



HAL
open science

Rôle d'histones méthyltransférases spécifiques de H3K9 dans l'équilibre prolifération et différenciation cellulaire

Valentine Battisti

► **To cite this version:**

Valentine Battisti. Rôle d'histones méthyltransférases spécifiques de H3K9 dans l'équilibre prolifération et différenciation cellulaire. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T092 . tel-01124181

HAL Id: tel-01124181

<https://theses.hal.science/tel-01124181>

Submitted on 6 Mar 2015

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.

Année 2013/2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

Champ disciplinaire : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

École Doctorale de rattachement : Cancérologie (ED 0418)

Présentée et soutenue publiquement par

Valentine BATTISTI

Le 10 Décembre 2013

Titre : Rôle d'histones méthyltransférases spécifiques de H3K9 dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire

Directeur de Thèse : AIT-SI-ALI Slimane

JURY

Dr LIPINSKI Marc : Président

Dr POLESSKAYA Anna : Rapportrice

Dr VANDROMME Marie : Rapportrice

Dr DANDOLO Luisa : Examinatrice

Dr AIT-SI-ALI Slimane : Directeur de thèse

Avant-propos

Chez les eucaryotes, l'expression des gènes dépend en partie du degré de compaction de la chromatine. La structure chromatinienne est régulée par des marques dites épigénétiques, telles que les modifications post-traductionnelles des protéines structurelles de la chromatine, les histones. Ainsi, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) sur le promoteur des gènes est essentiellement associée à la répression de la transcription. H3K9 est méthylée par différentes enzymes appelées lysine méthyltransférases (KMTs). L'objectif principal de mon projet de thèse a été de mieux comprendre le rôle de principales KMTs de H3K9, que sont G9a, GLP, Suv39h1 et SETDB1, dans la régulation de l'équilibre entre prolifération et différenciation terminale. Pour cela, j'ai utilisé le modèle de différenciation terminale de cellules du muscle squelettique. En effet, durant la différenciation terminale, les myoblastes arrêtent de proliférer et fusionnent entre eux pour former de longues cellules multinucléées que sont les myotubes. Ce processus implique, d'une part, l'expression des gènes de différenciation musculaire et, d'autre part, la répression irréversible des gènes associés à la prolifération cellulaire.

L'introduction bibliographique de ce travail de thèse est séparée en trois chapitres. Le premier chapitre porte sur la chromatine et ses modifications post-traductionnelles. Le second s'attache à décrire les rôles de la méthylation de H3K9 et, en particulier, des quatre KMTs sur lesquelles j'ai travaillé durant ma thèse : G9a, GLP, SETDB1 et Suv39h1. Dans le troisième chapitre, je présente le modèle de la différenciation terminale du muscle squelettique. Dans la partie "Résultats", je décris deux des principales études que j'ai menées durant ma thèse. La première porte sur les rôles antagonistes de G9a et GLP. La seconde porte sur le rôle de SETDB1 durant la différenciation musculaire. Les résultats que j'ai obtenus sont discutés dans cette partie. Je conclus ce manuscrit en discutant mes résultats de manière plus générale et en proposant des perspectives à long terme. Enfin, une annexe présentera les autres articles de recherche auxquels j'ai participé pendant ma thèse.

Abstract

In eukaryotes, gene expression partly relies on chromatin compaction degree. Chromatin status is controlled by epigenetic marks, such as histones (chromatin structural proteins) post-translational modifications. As an example, histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation on gene promoters is mainly associated with transcriptional repression. H3K9 is methylated by several enzymes called lysine methyltransferases (KMTs). The aim of my thesis project was to understand the role of the H3K9 KMTs, G9a, GLP, Suv39h1 and SETDB1 in regulating the balance between proliferation and terminal differentiation. For this purpose, I used skeletal muscle terminal differentiation as model. Upon muscle terminal differentiation, myoblasts exit, in an irreversible way, from the cell cycle and undergo differentiation where cells fusion and form myotubes. During this process, cell cycle genes are permanently silenced and muscle specific genes are activated.

