitutive heterochromatic foci, composed of both 1q12 satellite II-rich heterochromatin and alpha satellite-rich centromeric heterochromatin, on the same rearranged chromosome. This was likely to occur as a consequence of long-range chromatin looping and specific intra-chromosomal interactions rather than chance co-localisation of the normal 1q12 and centromere 2 heterochromatin domains in the nucleus. Indeed, our data indicate that these regions occupy different nuclear compartments and have a very low tendency to associate in either lymphoma without 1q12 rearrangements or normal B cells. Importantly, we have observed similar abnormal heterochromatin structures in other lymphoma cases presenting 1q12 rearrangements ((Barki-Celli et al., 2005), and data not shown), thereby strongly suggesting that intra-chromosomal ‘pairing’ of heterochromatic regions, and the formation of aberrant heterochromatic foci are recurring features of tumour cells presenting such anomalies. In this respect, the parallels between 1q12 satellite II-rich heterochromatin anomalies and rearrangements that result in silencing of the eye colour gene,

brown, by heterochromatin insertion, in *Drosophila*, are striking. In the latter model, heterochromatin insertion to the *brown* locus leads to association between the inserted heterochromatin domain and centromeric heterochromatin on the same chromosome. Interestingly, this is associated to delocalisation of the rearranged chromosome to the nuclear periphery, together with the wild type *brown* allele, which is also silenced (Dernburg et al., 1996). Thus, a number of important features associated to silencing of the *brown* locus in flies appear to be conserved in the 1q12 rearrangements in human tumour cells. How the aberrant heterochromatic foci are formed and maintained in tumour cells is a question of considerable interest. Such structures may require DNA sequence interactions between homologous, repetitive DNA elements (or repeat-derived transcripts?) at centromeric or pericentric regions, in addition to structural chromatin proteins such as HP1 (Grewal and Jia, 2007).

The aberrant heterochromatic foci described here are associated to abnormal enrichment of 'repressive' epigenetic marks at adjacent euchromatin. The simplest explanation is that this event occurs as a consequence of *in cis* heterochromatin spreading from aberrant heterochromatic foci along euchromatin. There is substantial evidence that heterochromatin can spread along the chromatin fiber *in cis* and that this can be propagated by the interaction of HP1 with SUV39H which may in turn create additional binding sites for HP1 on the neighbouring nucleosomes. However, in *Drosophila* and other species, certain genes seem to 'escape' from silencing *in cis* (Vogel et al., 2009). Thus alternative *in cis* models have been proposed whereby heterochromatin domains may form in a discontinuous fashion and thereby 'skip' certain genes which would remain in a euchromatic state. This might occur through 'looping' of certain domains away from or closer to pericentric heterochromatin. It is highly probable that, in the case of 1q12 satellite II DNA rearrangements, the situation is likely to be even more complex since these aberrations involve both physical and spatial repositioning of genes to a single large aberrant heterochromatin structure that itself forms as a consequence of long range intrachromosomal

interactions. In addition, the aberrant heterochromatic foci become repositioned to the nuclear periphery which may further influence gene transcriptional potential (Finlan et al., 2008; Kumaran and Spector, 2008; Reddy et al., 2008).

Additional insights into heterochromatin spreading have come from studies on X;autosome translocations [t(X;A)]. These are observed in certain constitutional genetic disorders and, as in the case of 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements, are usually unbalanced translocations. In agreement with their association to gene repression they can be associated to milder clinical phenotypes (Giorda et al., 2008). In t(X;A), heterochromatin spreading has been shown to be relatively inefficient and this has been attributed to either attenuated spreading of silencing at the onset of X-inactivation or to failure to maintain efficient silencing through development, referred to as the ‘spread and retreat’ model (Popova et al., 2006). To explain increased efficiency of silencing on the X chromosome relative to autosomes, Gartler and Riggs have proposed the concept of “way stations” or “boosters elements” that facilitate spreading and / or maintenance of X inactivation (Gartler and Riggs, 1983). Of interest in this respect is a model proposed by Lyon, whereby repetitive sequence elements such as LINE-1 might be good candidates for ‘way stations’ (Lyon, 1998). The role of nuclear architecture has not been addressed in any detail in heterochromatin spreading at t(X;A). In any case, similar mechanisms – linked to repeat sequence density along the 2p chromosome arm, for example, may be influencing propagation of heterochromatin ‘marks’, in the model studied here. Indeed pericentric and centromeric repeat sequences are configured as constitutive heterochromatin early in development and are thus maintained in all somatic tissues thereafter. The parallels between this process and the maintenance of parental imprinting are interesting (Delaval et al., 2007). Specific DNA sequence characteristics, such as the repeats themselves, are clearly required for these processes and these may be absent or not recruited to euchromatin regions of the genome. This, in turn, may explain why 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements and associated aberrant heterochromatic foci

lead to variable propagation of heterochromatin ‘marks’ and to downregulation of gene expression rather than to complete silencing of genes in the affected tumour cells (in this case B-cell lymphoma).

The der(2)t(1;2)(q12;p13) described here, and its associated aberrant heterochromatic foci, were linked to coordinate downregulation of the expression of genes, such as *MXDI* (formerly known as *MAD*) and *GMCLI* which encode proteins that play a role in the control of MYC (Montagne et al., 2008) and P53 signalling (Masuhara et al., 2003), respectively. This important finding suggests that 1q12 satellite DNA rearrangements and associated aberrant heterochromatic foci have the potential to interfere with tumour suppressor pathways.

In summary, we propose that 1q12 anomalies correspond to a new class of chromosome rearrangement with the power, via novel long range heterochromatin-dependent mechanisms, to profoundly perturb gene organisation and function. This model would be relevant not only for B cell lymphoma but for additional haematological and solid tumours as well. Indeed, these anomalies are frequently and non-randomly observed in a broad spectrum of human tumours and have been linked to disease progression and poor prognosis (Fournier et al., 2007). Further studies geared to understanding the mechanistic origins of these aberrant heterochromatic foci will be required to elucidate their role in cancer initiation and progression.

Materials and Methods

Cell culture, cell lines and primary cells

Peripheral-blood B lymphocytes were obtained from healthy donors and processed by immuno-magnetic bead cell sorting using positive selection. Positive selection was performed with anti-CD19 immunomagnetic beads at 1 µg per 1×10^6 cells (CD19 Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of the sorted B cell populations was assessed by anti-CD3/CD19 antibody double labelling and flow cytometric analysis. Resting B lymphocytes were either used directly or activated *in vitro* using CD40L (Alexis Biochemicals) at 0.5 µg/ml for 48 h in RPMI complete medium. The cell lines studied were diffuse large B-cell lymphoma lines CH1 and B593 and have been described previously (Barki-Celli et al., 2005; Callanan et al., 2000). Cell lines were checked for absence of mycoplasma contamination (MycoAlert mycoplasma detection kit, Lonza, Switzerland). Cell lines and primary B cells were cultivated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Primary B cells, B593) or human AB+ serum (CH1 cells), 100 µg/ml penicillin-streptomycin, 1.4 mM sodium pyruvate and 1.4 mM non-essential amino acids (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Immunodetection of Methyl-CpG on mitotic chromosomes

Mitotic chromosome spreads were prepared according to standard techniques (Le Baccon et al., 2001). For DNA methylation analysis by immunodetection, mitotic chromosomes were first irradiated with ultraviolet light in a shallow suspension of 1X phosphate buffered saline (1X PBS) for 90 min. Following denaturation the slides were immersed in 1% paraformaldehyde for 10 min at 4°C, and then rinsed 3 times in a modified 1X PBS solution (1X PBS, 0.3% BSA fraction V, 0.1% Tween 20). Metaphases spreads were then treated with

blocking reagent during 15 min without agitation. DNA methylation was detected using an anti-5-Methylcytosine antibody serum (a gift from A. Niveleau) at a 1/5 dilution in modified PBS for 1 h at 37 °C. Following two 5 min washes anti-5-methylcytosine signals were revealed with an FITC-labelled secondary antibody (DAKO) for 45 min at 37 °C. Non-specific signal was removed by 2 washes in 1X PBS. The slides were air dried and mounted in an anti-fade / DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole 0.5 mg/ml) solution, for microscope analysis. Analysis was performed on a Zeiss epifluorescence microscope (lamp HB 100W) equipped with a CCD camera under a 100X oil immersion objective. A total of 30 metaphases were analysed.

ChIP on native and cross-linked chromatin

ChIP on native and cross-linked chromatin was performed as previously described (du Chene et al., 2007; Govin et al., 2007; Umlauf et al., 2004). Chromatin was sonicated into fragments of between 3 to 7 nucleosomes in length. All Q-ChIP assays were performed at least three times on independent chromatin preparations. Details of the antibodies used are given in the supplementary Table I. For Q-PCR analyses of immunoprecipitated chromatin fractions at sequences of interest, a SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems) was used. Q-PCR was performed in duplicate on 25 ng of immunoprecipitated DNA or DNA from input chromatin fractions using the following conditions; 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min. Primers pairs are listed in supplementary Table II. Q-PCR data obtained on immunoprecipitated fractions were normalised to input chromatin ($IP/Input = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-[Ct(IP)-Ct(Input)]}$). Background precipitation was evaluated with a mock IP.

FISH to metaphase chromosomes and to interphase 2D and 3D nuclei

FISH to metaphase chromosomes for translocation breakpoint mapping purposes were performed as described (Lefebvre et al., 2007). Interphase FISH experiments (2D or 3D-FISH) were performed as described (Barki-Celli et al., 2005). Briefly, 16 h prior to harvesting, cells were diluted to 0.5×10^6 /ml in RPMI medium. Lymphocytes were harvested and resuspended at a concentration of 2.5×10^6 / 2 ml of nuclei buffer (5 mM Hepes, 50 mM KCL, 10 mM MgSO₄, 0.05% Tween 20 pH8) with 30 μ l of RNase (10 mg/ml), permeabilised and fixed, as described (Ferguson and Ward, 1992). The released nuclei were collected by centrifugation on a Ficoll gradient and washed 3 times in 1X PBS. Nuclei (50,000) were then cytocentrifuged onto Vectabond-treated glass slides (Vector Laboratories). These slides were stored for a maximum of 3 weeks prior to use in 2D or 3D immuno-FISH or 2D-FISH experiments. The 1q12 heterochromatin region was detected using the pUC1.77 probe, chromosome 1 and chromosome 2 centromeres using commercial probes (Vysis), as described (Le Baccon et al., 2001). Locus-specific FISH was performed with BACs selected from the Sanger Centre Ensembl or UCSC genome browsers. Gene and BAC probes used in the study were as follows: *EXOC6B* (RP11-564H1 and RP11-321C18), *GMCLI*, *MXD1*, *RY1* (RP11-401N16), and *AAK1* (RP11-7707). For FISH, BACs were directly labelled with cyanine 5-modified nucleotides by using a commercial nick translation kit (Vysis), according to the manufacturer's instructions. For repeat sequence probes, 50 ng of labelled DNA was used for FISH while for BAC probes 200 ng was used. Prior to FISH, slides were rinsed twice in 2X SSC, then permeabilised (Triton X-100 / Saponine 0.5% / 1X PBS) twice for 10 min to allow penetration of the probe. Non-specific sites were blocked in 3% BSA / 2X SSC for 30 min at 37 °C. Slides were then rinsed in 2X SSC and incubated for 10 min in 50% formamide / 2X SSC. FISH was performed as previously described with the following modifications; nuclei were preincubated in hybridisation buffer for 30 min prior to co-denaturation of probe and target, for 5 min at 86 °C. The addition of COT-1 DNA was performed to reduce

background hybridisation. Washes were performed, as described, to remove non-specific signal (Barki-Celli et al., 2005; Lefebvre et al., 2007).

FISH Image analysis

For translocation breakpoint mapping purposes, FISH signals were captured in two-dimensional samples on a Zeiss Axioskop epifluorescence camera equipped with triple band pass filter by cooled CCD camera. For 3D-immunoFISH and analysis of radial nuclear distributions of 1q12 domains, three-dimensional analysis and image deconvolution was performed as described (Barki-Celli et al., 2005). To calculate the distance between two probes in 2D, the hybridization signals were manually segmented and the XY coordinates of the centroid of each were determined. 3D images of labelled cell nuclei were acquired in a wide-field epifluorescence mode using an Axiovert200M microscope (Zeiss) equipped with a 63x/1.4 plan-apochromat oil immersion lens, a piezoelectric stage and a cooled CCD camera CoolSnap HQ2 (Roper). The 15 μm stacks were registered in four colours with an axial step of 0.2 μm and processed by iterative deconvolution with the measured PSFs and Meinel algorithm (MetaMorph, Roper Scientific). The resulting images were then thresholded and the 3D distances between the barycentres of FISH signals were quantified using the 4D-Viewer software package (Roper). Statistical analysis was performed with the Statview package using the Kolmogorov-Smirnoff and Kruskal-Wallis tests of significance, as indicated (Barki-Celli et al., 2005)

Array-CGH

Genome-wide analysis of DNA copy number changes in CH1 cells was performed using a high resolution microarray containing 240,000 probes (Human genome CGH array 244K, Agilent), as described (Jardin et al., 2009). Digestion was performed as recommended by the manufacturer of the arrays. Tumour DNA was labelled with cyanine-5 (Cy5) and reference

DNA (pooled normal DNA, Promega, Madison, WI) was labelled with cyanine-3 (Cy3). Microarray image analysis and extraction were performed with Agilent Feature Extraction 9.5.3.1 software. Data analysis was performed with Agilent CGH-Analytics 3.4.27 software. Classification as gain or loss was based on the ADM-2 algorithm as implemented in CGH-analytics (threshold 6) and a visual inspection of the \log_2 ratios. Data sets were reviewed for frequently affected chromosomal sites of physiological copy number variations (CNV), using comparison with the genomic variants database (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Q-RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cell lines and purified normal and tumour B cells by TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies), quality controlled by using the Agilent Bioanalyzer system, and quantified by NanoDrop (Thermo Scientific) before being reverse transcribed using the SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. In CD40 activation experiments, purified B cells were stimulated for 72 h with CD40L (0.5 $\mu\text{g/ml}$) and enhancer at 5 $\mu\text{g/ml}$ in the presence of IL-4 (10 ng/ml), prior to RNA extraction. Q-PCR was performed using SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems) and primers shown in supplementary Table 1, according to the manufacturer's instructions. Quantification was achieved against standard curves run in parallel in each PCR assay for each target. The U6 gene was used as a control gene for normalisation of gene expression data. Q-PCR was performed on a MX3000P (Stratagene) machine.

Affymetrix gene expression profiling

RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), quality controlled by using the Agilent Bioanalyzer system and quantified, prior to labelling, by NanoDrop (Thermo Scientific). Biotinylated cRNA was amplified with double *in vitro*

transcription and hybridized to the Affymetrix HG U133 Plus 2.0 microarrays, according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Fluorescence intensities were quantified and analyzed using the GCOS 1.2 software (Affymetrix). Gene expression data were normalized with the MAS5 algorithm by scaling each array to a target value of 100 using the *global scaling* method. Statistical analysis was performed using the Gene Spring software package (Agilent).

Acknowledgements

We are very grateful to Stefan Dimitrov and to Rosemary Kiernan for invaluable assistance and advice with cross-linked ChIP analyses. We thank Aurélie Granjon for additional, excellent technical assistance. We acknowledge Pr Jean-Jacques Sotto, Pr Jean-Yves Cahn, and Pr Eric Gilson and members of the ARAMIS association for their encouragement of this work. This work has been funded by generous financial support from the Fondation de France, the Institut National du Cancer (EpiPro network, the programme 'Développement de plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers', the P.A.I.R 'Mantle Cell Lymphoma network' and the INCa-DHOS translational research programme). Additional funding was obtained from the Région Rhone-Alpes programme 'Thématique prioritaire -- Cancer', the canceropôle CLARA (EpiMed), the Ligue Nationale Contre le Cancer -- Comités de l'Isère / Savoie, the Délégation Régionale de la Recherche Clinique -- CHU de Grenoble, the French GOELAMS clinical trials group and the ARAMIS association. Alexandra Fournier has been the recipient of doctoral funding from the Ministère de l'Éducation et de la Recherche and ARC; Anne Florin of post-doctoral funding from the ARC-ARECA network 'epigenetic profiling in breast and haematological tumours'; Juliana Bruder Ribeyron of doctoral funding from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Société Française d'Hématologie; Leila Barki of doctoral funding from the Ministère de l'Éducation et de la Recherche and La Ligue Nationale Contre le Cancer; Mary Callanan of a 'Contrat d'Interface INSERM / Grenoble University Hospital Centre (2006-2011). The authors declare no competing financial interests.

References

- Barki-Celli, L., Lefebvre, C., Le Baccon, P., Nadeau, G., Bonnefoix, T., Usson, Y., Vourc'h, C., Khochbin, S., Leroux, D. and Callanan, M. (2005) Differences in nuclear positioning of 1q12 pericentric heterochromatin in normal and tumor B lymphocytes with 1q rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 339-349.
- Bernstein, E. and Allis, C.D. (2005) RNA meets chromatin. *Genes Dev*, **19**, 1635-1655.
- Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*, **3**, 207-217.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Busson-Le Coniat, M., Salomon-Nguyen, F., Dastugue, N., Maarek, O., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Baranger, L., Brizard, F., Radford, I., Jeanpierre, M., Bernard, O.A. and Berger, R. (1999) Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 1 abnormalities in hematopoietic disorders: rearrangements of DNA satellite II and new recurrent translocations. *Leukemia*, **13**, 1975-1981.
- Callanan, M.B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M.J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J.J. and Leroux, D. (2000) The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 309-314.
- Delaval, K., Govin, J., Cerqueira, F., Rousseaux, S., Khochbin, S. and Feil, R. (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J*, **26**, 720-729.
- Dernburg, A.F., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshall, W.F., Philips, J., Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, **85**, 745-759.
- du Chene, I., Basyuk, E., Lin, Y.L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Bertrand, E., Marcello, A., Emiliani, S., Kiernan, R. and Benkirane, M. (2007) Suv39H1 and HP1γ are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *Embo J*, **26**, 424-435.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, **7**, 21-33.
- Ferguson, M. and Ward, D.C. (1992) Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T- lymphocyte nuclei. *Chromosoma*, **101**, 557-565.
- Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R. and Bickmore, W.A. (2008) Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet*, **4**, e1000039.
- Fournier, A., Florin, A., Lefebvre, C., Solly, F., Leroux, D. and Callanan, M.B. (2007) Genetics and epigenetics of 1q rearrangements in hematological malignancies. *Cytogenet Genome Res*, **118**, 320-327.
- Gartler, S.M. and Riggs, A.D. (1983) Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*, **17**, 155-190.
- Giorda, R., Bonaglia, M.C., Milani, G., Baroncini, A., Spada, F., Beri, S., Menozzi, G., Rusconi, M. and Zuffardi, O. (2008) Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1). *Eur J Hum Genet*, **16**, 897-905.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. and Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin

- reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol*, **176**, 283-294.
- Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, **8**, 35-46.
- Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W. and Locksley, R.M. (2001) Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, **14**, 205-215.
- Itoyama, T., Nanjungud, G., Chen, W., Dyomin, V.G., Teruya-Feldstein, J., Jhanwar, S.C., Zelenetz, A.D. and Chaganti, R.S. (2002) Molecular cytogenetic analysis of genomic instability at the 1q12-22 chromosomal site in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **35**, 318-328.
- Jardin, F., Callanan, M., Penther, D., Ruminy, P., Troussard, X., Kerckaert, J.P., Figeac, M., Parmentier, F., Rainville, V., Vaida, I., Bertrand, P., Duval, A.B., Picquenot, J.M., Chaperot, L., Marolleau, J.P., Plumas, J., Tilly, H. and Bastard, C. (2009) Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*, **23**, 698-707.
- Kumaran, R.I. and Spector, D.L. (2008) A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *J Cell Biol*, **180**, 51-65.
- Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmenjaud, E., Sotto, J.J. and Callanan, M. (2001) Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, **32**, 250-264.
- Lefebvre, C., Fabre, B., Vettier, C., Rabin, L., Florin, A., Wang, J., Gressin, R., Jacob, M.C., Callanan, M. and Leroux, D. (2007) Composite splenic marginal zone lymphoma and mantle cell lymphoma arising from 2 independent B-cell clones. *Hum Pathol*, **38**, 660-667. Epub 2006 Nov 28.
- Lyon, M.F. (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*, **80**, 133-137.
- Masuhara, M., Nagao, K., Nishikawa, M., Kimura, T. and Nakano, T. (2003) Enhanced degradation of MDM2 by a nuclear envelope component, mouse germ cell-less. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 927-932.
- Matarazzo, M.R., Boyle, S., D'Esposito, M. and Bickmore, W.A. (2007) Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16546-16551.
- Montagne, M., Naud, J.F. and Lavigne, P. (2008) Elucidation of the structural determinants responsible for the specific formation of heterodimeric Mxd1/Max b-HLH-LZ and its binding to E-box sequences. *J Mol Biol*, **376**, 141-152.
- Popova, B.C., Tada, T., Takagi, N., Brockdorff, N. and Nesterova, T.B. (2006) Attenuated spread of X-inactivation in an X;autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7706-7711.
- Rabbitts, T.H. (2009) Commonality but diversity in cancer gene fusions. *Cell*, **137**, 391-395.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E. and Singh, H. (2008) Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, **452**, 243-247.
- Sawyer, J.R., Tricot, G., Lukacs, J.L., Binz, R.L., Tian, E., Barlogie, B. and Shaughnessy, J., Jr. (2005) Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 95-106.
- Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S. and Barlogie, B. (1998) Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: Evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood*, **91**, 1732-1741.

- Su, R.C., Brown, K.E., Saaber, S., Fisher, A.G., Merckenschlager, M. and Smale, S.T. (2004) Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat Genet*, **36**, 502-506.
- Takizawa, T., Meaburn, K.J. and Misteli, T. (2008) The meaning of gene positioning. *Cell*, **135**, 9-13.
- Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y. and 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**, 1296-1300.
- Vogel, M.J., Pagie, L., Talhout, W., Nieuwland, M., Kerkhoven, R.M. and van Steensel, B. (2009) High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model. *Epigenetics Chromatin*, **2**, 1.

Figure legends

Figure 1 Formation of aberrant heterochromatic foci in lymphoma B cells presenting a t(1;2) that targets 1q12 constitutive heterochromatin. (A) Dual colour FISH showing the t(1;2) translocation. Three 1q12 FISH signals (green) are visible, one of which is translocated to the short arm of the der(2) chromosome (white arrow). Red FISH signals correspond to chromosome 1 centromeres. (B) Immuno-detection of methylated DNA on mitotic chromosomes by an anti-MethylCytosine antibody. Note intense labelling at the juxtacentromeric 1q12 band on normal chromosome 1 and at the 1q12/2p breakpoint region on the der(2) chromosome (white arrow). (C) 3D immuno-FISH showing colocalisation between 1q12 satellite DNA (red) and foci enriched in H3K9me3 (green) (white arrows); DNA is counterstained with DAPI (blue). (D) 3D FISH with 1q12 (green) and chromosome 2 centromere-specific probes (red) detects formation of an aberrant constitutive heterochromatic structure ('aHCF', yellow arrow) in CH1 lymphoma B cells (left panel). The image was obtained by the maximum z-projection of red and green stacks after deconvolution. DAPI staining was outlined in the equatorial plane of the nucleus. Histogrammes (middle panel) showing nuclear distance distributions (in μm) between 1q12 and chromosome 2 centromere regions on the der(2) and normal 2 chromosomes, in lymphoma B cells presenting aberrant heterochromatic foci (CH1) compared to B593 lymphoma B cells (no heterochromatic foci, 2 normal copies of chromosome 2). Simplified model showing how aberrant heterochromatic foci might form in CH1 interphase nuclei (cartoon, right panel). (E) 3D-immuno-FISH. Left panel: a representative nucleus (confocal stack) compiled from single equatorial optical sections. The nuclear membrane is detected by an anti-lamin B antibody (red), 1q12 domains (pink) and chromosome 2 centromeres (green) are detected by specific probes. Right panel: analysis of radial nuclear distributions of 1q12 domains for both normal (green histograms)

and derivative chromosome 2 (blue histograms). aHCF: aberrant heterochromatic foci; scale bar: 2 μ m.

Figure 2 Genetic characterisation of the der(2)t(1;2)(q12;p13) in CH1 lymphoma B cells. (A) Agilent 244K CGH-array profile of the 2p breakpoint region. Genomic coordinates and BAC clones mapping to the region are indicated. The t(1;2) breakpoint (bk) is represented by the dashed line. 2p regions in 2 (2N) or 3 (3N) copies are indicated. (B) Confirmation of the breakpoint region by dual colour FISH and identification of a ‘mirror image’ 2p duplication on the der(2) chromosome. (C) Physical map of the der(2) breakpoint region showing the orientation of the duplicated 2p region and the genomic positions of 2p genes with respect to the 1q12 / 2p breakpoint (black arrow top panel ; bottom panel, set to 0.0 Mb). The 1q12 proximal 2p region is in the reverse order, compared to the germline region on the same chromosome, as indicated on the map (facing horizontal thick blue arrows) and on the cartoon of the aHCF. Regions analysed by ChIP in Figure 3 and Figure 4, are indicated underneath the map (horizontal red bars). The t(1;2) breakpoint (bk) is indicated by a black arrow. aHCF, aberrant heterochromatin foci.

Figure 3 Long range propagation of repressive heterochromatin ‘marks’ at 2p sequences in close physical or spatial proximity to aberrant 1q12 / chromosome 2 heterochromatic foci. (A) ChIP for histone modifications, as indicated, followed by Q-PCR analysis for enrichment levels, at the indicated 2p regions. Location of 2p sequences analysed by ChIP are indicated by a red bar on the gene maps shown above the respective ChIP panels. Primer pairs are numbered (Table SII). (B) HP1 Q-ChIP on fixed chromatin at selected sites from Figure 2A above. HP1 isoforms studied are indicated on the left of the Q-ChIP histograms. ChIP analysis show HP1 α and/or HP1 γ enrichment at most of the selected sequences analysed. Breakpoint; bk.

Figure 4 Deregulation of cancer-relevant 2p genes as a consequence of 1q12 constitutive heterochromatin rearrangement in lymphoma B cells. (A) 1q12 / 2p breakpoint region map as in Figure 2C; green and red genes are either underexpressed or overexpressed, respectively, in CH1 compared to B593 lymphoma B cells. Genes coloured in white are expressed in CH1 and B593 cells at similar levels (no change in expression). Genes coloured in grey are not expressed in either cell line; green and red stars indicate genes for which expression status was further confirmed by RT-Q-PCR. (B) Differential gene expression analysis by Affymetrix HG U133 Plus 2.0 microarray as assessed by GeneSpring software (Agilent), in a 5 Mb 2p region located close to the aberrant heterochromatin foci in CH1 lymphoma B cells. The 2p genes differentially expressed between CH1 and B593 cells are shown on the left panel (Affymetrix data). RT-Q-PCR validation of the expression patterns of a subset of these genes in CH1 compared to B593 (right panel) or activated normal B cells (Figure S2), are shown as indicated. In all cases, expression data was normalized to the U6 control gene. (C) Q-PCR analysis of ChIP enrichments calculated as IP/input for the indicated histone modifications, at the promoters of the indicated 2p genes. Red bars indicate the regions studied by Q-ChIP on the detailed 2p gene maps located above each ChIP panel. Primer pairs are indicated in Table SI.

Figure 5 Abnormal spatial positioning of genes with respect to aberrant heterochromatin foci as a consequence of 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements in B cell lymphoma. (A) Map of 1q12 / 2p breakpoint region on der(2) as indicated in Figure 2C and 4A; blue bars indicate BACs used for 3D FISH experiments. Colour codes for gene expression as in Figure 4A. (B) 3D FISH analysis (BAC RP11-401N16, top image; BAC RP11-7707, bottom image) and histograms showing the distribution of distances from the chromosome 2 centromere to BACs RP11-401N16 (top histogram) and RP11-7707 (bottom histogram) on the der(2),

compared to the normal chromosomes 2, in lymphoma B cell nuclei without (-) or with (+) 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements. Distances were measured in 54 (RP11-401N16) or 62 (RP11-7707) CH1 nuclei and 69 (RP11-7707) or 80 (RP11-401N16) B593 nuclei. To illustrate the relative distribution of FISH signals, images in which the localisation of centromere 2, 1q12 and BAC FISH signals on normal and derivative chromosomes 2 were selected were almost co-planar, were selected. The images were obtained by the maximum z-projection of the respective red, green and blue stacks, after deconvolution. DAPI staining was outlined in the equatorial plane of the nucleus. Histogrammes showing 3D distances between the chromosome 2 centromere and 2p BAC probes, located in either the germline or 1q12 / 2p breakpoint proximal positions (1q12 proximal) on the der(2) or normal 2 chromosomes, in lymphoma B cells without (-) or with (+) aberrant heterochromatin foci (B593 and CH1 lymphoma B Cells, respectively). Note the decreased distances between the chromosome 2 centromere and 2p BAC probe signals, at the 1q12/2p breakpoint proximal position in CH1 lymphoma B cells. For simplification, RP11-401N16 and RP11-7707 BACs are referred to as 401N16 and 7707, respectively, in Figure 5B. Aberrant heterochromatin foci (aHCF) are indicated by yellow arrows. Scale bar: 2µm. Cartoon, right panel ; simplified model of the putative 'loop' structure involved in abnormal spatial positioning of 2p genes with respect to aberrant heterochromatin foci.

Supplementary data

Table 1. Antibodies used for ChIP analyses (see text for details).

Table 2. Primer pairs used for ChIP analyses or RT-Q-PCR as indicated (see text for details).

Figure S1. Q-ChIP analysis of HP1 β enrichment across the indicated 2p, satellite II and control sequences. Details as in the legend of Figure 3A. Bk indicates breakpoint.

Figure S2. RT-Q-PCR validation of a subset of differentially expressed 2p genes in CH1 compared to activated normal B cells

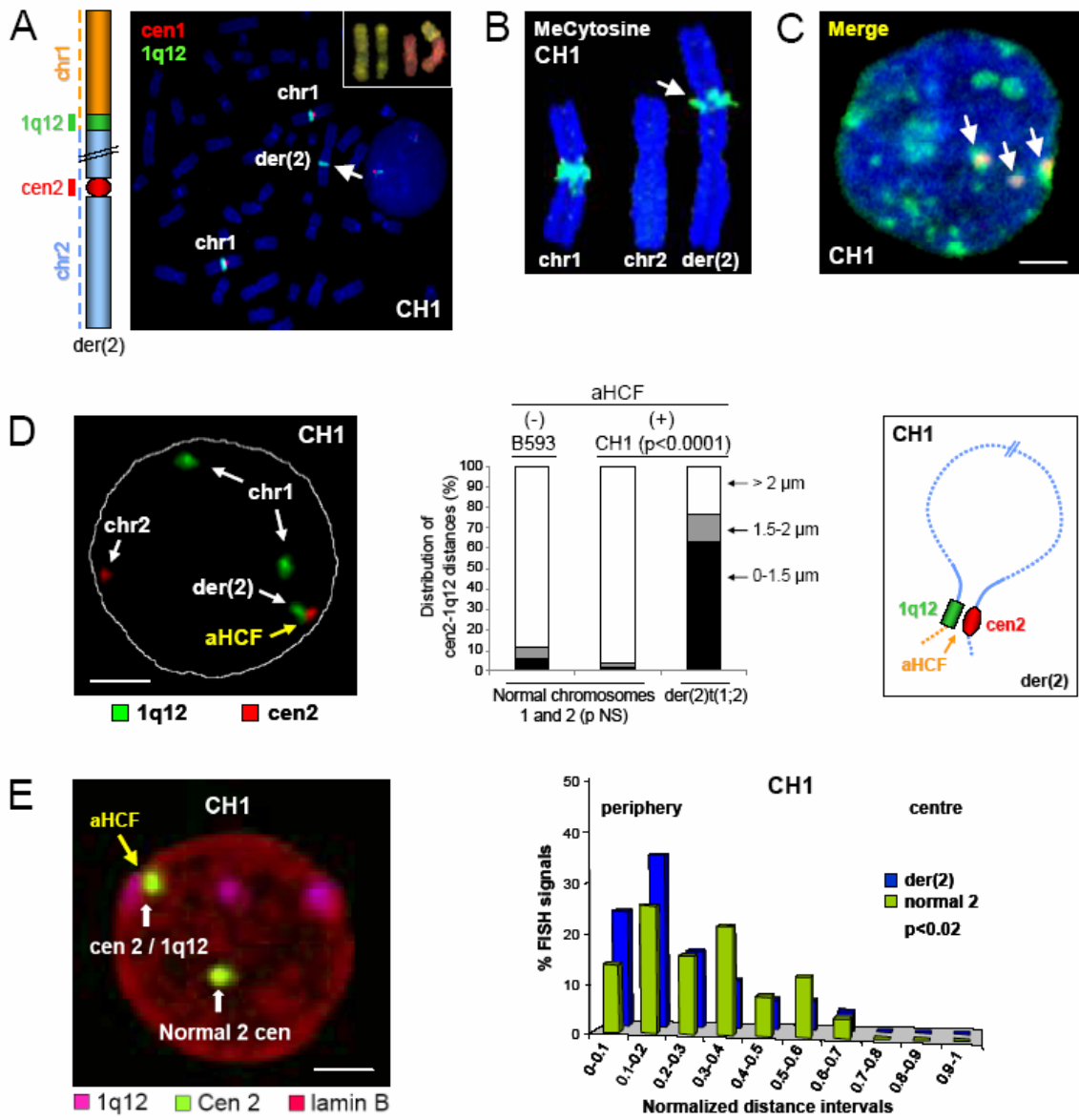


Figure 1

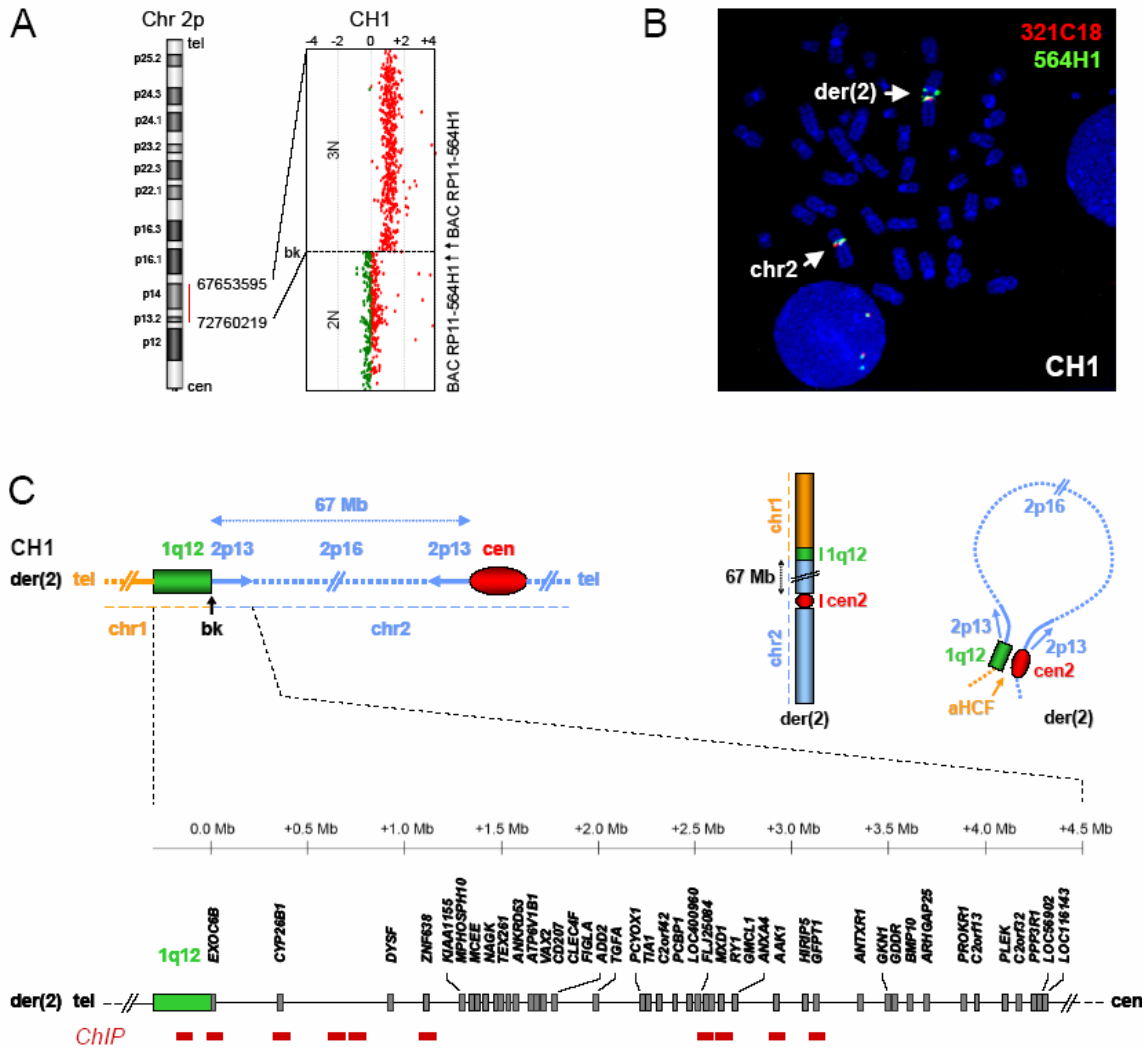


Figure 2

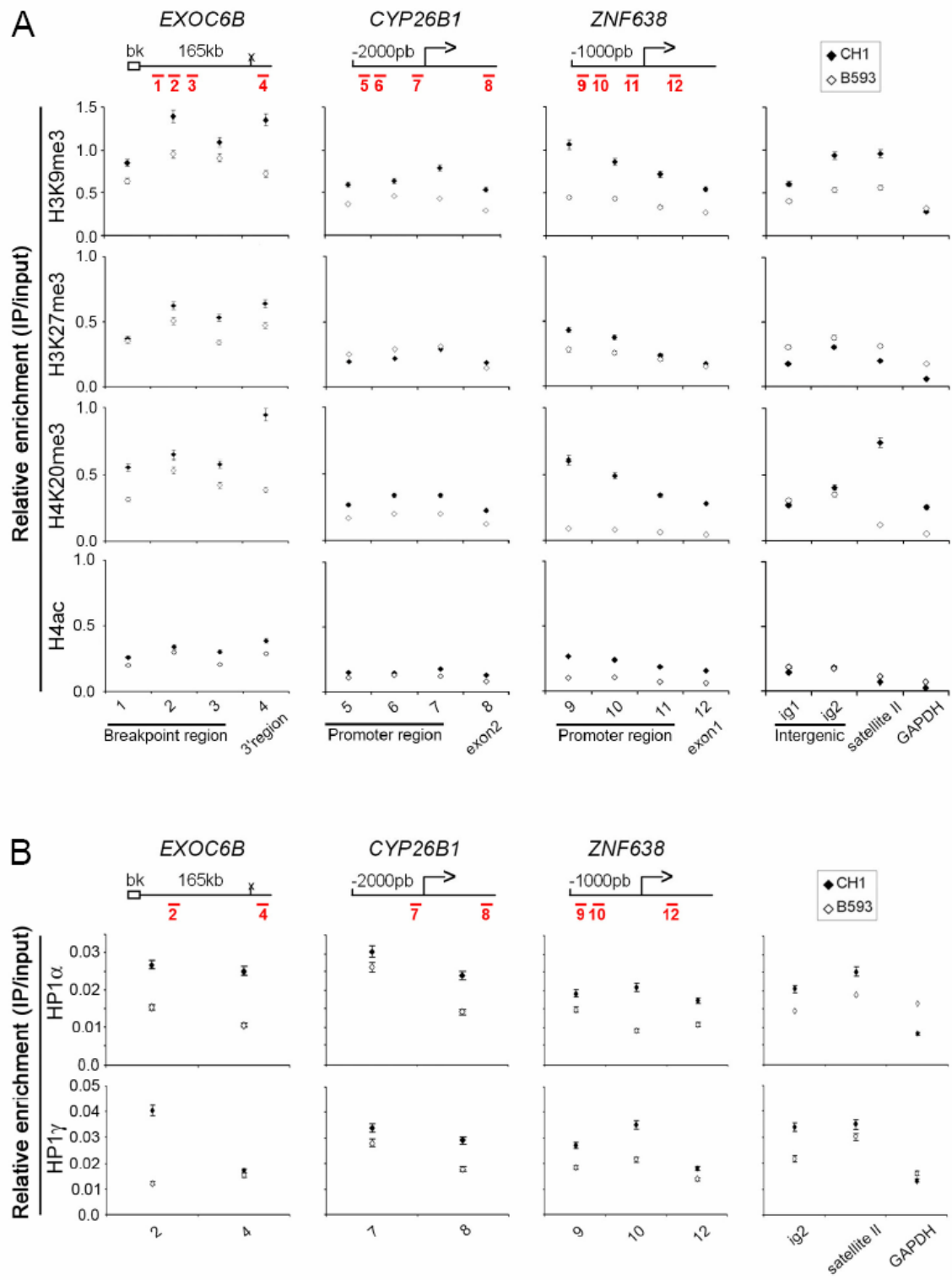


Figure 3

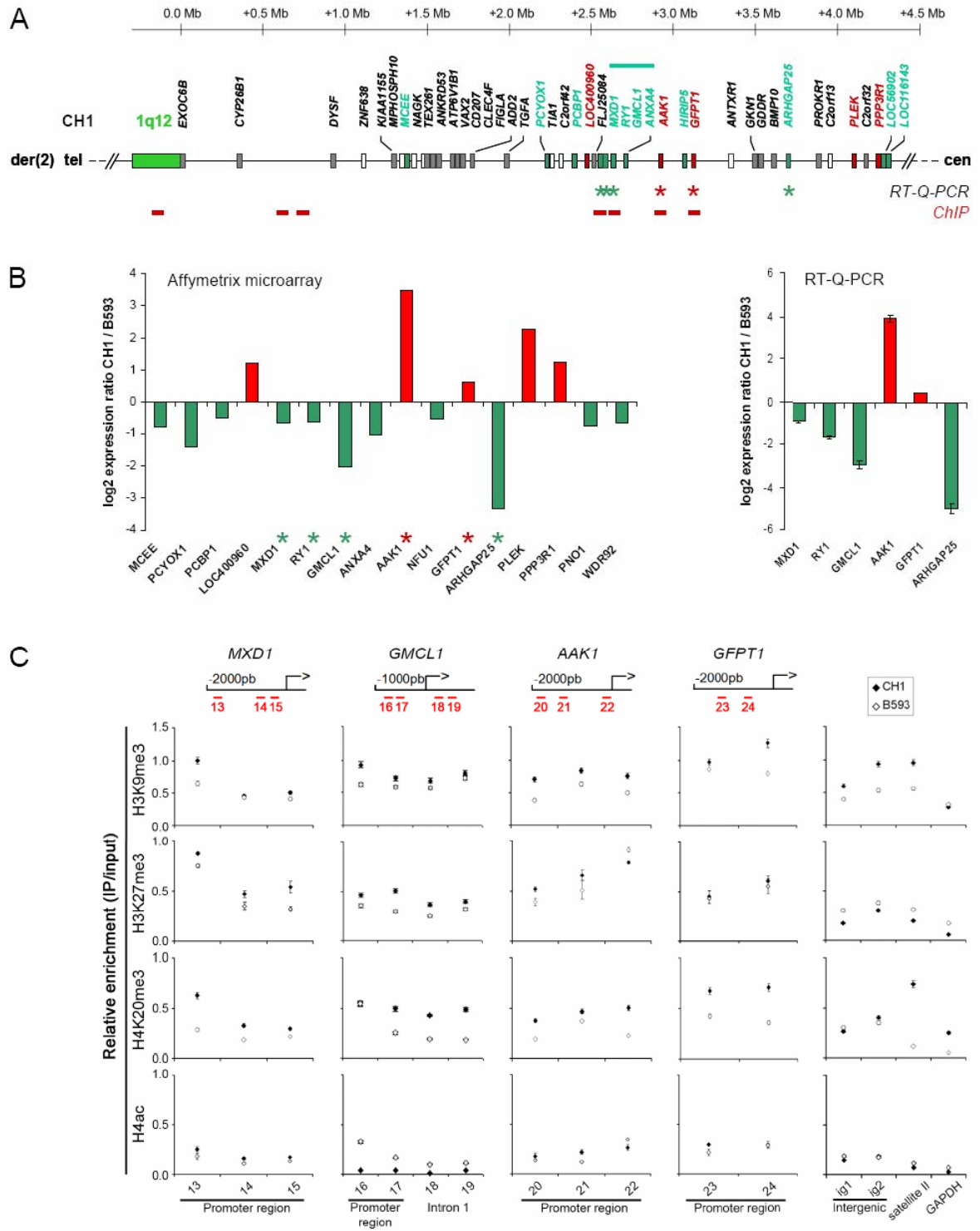


Figure 4

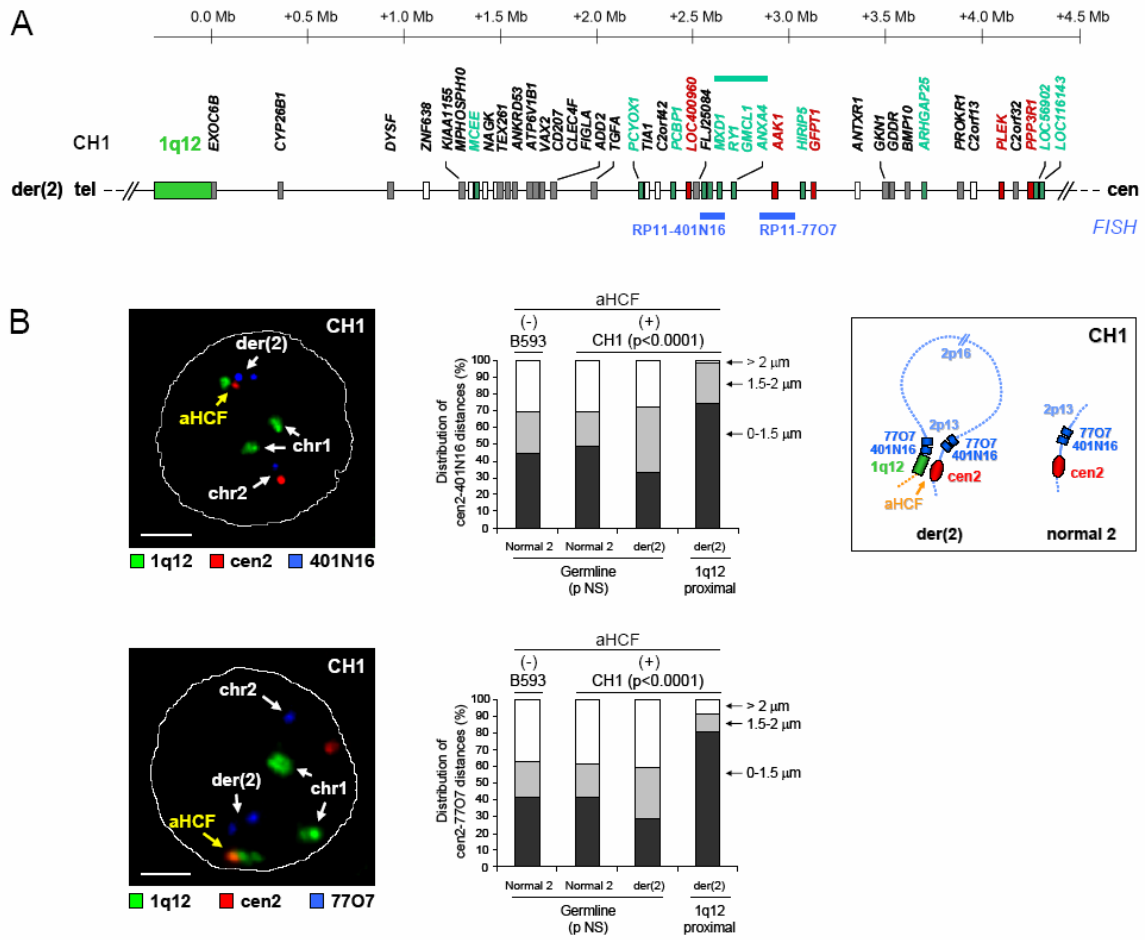


Figure 5

Antibody	Reference	Type
H3K9me3	Millipore (07-523)	Polyclonal
H3K27me3	Millipore (07-449)	Polyclonal
H4K20me3	Millipore (07-749)	Polyclonal
H4ac	Millipore (06-598)	Polyclonal
HP1 α	Euromedex (2HP-2G9-AS)	Monoclonal
HP1 β	Euromedex (1MOD-1A9-AS)	Monoclonal
HP1 γ	Euromedex (2MOD-1G6-AS)	Monoclonal

Table SI Antibodies used for ChIP analyses (see text for details).

Gene/Sequence ChIP	Forward primer	Reverse primer
<i>EXOC6B_1</i>	ATCTCCTTCTGGTGGACCT	TGTGGCTCGCTAAACATTG
<i>EXOC6B_2</i>	ATTTGGGTCCAAAGCATCAC	TACCAAAAACCCCAAGAACA
<i>EXOC6B_3</i>	GCCTGGCCTGTGTTTTCTAA	TAAGATCCCCTGACGCAGTT
<i>EXOC6B_4</i>	CAAAGGATGGGATGCAAAGG	TCCAGAGGAGGATTGGTTTG
<i>CYP26B1_5</i>	TCTTTTCTCCTTCCCAGGT	CCCTAAGGCACAGTTTCGAG
<i>CYP26B1_6</i>	CAGACGGACGAGATGAGACA	GAAGCCAAGCAGGCACTAAG
<i>CYP26B1_7</i>	GACTGGGGTGCACCTTTGTT	AACCCACCAGCTTGACTCAC
<i>CYP26B1_8</i>	GTTCAGACGCATTTGTTGG	GAATTGGACACCGTGTGG
<i>ZNF638_9</i>	ACGCTGTGCATCCCAAGGTT	CCCTATGGCAATGATGTGTG
<i>ZNF638_10</i>	TTGCCATAGGGATCAAAGG	AGTGAGGGAAGATTGCACCA
<i>ZNF638_11</i>	TGAAGGCACAAATGATCAGG	GGTCTGTGCCTGTCTCTC
<i>ZNF638_12</i>	AGCTCTTTGGAGGCGGTA	TATGCCTACCCGACTAACAGC
<i>MXD1_13</i>	TGGGGACTCAACCTACCAAG	TGGCAAACCAAGCTACACTG
<i>MXD1_14</i>	CATCATCGTAGCTGGGAGGT	TCGTGCTCCTTCTTGTTC
<i>MXD1_15</i>	CTCCCAATCGCACAAAGTGTA	TATCCCCGACTCACCATCTC
<i>GMCL1_16</i>	CTGGCACTTGAGAGGAAAGG	CCTGGGCTTCCTTAACATGA
<i>GMCL1_17</i>	ATCCAGCATATCGCCTCATC	TGGGCCCTGTGCTAAGCTAGT
<i>GMCL1_18</i>	TTGACAGGGTGAATGTGGAA	GTGAAAATGCGGAACACCT
<i>GMCL1_19</i>	CCCCAAGATGAGGATGAGAA	TACTCTGCGGCTACCCACTT
<i>AAk1_20</i>	AATAGGGAGCAGCAAAGCAA	CCTCTCCGAGGTGAAAATCTG
<i>AAk1_21</i>	AACGGATCGAGACTGACACC	CTTCTCGCTTCCATTTGAGC
<i>AAk1_22</i>	CCTGATACCGTCCAAGTGCT	TGCCACTCTTCAGCATCATC
<i>GFPT1_23</i>	TGACTGTAAAGCCCCAAAGG	ATTCTCTCTTACCCCTCCA
<i>GFPT1_24</i>	GGTCTTAGCCTGCTGACTGC	TGGCCCAGTTGAGGAACACT
<i>Ig1</i>	CTCTCCCTGCAGTGACCTTC	TCAGGGACAGCCTGAACTCT
<i>Ig2</i>	CTTAGGGGTGCTTGCTTCTG	GCTCCTCTGTCTGTCTG
Satellite II	TGAATGGAATCGTCATCGAA	CCATTCGATAATTCCGCTTG
<i>GAPDH</i>	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTT	CTTCAGGCCGTCCTAGC
RT-Q-PCR		
<i>EXOC6B</i>	TCCTGCGAGAGATCGAGAGC	GTCGTGATTACGGATACGAGTTT
<i>CYP26B1</i>	AGTTTGTGGACAATGTCTTCTCC	CCTTGCTGCTCTCAATGAGGA
<i>ZNF638</i>	ATGTGAGACCCAGGTTTAATCC	GTAGGTGCTCGTGGCCTTT
<i>MXD1</i>	CAGAAAAGCCGTTACCAAATC	CGTCAGAGTCGCTCACACTG
<i>RY1</i>	AATGGGATTTGCCTCCTTTGAC	TCATGTACTGCCTGTACTTCCTC
<i>GMCL1</i>	ACTGGAGATTCCTGACCAGAAC	CCAAAATGGCAACAACCTGACT
<i>AAk1</i>	TCAGAAGGGTCTACGTGGAAT	CCTTGGGTTGATTGAAAGCCTG
<i>GFPT1</i>	GGGGCACTGAAAATCAAAGA	TTATCCACCAAAGCCAGAGG
<i>ARHGAP25</i>	GAACGATGTCTCAAGACTTGCG	TCCCTTGGAGTCACAGGCTT
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

Table SII Primer pairs used for ChIP analyses or RT-Q-PCR as indicated (see text for details).