Thesis introduction is divided into three chapters. The first chapter focuses on chromatin and post-translational modifications. The second chapter describes H3K9 methylation characteristics and the role of the four KMTs that I studied during my thesis project: G9a, GLP, Suv39h1 and SETDB1. In the third chapter, the skeletal muscle terminal differentiation model is described in details. Results section reports my two major studies outcomes and their discussion. The first concerns the antagonistic roles of G9a and GLP regarding the muscle terminal differentiation and the second focuses on the role of SETDB1 during muscle differentiation. Finally, I conclude this manuscript by a plainer discussion followed by long-term perspectives and an appendix presents other research articles, in which I collaborated during my PhD.

Liste des abréviations

Acétyl-CoA : Acétyl-Co-enzyme A
ARN pol II : ARN polymérase II
ATP : Adénosine Triphosphate
CENP-A : Centromere Protein-A
DMAA : Diméthylarginine asymétrique
DMAS : Diméthylarginine symétrique
DNMT : ADN méthyltransférase
ESC : Embryonic stem cell ou cellules souches embryonnaires
ESET : ERG associated protein with SET domain
E(Z) : Enhancer of Zeste
FAD : Adénine Flavine dinucléotide
H : Histidine
HAT : Histone acétyltransférase
HDAC : Histone désacétylase
HMT : Histone méthyltransférase
HP1 : Heterochromatin Protein 1
H3K9 : Lysine 9 de l'histone H3
H3K14 : Lysine 14 de l'histone H3
H3S10P : Sérine 10 sur l'histone H3 phosphorylé
H3S28P : Sérine 28 sur l'histone H3 phosphorylé
ICF : Immunodéficiences, instabilité Centromérique, anomalies Faciales
INO80 : Inositol requiring 80
ISWI : Imitation SWI
JmJc : Jumonji domain-containing C
JMJD6 : Jumonji domain-containing 6
K : Lysine
KDM : Lysine déméthylase
KMT : Lysine méthyltransférase

LSD : Lysine (K)-specific déméthylase
MADS : MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor
MCK : Muscle creatin kinase
MHC : Myosin heavy chain
MiARN : MicroARN
MMA : Monomethylarginine
MPC : Muscle Progenitor Cells
MTh1 : Metallothionein h1
m5C : 5 Méthyl-cytosine
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide
NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylation
Oct-4 : Octamer-binding transcription factor 4
PAD14 : Peptidylarginine désaminase 4 humaine
pRb : Protéine de susceptibilité au rétinoblastome
PRC1 : Polycomb Repressive Complex 1
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2
PRMTs : Protein arginine methyltransférase
R : Arginine
S : Sérine
SAM : S-Adénosyl méthionine
SET : Su(var)3-9 Enhancer of zeste Trithorax
SETDB1 : SET Domain Bifurcated 1
SF/FGH : Scatter Factor/hepatocyte Growth Factor
SIRT : Sirtuine
SRF : Serum Response Factor
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier
SWI/SNF : Switching defective/Sucrose Non Fermenting
T : Thréonine
TSS : Transcription Start Site

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le Dr. Marc Lipinski pour avoir accepté d'être le président de ma thèse. Je souhaite également remercier le Dr. Anna Polesskaya et le Dr. Marie Vandromme d'avoir été rapportrices de ma thèse et de m'avoir aidée à améliorer ce manuscrit. Enfin, je souhaite remercier le Dr. Luisa Dandolo pour avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse.

Je voudrais spécialement remercier mon directeur de Thèse. Merci Slimane de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir prise sous ton aile et soutenue tout au long de ma thèse. Merci pour ta patience et pour m'avoir transmise un peu de ton savoir, scientifique mais littéraire aussi ! (Tu as vu comme je flagorne ?). J'ai beaucoup appris grâce à toi et pour cela je t'en suis infiniment reconnaissante!

Un grand merci à Jonathan et Valérie, directeur et directrice adjointe de l'UMR7216 Epigénétique et Destin Cellulaire, pour l'accueil chaleureux au sein de l'unité, pour votre disponibilité, votre aide et pour tous vos conseils avisés.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de mon équipe d'accueil qui ont été ma seconde famille pendant 4 ans!

Merci beaucoup Lolo pour m'avoir aidée à commencer ma thèse et notamment de m'avoir consacré pas mal de temps pour me former à de nombreuses techniques dont tu es experte mondialement (ouais au moins ça !). Un grand merci à Véro pour ta grande gentillesse, ta grande aide et ta bonne humeur. Tu m'as vraiment chouchoutée durant ces 4 années ! Merci aussi à toi Philippe pour tes bons conseils et j'espère de tout mon cœur que tu vas te rétablir. Merci aussi à Chiara, même si tu nous as quittés pour des contrées plus ensoleillées. Sophie, tank your very much. Et je suis vraiment sori ebaout mon English ! Merci aussi à Katia et

Maya que je viens de connaître. Merci Maya pour ton temps et tes précieuses corrections. Je suis heureuse de pouvoir rester un peu plus longtemps pour mieux vous connaître ! Enfin, je voudrais spécialement remercier deux personnes qui ont été comme des frères pour moi. Mr. Jean-Julien Pontisti, l'expert des ChIP Seq. Dans la recherche, il y a deux catégories de laboratoire. Il y a les labos qui collaborent déjà avec Mr. Pontis et ceux qui ne le savent pas encore. « T'es scientifique et tu fais pas de ChIPseq ! non mais allo quoi ! » Merci aussi à ma grande sœur Ouardia. Nous sommes arrivées presque le même jour au labo et nous avons fait tout ce chemin ensemble. Merci à tous les deux d'avoir été à mes côtés pendant ces 4 années et de m'avoir supportée, même dans les pires moments. J'espère que notre amitié continuera encore longtemps.

Je tiens à remercier également tous les membres de l'unité EDC. Merci à Claire qui a été ma tutrice et aussi Florent pour nos discussions. Merci Guigui d'être si drôle! Merci à Audrey, Claire et Laetitia parce qu'on s'est bien marrées ensemble ! Vive la Poutine et la Brooklyn! Merci à Anne pour tes bons conseils littéraires. T'as vu, je me suis achetée des baskets! Merci à Mélanie pour m'avoir expliquée le tarif de fin de thèse. Merci à Jean-François, je ne te déteste pas parce que tu poses trop de question, je suis juste timide ! Merci à tous, j'ai passé de très bons moments auprès de vous!

Je voudrais également remercier Lenaig et Michael (bravo pour ton poste !) avec qui j'ai travaillé en M2 et aussi Véronique Monnier dont l'enthousiasme et l'intelligence m'ont donnée le gout de la recherche ! Merci beaucoup Véro !

Je voudrais remercier mon second tuteur Alexis Lalouette qui a également été mon professeur pendant quelques années au magistère. Et je voudrais aussi remercier le professeur Joël Silber pour m'avoir permise d'intégrer le magistère qui m'a permise d'être là où je suis maintenant. Merci Kevin, c'est toi qui m'a donnée envie de faire le magistère.

J'aimerais également remercier toute la bande du magistère (même si certains n'y ont pas été, c'est tout comme). Merci à Fanny, Anne Flore, Gilles, Polo - qui aura le prix Nobel c'est sur ! -, Tony, Alex, Elodie, Oriane, Laurianne, Mathilde et JP.

J'aimerais également remercier les trois membres du traquenard du lundi : Charlotte, Jean-Ju et PM. Vous avez été là quand j'en avais le plus besoin. Merci!

Je voudrais remercier Max d'être aussi moumoute. Je te souhaite bonne chance pour la suite et je suis heureuse que tu trouves enfin ta voie.

Je voudrais remercier toute la bande de Rodin parce que vous êtes mes plus vieux potes. Merci d'abord aux poufs : merci à Leila, Vaness, Flore (tu me manques beaucoup et je te promet de venir bientôt petit scarabée), Thanh qui ramène ces fraises, Amelie, Pardis, Maeva et Meurins ma plus vieille amie! Merci aussi à ton papa pour m'avoir prêtée, il y a tant d'année, la recherche où il y avait un dossier spécial épigénétique sur l'inactivation du chromosome X. Merci aussi à tous les mectons. Merci Vinsou, Sebou, MenDo (la thèse c'est cho tu vois), Biktu, Jo, Antoine et Antoine, Antonin, Armand, Olivier, Juju306 et Florent.

Merci à Etienne et Lucie même si vous avez essayé de vous débarrasser de moi en m'emmenant au parc Asterix!