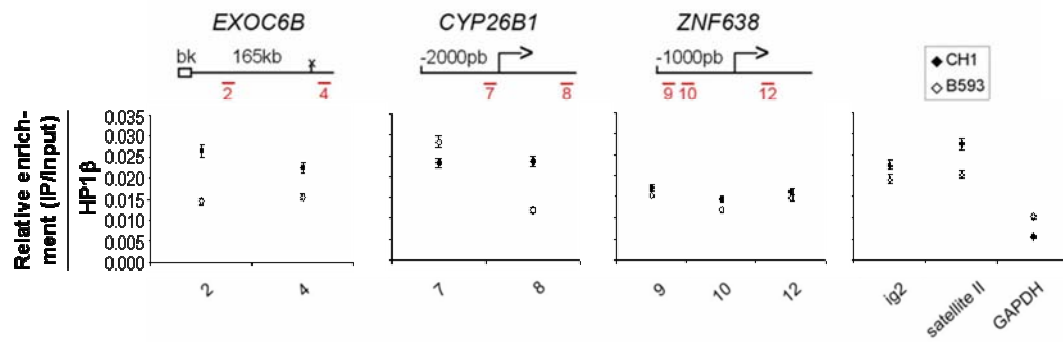


Figure S1 Q-ChIP analysis of HP1 β enrichment across the indicated 2p, satellite II and control sequences. Details as in the legend of Figure 3A. Bk indicates breakpoint.

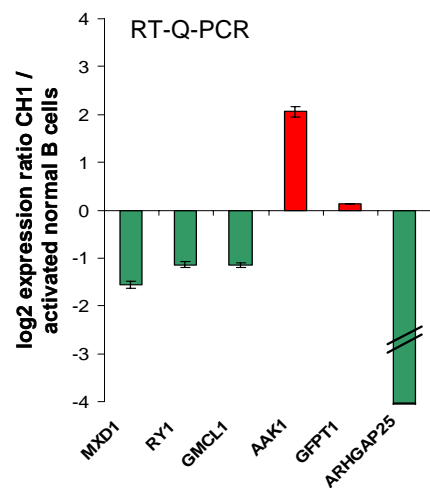


Figure S2 RT-Q-PCR validation of a subset of differentially expressed 2p genes in CH1 compared to activated normal B cells (see text for details).

I.3. Résultats complémentaires / en cours

Afin de déterminer si les phénomènes associés au réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12 observés dans notre lignée cellulaire modèle CH1 (formation de foyers hétérochromatiques aberrants, enrichissement du point de cassure en marques épigénétiques répressives, répression de gènes pertinents pour le cancer) peuvent constituer des processus généraux, et donc récurrents dans les cellules tumorales présentant un réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12, nous avons étendu notre étude à deux autres échantillons de lymphome porteurs d'une anomalie de l'hétérochromatine constitutive 1q12.

La formation de foyers aberrants d'hétérochromatine serait un processus général et récurrent associé aux réarrangement de l'hétérochromatine constitutive 1q12

Nous avons évalué la présence de foyers hétérochromatiques aberrants dans deux autres échantillons présentant un réarrangement de l'hétérochromatine 1q12 : une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt présentant une duplication d'une région 1q incluant la région 1q12 dup1(q12;q3?7), et des cellules primaires de patient atteint de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) présentant une translocation déséquilibrée t(1;2)(q12;q3?7).

De manière remarquable, les analyses FISH 3D en cours indiquent que la formation de foyers aberrants d'hétérochromatine est également observée dans ces deux nouveaux cas (Figure 1). Ces observations suggèrent fortement que la formation de ces foyers dans les cellules tumorales présentant une anomalie de l'hétérochromatine constitutive 1q12 serait une conséquence récurrente, quel que soit le chromosome cible / partenaire du réarrangement, et quel que soit le type de pathologie. Il serait important d'élargir cette étude à d'autres cas de lymphome.

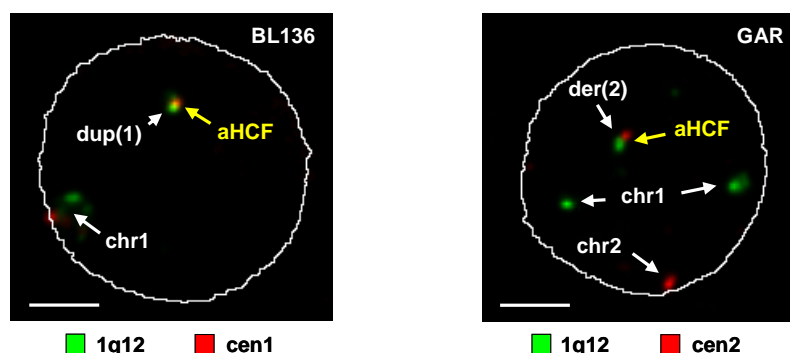


Figure 1 Formation of aberrant heterochromatic foci in lymphoma B cells presenting a 1q12 constitutive heterochromatin rearrangement. 3D FISH with 1q12 (green) and chromosome 1 (left panel) or chromosome 2 (right panel) centromere-specific probes (red) detects formation of an aberrant constitutive heterochromatic structure ('aHCF', yellow arrow) in BL136 lymphoma B cells (left panel) and GAR patient lymphoma B cells (right panel). The image was obtained by the maximum z-projection of red and green stacks after deconvolution. DAPI staining was outlined in the equatorial plane of the nucleus.

La répression transcriptionnelle des gènes 2p associée à la formation des foyers hétérochromatiques aberrants, et à un enrichissement de leurs régions promotrices en marques épigénétiques répressives, était susceptible d'être levée par des drogues bloquant les enzymes responsables de la mise en place d'une structure hétérochromatique répressive. Nous avons voulu tester cette possibilité en mesurant l'expression de nos gènes 2p d'intérêt dans les cellules CH1 avant et après traitement par des inhibiteurs des histone déacétylases (HDAC) et de la méthylation de l'ADN.

La répression transcriptionnelle hétérochromatine-dépendante des gènes en 2p est réversible

Les cellules CH1 ont été traitées par une drogue inhibitrice des histones déacétylases (HDAC), la trichostatine A (TSA) à 50ng/ml pendant 6h, combinée ou non à un agent hypométhylant de l'ADN, la 5-aza-2'-déoxycytidine, à 0,5µM pendant 6j. De manière tout à fait remarquable, le traitement des cellules par la TSA ou par TSA+5-aza-2'-deoxycytidine permet de lever la répression aberrante de certains gènes 2p, notamment *MXD1* et *GMCL1* pour lesquels l'effet est particulièrement frappant, mais également *GFPT1* et *RY1*, confirmant ainsi la nature épigénétique de cette dérégulation génique (Figure 2).

L'absence d'effet du traitement 5-aza seul sur l'expression de ces gènes 2p n'est pas surprenante puisque les analyses de méthylation de l'ADN par MSP (Methyl Specific PCR) ont montré que ces gènes n'étaient pas méthylés (figure en cours de préparation).

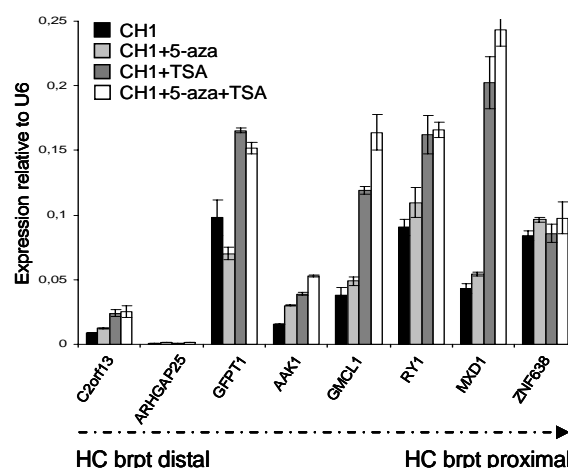


Figure 2 Increased expression of cancer-relevant 2p genes after TSA treatment in CH1 lymphoma B cells. RT-Q-PCR analysis of 2p genes expression in CH1 lymphoma B cells with or without TSA (50ng/ml, 6h) and/or 5-aza-2'-deoxycytidine (0.5µM, 6 days) treatment. Expression data are normalized to the U6 control gene.

La capacité de la TSA à réactiver l'expression de certains gènes 2p, réprimés de manière aberrante, nous a incité à caractériser les effets de ces traitements. Cette augmentation d'expression pourrait être due à une chromatine plus accessible, et donc moins enrichie en marques épigénétiques répressives, et/ou à un changement de l'organisation spatiale du chromosome der(2) – par exemple une dissociation des domaines d'hétérochromatine 1q12 et centromérique du 2, aboutissant à l'absence de formation des foyers hétérochromatiques aberrants – générant un environnement nucléaire plus permissif à la transcription des gènes 2p. Ces 2 possibilités sont en cours d'évaluation.

Le traitement à la TSA n'induit pas de diminution d'enrichissement en marques épigénétiques répressives des gènes 2p dont l'expression est augmentée après traitement

Nous avons regardé par CHIP si les traitements à la TSA induisaient une diminution du niveau d'enrichissement en marques répressives H3K9me3 et H4K20me3 des régions promotrices des gènes 2p d'intérêt, i.e. *MXD1* et *GMCL1*, dont l'expression est augmentée suite au traitement TSA. Or, dans les conditions de traitement à la TSA utilisées (50ng/ml pendant 6h), et avec lesquelles l'augmentation de l'expression des gènes *MXD1* et *GMCL1* était observée, nous n'avons pas pu mettre en évidence de diminution de ces marques au niveau de leurs régions promotrices (niveaux d'enrichissement en H3K9me3 et H4K20me3 équivalents avec ou sans traitement TSA, figure en cours de préparation).

Nous avons également entrepris d'étudier l'effet des traitements sur l'organisation spatiale de nos loci d'intérêt, par FISH 3D. Nous voulions notamment savoir si les traitements avaient un effet sur la formation des foyers aberrants d'hétérochromatine, et/ou sur la localisation de gènes 2p vis-vis de l'hétérochromatine. Pour cela, nous avons choisi des conditions de traitements plus longs, nécessaires pour affecter la structure fortement compactée de l'hétérochromatine (Taddei A, EMBO Report, 2005) (analyses en cours).

I.4. Discussion / conclusion

Nous avons démontré pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12, qui sont observés de manière fréquente et non-aléatoire dans les cancers humains, provoquent de profondes perturbations épigénétiques. Les conséquences majeures de ces anomalies sont des « appariements » intra-chromosomiques à longue distance entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 transloqué et le domaine d'hétérochromatine centromérique, formant ainsi des foyers hétérochromatiques aberrants qui se trouvent relocalisés vers la périphérie nucléaire. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la

dérégulation de l'expression de gènes, dont certains sont de nouvelles cibles pertinentes dans les lymphomes. De telles perturbations sont remarquables, et n'avaient pas encore été décrites dans le cadre de réarrangements chromosomiques dans les tumeurs humaines.

Les foyers aberrants d'hétérochromatine observés sont composés de deux régions d'hétérochromatine constitutive provenant du chromosome réarrangé : l'hétérochromatine 1q12 riche en satellites 2, et l'hétérochromatine centromérique riche en alpha-satellites. Ces foyers se formeraient par « looping » de la chromatine, et la formation de cette boucle serait vraisemblablement dictée par des interactions intra-chromosomiques spécifiques entre ces deux domaines d'hétérochromatine. En effet, une co-localisation « chanceuse » de ces domaines présente une très faible probabilité de se produire, comme suggéré par plusieurs études ((Bantignies and Cavalli, 2006); (Lanctot et al., 2007)), car, bien que situés sur le même chromosome, ces domaines sont distants de 67Mb, et ne sont donc pas supposés se trouver aussi proches l'un de l'autre dans l'espace nucléaire. Or la proportion non négligeable de noyaux dans lesquels ces foyers sont observés nous permet de considérer ces co-localisations comme significatives, et non accidentelles.

Point important, nous avons observé des structures hétérochromatiques anormales similaires dans d'autres cas de lymphome présentant des réarrangements 1q12 ((Barki-Celli et al., 2005), et résultats complémentaires / en cours), suggérant ainsi fortement que les « appariements » chromosomiques de régions hétérochromatiques et la formation de foyers hétérochromatiques aberrants pourraient être des caractéristiques récurrentes des cellules tumorales présentant des réarrangements 1q12.

Le réarrangement 1q12 décrit ici, et ses foyers hétérochromatiques aberrants associés, sont liés à une down-régulation coordonnée de l'expression de certains gènes, parmi lesquels *MXD1* et *GMCL1* qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la signalisation MYC (Montagne et al., 2008) et P53 (Masuhara et al., 2003), respectivement. Cette découverte importante suggère que les réarrangements de l'ADN satellite 1q12 et les foyers hétérochromatiques aberrants associés ont le potentiel d'interférer avec les voies de signalisation « suppresseur de tumeur ».

Fait très intéressant, des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) seraient capables de lever la répression aberrante de gènes 2p – dont *MXD1* et *GMCL1* – anormalement localisés à proximité de l'hétérochromatine 1q12. Cependant, les mécanismes par lesquels ces inhibiteurs permettent une dé-répression de ces gènes restent à éclaircir. Les analyses en cours, pour déterminer si des traitements par la TSA et/ou la 5-aza-2'-deoxycytidine pouvaient empêcher la formation ou le maintien des foyers hétérochromatiques aberrants, permettront sans doute d'apporter quelques éléments de réponse concernant les mécanismes mis en jeu. Quoi qu'il en soit, différents niveaux de régulation sont probablement impliqués.

En résumé, nous proposons que les anomalies 1q12 correspondent à une nouvelle classe de réarrangement chromosomique ayant le potentiel, via des mécanismes à longue distance nouveaux dépendants de l'hétérochromatine, de perturber profondément l'organisation et la fonction des gènes. Ce modèle serait pertinent non seulement pour les lymphomes B mais également pour d'autres tumeurs hématologiques ou solides. En effet, ces anomalies sont observées de manière fréquente et non-aléatoire dans un large spectre de tumeurs humaines, et sont liées à la progression tumorale et à un mauvais pronostic (Fournier et al., 2007). Des études plus approfondies visant à comprendre les origines mécanistiques de ces foyers hétérochromatiques aberrants ainsi que leur impact sur l'expression des gènes seront requises pour élucider leur rôle dans l'initiation et la progression tumorale.

Partie II : Profiling transcriptionnel dans une série de patients atteints de lymphome B avec réarrangement 1q12

II.1. Introduction

La mise en évidence de foyers aberrants d'hétérochromatine dans les trois échantillons de lymphomes B avec anomalie de l'hétérochromatine constitutive 1q12 étudiés suggère un mécanisme récurrent survenant dans les lymphomes présentant un réarrangement 1q12. Si des perturbations locales de l'expression des gènes ont été observées dans cette étude, ces foyers / la présence d'un domaine d'hétérochromatine constitutive 1q12 surnuméraire, seraient susceptibles de perturber de manière plus globale l'organisation et l'expression du génome dans les cellules de lymphome. Ceci, associé à l'incidence élevée des réarrangements affectant l'hétérochromatine 1q12 dans les lymphomes B et en particulier dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), nous a conduits à réaliser une étude pilote du profil d'expression génique de 20 cas de lymphomes B porteurs ou non d'anomalies de l'hétérochromatine constitutive 1q12 (issue de la tumorotheque lymphome de Grenoble – Pr D Leroux) par puces Affymetrix U133 plus 2.0 (J de Vos - Montpellier). L'objectif était de mettre en évidence des gènes nouveaux dérégulés dans ces pathologies, et d'évaluer l'intérêt des profils transcriptionnels associés à ces réarrangements, par exemple comme marqueurs pronostiques ou diagnostiques dans les lymphomes.

II.2. Résultats (analyses en cours) / discussion

Une analyse supervisée préliminaire (dans 10 patients) de la répartition de l'expression des gènes a été réalisée, après normalisation des données (MAS5 - ArrayAssist) et comparaison des valeurs normalisées par le test de Mann-Whitney.

Afin de sélectionner les gènes les plus différentiellement exprimés entre les deux groupes (DLBCL avec réarrangement 1q12 versus DLBCL sans réarrangement 1q), nous avons effectué une première analyse avec les paramètres suivants : Fold Change (FC) ≥ 3 ; probabilité $p < 0,02$ (test de Mann-Whitney). Nous avons ainsi identifié 103 sondes, correspondant à 96 gènes différentiellement exprimés entre les 6 DLBCL avec réarrangement 1q12 et les 4 DLBCL sans anomalie 1q, présentées sur le dendrogramme (Figure 3).

De manière surprenante, ces données indiquent une prédominance des gènes surexprimés dans les DLBCL avec réarrangement 1q12 (73/96). Parmi les gènes surexprimés, nous observons des gènes tissu-spécifiques (*ELL3*, *MITF*, *MEF2C*) - non décrits à ce jour comme étant impliqués dans la lymphomagenèse - et d'autres pour lesquels un rôle oncogénique est déjà évoqué (*LMO2*, *CLLU1*). Ces données suggèrent que les réarrangements 1q12 dans les

DLBCL pourraient être associés à la dé-répression de gènes particuliers, qui peuvent présenter un pouvoir oncogène potentiel. Ces gènes sont dispersés à travers le génome et leur dérégulation transcriptionnelle ne semble pas liée à des altérations génétiques (d'après les données caryotypiques, FISH, array-CGH). Nous confirmons actuellement ces données d'expression par RT-Q-PCR et / ou immunohistochimie.

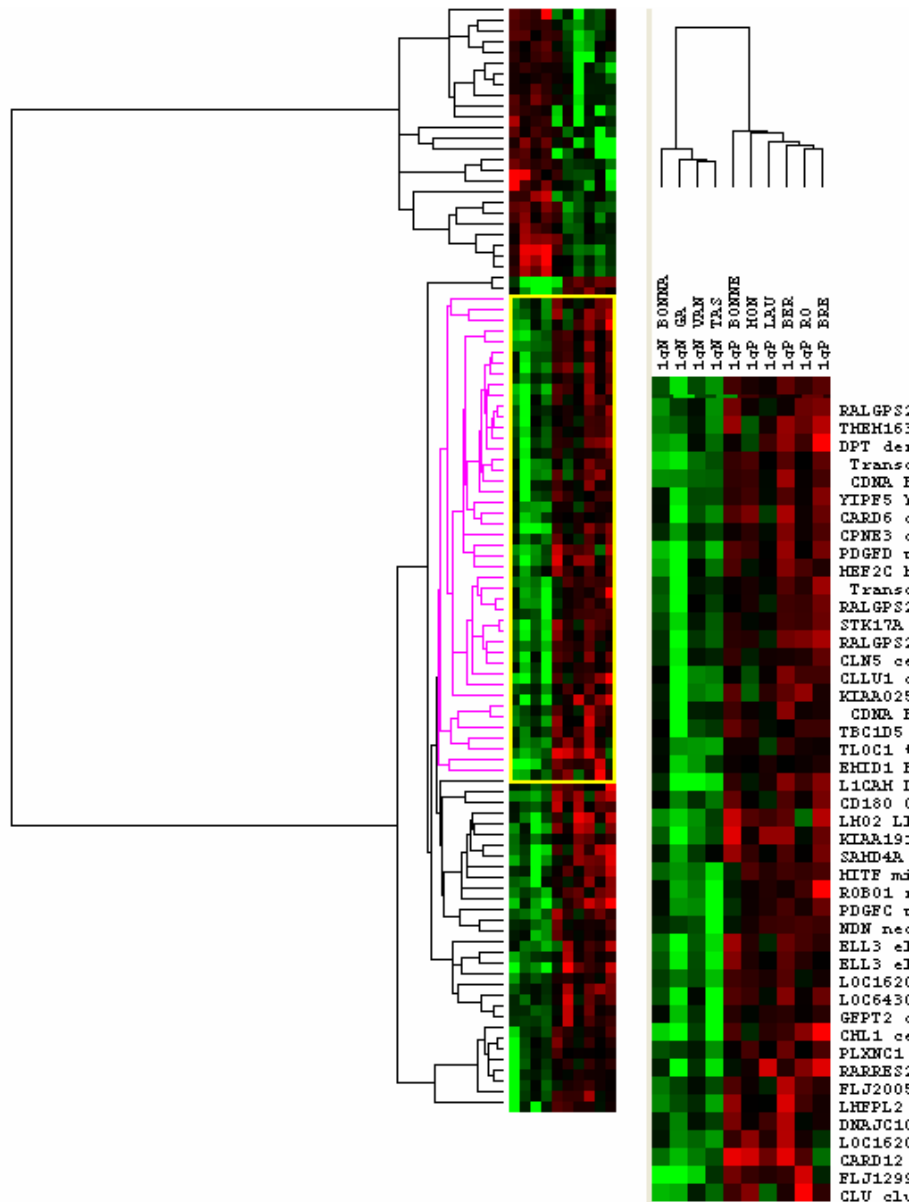


Figure 3 : Dendrogramme issu de l'analyse supervisée de 10 cas de DLBCL avec réarrangement de l'hétérochromatine 1q12 (1qP) ou en l'absence de réarrangement 1q (1qN). Chaque ligne représente un gène (sonde), chaque colonne représente un échantillon. Le cadre jaune indique la localisation de l'agrandissement d'une fenêtre. L'expression d'un gène peut être augmentée (rouge), diminuée (vert) ou non changée (noir).

L'analyse supervisée des données transcriptionnelles de 10 échantillons de patients a permis l'identification de 96 gènes différentiellement exprimés entre les DLBCL avec réarrangement 1q12 et les DLBCL sans anomalie 1q (FC=3, p<0.02). Ces premières données suggèrent

l'existence d'un profil transcriptionnel associé aux réarrangements de l'hétérochromatine 1q12.

Etant donné les fonctions répressives de l'hétérochromatine sur l'expression génique, on pouvait s'attendre à ce que la présence d'un réarrangement 1q12 déséquilibré, et donc d'un domaine d'hétérochromatine supplémentaire, génère une proportion plus importante de gènes sous-exprimés que de gènes surexprimés, chez les patients avec anomalie 1q12. Cependant, 73 des 96 gènes différentiellement exprimés sont surexprimés dans les cas avec anomalie 1q12. Cette proportion inattendue de gènes surexprimés dans les cas avec anomalie 1q12 pourrait résulter d'une dérégulation de la transcription dépendante de la présence d'un domaine d'hétérochromatine supplémentaire. En effet, certains régulateurs transcriptionnels sont regroupés dans des compartiments nucléaires répresseurs, en association avec des blocs d'hétérochromatine, et répriment les gènes en les recrutant au sein de ces compartiments. Ces phénomènes sont parfaitement décrits chez la souris (Brown et al. 1997). La présence d'un domaine d'hétérochromatine surnuméraire (associée ou non à la formation des foyers hétérochromatiques aberrants précédemment décrits) pourrait donc provoquer une séquestration locale aberrante de régulateurs transcriptionnels, qui aboutirait à une dérépression / activation illégitime de l'expression de gènes cibles ailleurs dans le génome.

Par ailleurs, la présence de facteurs de transcription et/ou de protéines à potentiel oncogénique connu ou supposé (LMO2, ELL3, MITF, CLLU1) parmi les gènes surexprimés dans les DLBCL avec réarrangement 1q12, pourrait représenter un mécanisme oncogénique de lymphomagenèse et/ou de progression tumorale dans ces DLBCL avec anomalie 1q12.

Dans notre étude, 5 des 6 cas de DLBCL avec réarrangement 1q12 surexpriment LMO2 (LIM domain only 2). Le facteur de transcription LMO2 joue un rôle physiologique important dans l'érythropoïèse et l'angiogenèse. Il facilite les interactions protéine-protéine et la formation de complexes multimériques nécessaires à la spécification de lignée et à la différenciation. Outre son expression dans les cellules T immatures, LMO2 est également physiologiquement exprimé dans les cellules B normales du centre germinatif (GCB) et dans 47% des DLBCL de phénotype GCB (Dik et al. 2007; Natkunam et al. 2007). L'expression de ce marqueur a d'ailleurs été détectée sur les profils transcriptionnels des DLBCL du groupe GCB (Alizadeh et al. 2000 ; Rosenwald et al. 2002). Par ailleurs, la t(11;14)(p13;q11)TCR/LMO2, décrite dans 8% des LAL-T, aboutit à la dérégulation de l'expression de LMO2 (Dik et al. 2007) et induit la transformation cellulaire en coopération avec d'autres facteurs de transcription (HOX11, LMO1...).