Merci ma très chère Laura car même si tu as été loin de mes yeux tu as toujours été près de mon cœur. Je t'adore!

Un merci très spécial pour la personne qui a subi avec moi les moments les plus durs de ma thèse. Merci Jeremy d'être resté près de moi tout ce temps et de m'avoir autant soutenue. Merci du fond du cœur ! Je voudrais aussi remercier toute ta famille qui a été si gentille et accueillante avec moi. Merci Dominique, Daniel, Charles, Jacques, Liliane, Julien, Carine, Jérôme et Caroline.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille à moi. Merci Fred et Jo d'avoir tant fait pour moi.
C'est quand même grâce à vous que j'ai fait cette thèse! Merci tonton Fred pour avoir toujours été près de nous !

Grazie a tutta la famiglia Grazie a tutti gli zii e cugini. Vi voglio tanto bene a tutti !

Enfin, je voudrais particulièrement remercier mon papa, ma maman et ma très chère sœur.
Merci pour tout ce vous m'avez donnée et me donnez encore chaque jour. Je vous aime tant !



Table des matières

Avant-propos	2
Liste des abréviations	4
Table des matières	10
Introduction	12
Partie 1 : Structure et dynamique de la chromatine	13
I. Structure de la chromatine	13
1. Les différents niveaux de compaction de la chromatine	13
2. Le nucléosome	13
3. Organisation nucléaire de la chromatine	15
II. Les modifications de la chromatine.....	17
1. Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP	17
2. La méthylation de l'ADN.....	18
3. Les variants d'histones	20
4. Les modifications post-traductionnelles des histones	21
4.1. L'acétylation.....	22
4.2. La phosphorylation	24
4.3. L'ubiquitination	25
4.4. La sumoylation	25
4.5. La méthylation.....	26
4.5.1 Méthylation des arginines.....	26
4.5.2 Méthylation des lysines	28
4.5.2.1 Rôle fonctionnel de la méthylation des lysines sur les histones.....	29
4.5.2.2 Les lysines méthyltransférases	33
4.5.2.3 La déméthylation des lysines.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.2.4 Le code des histones	36
Partie 2 : Rôle de la méthylation de H3K9 dans la physiologie cellulaire	41
I. Les méthyltransférases spécifiques de H3K9	41
1. Suv39h1 et Suv39h2	42
2. SETDB1/ESET	44
3. G9a/EuHMT2 et GLP/EuHMT1	45
II. Conséquences de la perturbation des fonctions des KMTs de H3K9	49
1. Pathologies impliquant les KMTs G9a GLP SETDB1 et Suv39h1.....	50
2. Implication des KMTs de H3K9 dans la tumorigenèse	51
Partie 3 : Régulation de la différenciation musculaire squelettique et rôle des KMTs de H3K9 dans cette régulation.	54
I. Présentation du modèle d'étude : le muscle squelettique.....	54
1. Origine embryonnaire du muscle squelettique	56
2. Myogenic Regulatory Factors ou "MRFs".....	57
2.1. Mise en évidence des MRFs	57
2.2. Structure des MRFs	57
2.3. Détermination et différenciation des cellules musculaires au cours de la myogenèse embryonnaire.....	58
3. Les protéines MEF2, co-facteurs des MRFs	60
II. L'équilibre prolifération différenciation dans le système musculaire	61
1. Régulation négative des gènes de la différenciation dans les myoblastes proliférants.....	62
2. La sortie irréversible du cycle cellulaire.....	63
3. L'activation des gènes spécifiques du muscle.....	66
III. Facteurs épigénétiques impliqués dans la régulation de la myogenèse.	66
1. Facteurs épigénétiques impliqués dans le maintien des cellules en prolifération.....	67

2. Facteurs épigénétiques impliqués dans l'activation du programme de différenciation.....	68
Résultats	71
Contexte et présentation du projet de recherche.....	72
Partie 1 : Les lysines méthyltransférases G9a et GLP agissent de manière antagoniste sur la régulation de la différenciation musculaire squelettique.	74
I. Introduction	74
II. Résultats	75
1. G9a et GLP interagissent et présentent le même profil d'expression durant la différenciation musculaire terminale.....	75
2. La surexpression de G9a inhibe la différenciation musculaire terminale, à l'inverse de GLP.....	77
3. La perte de fonction de GLP inhibe la différenciation musculaire tandis que celle de G9a la favorise.....	80
4. La surexpression de G9a favorise l'expression de la cycline D1.....	83
5. La perte d'expression de G9a et GLP a un effet antagoniste dans les myoblastes primaires en prolifération	85
6. Etude du transcriptome global de myoblastes transfectés par des siARNs ciblant G9a ou GLP..	86
III. Conclusion et perspectives à court terme	94
1. G9a inhibe la différenciation musculaire squelettique terminale et favorise la prolifération	94
2. GLP défavorise la prolifération et favorise la différenciation musculaire terminale.....	99
Partie 2 : Etude du rôle de SETDB1 dans la différenciation musculaire squelettique terminale.....	101
I. Introduction	101
II. Résultats	101
1. Profil d'expression de SETDB1 durant la différenciation musculaire terminale.	101
2. SETDB1 interagit différemment avec les HDACs selon que les cellules sont en prolifération ou en différenciation	106
3. Une dérégulation de SETDB1 perturbe l'équilibre entre la prolifération et la différenciation musculaire terminale.....	107
4. SETDB1 interagit avec des régulateurs positifs de la différenciation musculaire.....	112
III. Conclusions et perspectives à court terme	115
1. SETDB1 est présent dans le cytoplasme des cellules.....	115
2. SETDB1 régule positivement la différenciation musculaire terminale, potentiellement via un nouveau rôle d'activateur de la transcription.	117
Discussion et perspectives à long terme.....	119
I. G9a et GLP sont présentes sous forme de complexe mais peuvent avoir différentes fonctions.....	120
II. Rôles de G9a, GLP, SETDB1 et Suv39h1 dans la différenciation musculaire	122
1. La dérégulation de G9a, GLP, SETDB1 ou Suv39h1 impacte la différenciation terminale	122
2. Selon le contexte cellulaire, Suv39h1 est nécessaire à l'inhibition des gènes de différenciation et de prolifération	123
3. G9a pourrait coopérer avec Suv39H1 pour inhiber la différenciation musculaire	124
4. SETDB1 a un rôle bivalent durant la différenciation musculaire terminale.....	125
5. Contrairement à G9a, GLP favorise la différenciation musculaire.....	126
III. G9a et SETDB1 régulent positivement la cycline D1, à l'inverse de GLP.....	128
1. Dégradation de la cycline D1 et cancer.....	128
2. G9A et SETDB1 stabilisent la cycline D1.....	131
3. GLP : un anti-oncogène ?.....	132
IV. Rôle de SETDB1 dans le cytoplasme	132
V. Conclusion	133
Matériel et méthodes	136
Références bibliographiques.....	146
ANNEXE	174

Introduction

Partie 1 : Structure et dynamique de la chromatine

I. Structure de la chromatine

1. Les différents niveaux de compaction de la chromatine

Chez les eucaryotes, le support de l'information génétique, c'est à dire l'ADN, est contenu dans le noyau dont la dimension micrométrique doit pourtant contenir une grande quantité d'ADN. Par exemple, chez l'homme, le noyau mesurant une dizaine de microns environ renferme près de 2 m d'ADN. De ce fait, les molécules d'ADN sont organisées au sein du noyau, sous forme d'une structure compacte appelée la chromatine.

La chromatine constitue une structure dynamique pouvant être dans des états plus ou moins compacts (Figure 1). Ainsi, son niveau de condensation contrôle l'accessibilité de l'ADN aux machineries cellulaires, et constitue un facteur déterminant dans la régulation de l'information génétique. L'unité structurale de base de la chromatine est le nucléosome, constitué d'ADN enroulé autour de petites protéines basiques appelées histones. L'enchaînement de nucléosomes forme une structure dite en « collier de perle » (Figure 1) de 11 nm de diamètre, constituant ainsi le premier niveau de compaction de la chromatine. Cette structure primaire se replie pour former une structure secondaire, la fibre de 30 nm de diamètre, qui peut subir davantage d'enroulements jusqu'au stade ultime de compaction correspondant au chromosome métaphasique.