ELL3 (membre de la famille ELL, Elongation factor RNA polymerase II-like) code pour un facteur de transcription qui permet l'élongation de la transcription par la RNA polymérase II (Shilatifard et al. 1996), et est exprimé spécifiquement dans le testicule. Ce gène est impliqué

dans une translocation récurrente t(11;15)(q23;q15), décrite dans certaines LAM, et forme un gène de fusion avec *MLL/11q23*. Les protéines ELL peuvent s'associer avec P53 et inhiber l'apoptose P53-dépendante (Shinobu et al. 1999). Outre son rôle oncogénique putatif dans la t(11;15) *MLL/ELL*, l'expression constitutive de ELL dans des fibroblastes RAT1 induit une augmentation de la croissance cellulaire et une indépendance aux facteurs de croissance (Kanda et al. 1998). L'expression augmentée de ce gène testicule-spécifique dans les DLBCL pourraient être la signature d'une dé-répression aberrante (/activation illégitime), induite par le réarrangement 1q12.

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) est un facteur de transcription essentiel au développement des mélanocytes chez la souris ; il promeut la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire. Paradoxalement, MITF permet également la survie et la prolifération dans les mélanomes. Ces propriétés sont assurées via l'interaction de MITF avec le complexe de remodelage SWI/SNF (Keenen et al., *Oncogene*, 2009). Par ailleurs, MITF est également fondamental pour le maintien des cellules B matures à l'état quiescent et inhibe la différenciation plasmocytaire (Lin et al. 2004). L'activité de MITF dépend de la répression de l'expression du facteur régulateur des interférons IRF4/MUM1, lui même associé à la différenciation plasmocytaire (Shapiro-Shelef 2005). Fait très intéressant, MITF fait partie d'un groupe de gènes composant une signature immune transcriptionnelle et définissant un sous-groupe de lymphomes folliculaires de mauvais pronostic (Dave et al., *NEJM*, 2004).

CLLU1 (chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1) code pour un gène dont les fonctions sont actuellement inconnues. Néanmoins, une récente étude a montré l'expression fortement augmentée dans le sous-groupe des LLC non mutées, de pronostic défavorable (Buhl et al. 2006). Bien que l'expression de ce gène semble restreinte aux seules LLC (absente dans les autres hémopathies, dont les DLBCL) et que le rôle oncogénique de cette protéine ne soit pas établi, ce gène pourrait également représenter l'un des gènes spécifiquement dé-réprimés en conséquence du réarrangement 1q12.

Il faut également signaler l'expression plus élevée de certains facteurs de croissance (PDGFD, FGF7) dans les DLBCL avec anomalie 1q12, dont le rôle dans les cellules tumorales de DLBCL est inconnu.

II.3. Conclusion / perspectives

Les résultats obtenus permettent d'avancer sur une hypothèse nouvelle selon laquelle la présence d'un excès d'hétérochromatine dans une cellule cancéreuse pourrait, par un phénomène de séquestration de régulateurs transcriptionnels et de protéines associées à la chromatine, provoquer la dé-répression / l'activation illégitime d'une partie du génome.

Les perspectives de cette étude pilote sont nombreuses. Dans un premier temps, une validation des résultats par RT-Q-PCR et / ou immunohistochimie (si anticorps disponibles) est nécessaire. Il sera également important d'étendre l'étude à un panel élargi de patients (des cas supplémentaires de DLBCL sont actuellement en cours d'analyse). A plus long terme, l'étude du rôle oncogénique de gènes candidats (notamment *MITF*, particulièrement intéressant), et l'identification des mécanismes moléculaires (génétique, épigénétique) à l'origine de ces dérégulations, pourraient apporter des pistes importantes pour l'élucidation du rôle pathologique des réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans les lymphomes. D'autre part, les gènes surexprimés dans les DLBCL avec anomalie 1q12 pourraient appartenir à un groupe fonctionnel donné et/ou à une voie de signalisation préférentielle, ciblant une/des fonction(s) cellulaire(s) précise(s) et corrélés à ce point de cassure 1q12 ; des analyses de « pathways » (GeneSpring) sont en cours pour répondre à cette question.

D'autre part, la perte de la tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3) ayant été décrite comme une marque générale des cancers (Fraga et al, 2005), nous avons entrepris un profiling épigénétique par IHC (Immuno-histochimie) sur les échantillons de patients étudiés ci-dessus. Les premiers résultats suggèrent que cette marque n'est pas perdue dans tous les échantillons de patients DLBCL. Afin de savoir si la présence/absence de cette marque est associée à un profil transcriptionnel particulier, nous sommes en train de ré-analyser nos données d'expression Affymetrix sur la base cette fois de la présence/absence du marquage H4K20me3.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les hémopathies malignes représentent plus de 10% des cancers mais leur incidence, en particulier celle des lymphomes non-hodgkiniens, augmente à un taux alarmant, proche de 4% par an. Au vu de la fréquence élevée des anomalies chromosomiques touchant l'hétérochromatine constitutive 1q12 dans les hémopathies malignes (20% dans les myélomes, 15% dans les lymphomes), l'élucidation du rôle pathologique de ces anomalies – inconnu à ce jour – représente un potentiel considérable pour la caractérisation de nouveaux mécanismes oncogéniques et le développement de nouveaux marqueurs de diagnostic / pronostic et de cibles thérapeutiques dans les lymphomes.

Les données obtenues au cours de mon travail de thèse indiquent pour la première fois que les réarrangements de l'hétérochromatine constitutive 1q12 induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphome B. Les conséquences majeures de ces anomalies sont des « appariements » intra-chromosomiques à longue distance entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 transloqué et le domaine d'hétérochromatine centromérique, qui forment des foyers hétérochromatiques aberrants qui se trouvent relocalisés vers la périphérie nucléaire. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la dérégulation de l'expression de gènes, dont certains sont de nouvelles cibles pertinentes dans les lymphomes. En effet, le réarrangement 1q12 décrit ici, et ses foyers hétérochromatiques aberrants associés, sont liés à une down-régulation coordonnée de l'expression de certains gènes, parmi lesquels *MXD1* (MAX dimerization protein 1) et *GMCL1* (germ cell-less homolog 1) qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la signalisation MYC et P53, respectivement. De telles perturbations sont remarquables, et n'avaient pas encore été décrites dans le cadre de réarrangements chromosomiques dans les tumeurs humaines. D'autre part, une étude pilote de profiling transcriptionnel par puces Affymetrix dans des cas de lymphome avec ou sans anomalie de l'hétérochromatine 1q12 confirment et identifient de nouvelles cibles de dérégulation liées à l'hétérochromatine dans les lymphomes B non-Hodgkiniens.

En résumé, nous proposons que les anomalies de l'hétérochromatine constitutive 1q12 correspondent à une nouvelle classe de réarrangement chromosomique ayant le potentiel, via des mécanismes à longue distance dépendants de l'hétérochromatine, de perturber profondément l'organisation et la fonction des gènes. Ce modèle serait pertinent non seulement pour les lymphomes B mais également pour d'autres tumeurs hématologiques ou solides, puisque ces anomalies sont observées de manière fréquente et non-aléatoire dans un large spectre de tumeurs humaines, et sont liées à la progression tumorale et à un mauvais pronostic. Des études plus approfondies visant à comprendre les origines mécanistiques de ces foyers hétérochromatiques aberrants seront requises pour élucider leur rôle dans l'initiation et la progression tumorale.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J*, **18**, 1923-1938.
- Aagaard, L., Schmid, M., Warburton, P. and Jenuwein, T. (2000) Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres [In Process Citation]. *J Cell Sci*, **113**, 817-829.
- Agresti, A., Meneveri, R., Siccardi, A.G., Marozzi, A., Corneo, G., Gaudi, S. and Ginelli, E. (1989) Linkage in human heterochromatin between highly divergent Sau3A repeats and a new family of repeated DNA sequences (HaeIII family). *J Mol Biol*, **205**, 625-631.
- Alcobia, I., Dilao, R. and Parreira, L. (2000) Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood*, **95**, 1608-1615.
- Alcobia, I., Quina, A.S., Neves, H., Clode, N. and Parreira, L. (2003) The spatial organization of centromeric heterochromatin during normal human lymphopoiesis: evidence for ontogenically determined spatial patterns. *Exp Cell Res*, **290**, 358-369.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3983-3988.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. and Staudt, L.M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503-511.
- Allshire, R.C. and Karpen, G.H. (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet*, **9**, 923-937.
- Almeida, R. and Allshire, R.C. (2005) RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol*, **15**, 251-258.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U. and Zoghbi, H.Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, **23**, 185-188.
- Amor, D.J., Kalitsis, P., Sumer, H. and Choo, K.H. (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol*, **14**, 359-368.
- Ando, S., Yang, H., Nozaki, N., Okazaki, T. and Yoda, K. (2002) CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 2229-2241.
- Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C. and Sternglanz, R. (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing [published erratum appears in *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525]. *Nature*, **394**, 592-595.
- Araki, Y., Wang, Z., Zang, C., Wood, W.H., 3rd, Schones, D., Cui, K., Roh, T.Y., Lhotsky, B., Wersto, R.P., Peng, W., Becker, K.G., Zhao, K. and Weng, N.P. (2009) Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. *Immunity*, **30**, 912-925.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Arents, G. and Moudrianakis, E.N. (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11170-11174.
- Atkin, N.B. (1977) Chromosome 1 heteromorphism in patients with malignant disease: a constitutional marker for a high-risk group? *Br Med J*, **1**, 358.
- Atkin, N.B. (1986) Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, **21**, 279-285.
- Atkin, N.B. and Baker, M.C. (1977) Pericentric inversion of chromosome 1: frequency and possible association with cancer. *Cytogenet Cell Genet*, **19**, 180-184.
- Attwood, J.T., Yung, R.L. and Richardson, B.C. (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 241-257.
- Avet-Loiseau, H., Andree-Ashley, L.E., Moore, D., 2nd, Mellerin, M.P., Feusner, J., Bataille, R. and Pallavicini, M.G. (1997) Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, **19**, 124-133.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.L. and Bataille, R. (2001) Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, **98**, 3082-3086.
- Avner, P. and Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**, 59-67.
- Bachman, K.E., Rountree, M.R. and Baylin, S.B. (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem*, **276**, 32282-32287.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B. and Kellum, R. (2005) Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*, **113**, 370-384.

- Bajalica-Lagercrantz, S., Piehl, F., Lagercrantz, J., Lindahl, J., Weber, G., Kerckear, J.P., Porwit-MacDonald, A. and Nordenskjold, M. (1997) Expression of LAZ3/BCL6 in follicular center (FC) B cells of reactive lymph nodes and FC-derived non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia*, **11**, 594-598.
- Bannister, A.J., Schneider, R., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C. and Kouzarides, T. (2005) Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem*, **280**, 17732-17736.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bantignies, F. and Cavalli, G. (2006) Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 275-283.
- Bantignies, F., Grimaud, C., Lavrov, S., Gabut, M. and Cavalli, G. (2003) Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in Drosophila. *Genes Dev*, **17**, 2406-2420.
- Barki-Celli, L., Lefebvre, C., Le Baccon, P., Nadeau, G., Bonnefoix, T., Usson, Y., Vourc'h, C., Khochbin, S., Leroux, D. and Callanan, M. (2005) Differences in nuclear positioning of 1q12 pericentric heterochromatin in normal and tumor B lymphocytes with 1q rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 339-349.
- Barlesi, F., Giaccone, G., Gallegos-Ruiz, M.I., Loundou, A., Span, S.W., Lefesvre, P., Kruyt, F.A. and Rodriguez, J.A. (2007) Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **25**, 4358-4364.
- Barr, M.L. and Bertram, E.G. (1949) A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, **163**, 676.
- Barry, A.E., Howman, E.V., Cancilla, M.R., Saffery, R. and Choo, K.H. (1999) Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum Mol Genet*, **8**, 217-227.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.
- Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C. and Alt, F.W. (2003) Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*, **114**, 359-370.
- Bastard, C., Deweindt, C., Kerckaert, J.P., Lenormand, B., Rossi, A., Pezzella, F., Fruchart, C., Duval, C., Monconduit, M. and Tilly, H. (1994) LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood*, **83**, 2423-2427.
- Baumann, M., Mamais, A., McBlane, F., Xiao, H. and Boyes, J. (2003) Regulation of V(D)J recombination by nucleosome positioning at recombination signal sequences. *Embo J*, **22**, 5197-5207.
- Becker, P.B. and Horz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, **71**, 247-273.
- Belyaeva, E.S., Koryakov, D.E., Pokholkova, G.V., Demakova, O.V. and Zhimulev, I.F. (1997) Cytological study of the brown dominant position effect. *Chromosoma*, **106**, 124-132.
- Bentz, M., Werner, C.A., Dohner, H., Joos, S., Barth, T.F., Siebert, R., Schroder, M., Stilgenbauer, S., Fischer, K., Moller, P. and Lichter, P. (1996) High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood*, **88**, 1437-1444.
- Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 142-148.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. and Allshire, R.C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
- Bernstein, E. and Allis, C.D. (2005) RNA meets chromatin. *Genes Dev*, **19**, 1635-1655.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J. and Singh, H. (2005) Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol*, **6**, 836-843.
- Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**, 2395-2402.
- Bhaumik, S.R., Smith, E. and Shilatifard, A. (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1008-1016.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell*, **31**, 153-165.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.
- Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
- Blackburn, E.H. and Gall, J.G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*, **120**, 33-53.
- Blennow, E., Telenius, H., de Vos, D., Larsson, C., Henriksson, P., Johansson, O., Carter, N.P. and Nordenskjold, M. (1994) Tetrasomy 15q: two marker chromosomes with no detectable alpha- satellite DNA. *Am J Hum Genet*, **54**, 877-883.
- Blumenschein, G.R., Jr., Kies, M.S., Papadimitrakopoulou, V.A., Lu, C., Kumar, A.J., Ricker, J.L., Chiao, J.H., Chen, C. and Frankel, S.R. (2008) Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs*, **26**, 81-87.
- Bogdanovic, O. and Veenstra, G.J. (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, **118**, 549-565.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J. and Corcoran, A.E. (2004) Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat Immunol*, **5**, 630-637.

- Bonfils, C., Beaulieu, N., Chan, E., Cotton-Montpetit, J. and MacLeod, A.R. (2000) Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem*, **275**, 10754-10760.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K. and Dimitrov, S. (2007) Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell Biochem*, **41**, 71-89.
- Boultwood, J. and Wainscoat, J.S. (2007) Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol*, **138**, 3-11.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B. and Bestor, T.H. (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, **294**, 2536-2539.
- Bouzinba-Segard, H., Guais, A. and Francastel, C. (2006) Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8709-8714.
- Boveri, T. (1914) *Zur der Entstehung maligner Tumoren*. Jena: Gustav Fischer.
- Bowater, R.P. and Wells, R.D. (2001) The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **66**, 159-202.
- Boyer, L.A., Latek, R.R. and Peterson, C.L. (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 158-163.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A. and Jaenisch, R. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, **441**, 349-353.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 211-219.
- Broccoli, D., Smorzewska, A., Chong, L. and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, **17**, 231-235.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., Cooper, P., Smith, S., McCabe, V.M., Norris, D.P., Penny, G.D., Patel, D. and Rastan, S. (1991) Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature*, **351**, 329-331.
- Brodeur, G.M. (1996) Schwann cells as antineuroblastoma agents. *N Engl J Med*, **334**, 1537-1539.
- Broske, A.M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M.A., Jacobsen, S.E. and Rosenbauer, F. (2009) DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*, **41**, 1207-1215.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R. and Willard, H.F. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, **349**, 38-44.
- Brown, K.E., Amoils, S., Horn, J.M., Buckle, V.J., Higgs, D.R., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (2001) Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 602-606.
- Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*, **3**, 207-217.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997a) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997b) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H. and Arndt-Jovin, D.J. (1998) The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in Drosophila embryos: impact on models for silencing. *J Cell Biol*, **141**, 469-481.
- Buhler, M. and Moazed, D. (2007) Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1041-1048.
- Busson-Le Coniat, M., Salomon-Nguyen, F., Dastugue, N., Maarek, O., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Baranger, L., Brizard, F., Radford, I., Jeanpierre, M., Bernard, O.A. and Berger, R. (1999) Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 1 abnormalities in hematopoietic disorders: rearrangements of DNA satellite II and new recurrent translocations. *Leukemia*, **13**, 1975-1981.
- Cairns, B.R. (2004) Around the world of DNA damage INO80 days. *Cell*, **119**, 733-735.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15524-15529.
- Callanan, M., Baccon, P.L., Duley, S., Marais, D., Sotto, J. and Leroux, D. (2000a) FISH mapping of 1q breaks in malignant lymphoma; frequent rearrangement of heterochromatin band 1q12 and identification of two distinct but adjacent breakpoint cluster sites in a 2.5Mb region of proximal 1q21 [abstract, 6th International Chromosome 1 Workshop 2000]. *Cytogenet Cell Genet*, **in press**.
- Callanan, M., Leroux, D., Magaud, J.P. and Rimokh, R. (1996) Implication of cyclin D1 in malignant lymphoma. *Crit Rev Oncog*, **7**, 191-203.
- Callanan, M.B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M.J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J.J. and Leroux, D. (2000b) The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 309-314.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2002) Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, **26**, 26.
- Cariati, M. and Purushotham, A.D. (2008) Stem cells and breast cancer. *Histopathology*, **52**, 99-107.

- Carpenter, A.E., Memedula, S., Plutz, M.J. and Belmont, A.S. (2005) Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol*, **25**, 958-968.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H. and Silver, P.A. (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell*, **117**, 427-439.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R. (1995) BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*, **86**, 45-53.
- Cavalli, G. (2002) Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 269-278.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1998) Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 354-360.
- Chambeyron, S. and Bickmore, W.A. (2004) Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression? *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 256-262.
- Chang, C.C., Ye, B.H., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R. (1996) BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6947-6952.
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, **16**, 395-419.
- Cheng, X. and Blumenthal, R.M. (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, **16**, 341-350.
- Chim, C.S., Liang, R. and Kwong, Y.L. (2002) Hypermethylation of gene promoters in hematological neoplasia. *Hematol Oncol*, **20**, 167-176.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. and de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**, 1663-1667.
- Choo, K.H. (1997) Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet*, **61**, 1225-1233.
- Choo, K.H. (2000) Centromerization. *Trends Cell Biol*, **10**, 182-188.
- Chow, J. and Heard, E. (2009) X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 359-366.
- Chowdhury, M., Forouhi, O., Dayal, S., McCloskey, N., Gould, H.J., Felsenfeld, G. and Fear, D.J. (2008) Analysis of intergenic transcription and histone modification across the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15872-15877.
- Chuang, C.H., Carpenter, A.E., Fuchsova, B., Johnson, T., de Lanerolle, P. and Belmont, A.S. (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol*, **16**, 825-831.
- Cigudosa, J.C., Acosta Almeida, M.T., Carrasco Juan, J.L., Otero Gomez, A., Hernandez Nieto, L., Garcia Talavera, J. and Garcia Miranda, J.L. (1996) Deletion of exon b3 of the BCR gene in CML: easy breakpoint mapping by a two-round PCR. *Cancer Genet Cytogenet*, **91**, 71-73.
- Cirio, M.C., Martel, J., Mann, M., Toppings, M., Bartolomei, M., Trasler, J. and Chaillet, J.R. (2008) DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Dev Biol*, **324**, 139-150.
- Clapier, C.R. and Cairns, B.R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, **78**, 273-304.
- Clark, D.J. and Kimura, T. (1990) Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J Mol Biol*, **211**, 883-896.
- Clarke, M.F. (2005) A self-renewal assay for cancer stem cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **56 Suppl 1**, 64-68.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. and Busslinger, M. (2007) Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*, **8**, 463-470.
- Cockell, M. and Gasser, S.M. (1999) Nuclear compartments and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 199-205.
- Cooper, K.F., Fisher, R.B. and Tyler-Smith, C. (1992) Structure of the pericentric long arm region of the human Y chromosome. *J Mol Biol*, **228**, 421-432.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Cremer, M., Kupper, K., Wagler, B., Wizelman, L., von Hase, J., Weiland, Y., Kreja, L., Diebold, J., Speicher, M.R. and Cremer, T. (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol*, **162**, 809-820.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, **2**, 292-301.
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P. and Jackson, S.P. (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*, **7**, 588-598.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, **145**, 1119-1131.
- Csink, A.K. and Henikoff, S. (1996) Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature*, **381**, 529-531.
- Csink, A.K. and Henikoff, S. (1998) Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet*, **14**, 200-204.
- Cullen, B.R. (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, **16**, 861-865.
- Czernin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, **111**, 185-196.

- Daujat, S., Weiss, T., Mohn, F., Lange, U.C., Ziegler-Birling, C., Zeissler, U., Lappe, M., Schubeler, D., Torres-Padilla, M.E. and Schneider, R. (2009) H3K64 trimethylation marks heterochromatin and is dynamically remodeled during developmental reprogramming. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 777-781.
- Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Connors, J.M., Lansdorp, P.M., Ouyang, Q., Lister, T.A., Davies, A.J., Norton, A.J., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Campo, E., Montserrat, E., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Yang, L., Powell, J., Zhao, H., Goldschmidt, N., Chiorazzi, M. and Staudt, L.M. (2004) Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*, **351**, 2159-2169.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U. and Staudt, L.M. (2001) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*, **194**, 1861-1874.
- de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Gartner, F., Malynn, B., Davidson, L., Rickert, R., Rajewsky, K., DePinho, R.A. and Alt, F.W. (2001) Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, **14**, 45-55.
- Deger, R.B., Faruqi, S.A. and Noumoff, J.S. (1997) Karyotypic analysis of 32 malignant epithelial ovarian tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, **96**, 166-173.
- Delaire, S., Huang, Y.H., Chan, S.W. and Robey, E.A. (2004) Dynamic repositioning of CD4 and CD8 genes during T cell development. *J Exp Med*, **200**, 1427-1435.
- Delaval, K., Govin, J., Cerqueira, F., Rousseaux, S., Khochbin, S. and Feil, R. (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J*, **26**, 720-729.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. and Bernard, O.A. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, **360**, 2289-2301.
- Deng, G., Nguyen, A., Tanaka, H., Matsuzaki, K., Bell, I., Mehta, K.R., Terdiman, J.P., Waldman, F.M., Kakar, S., Gum, J., Crawley, S., Sleisenger, M.H. and Kim, Y.S. (2006) Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. *Int J Cancer*, **118**, 2999-3005.
- Denslow, S.A. and Wade, P.A. (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, **26**, 5433-5438.
- Dernburg, A.F., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshall, W.F., Phillips, J., Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, **85**, 745-759.
- Dewald, G.W., Kyle, R.A., Hicks, G.A. and Greipp, P.R. (1985) The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood*, **66**, 380-390.
- Deweindt, C., Albagli, O., Bernardin, F., Dhordain, P., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J.P. and Leprince, D. (1995) The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ*, **6**, 1495-1503.
- Dhasarathy, A. and Wade, P.A. (2008) The MBD protein family-reading an epigenetic mark? *Mutat Res*, **647**, 39-43.
- Dhordain, P., Lin, R.J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J.P., Evans, R.M. and Albagli, O. (1998) The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4645-4651.
- Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S. and Pelicci, P.G. (2002) Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, **295**, 1079-1082.
- Dierlamm, J., Pittaluga, S., Wlodarska, I., Stul, M., Thomas, J., Boogaerts, M., Michaux, L., Driessen, A., Mecucci, C., Cassiman, J.J. and et al. (1996) Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood*, **87**, 299-307.
- Dougllass, E.C., Magrath, I.T., Lee, E.C. and Whang-Peng, J. (1980) Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma. *Blood*, **55**, 148-155.
- du Chene, I., Basyuk, E., Lin, Y.L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Bertrand, E., Marcello, A., Emiliani, S., Kiernan, R. and Benkirane, M. (2007) Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *Embo J*, **26**, 424-435.
- du Sart, D., Cancilla, M.R., Earle, E., Mao, J.I., Saffery, R., Tainton, K.M., Kalitsis, P., Martyn, J., Barry, A.E. and Choo, K.H. (1997) A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA [see comments]. *Nat Genet*, **16**, 144-153.
- Dunleavy, K., Pittaluga, S., Czuczman, M.S., Dave, S.S., Wright, G., Grant, N., Shovlin, M., Jaffe, E.S., Janik, J.E., Staudt, L.M. and Wilson, W.H. (2009) Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **113**, 6069-6076.
- Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., Chiao, J.H., Reilly, J.F., Ricker, J.L., Richon, V.M. and Frankel, S.R. (2007) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*, **109**, 31-39.
- Earnshaw, W.C. and Laemmli, U.K. (1983) Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, **96**, 84-93.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. and Reuter, G. (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in Drosophila. *Chromosome Res*, **14**, 377-392.

- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, **429**, 457-463.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. and Elgin, S.C. (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9923-9927.
- Espada, J., Ballestar, E., Fraga, M.F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J.C., Robertson, K.D., Fuks, F. and Esteller, M. (2004) Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone h3 modification pattern. *J Biol Chem*, **279**, 37175-37184.
- Espada, J., Ballestar, E., Santoro, R., Fraga, M.F., Villar-Garea, A., Nemeth, A., Lopez-Serra, L., Ropero, S., Aranda, A., Orozco, H., Moreno, V., Juarranz, A., Stockert, J.C., Langst, G., Grummt, I., Bickmore, W. and Esteller, M. (2007) Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2191-2198.
- Espada, J. and Esteller, M. (2007) Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 449-457.
- Espinoza, C.R. and Feeney, A.J. (2007) Chromatin accessibility and epigenetic modifications differ between frequently and infrequently rearranging VH genes. *Mol Immunol*, **44**, 2675-2685.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 259-269.
- Esteller, M. (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer*, **94**, 179-183.
- Eymery, A., Callanan, M. and Vourc'h, C. (2009a) The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol*, **53**, 259-268.
- Eymery, A., Horard, B., El Atifi-Borel, M., Fourel, G., Berger, F., Vitte, A.L., Van den Broeck, A., Brambilla, E., Fournier, A., Callanan, M., Gazzeri, S., Khochbin, S., Rousseaux, S., Gilson, E. and Vourc'h, C. (2009b) A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, 6340-6354.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
- Fandy, T.E., Herman, J.G., Kerns, P., Jiemjit, A., Sugar, E.A., Choi, S.H., Yang, A.S., Aucott, T., Dausess, T., Odchimar-Reissig, R., Licht, J., McConnell, M.J., Nasrallah, C., Kim, M.K., Zhang, W., Sun, Y., Murgo, A., Espinoza-Delgado, I., Oteiza, K., Owoeye, I., Silverman, L.R., Gore, S.D. and Carraway, H.E. (2009) Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*, **114**, 2764-2773.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, **7**, 21-33.
- Felsher, D.W. and Bishop, J.M. (1999) Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3940-3944.
- Fenaux, P. (2005) Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes. *Nat Clin Pract Oncol*, **2 Suppl 1**, S36-44.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C. and Silverman, L.R. (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, **10**, 223-232.
- Feng, Q. and Zhang, Y. (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*, **15**, 827-832.
- Ferguson, M. and Ward, D.C. (1992) Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma*, **101**, 557-565.
- Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Chen, W., LaCasce, A.S., Cattoretti, G., Kurtin, P., Pinkus, G.S., de Leval, L., Harris, N.L., Savage, K.J., Neuberg, D., Habermann, T.M., Dalla-Favera, R., Golub, T.R., Aster, J.C. and Shipp, M.A. (2005) NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*, **106**, 1392-1399.
- Figueroa, M.E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T.E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M.S., Greally, J.M., Carraway, H., Licht, J.D., Gore, S.D. and Melnick, A. (2009) MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*, **114**, 3448-3458.
- Filion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E. and Defossez, P.A. (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*, **26**, 169-181.
- Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R. and Bickmore, W.A. (2008) Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet*, **4**, e1000039.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003a) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 172-183.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2003b) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*, **17**, 1870-1881.
- Fisher, S.G. and Fisher, R.I. (2004) The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, **23**, 6524-6534.

- Folco, H.D., Pidoux, A.L., Urano, T. and Allshire, R.C. (2008) Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*, **319**, 94-97.
- Fonatsch, C., Haase, D., Freund, M., Bartels, H. and Tesch, H. (1991) Partial trisomy 1q. A nonrandom primary chromosomal abnormality in myelodysplastic syndromes? *Cancer Genet Cytogenet*, **56**, 243-253.
- Fourel, G., Revardel, E., Koering, C.E. and Gilson, E. (1999) Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *Embo J*, **18**, 2522-2537.
- Fournier, A., Florin, A., Lefebvre, C., Solly, F., Leroux, D. and Callanan, M.B. (2007) Genetics and epigenetics of 1q rearrangements in hematological malignancies. *Cytogenet Genome Res*, **118**, 320-327.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and 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**, 391-400.
- Francastel, C., Magis, W. and Groudine, M. (2001) Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12120-12125.
- Francastel, C., Walters, M.C., Groudine, M. and Martin, D.I. (1999) A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell*, **99**, 259-269.
- Francis, N.J. and Kingston, R.E. (2001) Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 409-421.
- Fritsch, O., Benvenuto, G., Bowler, C., Molinier, J. and Hohn, B. (2004) The INO80 protein controls homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*, **16**, 479-485.
- Frommer, M., Prosser, J., Tkachuk, D., Reisner, A.H. and Vincent, P.C. (1982) Simple repeated sequences in human satellite DNA. *Nucleic Acids Res*, **10**, 547-563.
- Fujita, N., Takebayashi, S., Okumura, K., Kudo, S., Chiba, T., Saya, H. and Nakao, M. (1999) Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol*, **19**, 6415-6426.
- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. and Nakao, M. (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem*, **278**, 24132-24138.
- Fukagawa, T. (2004) Centromere DNA, proteins and kinetochore assembly in vertebrate cells. *Chromosome Res*, **12**, 557-567.
- Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T. and Oshimura, M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*, **24**, 88-91.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R. and Kouzarides, T. (2003a) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2305-2312.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P. and Kouzarides, T. (2003b) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, **278**, 4035-4040.
- Furuta, K., Chan, E.K., Kiyosawa, K., Reimer, G., Luderschmidt, C. and Tan, E.M. (1997) Heterochromatin protein HP1Hsbeta (p25beta) and its localization with centromeres in mitosis. *Chromosoma*, **106**, 11-19.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E. and Busslinger, M. (2004) Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev*, **18**, 411-422.
- Gagos, S., Iatridou-Kyrkou, K., Liosi, A., Karakitsos, P., Papageorgaki, P., Kyrroudi, A. and Pathak, S. (1995) Clonal evolution of an immunoblastic type non-Hodgkin's lymphoma with der(6)t(1;6)(q11;p11) as its primary cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet*, **79**, 59-63.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, **277**, 25748-25755.
- Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., Jenuwein, T. and Blasco, M.A. (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet*, **36**, 94-99.
- Garcia-Manero, G. and Issa, J.P. (2005) Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents. *Cancer Invest*, **23**, 635-642.
- Garcia-Manero, G., Kantarjian, H.M., Sanchez-Gonzalez, B., Yang, H., Rosner, G., Verstovsek, S., Rytting, M., Wierda, W.G., Ravandi, F., Koller, C., Xiao, L., Faderl, S., Estrov, Z., Cortes, J., O'Brien, S., Estey, E., Bueso-Ramos, C., Fiorentino, J., Jabbour, E. and Issa, J.P. (2006) Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*, **108**, 3271-3279.
- Garcia-Manero, G., Yang, H., Bueso-Ramos, C., Ferrajoli, A., Cortes, J., Wierda, W.G., Faderl, S., Koller, C., Morris, G., Rosner, G., Loboda, A., Fantin, V.R., Randolph, S.S., Hardwick, J.S., Reilly, J.F., Chen, C., Ricker, J.L., Secrist, J.P., Richon, V.M., Frankel, S.R. and Kantarjian, H.M. (2008) Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, **111**, 1060-1066.
- Gartler, S.M. and Riggs, A.D. (1983) Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*, **17**, 155-190.
- Gasser, S.M. (2002) Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*, **296**, 1412-1416.
- Geiman, T.M., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., Zhao, Y. and Robertson, K.D. (2004) DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**, 544-555.

- Georgel, P.T., Horowitz-Scherer, R.A., Adkins, N., Woodcock, C.L., Wade, P.A. and Hansen, J.C. (2003) Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem*, **278**, 32181-32188.
- Gibbons, R.J., McDowell, T.L., Raman, S., O'Rourke, D.M., Garrick, D., Ayyub, H. and Higgs, D.R. (2000) Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet*, **24**, 368-371.
- Giorda, R., Bonaglia, M.C., Milani, G., Baroncini, A., Spada, F., Beri, S., Menozzi, G., Rusconi, M. and Zuffardi, O. (2008) Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1). *Eur J Hum Genet*, **16**, 897-905.
- Goldmit, M., Ji, Y., Skok, J., Roldan, E., Jung, S., Cedar, H. and Bergman, Y. (2005) Epigenetic ontogeny of the Igk locus during B cell development. *Nat Immunol*, **6**, 198-203.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **74**, 481-514.
- Gondor, A. and Ohlsson, R. (2009) Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature*, **461**, 212-217.
- Gore, S.D., Baylin, S., Sugar, E., Carraway, H., Miller, C.B., Carducci, M., Grever, M., Galm, O., Dausers, T., Karp, J.E., Rudek, M.A., Zhao, M., Smith, B.D., Manning, J., Jiemjit, A., Dover, G., Mays, A., Zwiebel, J., Murgo, A., Weng, L.J. and Herman, J.G. (2006) Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res*, **66**, 6361-6369.
- Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Buckland, R.A., Clayton, R.P. and Evans, H.J. (1975) The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. *Exp Cell Res*, **92**, 148-158.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. and Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol*, **176**, 283-294.
- Graziano, A., d'Aquino, R., Tirino, V., Desiderio, V., Rossi, A. and Pirozzi, G. (2008) The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem*, **103**, 408-412.
- Green, K., Lewis, A., Dawson, C., Dean, W., Reinhart, B., Chaillet, J.R. and Reik, W. (2007) A developmental window of opportunity for imprinted gene silencing mediated by DNA methylation and the Kcnq1ot1 noncoding RNA. *Mamm Genome*, **18**, 32-42.
- Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, **65**, 337-365.
- Grewal, S.I. and Elgin, S.C. (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 178-187.
- Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, **8**, 35-46.
- Grewal, S.I. and Moazed, D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, **301**, 798-802.
- Grigoryev, S.A., Bulynko, Y.A. and Popova, E.Y. (2006) The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome Res*, **14**, 53-69.
- Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W. and Locksley, R.M. (2001) Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, **14**, 205-215.
- Gronwald, J., Storkel, S., Holtgreve-Grez, H., Hadaczek, P., Brinkschmidt, C., Jauch, A., Lubinski, J. and Cremer, T. (1997) Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res*, **57**, 481-487.
- Guang, S., Bochner, A.F., Pavelec, D.M., Burkhart, K.B., Harding, S., Lachowicz, J. and Kennedy, S. (2008) An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. *Science*, **321**, 537-541.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, **453**, 948-951.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C. and Almouzni, G. (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol*, **166**, 493-505.
- Guil, S. and Esteller, M. (2009) DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 87-95.
- Hadjur, S., Williams, L.M., Ryan, N.K., Cobb, B.S., Sexton, T., Fraser, P., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2009) Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature*, **460**, 410-413.
- Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S.I. (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, **297**, 2232-2237.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Hartmann-Goldstein, I.J. (1967) On the relationship between heterochromatinization and variegation in Drosophila, with special reference to temperature-sensitive periods. *Genet Res*, **10**, 143-159.
- He, D., Zeng, C., Woods, K., Zhong, L., Turner, D., Busch, R.K., Brinkley, B.R. and Busch, H. (1998a) CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily. *Chromosoma*, **107**, 189-197.
- He, H., Liao, C. and Edstrom, J.E. (1998b) Centromere 3 specific tandem repeat from Chironomus pallidivittatus. *Chromosoma*, **107**, 304-310.
- Heard, E. (2005) Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 482-489.
- Hediger, F. and Gasser, S.M. (2006) Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 143-150.
- Heim, S., Teixeira, M.A. and Pandis, N. (2001) Are some breast carcinomas polyclonal in origin? *J Pathol*, **194**, 395-397.

- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., Wang, W., Weng, Z., Green, R.D., Crawford, G.E. and Ren, B. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 311-318.
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-6547.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J. and Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301-304.
- Hendrich, B. and Tweedie, S. (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet*, **19**, 269-277.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S. and van Steensel, B. (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 716-721.
- Henikoff, S., Jackson, J.M. and Talbert, P.B. (1995) Distance and pairing effects on the brownDominant heterochromatic element in *Drosophila*. *Genetics*, **140**, 1007-1017.
- Hervouet, E., Vallette, F.M. and Cartron, P.F. (2009) Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*, **4**.
- Hewitt, S.L., High, F.A., Reiner, S.L., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2004) Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur J Immunol*, **34**, 3604-3613.
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., Farrar, M.A., Sleckman, B.P., Schatz, D.G., Busslinger, M., Bassing, C.H. and Skok, J.A. (2009) RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat Immunol*, **10**, 655-664.
- Hiratani, I. and Gilbert, D.M. (2009) Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics*, **4**, 93-97.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H. and Peters, J.M. (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, **438**, 1176-1180.
- Hite, K.C., Adams, V.H. and Hansen, J.C. (2009) Recent advances in MeCP2 structure and function. *Biochem Cell Biol*, **87**, 219-227.
- Hogan, C. and Varga-Weisz, P. (2007) The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutat Res*, **618**, 41-51.
- Hollis, M. and Hindley, J. (1988) Satellite II DNA of human lymphocytes: tandem repeats of a simple sequence element. *Nucleic Acids Res*, **16**, 363.
- Honjo, T., Muramatsu, M. and Fagarasan, S. (2004) AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity*, **20**, 659-668.
- Hoppe, G.J., Tanny, J.C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Danaie, S., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2002) Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol Cell Biol*, **22**, 4167-4180.
- Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J.F. and Kohwi-Shigematsu, T. (2005) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, **37**, 31-40.
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M. and Chaillet, J.R. (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, **104**, 829-838.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P. and Choo, K.H. (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1148-1153.
- Hsu, L.Y., Lauring, J., Liang, H.E., Greenbaum, S., Cado, D., Zhuang, Y. and Schlissel, M.S. (2003) A conserved transcriptional enhancer regulates RAG gene expression in developing B cells. *Immunity*, **19**, 105-117.
- Hu, H., Wang, B., Borde, M., Nardone, J., Maika, S., Allred, L., Tucker, P.W. and Rao, A. (2006) Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol*, **7**, 819-826.
- Hu, Y.G., Hirasawa, R., Hu, J.L., Hata, K., Li, C.L., Jin, Y., Chen, T., Li, E., Rigolet, M., Viegas-Pequignot, E., Sasaki, H. and Xu, G.L. (2008) Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet*, **17**, 2654-2664.
- Husson, H., Carideo, E.G., Neuberg, D., Schultze, J., Munoz, O., Marks, P.W., Donovan, J.W., Chillemi, A.C., O'Connell, P. and Freedman, A.S. (2002) Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood*, **99**, 282-289.
- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *J Cell Sci*, **109 (Pt 6)**, 1427-1436.
- Inoue, A., Hyle, J., Lechner, M.S. and Lahti, J.M. (2008) Perturbation of HP1 localization and chromatin binding ability causes defects in sister-chromatid cohesion. *Mutat Res*, **657**, 48-55.
- Ioshikhes, I.P. and Zhang, M.Q. (2000) Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat Genet*, **26**, 61-63.
- Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J.B., Sabunciyany, S. and Feinberg, A.P. (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, **41**, 178-186.
- Issa, J.P., Gharibyan, V., Cortes, J., Jelinek, J., Morris, G., Verstovsek, S., Talpaz, M., Garcia-Manero, G. and Kantarjian, H.M. (2005) Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol*, **23**, 3948-3956.

- Itoyama, T., Nanjungud, G., Chen, W., Dyomin, V.G., Teruya-Feldstein, J., Jhanwar, S.C., Zelenetz, A.D. and Chaganti, R.S. (2002) Molecular cytogenetic analysis of genomic instability at the 1q12-22 chromosomal site in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **35**, 318-328.
- Jackson, D.A., Iborra, F.J., Manders, E.M. and Cook, P.R. (1998) Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell*, **9**, 1523-1536.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. and Jaenisch, R. (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, **27**, 31-39.
- Jacobs, S.A. and Khorasanizadeh, S. (2002) Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail. *Science*, **21**, 21.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D. and Khorasanizadeh, S. (2001) Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo J*, **20**, 5232-5241.
- Jardin, F., Callanan, M., Penther, D., Ruminy, P., Troussard, X., Kerckaert, J.P., Figeac, M., Parmentier, F., Rainville, V., Vaida, I., Bertrand, P., Duval, A.B., Picquenot, J.M., Chaperot, L., Marolleau, J.P., Plumas, J., Tilly, H. and Bastard, C. (2009) Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*, **23**, 698-707.
- Jeanpierre, M., Turleau, C., Aurias, A., Prieur, M., Ledest, F., Fischer, A. and Viegas-Pequignot, E. (1993) An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet*, **2**, 731-735.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. and Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 80-93.
- Jhunjhunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M. and Murre, C. (2009) Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell*, **138**, 435-448.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., Sekeres, M., Saunthararajah, Y. and Maciejewski, J.P. (2009) Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, **113**, 1315-1325.
- Johnson, K., Angelin-Duclos, C., Park, S. and Calame, K.L. (2003) Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol Cell Biol*, **23**, 2438-2450.
- Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G., Lin, K.I., Bothwell, A.L., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G. and Calame, K. (2004) B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat Immunol*, **5**, 853-861.
- Jolly, C., Konecny, L., Grady, D.L., Kutsikova, Y.A., Cotto, J.J., Morimoto, R.I. and Vourc'h, C. (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol*, **156**, 775-781.
- Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B.M., Khochbin, S. and Vourc'h, C. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol*, **164**, 25-33.
- Jones, D.O., Cowell, I.G. and Singh, P.B. (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*, **22**, 124-137.
- Jones, K.W., Purdom, I.F., Prosser, J. and Corneo, G. (1974) The chromosomal localisation of human satellite DNA I. *Chromosoma*, **49**, 161-171.
- Jouvenot, Y., Ginjala, V., Zhang, L., Liu, P.Q., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Wolffe, A.P., Ohlsson, R. and Gregory, P.D. (2003) Targeted regulation of imprinted genes by synthetic zinc-finger transcription factors. *Gene Ther*, **10**, 513-522.
- Juneja, S., Lukeis, R., Tan, L., Cooper, I., Szelag, G., Parkin, J.D., Ironside, P. and Garson, O.M. (1990) Cytogenetic analysis of 147 cases of non-Hodgkin's lymphoma: non-random chromosomal abnormalities and histological correlations. *Br J Haematol*, **76**, 231-237.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. and Alt, F.W. (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*, **24**, 541-570.
- Kagansky, A., Folco, H.D., Almeida, R., Pidoux, A.L., Boukaba, A., Simmer, F., Urano, T., Hamilton, G.L. and Allshire, R.C. (2009) Synthetic heterochromatin bypasses RNAi and centromeric repeats to establish functional centromeres. *Science*, **324**, 1716-1719.
- Kaludov, N.K. and Wolffe, A.P. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1921-1928.
- Kaminskas, E., Farrell, A., Abraham, S., Baird, A., Hsieh, L.S., Lee, S.L., Leighton, J.K., Patel, H., Rahman, A., Sridhara, R., Wang, Y.C. and Pazdur, R. (2005) Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res*, **11**, 3604-3608.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M. and Rajewsky, K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, **19**, 489-501.
- Kantor, B., Makedonski, K., Shemer, R. and Razin, A. (2003) Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr Patterns*, **3**, 697-702.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R. and Li, Z.W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, **2**, 301-310.

- Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.
- Kasper, S. (2008) Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev*, **4**, 193-201.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M. and Cairns, B.R. (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J*, **23**, 1348-1359.
- Kazazian, H.H., Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, **303**, 1626-1632.
- Keshet, I., Schlesinger, Y., Farkash, S., Rand, E., Hecht, M., Segal, E., Pikarski, E., Young, R.A., Niveleau, A., Cedar, H. and Simon, I. (2006) Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet*, **38**, 149-153.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, **10**, 345-355.
- Kishi, H., Jin, Z.X., Wei, X.C., Nagata, T., Matsuda, T., Saito, S. and Muraguchi, A. (2002) Cooperative binding of c-Myb and Pax-5 activates the RAG-2 promoter in immature B cells. *Blood*, **99**, 576-583.
- Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E. and Martienssen, R. (2008) RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication. *Curr Biol*, **18**, 490-495.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.
- Knoepfler, P.S. and Eisenman, R.N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell*, **99**, 447-450.
- Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.
- Knutsen, T. (1997) Cytogenetic mechanisms in the pathogenesis and progression of follicular lymphoma. *Cancer Surv*, **30**, 163-192.
- Ko, Y.G., Nishino, K., Hattori, N., Arai, Y., Tanaka, S. and Shiota, K. (2005) Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*, **280**, 9627-9634.
- Koch, B., Kueng, S., Ruckenbauer, C., Wendt, K.S. and Peters, J.M. (2008) The Suv39h-HP1 histone methylation pathway is dispensable for enrichment and protection of cohesin at centromeres in mammalian cells. *Chromosoma*, **117**, 199-210.
- Koduru, P.R., Filippa, D.A., Richardson, M.E., Jhanwar, S.C., Chaganti, S.R., Koziner, B., Clarkson, B.D., Lieberman, P.H. and Chaganti, R.S. (1987) Cytogenetic and histologic correlations in malignant lymphoma. *Blood*, **69**, 97-102.
- Kogan, S.C., Brown, D.E., Shultz, D.B., Truong, B.T., Lallemand-Breitenbach, V., Guillemin, M.C., Lagasse, E., Weissman, I.L. and Bishop, J.M. (2001) BCL-2 cooperates with promyelocytic leukemia retinoic acid receptor alpha chimeric protein (PMLRARalpha) to block neutrophil differentiation and initiate acute leukemia. *J Exp Med*, **193**, 531-543.
- Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T. and Wutz, A. (2004) A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol*, **2**, E171.
- Koonin, E.V., Zhou, S. and Lucchesi, J.C. (1995) The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4229-4233.
- Korber, P. and Horz, W. (2004) SWRred not shaken; mixing the histones. *Cell*, **117**, 5-7.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y.L. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98**, 285-294.
- Kosak, S.T. and Groudine, M. (2004) Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev*, **18**, 1371-1384.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G. and Singh, H. (2002) Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*, **296**, 158-162.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Krajewski, W.A. and Reese, J.C. (2009) SET domains of histone methyltransferases recognize ISWI-remodeled nucleosomal species. *Mol Cell Biol*.
- Kristensen, L.S., Nielsen, H.M. and Hansen, L.L. (2009) Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol*, **625**, 131-142.
- Krivtsov, A.V. and Armstrong, S.A. (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*, **7**, 823-833.
- Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., Kutok, J.L., Kung, A.L. and Armstrong, S.A. (2008) H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell*, **14**, 355-368.
- Kumaran, R.I. and Spector, D.L. (2008) A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *J Cell Biol*, **180**, 51-65.
- Kurnit, D.M., Neve, R.L., Morton, C.C., Bruns, G.A., Ma, N.S., Cox, D.R. and Klinger, H.P. (1984) Recent evolution of DNA sequence homology in the pericentromeric regions of human acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, **38**, 99-105.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lakshmikuttyamma, A., Scott, S.A., Decoteau, J.F. and Geyer, C.R. (2009) Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene*.

- Lam, L.T., Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Wright, G., Xu, W., Zhao, H., Yu, X., Dang, L. and Staudt, L.M. (2008) Compensatory IKK α activation of classical NF- κ B signaling during IKK β inhibition identified by an RNA interference sensitization screen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20798-20803.
- Lan, F., Collins, R.E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J.R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X. and Shi, Y. (2007) Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature*, **448**, 718-722.
- Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. and Cremer, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*, **8**, 104-115.
- Lander, E.S., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Lane, A.A. and Chabner, B.A. (2009) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*, **27**, 5459-5468.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A. and Dick, J.E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**, 645-648.
- Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmejnand, E., Sotto, J.J. and Callanan, M. (2001a) Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, **32**, 250-264.
- Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmejnand, E., Sotto, J.J. and Callanan, M. (2001b) Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, **32**, 250-264.
- Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A., Cohen, A., Lasonder, E. and Stunnenberg, H.G. (2006) MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol*, **26**, 843-851.
- Lee, C., Li, X., Jabs, E.W., Court, D. and Lin, C.C. (1995) Human gamma X satellite DNA: an X chromosome specific centromeric DNA sequence. *Chromosoma*, **104**, 103-112.
- Lee, C., Wevrick, R., Fisher, R.B., Ferguson-Smith, M.A. and Lin, C.C. (1997) Human centromeric DNAs. *Hum Genet*, **100**, 291-304.
- Lee, C.J., Dosch, J. and Simeone, D.M. (2008) Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol*, **26**, 2806-2812.
- Lee, J.W., Lee, Y.C., Na, S.Y., Jung, D.J. and Lee, S.K. (2001) Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 289-297.
- Lees-Miller, S.P. and Meek, K. (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, **85**, 1161-1173.
- Lefebvre, C., Fabre, B., Vettier, C., Rabin, L., Florin, A., Wang, J., Gressin, R., Jacob, M.C., Callanan, M. and Leroux, D. (2007) Composite splenic marginal zone lymphoma and mantle cell lymphoma arising from 2 independent B-cell clones. *Hum Pathol*, **38**, 660-667. Epub 2006 Nov 2028.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A.H. (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, **13**, 1192-1200.
- Lenz, G., Wright, G.W., Emre, N.C., Kohlhammer, H., Dave, S.S., Davis, R.E., Carty, S., Lam, L.T., Shaffer, A.L., Xiao, W., Powell, J., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Rimsza, L.M., Fisher, R.I., Weisenburger, D.D., Chan, W.C. and Staudt, L.M. (2008) Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13520-13525.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U. and Bestor, T.H. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873.
- Leuba, S.H., Bennink, M.L. and Zlatanova, J. (2004) Single-molecule analysis of chromatin. *Methods Enzymol*, **376**, 73-105.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. and Bird, A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, **69**, 905-914.
- Li, C., Wu, W., Liu, J., Qian, L., Li, A., Yang, K., Wei, Q., Zhou, J. and Zhang, Z. (2006) Functional polymorphisms in the promoter regions of the FAS and FAS ligand genes and risk of bladder cancer in south China: a case-control analysis. *Pharmacogenet Genomics*, **16**, 245-251.
- Li, Q. and Verma, I.M. (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**, 725-734.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T. and Nevo, E. (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol*, **21**, 991-1007.
- Li, Y.S., Hayakawa, K. and Hardy, R.R. (1993) The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med*, **178**, 951-960.
- Limpens, J., Stad, R., Vos, C., de Vlaam, C., de Jong, D., van Ommen, G.J., Schuurin, E. and Kluin, P.M. (1995) Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*, **85**, 2528-2536.
- Lin, C.C., Sasi, R., Lee, C., Fan, Y.S. and Court, D. (1993) Isolation and identification of a novel tandemly repeated DNA sequence in the centromeric region of human chromosome 8. *Chromosoma*, **102**, 333-339.
- Lin, W.C. and Desiderio, S. (1995) V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol Today*, **16**, 279-289.
- Lin, Y.H., Kakadia, P.M., Chen, Y., Li, Y.Q., Deshpande, A.J., Buske, C., Zhang, K.L., Zhang, Y., Xu, G.L. and Bohlander, S.K. (2009) Global reduction of the epigenetic H3K79 methylation mark and increased chromosomal instability in CALM-AF10-positive leukemias. *Blood*, **114**, 651-658.