2. Le nucléosome

L'unité fondamentale de la chromatine, c'est-à-dire le nucléosome, se compose d'environ 147 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones. Cet octamère, également appelé cœur du nucléosome, est formé d'un hétérotétramère d'histones H3-H4 et de deux hétérodimères

d'histones H2A-H2B (Figure 2).

Les nucléosomes adjacents sont espacés par une séquence d'ADN appelée ADN de liaison ou « DNA linker » dont la longueur peut varier en fonction du type cellulaire ou de l'organisme. Au niveau de cette région se trouve l'histone de liaison internucléosomale H1 qui stabilise les nucléosomes et permet de réduire l'activité transcriptionnelle en organisant et en compactant la chromatine (Figure 2).

Les histones constituant le nucléosome sont de petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution. Les extrémités N-terminales des histones ou « queues d'histones », d'une trentaine d'acides aminés, dépassent du cœur du nucléosome. Ces « queues » d'histones jouent un rôle fondamental dans la régulation de la structure chromatinienne et donc dans la régulation du niveau d'expression des gènes. En effet, les extrémités N-terminales des histones peuvent être modifiées post-traductionnellement, et cela a une influence sur le degré de compaction de la chromatine.

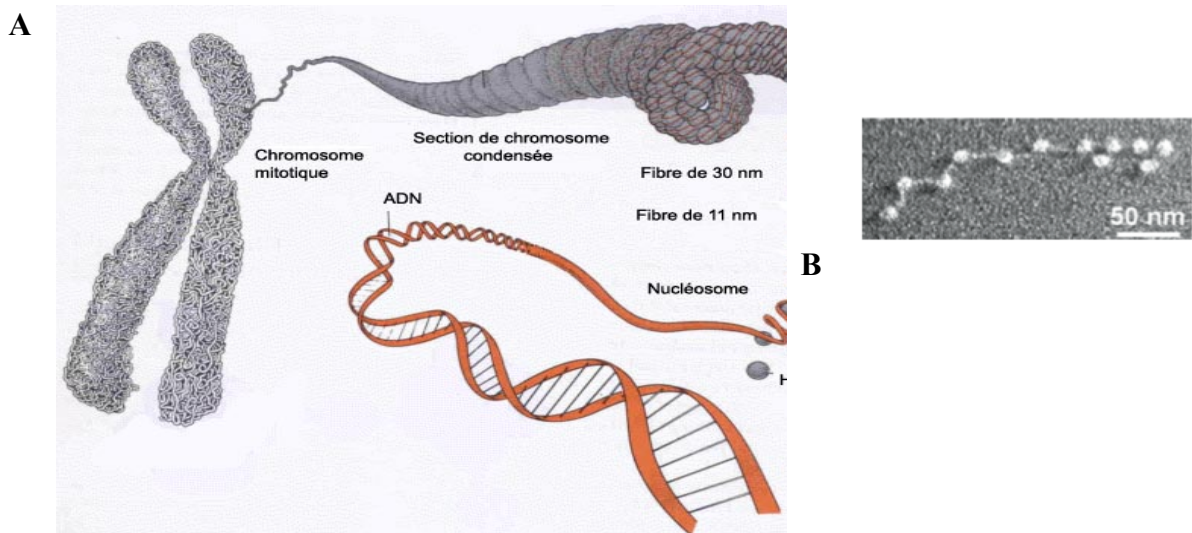


Figure 1 : Structure de la chromatine, de la double hélice au chromosome

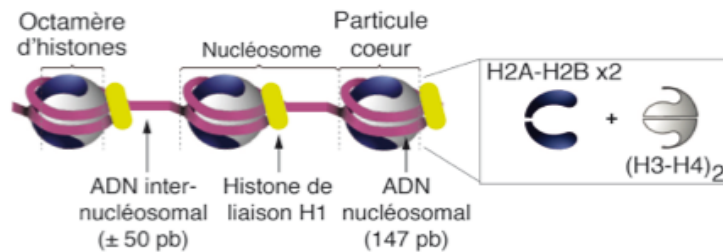
A) Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine. **B)** Image de la structure dite « collier de perles » obtenue par microscopie électronique à transmission. (Grigoryev et al, 2009).