- Liu, S.T., Hittle, J.C., Jablonski, S.A., Campbell, M.S., Yoda, K. and Yen, T.J. (2003) Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 341-345.
- Liu, Y., Oakeley, E.J., Sun, L. and Jost, J.P. (1998) Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1038-1045.
- Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R. and Desiderio, S. (2007) A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity*, **27**, 561-571.
- Liyanage, M., Weaver, Z., Barlow, C., Coleman, A., Pankratz, D.G., Anderson, S., Wynshaw-Boris, A. and Ried, T. (2000) Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from Atm-deficient mice. *Blood*, **96**, 1940-1946.
- Lo, A.W., Liao, G.C., Rocchi, M. and Choo, K.H. (1999) Extreme reduction of chromosome-specific alpha-satellite array is unusually common in human chromosome 21. *Genome Res*, **9**, 895-908.
- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E. and Urrutia, R. (2006a) Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol*, **8**, 407-415.
- Lomberk, G., Wallrath, L. and Urrutia, R. (2006b) The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*, **7**, 228.
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D.J., Mendelsohn, M., Kirkland, J. and Axel, R. (2006) Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*, **126**, 403-413.
- Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M.F., Alaminos, M., Setien, F. and Esteller, M. (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res*, **66**, 8342-8346.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y. and Almouzni, G. (2009) The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep*, **10**, 769-775.
- Lu, B.Y., Emtage, P.C., Duyf, B.J., Hilliker, A.J. and Eissenberg, J.C. (2000) Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in Drosophila. *Genetics*, **155**, 699-708.
- Luger, K. and Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 140-146.
- Lukusa, T. and Fryns, J.P. (2008) Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 3-16.
- Luo, K., Vega-Palas, M.A. and Grunstein, M. (2002) Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev*, **16**, 1528-1539.
- Lyko, F. (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends Genet*, **17**, 169-172.
- Lyon, M.F. (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, **190**, 372-373.
- Lyon, M.F. (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*, **80**, 133-137.
- Ma, S., Turetsky, A., Trinh, L. and Lu, R. (2006) IFN regulatory factor 4 and 8 promote Ig light chain kappa locus activation in pre-B cell development. *J Immunol*, **177**, 7898-7904.
- Magenis, R.E., Donlon, T., Parks, M., Rivas, M.L. and Lovrien, E.W. (1978) Linkage relationships of dominant antithrombin III deficiency and the heterochromatic region of chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet*, **22**, 327-329.
- Malik, H.S. and Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, **10**, 882-891.
- Manis, J.P., Tian, M. and Alt, F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*, **23**, 31-39.
- Marks, H., Chow, J.C., Denissov, S., Francoijs, K.J., Brockdorff, N., Heard, E. and Stunnenberg, H.G. (2009) High-resolution analysis of epigenetic changes associated with X inactivation. *Genome Res*, **19**, 1361-1373.
- Martin, M., Kettmann, R. and Dequiedt, F. (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene*, **26**, 5450-5467.
- Martin-Subero, J.I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., Bruggemann, M., Bug, S., Calasanz, M.J., Deckert, M., Dreyling, M., Du, M.Q., Durig, J., Dyer, M.J., Fan, J.B., Gesk, S., Hansmann, M.L., Harder, L., Hartmann, S., Klapper, W., Kuppers, R., Montesinos-Rongen, M., Nagel, I., Pott, C., Richter, J., Roman-Gomez, J., Seifert, M., Stein, H., Suella, J., Trumper, L., Vater, I., Prosper, F., Haferlach, C., Cruz Cigudosa, J. and Siebert, R. (2009a) A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One*, **4**, e6986.
- Martin-Subero, J.I., Kreuz, M., Bibikova, M., Bentink, S., Ammerpohl, O., Wickham-Garcia, E., Rosolowski, M., Richter, J., Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Berger, H., Agirre, X., Bernd, H.W., Calvanese, V., Cogliatti, S.B., Drexler, H.G., Fan, J.B., Fraga, M.F., Hansmann, M.L., Hummel, M., Klapper, W., Korn, B., Kuppers, R., Macleod, R.A., Moller, P., Ott, G., Pott, C., Prosper, F., Rosenwald, A., Schwaenen, C., Schubeler, D., Seifert, M., Sturzenhofecker, B., Weber, M., Wessendorf, S., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H., Spang, R., Esteller, M., Barker, D., Hasenclever, D. and Siebert, R. (2009b) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood*, **113**, 2488-2497.
- Masuhara, M., Nagao, K., Nishikawa, M., Kimura, T. and Nakano, T. (2003) Enhanced degradation of MDM2 by a nuclear envelope component, mouse germ cell-less. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 927-932.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. and Okazaki, T. (1989) A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol*, **109**, 1963-1973.
- Matarazzo, M.R., Boyle, S., D'Esposito, M. and Bickmore, W.A. (2007) Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16546-16551.
- Mathas, S., Kreher, S., Meaburn, K.J., Johrens, K., Lamprecht, B., Assaf, C., Sterry, W., Kadin, M.E., Daibata, M., Joos, S., Hummel, M., Stein, H., Janz, M., Anagnostopoulos, I., Schrock, E., Misteli, T. and Dorken, B.

- (2009) Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 5831-5836.
- Mathews, L.A., Crea, F. and Farrar, W.L. (2009) Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer. *Differentiation*, **78**, 1-17.
- Matthews, A.G., Kuo, A.J., Ramon-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., Walter, K.L., Utz, P.J., Shi, Y., Kutateladze, T.G., Yang, W., Gozani, O. and Oettinger, M.A. (2007) RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature*, **450**, 1106-1110.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J. and Vance, V.B. (2001) RNA-based silencing strategies in plants. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 221-227.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, S.J. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, 79-88.
- McDonnell, T.J. and Korsmeyer, S.J. (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*, **349**, 254-256.
- McMurry, M.T. and Krangel, M.S. (2000) A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science*, **287**, 495-498.
- Meaburn, K.J., Misteli, T. and Soutoglou, E. (2007) Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol*, **17**, 80-90.
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, **20**, 3728-3741.
- Meneveri, R., Agresti, A., Marozzi, A., Saccone, S., Rocchi, M., Archidiacono, N., Corneo, G., Della Valle, G. and Ginelli, E. (1993) Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks. *Gene*, **123**, 227-234.
- Menssen, A. and Hermeking, H. (2002) Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6274-6279.
- Merkenschlager, M., Amoils, S., Roldan, E., Rahemtulla, A., O'Connor, E., Fisher, A.G. and Brown, K.E. (2004) Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *J Exp Med*, **200**, 1437-1444.
- Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R. and Brockdorff, N. (1999) Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J Cell Biol*, **147**, 1399-1408.
- Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M. and Mitelman, F. (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res*, **57**, 2765-2780.
- Mertineit, C., Yoder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J.M. and Bestor, T.H. (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*, **125**, 889-897.
- Meyne, J., Ratliff, R.L. and Moyzis, R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7049-7053.
- Michaux, L., Wlodarska, I., Theate, I., Stul, M., Scheiff, J.M., Deneys, V., Ferrant, A. and Hagemeijer, A. (2004) Coexistence of BCL1/CCND1 and CMYC aberrations in blastoid mantle cell lymphoma: a rare finding associated with very poor outcome. *Ann Hematol*, **83**, 578-583.
- Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Nishimura, K., Kamimura, N., Kano, M., Sakamoto, H., Makuuchi, M. and Aburatani, H. (2004) Distinct chromosomal bias of gene expression signatures in the progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, **64**, 7263-7270.
- Midorikawa, Y., Yamamoto, S., Ishikawa, S., Kamimura, N., Igarashi, H., Sugimura, H., Makuuchi, M. and Aburatani, H. (2006) Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*, **25**, 5581-5590.
- Miki, Y., Nishisho, I., Horii, A., Miyoshi, Y., Utsunomiya, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Nakamura, Y. (1992) Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res*, **52**, 643-645.
- Min, J., Zhang, Y. and Xu, R.M. (2003) Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev*, **17**, 1823-1828.
- Minc, E., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2000) HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, **90**, 279-284.
- Minucci, S. and Pelicci, P.G. (1999) Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 215-225.
- Misteli, T. (2005) Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*, **27**, 477-487.
- Misteli, T. and Soutoglou, E. (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 243-254.
- Mitchell, A.R., Beauchamp, R.S. and Bostock, C.J. (1979) A study of sequence homologies in four satellite DNAs of man. *J Mol Biol*, **135**, 127-149.
- Mitelman, F., Johansson, B. and Mertens, F. (2004) Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet*, **36**, 331-334.
- Moazed, D. (2009a) Molecular biology. Rejoice--RNAi for yeast. *Science*, **326**, 533-534.
- Moazed, D. (2009b) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, **457**, 413-420.
- Mohamed, M.A., Greif, P.A., Diamond, J., Sharaf, O., Maxwell, P., Montironi, R., Young, R.A. and Hamilton, P.W. (2007) Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *BJU Int*, **99**, 908-915.

- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, **68**, 869-877.
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K. and Knuutila, S. (1996) DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood*, **87**, 5269-5278.
- Montagne, M., Naud, J.F. and Lavigne, P. (2008) Elucidation of the structural determinants responsible for the specific formation of heterodimeric Mxd1/Max b-HLH-LZ and its binding to E-box sequences. *J Mol Biol*, **376**, 141-152.
- Monti, S., Savage, K.J., Kutok, J.L., Feuerhake, F., Kurtin, P., Mihm, M., Wu, B., Pasqualucci, L., Neubergh, D., Aguiar, R.C., Dal Cin, P., Ladd, C., Pinkus, G.S., Salles, G., Harris, N.L., Dalla-Favera, R., Habermann, T.M., Aster, J.C., Golub, T.R. and Shipp, M.A. (2005) Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*, **105**, 1851-1861.
- Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**, 521-529.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., Krijgsveld, J., Khochbin, S., Muller, C.W. and Petosa, C. (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature*, **461**, 664-668.
- Morris, C.M., Fitzgerald, P.H., Neville, M.A., Wyld, P.J. and Beard, M.E. (1984) Does multisonomy of chromosome 1q confer a proliferative advantage in B-cell acute lymphoblastic leukemia? *Cancer*, **54**, 48-53.
- Mossafa, H., Damotte, D., Jenabian, A., Delarue, R., Vincenneau, A., Amouroux, I., Jeandel, R., Khoury, E., Martelli, J.M., Samson, T., Tapia, S., Flandrin, G. and Troussard, X. (2006) Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leuk Lymphoma*, **47**, 1885-1893.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A. and Bergman, Y. (1998) Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev*, **12**, 1801-1811.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. and Wu, J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6622-6626.
- Mulero-Navarro, S. and Esteller, M. (2008) Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*, **68**, 1-11.
- Muller, H. (1938) *The Collecting Net*, **13**, 181.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N. and Jyothy, A. (2009) Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics*, **36**, 75-88.
- Murphy, T.D. and Karpen, G.H. (1998) Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell*, **93**, 317-320.
- Nan, X., Campoy, F.J. and Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.
- Nan, X., Meehan, R.R. and Bird, A. (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4886-4892.
- Neves, H., Ramos, C., da Silva, M.G., Parreira, A. and Parreira, L. (1999) The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation [see comments]. *Blood*, **93**, 1197-1207.
- Ng, H.H., Jeppesen, P. and Bird, A. (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol*, **20**, 1394-1406.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
- Nielsen, P.R., Nietlisbach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V. and Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103-107.
- Noma, K., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*, **293**, 1150-1155.
- Nowell, P.C. and Hungerford, D.A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, **132**, 1497.
- O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. and Jenuwein, T. (2000) Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol*, **20**, 9423-9433.
- Offit, K., Jhanwar, S.C., Ladanyi, M., Filippa, D.A. and Chaganti, R.S. (1991) Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosomes Cancer*, **3**, 189-201.
- Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Yu, X., Cheng, L., Schubeil, K.E., Cope, L., Mohammad, H.P., Chen, W., Daniel, V.C., Yu, W., Berman, D.M., Jenuwein, T., Pruitt, K., Sharkis, S.J., Watkins, D.N., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, **39**, 237-242.
- Ohzeki, J., Nakano, M., Okada, T. and Masumoto, H. (2002) CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J Cell Biol*, **159**, 765-775.
- Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V.M., Su, L., Xu, G. and Zhang, Y. (2005) hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*, **121**, 167-178.

- Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D. and Heard, E. (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, **303**, 644-649.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998a) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**, 219-220.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998b) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2536-2540.
- Ooi, S.K., O'Donnell, A.H. and Bestor, T.H. (2009) Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci*, **122**, 2787-2791.
- Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X. and Bestor, T.H. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, **448**, 714-717.
- O'Riain, C., O'Shea, D.M., Yang, Y., Le Dieu, R., Gribben, J.G., Summers, K., Yeboah-Afari, J., Bhaw-Rosun, L., Fleischmann, C., Mein, C.A., Crook, T., Smith, P., Kelly, G., Rosenwald, A., Ott, G., Campo, E., Rimsza, L.M., Smeland, E.B., Chan, W.C., Johnson, N., Gascoyne, R.D., Reimer, S., Braziel, R.M., Wright, G.W., Staudt, L.M., Lister, T.A. and Fitzgibbon, J. (2009) Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia*, **23**, 1858-1866.
- Orlando, V. (2003) Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell*, **112**, 599-606.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, **36**, 1065-1071.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E. and Fraser, P. (2007) Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*, **5**, e192.
- Osipovich, O.A., Subrahmanyam, R., Pierce, S., Sen, R. and Oltz, E.M. (2009) Cutting edge: SWI/SNF mediates antisense Igh transcription and locus-wide accessibility in B cell precursors. *J Immunol*, **183**, 1509-1513.
- Ostashevsky, J. (1998) A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes. *Mol Biol Cell*, **9**, 3031-3040.
- Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M. and Shirakawa, M. (2009) Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep*, **10**, 1235-1241.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. and Elgin, S.C. (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery. *Science*, **303**, 669-672.
- Pandis, N., Heim, S., Bardi, G., Idvall, I., Mandahl, N. and Mitelman, F. (1992) Whole-arm t(1;16) and i(q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. *Genes Chromosom Cancer*, **5**, 235-238.
- Pannetier, M., Julien, E., Schotta, G., Tardat, M., Sardet, C., Jenuwein, T. and Feil, R. (2008) PR-SET7 and SUV4-20H regulate H4 lysine-20 methylation at imprinting control regions in the mouse. *EMBO Rep*, **9**, 998-1005.
- Parada, L. and Misteli, T. (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*, **12**, 425-432.
- Parada, L.A., McQueen, P.G. and Misteli, T. (2004) Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol*, **5**, R44.
- Pardal, R., Clarke, M.F. and Morrison, S.J. (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 895-902.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., Cobb, B.S., Yokomori, K., Dillon, N., Aragon, L., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, **132**, 422-433.
- Paro, R. and Hogness, D.S. (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 263-267.
- Partridge, J.F., Scott, K.S., Bannister, A.J., Kouzarides, T. and Allshire, R.C. (2002) cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol*, **12**, 1652-1660.
- Pauler, F.M., Koerner, M.V. and Barlow, D.P. (2007) Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? *Trends Genet*, **23**, 284-292.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, **10**, 886-895.
- Pearce, J.J., Singh, P.B. and Gaunt, S.J. (1992) The mouse has a Polycomb-like chromobox gene. *Development*, **114**, 921-929.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H. and Jenuwein, T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*, **12**, 1577-1589.
- Peters, A.H., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N. and Jenuwein, T. (2002) Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, **30**, 77-80.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. and Jenuwein, T. (2001) Loss of the

- Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-337.
- Peters, A.H. and Schubeler, D. (2005) Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 230-238.
- Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G.D., Seeholzer, S.H., Genuardi, M., Karbowski, M., Yeung, A.T., Matsumoto, Y. and Bellacosa, A. (2000) Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol*, **185**, 473-480.
- Pfeifer, G.P., Steigerwald, S., Boehm, T.L. and Drahovsky, D. (1988) DNA methylation levels in acute human leukemia. *Cancer Lett*, **39**, 185-192.
- Phalke, S., Nickel, O., Walluscheck, D., Hortig, F., Onorati, M.C. and Reuter, G. (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet*, **41**, 696-702.
- Phillips, J.E. and Corces, V.G. (2009) CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, **137**, 1194-1211.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B. and Zhang, Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**, 131-135.
- Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Hawkes, N. and Varga-Weisz, P.D. (2005) Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance? *Cell Cycle*, **4**, 543-546.
- Popova, B.C., Tada, T., Takagi, N., Brockdorff, N. and Nesterova, T.B. (2006) Attenuated spread of X-inactivation in an X;autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7706-7711.
- Powers, J.A. and Eissenberg, J.C. (1993) Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding. *J Cell Biol*, **120**, 291-299.
- Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P. and Stoffel, M. (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, **432**, 226-230.
- Preud'homme, J.L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J.C. and Lelievre, E. (2000) Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol*, **37**, 871-887.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A. and Prokhortchouk, E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*, **15**, 1613-1618.
- Prosser, J., Frommer, M., Paul, C. and Vincent, P.C. (1986) Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol*, **187**, 145-155.
- Quivy, J.P., Gerard, A., Cook, A.J., Roche, D. and Almouzni, G. (2008) The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 972-979.
- Rabbitts, T.H. (2009) Commonality but diversity in cancer gene fusions. *Cell*, **137**, 391-395.
- Rae, M.M. and Franke, W.W. (1972) The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin in mouse nuclei. *Chromosoma*, **39**, 443-456.
- Ragoczy, T., Bender, M.A., Telling, A., Byron, R. and Groudine, M. (2006) The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev*, **20**, 1447-1457.
- Rahmatpanah, F.B., Carstens, S., Guo, J., Sjahputera, O., Taylor, K.H., Duff, D., Shi, H., Davis, J.W., Hooshmand, S.I., Chitma-Matsiga, R. and Caldwell, C.W. (2006) Differential DNA methylation patterns of small B-cell lymphoma subclasses with different clinical behavior. *Leukemia*, **20**, 1855-1862.
- Rando, O.J. and Chang, H.Y. (2009) Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem*, **78**, 245-271.
- Rao, B.J., Brahmachari, S.K. and Rao, M.R. (1983) Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem*, **258**, 13478-13485.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases [see comments]. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E. and Singh, H. (2008) Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, **452**, 243-247.
- Reese, B.E., Bachman, K.E., Baylin, S.B. and Rountree, M.R. (2003) The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol*, **23**, 3226-3236.
- Regha, K., Sloane, M.A., Huang, R., Pauler, F.M., Warczok, K.E., Melikant, B., Radolf, M., Martens, J.H., Schotta, G., Jenuwein, T. and Barlow, D.P. (2007) Active and repressive chromatin are interspersed without spreading in an imprinted gene cluster in the mammalian genome. *Mol Cell*, **27**, 353-366.
- Reinhart, B.J. and Bartel, D.P. (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, **297**, 1831.
- Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J. and Fearon, D.T. (2000) Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med*, **192**, 1841-1848.
- Reuter, G., Werner, W. and Hoffmann, H.J. (1982) Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, **85**, 539-551.
- Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 263-273.

- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y. and Allis, C.D. (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*, **12**, 1591-1598.
- Rich, S., Ganz, R. and Levy, P.S. (1983) Comparative actions of hydralazine, nifedipine and amrinone in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*, **52**, 1104-1107.
- Rizzi, N., Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Valgardsdottir, R., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G. (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell*, **15**, 543-551.
- Robertson, K.D. (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, **20**, 3139-3155.
- Robertson, K.D. (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene*, **21**, 5361-5379.
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A. and Jones, P.A. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2291-2298.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K. and Zhao, K. (2006) The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15782-15787.
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A. and Misteli, T. (2003) Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet*, **34**, 287-291.
- Roldan, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M. and Skok, J.A. (2005) Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol*, **6**, 31-41.
- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., Feeney, A.J. and Murre, C. (2000) E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Mol Cell*, **5**, 343-353.
- Rooney, S., Alt, F.W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D.O., Schatz, D.G. and Sekiguchi, J. (2003) Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med*, **197**, 553-565.
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Zhu, C., Cheng, H.L., Manis, J., Whitlow, S., DeVido, J., Foy, D., Chaudhuri, J., Lombard, D. and Alt, F.W. (2002) Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Mol Cell*, **10**, 1379-1390.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltner, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T. and Staudt, L.M. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **346**, 1937-1947.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Campo, E., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Braziel, R., Grogan, T.M., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Chiorazzi, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D. and Staudt, L.M. (2003) Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*, **198**, 851-862.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E. and Baylin, S.B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**, 269-277.
- Ruault, M., Dubarry, M. and Taddei, A. (2008) Re-positioning genes to the nuclear envelope in mammalian cells: impact on transcription. *Trends Genet*, **24**, 574-581.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L. and Rine, J. (2002) Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2207-2222.
- Saito, M. and Ishikawa, F. (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem*, **277**, 35434-35439.
- Saito, Y. and Jones, P.A. (2006) Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*, **5**, 2220-2222.
- Saitoh, Y. and Laemmli, U.K. (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, **76**, 609-622.
- Santaguida, S. and Musacchio, A. (2009) The life and miracles of kinetochores. *Embo J*, **28**, 2511-2531.
- Santos, F. and Dean, W. (2004) Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, **127**, 643-651.
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C. (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 2381-2402.
- Sartorius, U.A. and Kramer, P.H. (2002) Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer*, **97**, 584-592.
- Sasai, N. and Defossez, P.A. (2009) Many paths to one goal: The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol*, **53**, 323-334.
- Sassaman, D.M., Dombroski, B.A., Moran, J.V., Kimberland, M.L., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Gabriel, A., Swergold, G.D. and Kazazian, H.H., Jr. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet*, **16**, 37-43.
- Saunders, L.R. and Verdin, E. (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, **26**, 5489-5504.

- Saunders, W.S., Chue, C., Goebel, M., Craig, C., Clark, R.F., Powers, J.A., Eissenberg, J.C., Elgin, S.C., Rothfield, N.F. and Earnshaw, W.C. (1993) Molecular cloning of a human homologue of Drosophila heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. *J Cell Sci*, **104 (Pt 2)**, 573-582.
- Saurin, A.J., Shiels, C., Williamson, J., Satijn, D.P., Otte, A.P., Sheer, D. and Freemont, P.S. (1998) The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, **142**, 887-898.
- Sawyer, J.R., Tian, E., Thomas, E., Koller, M., Stangeby, C., Sammartino, G., Goosen, L., Swanson, C., Binz, R.L., Barlogie, B. and Shaughnessy, J. (2009) Evidence for a novel mechanism for gene amplification in multiple myeloma: 1q12 pericentromeric heterochromatin mediates breakage-fusion-bridge cycles of a 1q12 approximately 23 amplicon. *Br J Haematol*, **147**, 484-494.
- Sawyer, J.R., Tricot, G., Lukacs, J.L., Binz, R.L., Tian, E., Barlogie, B. and Shaughnessy, J., Jr. (2005) Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 95-106.
- Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S. and Barlogie, B. (1998a) Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood*, **91**, 1732-1741.
- Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S. and Barlogie, B. (1998b) Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: Evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood*, **91**, 1732-1741.
- Sayegh, C.E., Jhunjhunwala, S., Riblet, R. and Murre, C. (2005) Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev*, **19**, 322-327.
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K. and Lyko, F. (2009) RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res*, **37**, e12.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Schlissel, M.S. (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol*, **10**, 359-383.
- Schebesta, M., Heavey, B. and Busslinger, M. (2002) Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol*, **14**, 216-223.
- Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., Bergman, Y., Simon, I. and Cedar, H. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*, **39**, 232-236.
- Schmid, M., Arib, G., Laemmli, C., Nishikawa, J., Durussel, T. and Laemmli, U.K. (2006) Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell*, **21**, 379-391.
- Schmitt, C.A., Rosenthal, C.T. and Lowe, S.W. (2000) Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med*, **6**, 1029-1035.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A. (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, **10**, 228-236.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A. (2009) A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *Embo J*, **28**, 2323-2336.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G. (2002) Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J*, **21**, 1121-1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. and Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, **18**, 1251-1262.
- Schulze-Luehrmann, J. and Ghosh, S. (2006) Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity*, **25**, 701-715.
- Schumacher, A. and Magnuson, T. (1997) Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet*, **13**, 167-170.
- Seligson, D.B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M. and Kurdستاني, S.K. (2005) Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, **435**, 1262-1266.
- Sexton, T., Bantignies, F. and Cavalli, G. (2009) Genomic interactions: chromatin loops and gene meeting points in transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 849-855.
- Shahbazian, M.D. and Grunstein, M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, **76**, 75-100.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. and et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, **68**, 855-867.
- Shopland, L.S., Lynch, C.R., Peterson, K.A., Thornton, K., Kepper, N., Hase, J., Stein, S., Vincent, S., Molloy, K.R., Kreth, G., Cremer, C., Bult, C.J. and O'Brien, T.P. (2006) Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol*, **174**, 27-38.
- Shrey, K., Suchit, A., Nishant, M. and Vibha, R. (2009) RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. *Biochem Biophys Res Commun*, **386**, 273-277.
- Simon, J.A. and Kingston, R.E. (2009) Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 697-708.

- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. and de Laat, W. (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet*, **38**, 1348-1354.
- Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S. and Reinberg, D. (2005) Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem*, **280**, 41789-41792.
- Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*, **19**, 629-639.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (2001) Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol*, **2**, 848-854.
- Smith, M.M. (2002) Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 279-285.
- Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G. and Misteli, T. (2007) Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 675-682.
- Soutoglou, E. and Misteli, T. (2008) On the contribution of spatial genome organization to cancerous chromosome translocations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 16-19.
- Souza, P.P., Volkel, P., Trinel, D., Vandamme, J., Rosnoblet, C., Heliot, L. and Angrand, P.O. (2009) The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biol*, **10**, 41.
- Sparvoli, E., Galli, M.G., Chiatante, D. and Sgorbati, S. (1977) Perinuclear DNA and heterochromatin. *Exp Cell Res*, **110**, 315-321.
- Stahl, A., Hartung, M., Vagner-Capodano, A.M. and Fouet, C. (1976) Chromosomal constitution of nucleolus-associated chromatin in man. *Hum Genet*, **35**, 27-34.
- Stanek, D. and Neugebauer, K.M. (2004) Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol*, **166**, 1015-1025.
- Staudt, L.M. and Dave, S. (2005) The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*, **87**, 163-208.
- Stavnezer, J. (1996) Antibody class switching. *Adv Immunol*, **61**, 79-146.
- Steinemann, D., Skawran, B., Becker, T., Tauscher, M., Weigmann, A., Wingen, L., Tauscher, S., Hinrichsen, T., Hertz, S., Flemming, P., Flik, J., Wiese, B., Kreipe, H., Lichter, P., Schlegelberger, B. and Wilkens, L. (2006) Assessment of differentiation and progression of hepatic tumors using array-based comparative genomic hybridization. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **4**, 1283-1291.
- Storb, U., Peters, A., Klotz, E., Kim, N., Shen, H.M., Hackett, J., Rogerson, B. and Martin, T.E. (1998) Cis-acting sequences that affect somatic hypermutation of Ig genes. *Immunol Rev*, **162**, 153-160.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strasser, A., Harris, A.W., Vaux, D.L., Webb, E., Bath, M.L., Adams, J.M. and Cory, S. (1990) Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol*, **166**, 175-181.
- Strolin Benedetti, M., Rumigny, J.F. and Dostert, P. (1984) [Mechanisms of action and biochemical toxicology of valproic acid]. *Encephale*, **10**, 177-188.
- Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T. and Tarakhovskiy, A. (2003) Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*, **4**, 124-131.
- Su, R.C., Brown, K.E., Saaber, S., Fisher, A.G., Merkenschlager, M. and Smale, S.T. (2004) Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat Genet*, **36**, 502-506.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. and Tajima, S. (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*, **279**, 27816-27823.
- Sugimoto, K., Shibata, A. and Himeno, M. (1998) Nucleotide specificity at the boundary and size requirement of the target sites recognized by human centromere protein B (CENP-B) in vitro. *Chromosome Res*, **6**, 133-140.
- Sullivan, B.A. and Karpen, G.H. (2004) Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1076-1083.
- Suzuki, M.M. and Bird, A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, **9**, 465-476.
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R. and Gasser, S.M. (2004) The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet*, **38**, 305-345.
- Taddei, A., Maisson, C., Roche, D. and Almouzni, G. (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol*, **3**, 114-120.
- Tagarro, I., Fernandez-Peralta, A.M. and Gonzalez-Aguilera, J.J. (1993) Digestion of centromeric DNA from each human metaphase chromosome by the 6 bp-restriction enzyme *StuI*. *Histochemistry*, **99**, 453-456.
- Tagarro, I., Fernandez-Peralta, A.M. and Gonzalez-Aguilera, J.J. (1994) Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet*, **93**, 383-388.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L. and Rao, A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, **324**, 930-935.
- Takaishi, S., Okumura, T. and Wang, T.C. (2008) Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol*, **26**, 2876-2882.
- Takizawa, T., Meaburn, K.J. and Misteli, T. (2008) The meaning of gene positioning. *Cell*, **135**, 9-13.

- Talasz, H., Lindner, H.H., Sarg, B. and Helliger, W. (2005) Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J Biol Chem*, **280**, 38814-38822.
- Talbert, P.B., LeCiel, C.D. and Henikoff, S. (1994) Modification of the Drosophila heterochromatic mutation brownDominant by linkage alterations. *Genetics*, **136**, 559-571.
- Terranova, R., Sauer, S., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (2005) The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Exp Cell Res*, **310**, 344-356.
- Thangavelu, M., Olopade, O., Beckman, E., Vardiman, J.W., Larson, R.A., McKeithan, T.W., Le Beau, M.M. and Rowley, J.D. (1990) Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of patients with lymphoid malignancies characterized by both t(14;18)(q32;q21) and t(8;14)(q24;q32) or t(8;22)(q24;q11). *Genes Chromosomes Cancer*, **2**, 147-158.
- Tian, X. and Fang, J. (2007) Current perspectives on histone demethylases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **39**, 81-88.
- Ting, A.H., McGarvey, K.M. and Baylin, S.B. (2006) The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev*, **20**, 3215-3231.
- Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J. and Kallioniemi, O.P. (1998) Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 177-184.
- Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F. and de Laat, W. (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell*, **10**, 1453-1465.
- Tomlinson, G.E., Douglass, E.C., Pollock, B.H., Finegold, M.J. and Schneider, N.R. (2005) Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer*, **44**, 177-184.
- Tommerup, H., Dousmanis, A. and de Lange, T. (1994) Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol*, **14**, 5777-5785.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581.
- Torring, N., Borre, M., Sorensen, K.D., Andersen, C.L., Wiuf, C. and Orntoft, T.F. (2007) Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer*, **96**, 499-506.
- Trojer, P. and Reinberg, D. (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, **28**, 1-13.
- Tumbar, T. and Belmont, A.S. (2001) Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nat Cell Biol*, **3**, 134-139.
- Turner, B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, **22**, 836-845.
- Turner, B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell*, **111**, 285-291.
- Turner, B.M. (2007) Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*, **9**, 2-6.
- Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y. and 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**, 1296-1300.
- Vagnarelli, P., Ribeiro, S.A. and Earnshaw, W.C. (2008) Centromeres: old tales and new tools. *FEBS Lett*, **582**, 1950-1959.
- Vairo, G., Innes, K.M. and Adams, J.M. (1996) Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene*, **13**, 1511-1519.
- Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H. and Blobel, G.A. (2006) Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol*, **26**, 9185-9195.
- Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W. and van Lohuizen, M. (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, **118**, 409-418.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S.M. (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, **119**, 777-788.
- van Attikum, H. and Gasser, S.M. (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*, **19**, 207-217.
- van Dekken, H., Wink, J.C., Vissers, K.J., van Marion, R., Koppert, L.B., Tilanus, H.W., Siersema, P.D., Tanke, H.J., Szuhai, K. and Hop, W.C. (2006) Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 516-525.
- Van Den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., Khochbin, S. and Gazeri, S. (2008) Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 7237-7245.
- Vanasse, G.J., Concannon, P. and Willerford, D.M. (1999) Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood*, **94**, 3997-4010.
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R. and Reinberg, D. (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*, **20**, 1256-1261.
- Vaute, O., Nicolas, E., Vandel, L. and Trouche, D. (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, **30**, 475-481.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. and Moazed, D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
- Verdel, A. and Moazed, D. (2005) RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett*, **579**, 5872-5878.

- Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M. and Touat-Todeschini, L. (2009) Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol*, **53**, 245-257.
- Verdin, E., Dequiedt, F. and Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, **19**, 286-293.
- Vogel, M.J., Pagie, L., Talhout, W., Nieuwland, M., Kerkhoven, R.M. and van Steensel, B. (2009) High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model. *Epigenetics Chromatin*, **2**, 1.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Voullaire, L.E., Slater, H.R., Petrovic, V. and Choo, K.H. (1993) A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am J Hum Genet*, **52**, 1153-1163.
- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. and Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nat Genet*, **23**, 62-66.
- Wagschal, A., Sutherland, H.G., Woodfine, K., Henckel, A., Chebli, K., Schulz, R., Oakey, R.J., Bickmore, W.A. and Feil, R. (2008) G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. *Mol Cell Biol*, **28**, 1104-1113.
- Wahlfors, J., Hiltunen, H., Heinonen, K., Hamalainen, E., Alhonen, L. and Janne, J. (1992) Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **80**, 2074-2080.
- Walters, M.C., Magis, W., Fiering, S., Eidemiller, J., Scalzo, D., Groudine, M. and Martin, D.I. (1996) Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes Dev*, **10**, 185-195.
- Wang, G.G., Allis, C.D. and Chi, P. (2007) Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med*, **13**, 373-380.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W. and Zhao, K. (2009) Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, **138**, 1019-1031.
- Watanabe, H., Soejima, K., Yasuda, H., Kawada, I., Nakachi, I., Yoda, S., Naoki, K. and Ishizaka, A. (2008) Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int*, **8**, 15.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 457-466.
- Weiler, K.S. and Wakimoto, B.T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, **29**, 577-605.
- Weissman, B. and Knudsen, K.E. (2009) Hijacking the chromatin remodeling machinery: impact of SWI/SNF perturbations in cancer. *Cancer Res*, **69**, 8223-8230.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao, M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K. and Peters, J.M. (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, **451**, 796-801.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I. and Laird, P.W. (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet*, **39**, 157-158.
- Williams, R.R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (2006) Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the *Mash1* locus. *J Cell Sci*, **119**, 132-140.
- Willis, T.G. and Dyer, M.J. (2000) The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*, **96**, 808-822.
- Windle, J., Prystowsky, E.N., Miles, W.M. and Heger, J.J. (1987) Pharmacokinetic and electrophysiologic interactions of amiodarone and procainamide. *Clin Pharmacol Ther*, **41**, 603-610.
- Wolffe, A.P. and Kurumizaka, H. (1998) The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **61**, 379-422.
- Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 130-135.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Wreggett, K.A., Hill, F., James, P.S., Hutchings, A., Butcher, G.W. and Singh, P.B. (1994) A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet*, **66**, 99-103.
- Wu, K.J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J. and Dalla-Favera, R. (1999) Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet*, **21**, 220-224.
- Wu, L.P., Wang, X., Li, L., Zhao, Y., Lu, S., Yu, Y., Zhou, W., Liu, X., Yang, J., Zheng, Z., Zhang, H., Feng, J., Yang, Y., Wang, H. and Zhu, W.G. (2008) Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. *Mol Cell Biol*, **28**, 3219-3235.

- Wu, Q., Kumagai, T., Kawahara, M., Ogawa, H., Hiura, H., Obata, Y., Takano, R. and Kono, T. (2006) Regulated expression of two sets of paternally imprinted genes is necessary for mouse parthenogenetic development to term. *Reproduction*, **131**, 481-488.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C. and Allis, C.D. (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, **442**, 86-90.
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K. and Li, E. (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, **236**, 87-95.
- Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J. and Viegas-Pequignot, E. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, **402**, 187-191.
- Yang, Q., Riblet, R. and Schildkraut, C.L. (2005) Sites that direct nuclear compartmentalization are near the 5' end of the mouse immunoglobulin heavy-chain locus. *Mol Cell Biol*, **25**, 6021-6030.
- Yang, X.J. and Seto, E. (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, **26**, 5310-5318.
- Yano, T., van Krieken, J.H., Magrath, I.T., Longo, D.L., Jaffe, E.S. and Raffeld, M. (1992) Histogenetic correlations between subcategories of small noncleaved cell lymphomas. *Blood*, **79**, 1282-1290.
- Yasui, D.H., Peddada, S., Bieda, M.C., Vallero, R.O., Hogart, A., Nagarajan, R.P., Thatcher, K.N., Farnham, P.J. and Lasalle, J.M. (2007) Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19416-19421.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P. and Dalla-Favera, R. (1997) The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*, **16**, 161-170.
- Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K. and Okazaki, T. (2000) Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7266-7271.
- Yoo, C.B. and Jones, P.A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 37-50.
- Young, J.I., Hong, E.P., Castle, J.C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A.B., Rose, M.F., Kang, D., Richman, R., Johnson, J.M., Berget, S. and Zoghbi, H.Y. (2005) Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17551-17558.
- Yu, J.N., Xue, C.Y., Wang, X.G., Lin, F., Liu, C.Y., Lu, F.Z. and Liu, H.L. (2009) 5-AZA-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) leads to down-regulation of Dnmt1o and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Zygote*, **17**, 137-145.
- Yunis, J.J. (1987) Multiple recurrent genomic rearrangements and fragile sites in human cancer. *Somat Cell Mol Genet*, **13**, 397-403.
- Yunis, J.J., Frizzera, G., Oken, M.M., McKenna, J., Theologides, A. and Arnesen, M. (1987) Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med*, **316**, 79-84.
- Zhang, L., Liu, Y., Yang, S., Gao, C., Gong, H., Feng, Y. and He, Z.G. (2009) Archaeal eukaryote-like Orc1/Cdc6 initiators physically interact with DNA polymerase B1 and regulate its functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 7792-7797.
- Zhang, Z., Espinoza, C.R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G.S., Burrows, P.D., Hagman, J., Feeney, A.J. and Cooper, M.D. (2006) Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nat Immunol*, **7**, 616-624.
- Zhimulev, I.F., Belyaeva, E.S., Bgatov, A.V., Baricheva, E.M. and Vlassova, I.E. (1988) Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. II. Peculiarities of morphology and genetic activity of the 2B region in the T(1;2)dorvar7 chromosome in males. *Chromosoma*, **96**, 255-261.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2000) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med*, **191**, 631-640.
- Zink, D., Amaral, M.D., Englmann, A., Lang, S., Clarke, L.A., Rudolph, C., Alt, F., Luther, K., Braz, C., Sadoni, N., Rosenecker, J. and Schindelhauer, D. (2004) Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol*, **166**, 815-825.
- Zudaire, I., Odero, M.D., Caballero, C., Valenti, C., Martinez-Penuela, J.M., Isola, J. and Calasanz, M.J. (2002) Genomic imbalances detected by comparative genomic hybridization are prognostic markers in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*, **40**, 547-555.

Thèses :

Barki-Celli Leila
Eymery Angeline
Lefebvre Christine

ANNEXE
REVUE

Genetics and epigenetics of 1q rearrangements in hematological malignancies

A. Fournier^a A. Florin^a C. Lefebvre^{a,b} F. Solly^{a,b} D. Leroux^{a,b}
M.B. Callanan^{a,b}

^aEquipe 'Oncogenic pathways in the hematological malignancies', INSERM/UJF Research Centre U823, Institut Albert Bonniot – UJF Pôle Santé, BP 170, and ^bCellular and Molecular Hematology Unit, CHU de Grenoble, Grenoble (France)

Manuscript received 22 December 2006; accepted in revised form for publication by L. Cannizzaro, 9 February 2007.

Abstract. Recently, we and others have described a novel class of chromosome aberrations that involves constitutive heterochromatin on human chromosome 1 (cytogenetic band 1q12). These anomalies are particularly frequent in B cell non-Hodgkins lymphoma (NHL) and multiple myeloma (MM) and, remarkably, almost invariably involve partial or total gain of chromosome 1q (including 1q12 heterochromatin) and the formation of novel heterochro-

matin/euchromatin junctions. This review discusses the pathological significance of these anomalies in light of i) recent integrated gene expression and array comparative genomic hybridisation (aCGH) profiling in MM and ii) increasing evidence of a key role for heterochromatin in the control of normal and pathological gene silencing.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Haematological malignancies arise as a consequence of abnormal differentiation arrest and subsequent anarchic proliferation of the transformed progeny in either bone marrow, lymph nodes or other anatomic sites, depending on the specific tissue homing properties of the cell of origin (brain, skin...). Germinal-centre-derived B cell lymphomas are commonly associated with chromosome translocations

that activate expression of genes which directly or indirectly control B cell differentiation. Many of these translocations are thought to arise as a consequence of illegitimate immunoglobulin gene rearrangement, somatic hypermutation or class switch recombination. These events induce transcriptional deregulation on adjacent genes in neoplastic B cells through the action of strong transcriptional lymphoid-specific enhancers, derived from the immunoglobulin gene loci (Kuppers et al., 1999). Though not very precisely characterised at the present time, an important facet of enhancer activity is the ability to open up chromatin to regulatory factors. As such, immunoglobulin gene enhancer-linked chromosome translocations have been intensively studied and represent a model for abnormal gene activation in cancer cells.

Recently, we and others have described a novel category of chromosome aberrations that involves constitutive heterochromatin on human chromosome 1 (cytogenetic band 1q12) (Busson-Le Coniat et al., 1999; Le Baccon et al., 2001; Itoyama et al., 2002). Remarkably, these anomalies almost invariably involve partial or total gain of chromosome 1q (including 1q12 heterochromatin) and the formation of novel heterochromatin/euchromatin junctions. Chromo-

We acknowledge the Fondation de France, the Institut National du Cancer (EpiPro network), the Région Rhone-Alpes programme 'Thématique prioritaire – Cancer', the canceropôle CLARA (EpiMed), the Ligue Nationale Contre le Cancer – Comité de l'Isère, the Délégation Régionale de la Recherche Clinique – CHU de Grenoble and the ARAMIS association for generous financial support. Alexandra Fournier is the recipient of doctoral funding from the Ministère de l'Éducation; Anne Florin of post-doctoral funding from ARC-ARECA network 'epigenetic profiling in breast and haematological tumours'; Mary Callanan of a 'Contrat d'Interface INSERM/Grenoble University Hospital Centre.

Request reprints from Mary Callanan
Team 7 – Oncogenic Pathways in the Hematological Malignancies
INSERM Research Centre U823, Institut Albert Bonniot –
UJF Pôle Santé, BP 170, FR–38042 Grenoble cedex 09 (France)
telephone: +33 476549584; fax: +33 476549413
e-mail: mary.callanan@ujf-grenoble.fr

some 1q rearrangement is a particularly frequent event in a broad spectrum of human cancers. It is observed in Burkitt lymphoma (BL), Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL), Follicular Lymphoma (FL) and B cell acute leukaemias (B-ALL) (Le Baccon et al., 2001). Importantly, 1q rearrangement is among the most frequent events observed in multiple myeloma (MM) (Avet-Loiseau et al., 1997; Cigudosa et al., 1998; Sawyer et al., 1998, 2005; Le Baccon et al., 2001; Liebisch et al., 2003; Gutierrez et al., 2004) where it is associated with deregulated 1q gene expression, disease progression and poor prognosis (Carrasco et al., 2006; Hanamura et al., 2006; Shaughnessy Jr et al., 2006; Zhan et al., 2006a). Significantly the major 1q breakpoint observed in B cell non-Hodgkin lymphoma and MM localises to the 1q12 heterochromatin region (Le Baccon et al., 2001). Rearrangement of 1q has also been described in T cell lymphoma (Oshiro et al., 2006), in the myeloproliferative disorders (Andrieux et al., 2003; Sambani et al., 2005) and in numerous solid tumours (Hattinger et al., 2002; Lu et al., 2002; Zudaire et al., 2002; Cheng et al., 2004; Tomlinson et al., 2005; Mendrzyk et al., 2006; Stange et al., 2006; van Dekken et al., 2006).

In view of the unique structural features of 1q rearrangements in lymphoma and MM, and the recurrent involvement of 1q12 constitutive heterochromatin in these events, they are likely to drive complex oncogenic processes that target multiple genes through both genetic and epigenetic mechanisms. Based on i) recent integrated gene expression and array comparative genomic hybridisation (aCGH) profiling in multiple myeloma and ii) increasingly abundant literature pointing to an important role for heterochromatin in the control of normal and pathological gene silencing, this review discusses the genetics and epigenetics of 1q rearrangements in haematological malignancies.

Genetic impact of 1q rearrangements in haematological malignancies – insights from aCGH and gene expression profiling in multiple myeloma

Gene expression profiling has amply contributed to improved molecular characterisation of the haematological malignancies (Staudt, 2003). More recently, the integration of genomic- (conventional cytogenetics/FISH, array-CGH...) with transcriptome-profiling has allowed assessment of how gene expression profiles are linked to genetic abnormalities in tumour cells. In this setting, recent landmark studies in multiple myeloma (MM) have shed considerable light on the pathological impact of 1q rearrangements in this disorder (Carrasco et al., 2006; Shaughnessy Jr et al., 2006; Zhan et al., 2006a, b).

MM which is caused by malignant transformation of plasma cells that subsequently home to and accumulate in the bone marrow is characterised by numerous structural and numerical chromosome aberrations (Avet-Loiseau et al., 2007). It has been hypothesised that MM pathogenesis proceeds via two major oncogenic pathways. Hyperdiploid MM involves multiple trisomies of chromosomes 3, 5, 7, 9,

11, 15, 19 and 21 whereas non-hyperdiploid MM are associated with recurrent *IGH* gene translocations and are generally shown to be of poorer prognosis (Fonseca et al., 2004).

In order to identify genetic events underlying the genesis and progression of MM, Carrasco et al. (2006) have recently performed a high-resolution analysis of recurrent copy number alterations (CNAs) and gene expression profiles in a collection of MM cell lines (47) and a panel of newly diagnosed MM patients (67) for which detailed clinical annotation was available. All patients were treated with high-dose chemotherapy followed by tandem transplants and had a median follow-up of 43 months (range 5–65 months) (Barlogie et al., 2006).

In keeping with the molecular heterogeneity of MM, unsupervised clustering and non-negative matrix factorization of high resolution aCGH data uncovered distinct genomic subtypes of prognostic significance (Carrasco et al., 2006). A major finding was that hyperdiploid MM could be further subdivided into two groups, one exhibiting trisomies of the odd chromosomes (3, 5, 9, 11, 15, 19 and 21) and a second exhibiting, in addition, gains of chromosomes 1q and 7, deletion of chromosome 13 and absence of trisomy 11. Significantly, poor survival was associated with gain of 1q and/or loss of 13q.

Further integration with expression data generated a refined list of MM gene candidates residing within these minimal common regions (MCRs). In particular this analysis revealed a marked enrichment in overexpressed genes residing at 1q21→q23 (spans approximately 143–158 kb). Significantly overexpressed genes (of a list of 44) included previously identified target genes for 1q rearrangements in B cell malignancies (*BCL9*, *MLLT11*, *JTB* and *FCRL5*), genes known to play a role in MM pathobiology (*IL6R*, *MCL1*...) and other novel, functionally diverse genes not previously shown to be involved in MM. It is also interesting to note the presence of one microRNA gene within this 1q region (*hsa-mir-9-1*) (Carrasco et al., 2006).

Overall, this integrated aCGH/transcriptome analysis identified 87 discrete MCRs of amplification/deletion of strong biological and clinical significance in MM. Interestingly, 20% of these 87 high priority MCRs contain microRNAs (Carrasco et al., 2006). It will be important to investigate the expression status and pathological relevance of these genes in this disorder.

Further evidence for the importance of 1q gene deregulation in the pathogenesis or progression of MM has been obtained from unsupervised hierarchic clustering of transcriptome data from 414 newly diagnosed MM patients (Zhan et al., 2006a). This study allowed identification of seven disease subtypes that were strongly influenced by known genetic anomalies such as recurrent *IGH* gene translocations that target *cMAF*- and *MAFB*, *CCND1*, *CCND3* and *WHSC1* or hyperdiploidy. MM cases falling into poor-risk groups characterised by a proliferation signature or *MMSET* deregulation, showed significant overexpression of genes mapping to 1q. This 1q gene overexpression was not evident in the other five groups identified and thus seemed to be linked to the presence of a proliferation signature.

Whether 1q gene deregulation is a marker of or causal in the acquisition of the proliferation signature is not known at the present time (Zhan et al., 2006a).

The importance of 1q gain and/or overexpression of 1q genes in MM progression and prognosis is also evident from transcriptome profiling in a large series of MM and the related disorders, benign monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering MM (SMM) (Zhan et al., 2006b). In this study, Significance Analysis of Microarrays identified a set of 52 genes, that were involved in important pathways in cancer and were differentially expressed between plasma cells from healthy individuals and patients with MGUS/SMM and symptomatic MM (Zhan et al., 2006b). In addition, the presence of an MGUS signature in MM (termed MGUS-like MM) was linked to good prognosis. Interestingly, interphase FISH analysis showed 1q gain/amplification to be less frequent in MGUS-like MM relative to other MM and the negative prognostic impact of ampl1q21 was only seen in the non-MGUS-like MM (Zhan et al., 2006b). In keeping with this, previous FISH or aCGH-defined gains/amplifications of 1q in MM tumor cells have been linked to inferior survival (Hanamura et al., 2006) or progression of SMM to overt disease (Rosinol et al., 2005).

Detailed gene expression profiling and bioinformatics analyses (log rank tests of expression quartiles) in the tumor cells of a large series of newly diagnosed MM patients (532, treated on two separate protocols) identified 70 genes, that were linked to early disease-related death. 30% of these genes mapped to chromosome 1 (Shaughnessy Jr et al., 2006). Importantly, the majority of up-regulated genes mapped to chromosome 1q and of down-regulated genes mapped to chromosome 1p. Thus this data provides a strong indication that transcriptional deregulation of genes mapping to chromosome 1 may contribute to disease progression in MM and that expression profiling can be used to identify high-risk disease (Shaughnessy Jr et al., 2006).

Finally, a recent transcriptional profiling study, in a series of 77 MM patients, identified 61 genes that distinguished MM cases with 1q gain (1q/gain) from those without (1q/normal). 41 of the 43 upregulated genes mapped to 1q12→q44 whereas a significant proportion of the down-regulated genes was localized on chromosomes 13q and 11. While the 1q gene list did not include the *IL6R* or *CKS1B* genes, previously identified MM 1q target genes, such as *PSMD4*, *UBAP2L* and *UBE2Q1*, were present (Fabris et al., 2007). Interestingly, these 1q genes are implicated in the ubiquitin-proteasome pathway; *PSMD4* encodes the 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 and *UBE2Q1* encodes a putative member of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme family.

An issue that remains to be resolved is why a recurring MM-specific 1q gene expression signature has not been identified across all transcriptome analyses. This may reflect differences in sample populations and data mining approaches. Indeed, alternative data mining strategies in other MM series have revealed other candidate genes of potential interest in this disorder (Moreaux et al., 2006; Condomines et al., 2007). Of note is the identification of

CD200 – a membrane glycoprotein involved in the suppression of T cell-mediated immune responses – as a novel prognostic indicator in MM (Moreaux et al., 2006).

Alternatively, it is possible that the manner and ‘differentiation window’ in which 1q gain is achieved in tumour cells may favour particular types of 1q rearrangement (1q breakpoint heterogeneity?) and/or patterns of 1q gene deregulation. In support of this, FISH-defined amplification of 1q21 has been shown to be absent in MGUS: its presence in a subset of patients with SMM was associated with a higher risk of conversion to MM (Rosinol et al., 2005; Hanamura et al., 2006). Likewise, we have identified 1q12 juxtacentromeric heterochromatin as the single most frequent 1q breakpoint site in DLBCL, FL, BL and MM patients but this breakpoint is rarely observed in marginal zone or small lymphocytic lymphoma (Le Baccon et al., 2001). Also, 1q duplication (dup1q) is particularly frequent in Burkitt lymphoma but is relatively infrequent elsewhere.

In this setting, it will be of considerable interest to assess the incidence of 1q constitutive heterochromatin rearrangements, for example, in the MM patient series that have been studied by gene expression profiling. It should be pointed out that CGH arrays generally do not contain probes to repeat-rich regions (1q12 is enriched in satellite II repeats). Addressing these issues will help to define whether 1q gain/1q gene deregulation is causal or simply a surrogate marker for high risk disease in MM and should help to shed light on the role of heterochromatin abnormalities in this disorder.

Finally, the non-random, secondary nature of 1q anomalies in B cell non-Hodgkin lymphoma is strongly suggestive of a role in tumour progression. Indeed, early cytogenetic studies identified a negative prognostic impact for 1q rearrangements in DLBCL (Offit et al., 1991). Recent integrated aCGH/FISH and transcriptome profiling in DLBCL and BL, although confirming the frequency of 1q alterations, have not as yet delivered specific information on the biological significance of 1q alterations/gene deregulation in these disorders (Bea et al., 2005; Dave et al., 2006; Hummel et al., 2006). Array CGH has, however, identified frequent 1q gain in the germinal centre B cell-like DLBCL molecular subgroup compared to the activated B-cell-like subgroup (Tagawa et al., 2005).

Constitutive heterochromatin, gene silencing and epigenetic cancer mechanisms: implications for 1q-linked oncogenic mechanisms in haematological malignancies?

While 1q rearrangements are clearly associated with 1q gene deregulation, at least in MM, they are also likely to drive oncogenesis through other mechanisms that are linked to the unusual structural features of the rearrangements. In particular, as stated earlier, we and others have found that the 1q12 satellite II-rich constitutive heterochromatin region is a remarkably recurring breakpoint in a majority of DLBCL, FL and MM cases with 1q rearrangements

(Le Baccon et al., 2001). Indeed, we have observed MM cases with multiple copies of 1q12 heterochromatin in a single cell (Le Baccon et al., 2001). Taken together, this is strong evidence of heterochromatin-dependent oncogenic mechanisms in these disorders. It should be noted that 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements, unless specifically searched for with appropriate probe sets, are largely missed by conventional FISH or aCGH mapping approaches (repeat-sequence probes are selectively excluded from CGH arrays).

Constitutive heterochromatin is now recognised as performing a key role in the epigenetic regulation of gene expression, through a process termed gene silencing. We hypothesize that heterochromatin-dependent oncogenic mechanisms may contribute significantly to the pathogenesis of DLBCL, FL and MM with 1q rearrangements. In this setting, the second part of this review provides a brief overview of constitutive heterochromatin and gene silencing, followed by examples of its perturbation in cancer cells.

The epigenome, an overview

The epigenome refers to the totality of the reversible and inheritable information that is not directly coded by the genome. Epigenetic information is encoded by chemical modifications to DNA or histones which, when assembled into nucleosomes, form the basic structural and functional building blocks of chromatin. A major discovery in recent years has been the realisation that these modifications ('marks') constitute the basis of an epigenetic code that is capable of controlling genome structure and function (Strahl and Allis, 2000). This code operates through modulation of chromatin accessibility to factors that control gene transcription, DNA replication and repair. The 'writing' and functional read-out of this epigenetic code depends on specific and tightly regulated signalling pathways. For example, histone acetylation which facilitates the formation of an 'open' chromatin structure (euchromatin) is mediated by histone acetyl transferases (HATs). Removal of 'acetylation marks' and subsequent formation of 'closed' chromatin structures (heterochromatin) is mediated by histone deacetylases (HDACs). In recent years it has become increasingly evident that histone modifications constitute a combinatorial, indexing system for the dynamic and functional compartmentalization of chromatin. For example, trimethylation of histone H3-K9 is an epigenetic mark for transcriptionally repressed heterochromatin while acetylation at H3-K4 is associated with transcriptional activation (Fischle et al., 2003). This chromatin indexing is now thought to be rendered possible in large part through the action of specialised chromatin binding proteins that specifically read or recognise and subsequently bind these modifications. For example, the binding of acetylated histones is mediated by bromodomain-bearing proteins while methylated histones are recognised and bound by chromodomain-bearing proteins such as HP1 (binds trimethylated H3-K9 (Fischle et al., 2003; Nightingale et al., 2006)) or plant homeodomain-bearing proteins (PHD) in the case of trimethylated H3-K4

which epigenetically 'marks' transcriptionally active chromatin (Mellor, 2006).

During development and differentiation, cellular phenotypes are stably propagated through numerous cell divisions. This epigenetic 'cell memory' helps to maintain stable patterns of gene expression. Particularly exciting is the increasing probability that DNA methylation, post-translational histone modification and differential incorporation of histone variants into individual or groups of nucleosomes play a vital role in chromatin compartmentalization and the inheritance and maintenance of cellular memory (Turner, 2002; Govin et al., 2005; Hake and Allis, 2006).

In view of the importance of this epigenetic code in controlling DNA function it is not surprising to find that epigenetic deregulation has emerged as a key event in the development of diseases such as cancer (Lund and van Lohuizen, 2004). Examples of disturbed chromatin structure in cancer include global reductions in monoacetylated H4-K16 and trimethylated H4-K20 – hallmarks of euchromatin and heterochromatin, respectively (Fraga et al., 2005). Indeed, an 'epigenetic progenitor' model for the origin of cancer has recently been proposed (Feinberg et al., 2006). This new model proposes that cancer has a fundamentally common basis that is rooted in a polyclonal epigenetic disruption of stem/progenitor cells, mediated by 'tumour-progenitor genes'. Thus, tumour cell heterogeneity is in part due to epigenetic variation in progenitor cells and epigenetic and genetic instability in tumour progression (Feinberg et al., 2006). This new concept has far-reaching implications for cancer prevention and therapy.

Constitutive heterochromatin and gene silencing

Constitutive heterochromatin is a specialised compartment within the chromatin and is found primarily at centromeres, telomeres and the pericentromeric regions of certain chromosomes (Grewal and Jia, 2007). Constitutive heterochromatin is distinguished from facultative heterochromatin on the basis that it remains constitutively condensed throughout the cell cycle. It is composed of gene-poor, repetitive DNA sequences (alpha satellite, satellite II and III) that show distinct epigenetic features i.e. late-replication, high levels of DNA methylation and 'repressive' histone codes such as histone H3-K9 and H3-K20 trimethylation (Grewal and Jia, 2007). While the precise mechanisms for the assembly and maintenance of constitutive heterochromatin in mammalian cells are not clearly established, histone modifications and HP1 binding appear to have a crucial role. Evidence also exists for a role of an RNA component in heterochromatin formation (Bernstein and Allis, 2005; Grewal and Jia, 2007).

Apart from its role in the control of genomic stability, constitutive heterochromatin participates in the epigenetic regulation of gene expression in numerous species through a highly conserved mechanism known as gene silencing. This phenomenon results from heterochromatin spreading into adjacent euchromatin and induces gene repression (Fisher and Merckenschlager, 2002; Talbert and Henikoff, 2006; Grewal and Jia, 2007). Recent data indicates that this

mechanism also operates in mammalian cells. For example, during lymphoid development, stable transcriptional repression of certain lymphoid-specific genes is tightly correlated to their association with constitutive heterochromatin and formation of repressive histone codes (Brown et al., 1997, 1999; Grogan et al., 2001; Su et al., 2004).

Evidence exists that perinuclear localisation of heterochromatin, at least in yeast, facilitates heterochromatin-induced transcriptional silencing (Andrulis et al., 1998). It is also clear that genes are non-randomly positioned within the nucleus and that proximity to heterochromatin influences transcriptional activity (Cremer and Cremer, 2001; Chubb and Bickmore, 2003; Spector, 2003). For instance, it has been shown that the gene-rich human chromosome 19 preferentially localises to the nuclear interior whereas the relatively gene-poor chromosome 18 is localised to the nuclear periphery (Croft et al., 1999) although this organisation appears to be partially lost in tumour cells (Cremer et al., 2003). Furthermore, the spatial organisation of chromosome territories is largely conserved in higher primates (Tanabe et al., 2002), and depends on both cell type (Alcobia et al., 2000, 2003; Cremer et al., 2003) and cell cycle stage (Vourc'h et al., 1993; Walter et al., 2003).

Differential nuclear positioning of genes down- or up-regulated during B and T lymphocyte development has been described: these include the *RAG1* and *RAG2* genes during B and T lymphocyte development and cytokine genes during TH1 or TH2 polarisation in T lymphocyte differentiation (Brown et al., 1999; Grogan et al., 2001). Specific positioning of immunoglobulin gene loci, *IGH* and *IGK* loci has also been shown during murine B cell development (Kosak et al., 2002). A further example concerns the *VpreB1/λ5* loci which have been shown to undergo dynamic changes with respect to nuclear positioning and heterochromatin association in response to pre-B-cell receptor signalling, thereby providing a possible mechanism for their transcriptional silencing (Parker et al., 2005). Indeed, it has been proposed, in a rather elegant model, that reversible gene repression most likely involves local heterochromatinisation at target promoters whereas stable gene repression or silencing requires further repositioning of the repressed gene to constitutive heterochromatin foci (Fisher and Merckenschlager, 2002).

In this setting, it is interesting to note that 1q12 heterochromatin can recruit transcriptional regulators such as Ikaros and members of the Polycomb family (Saurin et al., 1998; Sewalt et al., 2002). In the case of Ikaros, heterochromatin interaction has been shown to require the DNA binding domain while Polycomb recruitment requires functional SUV39H1 histone methyltransferase activity (Saurin et al., 1998; Sewalt et al., 2002). KAP1/TIF1beta which is proposed to be a universal co-repressor protein for the KRAB zinc finger protein superfamily of transcriptional repressors has also been shown to be recruited to 1q12 heterochromatin (Ryan et al., 1999). The functional significance of these associations is not known but they may allow the formation of specialised transcriptional silencing compartments (1q12 heterochromatin-associated?) in the interphase nucleus.

Constitutive heterochromatin, cell stress, senescence and tumour suppression

Physiological processes such as the response to cell stress or the onset of cellular senescence also appear to be mediated through specialised constitutive heterochromatin compartments. At the cellular level, a very striking effect of stress is the rapid and reversible redistribution of HSF1 into nuclear structures termed nuclear stress granules which form primarily on the 9q12 locus in humans. Within these structures, HSF1 binds to satellite III repeated elements concomitant with satellite III repeat expression (Metz et al., 2004). Likewise, the formation of specialised senescence activated heterochromatin foci (SAHF) that exhibit features of constitutive heterochromatin such as enrichment in heterochromatin protein 1 (HP1), and histone H3-K9 trimethylation, appear to be linked to stable gene silencing during cellular senescence (Narita et al., 2003). These SAHF may provide a chromatin buffer preventing activation of proliferation genes in cells entering a senescent state thus providing a barrier to malignant transformation. In support of this, loss of senescence, resulting from decreased activity of the histone methyl transferase, SUV39H1, has been linked to rapid onset of lymphoma in mouse models of p53 or oncogenic RAS-driven oncogenesis (Braig et al., 2005).

Finally, oncogenic signalling may globally perturb heterochromatin regulated gene silencing. Indeed, constitutive JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila* (Shi et al., 2006). This remarkable finding would predict similar perturbations in human myeloproliferative disorders that show constitutive JAK signaling as a consequence of the recently identified JAK2 V617F mutation (Campbell and Green, 2006).

Taken together these data indicate a key role for constitutive heterochromatin in the control of normal and pathological gene silencing. An important challenge will be to determine whether chromosome anomalies that disturb constitutive heterochromatin compartments impact on these important epigenetic, regulatory mechanisms.

Epigenetic features of 1q12 constitutive heterochromatin rearrangements in B lymphoma cells

We have hypothesized that 1q12 constitutive heterochromatin anomalies in haematological malignancies might represent the molecular equivalent of heterochromatin rearrangements that provoke aberrant gene silencing by 'position effects' in other species such as *Drosophila* and yeast. As a first step towards testing this hypothesis, we have compared 1q12 heterochromatin organisation in normal and tumour B lymphocytes with 1q rearrangements. In keeping with our hypothesis, dramatic spatial disorganisation of 1q12 constitutive heterochromatin and partner chromosomes is observed in tumour B lymphocytes with 1q rearrangements (Barki-Celli et al., 2005). For example, in Burkitt lymphoma cells 1q12 heterochromatin duplication was associated with the formation of particularly large 1q12 het-

erochromatin foci that were displaced toward the nuclear interior (Barki-Celli et al., 2005).

We also found that 1q12 heterochromatin dynamically organises to the nuclear periphery in a non-random, cell cycle-dependent manner in normal B cells. Indeed, B cell activation, through antigen receptor engagement, was found to induce dramatic relocalisation of 1q12 domains to the extreme nuclear periphery. In addition, events which favoured increased local or global chromatin acetylation (enhancer activity or inhibition of HDAC inhibition) were associated with abnormal spatial positioning of 1q12 heterochromatin. Taken together, these findings suggest that aberrations affecting constitutive heterochromatin in lymphoma cells can induce long range epigenetic alterations that have the potential to induce gene silencing. Such 'position effects' may underpin, at least partially, the pathological role of particularly frequent 1q12 heterochromatin rearrangements in human tumours. It is also possible that the presence of excess constitutive heterochromatin in the same tumour cells might lead to inappropriate derepression of genes elsewhere in the genome. This might occur by 'titration' of key transcriptional regulators/heterochromatin 'components' away from their target genes and into constitutive heterochromatin compartments (Le Baccon et al., 2001). In this respect, it is worth noting that 1q/gain MM patients show overexpression of various cancer testis anti-

gen (CTA) genes (Chng et al., 2007). CTA are expressed in testis and malignant tumours but rarely in nongametogenic tissues. In this respect, they represent attractive targets for cancer vaccination approaches. Efforts to systematically analyse the expression pattern of CTA are now underway (Condomines et al., 2007).

Integrated genomic, transcriptomic and epigenomic profiling will be required to gain a clear picture of how long-range epigenetic alterations associated with 1q12 constitutive heterochromatin abnormalities impact on gene expression and function in tumour B cells. Particular attention will have to be paid to the identification of copy number independent alterations in gene expression since these are likely to yield important information concerning epigenetically deregulated loci (Frigola et al., 2006; Stransky et al., 2006). Ultimately, these studies will have direct clinical relevance since epigenetic therapy is now a viable option for correction of epigenetic perturbations in cancer cells (Fandy et al., 2007; Taddei et al., 2005).

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Saadi Khochbin and Dr. Claire Vourc'h (INSERM U823) for stimulating discussions.

References

- Alcobia I, Dilao R, Parreira L: Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood* 95:1608–1615 (2000).
- Alcobia I, Quina AS, Neves H, Clode N, Parreira L: The spatial organization of centromeric heterochromatin during normal human lymphopoiesis: evidence for ontogenically determined spatial patterns. *Exp Cell Res* 290:358–369 (2003).
- Andrieux J, Demory JL, Caulier MT, Agape P, Wetterwald M, et al: Karyotypic abnormalities in myelofibrosis following polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 140:118–123. (2003).
- Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R: Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394:592–595 (1998). Erratum, *Nature* 395:525 (1998).
- Avet-Loiseau H, Vigier M, Moreau A, Mellerin MP, Gaillard F, et al: Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80% of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 97:119–122 (1997).
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, et al: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 109:3489–3495 (2007).
- Barki-Celli L, Lefebvre C, Le Baccon P, Nadeau G, Bonnefoix T, et al: Differences in nuclear positioning of 1q12 pericentric heterochromatin in normal and tumor B lymphocytes with 1q rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 43:339–349 (2005).
- Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, Shaughnessy J, Rasmussen E, et al: Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 354:1021–1030 (2006).
- Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, et al: Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106:3183–3190 (2005).
- Bernstein E, Allis CD: RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19:1635–1655 (2005).
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, et al: Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436:660–665 (2005).
- Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merken-schlager M, et al: Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91:845–854 (1997).
- Brown KE, Baxter J, Graf D, Merken-schlager M, Fisher AG: Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 3:207–217 (1999).
- Busson-Le Coniat M, Salomon-Nguyen F, Dastugue N, Maarek O, Lafage-Pochitaloff M, et al: Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 1 abnormalities in hematopoietic disorders: rearrangements of DNA satellite II and new recurrent translocations. *Leukemia* 13:1975–1981 (1999).
- Campbell PJ, Green AR: The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 355:2452–2466 (2006).
- Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, et al: High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 9:313–325 (2006).
- Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, et al: The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* 10:1251–1256 (2004).
- Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, Ahmann G, Price-Troska T, et al: Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* 67:2982–2989 (2007).
- Chubb JR, Bickmore WA: Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* 112:403–406 (2003).
- Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Odero MD, Michaeli J, et al: Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 91:3007–3010 (1998).
- Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, et al: Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol* 178:3307–3315 (2007).
- Cremer M, Kupper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, et al: Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162:809–820 (2003).
- Cremer T, Cremer C: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2:292–301 (2001).

- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, et al: Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145:1119–1131 (1999).
- Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, et al: Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354:2431–2442 (2006).
- Fabris S, Ronchetti D, Agnelli L, Baldini L, Morabito F, et al: Transcriptional features of multiple myeloma patients with chromosome 1q gain. *Leukemia* 21:1113–1116 (2007).
- Fandy TE, Carraway H, Gore SD: DNA demethylating agents and histone deacetylase inhibitors in hematologic malignancies. *Cancer J* 13:40–48 (2007).
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S: The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7:21–33 (2006).
- Fischle W, Wang Y, Allis CD: Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15:172–183 (2003).
- Fisher AG, Merckenschlager M: Gene silencing, cell fate and nuclear organisation. *Curr Opin Genet Dev* 12:193–197 (2002).
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, et al: Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 64:1546–1558 (2004).
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, et al: Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37:391–400 (2005).
- Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, et al: Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 38:540–549 (2006).
- Govin J, Caron C, Rousseaux S, Khochbin S: Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci* 30:357–359 (2005).
- Grewal SI, Jia S: Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8:35–46 (2007).
- Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, et al: Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14:205–215 (2001).
- Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, Lumberras E, Castellanos M, et al: Prognostic and biological significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 104:2661–2666 (2004).
- Hake SB, Allis CD: Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the 'H3 barcode hypothesis'. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6428–6435 (2006).
- Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, et al: Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 108:1724–1732 (2006).
- Hattinger CM, Potschger U, Tarkkanen M, Squire J, Zielenska M, et al: Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer* 86:1763–1769 (2002).
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, et al: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354:2419–2430 (2006).
- Itoyama T, Nanjung G, Chen W, Dyomin VG, Teruya-Feldstein J, et al: Molecular cytogenetic analysis of genomic instability at the 1q12–22 chromosomal site in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 35:318–328 (2002).
- Kosak ST, Skok JA, Medina KL, Riblet R, Le Beau MM, et al: Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296:158–162 (2002).
- Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341:1520–1529 (1999).
- Le Baccon P, Leroux D, Dascalescu C, Duley S, Marais D, et al: Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 32:250–264 (2001).
- Liebisch P, Wendl C, Wellmann A, Krober A, Schilling G, et al: High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia* 17:2535–2537 (2003).
- Lu YJ, Hing S, Williams R, Pinkerton R, Shipley J, et al: Chromosome 1q expression profiling and relapse in Wilms' tumour. *Lancet* 360:385–386 (2002).
- Lund AH, van Lohuizen M: Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18:2315–2335 (2004).
- Mellor J: It takes a PHD to read the histone code. *Cell* 126:22–24 (2006).
- Mendrzyk F, Korshunov A, Benner A, Toedt G, Pfister S, et al: Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. *Clin Cancer Res* 12:2070–2079 (2006).
- Metz A, Soret J, Vourc'h C, Tazi J, Jolly C: A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci* 117:4551–4558 (2004).
- Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, et al: CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 108:4194–4197 (2006).
- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, et al: Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113:703–716 (2003).
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM: Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16:125–136 (2006).
- Offit K, Jhanwar SC, Ladanyi M, Filippa DA, Chaganti RS: Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosomes Cancer* 3:189–201 (1991).
- Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, Karube K, Uike N, et al: Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 107:4500–4507 (2006).
- Parker MJ, Licence S, Erlandsson L, Galler GR, Chakalova L, et al: The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J* 24:3895–3905 (2005).
- Rosinol L, Carrio A, Blade J, Queralt R, Aymerich M, et al: Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol* 130:729–732 (2005).
- Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, et al: KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatin and euchromatin HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 19:4366–4378 (1999).
- Sambani C, La Starza R, Pierini V, Vandenberghe P, Gonzales-Aguilera JJ, et al: Leukemic recombinations involving heterochromatin in myeloproliferative disorders with t(1;9). *Cancer Genet Cytogenet* 162:45–49 (2005).
- Saurin AJ, Shiels C, Williamson J, Satijn DP, Otte AP, et al: The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 142:887–898 (1998).
- Sawyer JR, Tricot G, Mattox S, Jagannath S, Barlogie B: Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: Evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 91:1732–1741 (1998).
- Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, Binz RL, Tian E, et al: Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes Cancer* 42:95–106 (2005).
- Sewalt RG, Lachner M, Vargas M, Hamer KM, den Blaauwen JL, et al: Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol* 22:5539–5553 (2002).
- Shaughnessy Jr JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, et al: A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 109:2276–2284 (2006).
- Shi S, Calhoun HC, Xia F, Li J, Le L, et al: JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. *Nat Genet* 38:1071–1076 (2006).
- Spector DL: The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72:573–608 (2003).
- Stange DE, Radlwimmer B, Schubert F, Traub F, Pich A, et al: High-resolution genomic profiling reveals association of chromosomal aberrations on 1q and 16p with histologic and genetic subgroups of invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 12:345–352 (2006).
- Staudt LM: Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med* 348:1777–1785 (2003).
- Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45 (2000).
- Stransky N, Vallot C, Reyat F, Bernard-Pierrot I, de Medina SG, et al: Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer. *Nat Genet* 38:1386–1396 (2006).
- Su RC, Brown KE, Saaber S, Fisher AG, Merckenschlager M, et al: Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat Genet* 36:502–506 (2004).
- Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G: The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 6:520–524 (2005).
- Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, et al: Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 106:1770–1777 (2005).
- Talbert PB, Henikoff S: Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet* 7:793–803 (2006).
- Tanabe H, Muller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, et al: Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4424–4429 (2002).

- Tomlinson GE, Douglass EC, Pollock BH, Finegold MJ, Schneider NR: Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 177–184 (2005).
- Turner BM: Cellular memory and the histone code. *Cell* 111:285–291 (2002).
- van Dekken H, Wink JC, Vissers KJ, van Marion R, Koppert LB, et al: Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences. *Genes Chromosomes Cancer* 45:516–525 (2006).
- Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL, Ward DC: Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subtelomeric domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res* 205:142–151 (1993).
- Walter J, Schermelleh L, Cremer M, Tashiro S, Cremer T: Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J Cell Biol* 160:685–697 (2003).
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, et al: The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108:2020–2028 (2006a).
- Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, Huang Y, Williams DR, et al: A gene expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood* 109:1692–1700 (2006b).
- Zudaire I, Odero MD, Caballero C, Valenti C, Martinez-Penuela JM, et al: Genomic imbalances detected by comparative genomic hybridization are prognostic markers in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology* 40:547–555 (2002).

RESUME

Les réarrangements chromosomiques affectant la région d'hétérochromatine constitutive du chromosome 1 humain (bande cytogénétique 1q12) sont remarquablement fréquents dans les lymphomes, les myélomes, les leucémies aiguës et dans certaines tumeurs solides. Ceci suggère fortement l'existence de mécanismes oncogéniques dépendant de l'hétérochromatine constitutive dans ces maladies. Mes travaux de thèse montrent que ces réarrangements induisent des altérations profondes de l'organisation et de la fonction de la chromatine dans des cellules de lymphome B. Les conséquences majeures sont la formation de foyers hétérochromatiques aberrants résultant d'appariements intra-chromosomiques 'longue distance' entre le domaine d'hétérochromatine 1q12 réarrangé et le domaine centromérique. Ces foyers sont associés à un enrichissement de l'euchromatine adjacente en marques épigénétiques répressives, et à la répression de l'expression de gènes, parmi lesquels *GMCL1* et *MXD1* qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle de la signalisation P53 et MYC, respectivement. D'autre part, l'étude pilote de profiling transcriptionnel par puces Affymetrix dans des cas de lymphome avec ou sans anomalie de l'hétérochromatine 1q12 confirme et identifie de nouvelles cibles de dérégulation liées à l'hétérochromatine dans les lymphomes B non-Hodgkiniens. La compréhension du rôle de ces foyers hétérochromatiques aberrants présenterait un intérêt majeur pour les tumeurs hématologiques ou solides, puisque ces anomalies sont observées de manière fréquente et non-aléatoire dans un large spectre de tumeurs humaines, et sont associées à la progression tumorale et à un mauvais pronostic.

ABSTRACT

Chromosomal rearrangements targeting human chromosome 1 constitutive heterochromatin region (cytogenetic band 1q12) are remarkably frequent in lymphoma, myeloma, acute leukaemia and in some solid tumours. This highly suggests existence of constitutive heterochromatin-dependent oncogenic mechanisms in these diseases. My PhD works show that these rearrangements induce profound alterations of chromatin organisation and function in lymphoma B-cells. Major consequences are the formation of aberrant heterochromatic foci resulting from long range intra-chromosomal 'matching' between the rearranged 1q12 and centromeric regions. These foci are associated with an enrichment of adjacent euchromatic sequences in repressive epigenetic marks, and with deregulated expression of genes such as *GMCL1* and *MXD1* which encodes proteins involved in the control of P53 and MYC pathways, respectively. In the other hand, a pilot study of transcriptional profiling by Affymetrix arrays in cases of human lymphoma with or without 1q12 heterochromatin rearrangement confirms and identifies new targets for deregulation linked to heterochromatin in non-Hodgkin B-cell lymphoma. Understanding the role of these aberrant heterochromatic foci would be of major interest for haematological and solid tumours, since these anomalies are frequent and non-random in a large panel of human tumours, and are associated to tumour progression and poor prognosis.