3. Organisation nucléaire de la chromatine

Les techniques de microscopie ont permis de démontrer que les chromosomes s'organisent en territoires de manière non aléatoire au sein du noyau. En particulier, il est possible de distinguer dans le noyau interphasique deux principales conformations de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine, enrichie en chromatine décondensée, héberge des gènes actifs, c'est à dire transcrits, ou plus précisément, activables. À l'inverse, l'hétérochromatine se compose de chromatine extrêmement condensée et est associée à la répression de l'expression des gènes. On distingue communément deux types d'hétérochromatine. L'hétérochromatine constitutive, pauvre en gènes, se composant principalement de séquences répétées. Elle est en particulier caractéristique des régions télomériques, centromériques et de l'ADN ribosomal. Le deuxième type d'hétérochromatine est l'hétérochromatine facultative, également fortement condensée, mais capable, dans des contextes particuliers, de se décondenser et de devenir transcriptionnellement active. Ces différents types de chromatine sont différemment organisés au niveau nucléaire. Ainsi, l'hétérochromatine se localise en périphérie du noyau ou autour du nucléole. L'euchromatine est, quant à elle, localisée majoritairement à l'intérieur du noyau. La réplication au cours de la phase S de ces deux types de chromatines est également différente. En effet, l'euchromatine est répliquée précocement comparée à l'hétérochromatine (Gilbert, 2002). De récentes études ont affiné la compréhension de cette organisation nucléaire, en démontrant l'existence d'une plus grande variété d'états chromatiniens. Chaque état étant défini par des combinaisons particulières de modifications d'histones et de facteurs liant la chromatine (Ernst et al, 2011; Filion et al, 2010; Kharchenko et al, 2011). Par exemple, chez la Drosophile, 5 types de chromatine ont été identifiés (Filion et al, 2010). Trois types d'hétérochromatine ont ainsi été définis : une hétérochromatine associée à la protéine de l'hétérochromatine HP1, une hétérochromatine associée au système de répression Polycomb et une dernière pour laquelle

aucune protéine spécifique n'a pu être associée mais qui est la forme la plus répressive et est la plus pauvre en gènes. Deux types d'euchromatine ont été identifiés : une euchromatine associée aux gènes codants les fonctions cellulaires universelles et une autre associée à des gènes plus spécialisés ou spécifiques de tissu. Chez l'Homme, 15 états chromatiniens ont été identifiés (Ernst et al, 2011). Cette étude, réalisée sur différentes lignées cellulaires, met en évidence, entre autre, un mécanisme déjà connu, démontrant que les gènes sont soumis à un état chromatinien spécifique du type cellulaire. En effet, au cours du processus de différenciation, la chromatine est extrêmement dynamique.

A



B

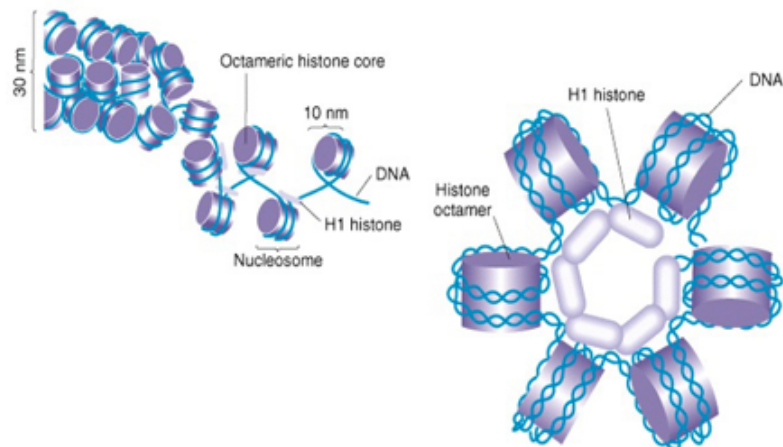


Figure 2 : Structure du nucléosome.

A) Les constituants du nucléosome. L'ADN s'enroule autour d'un octamère d'histones constitué d'un tétramère d'histones $(H3-H4)_2$ et de 2 dimères d'histones $H2A-H2B$.
B) Localisation de H1 à la périphérie du nucléosome, facilitant l'organisation des nucléosomes en une structure d'un niveau supérieur appelée la fibre de 30 nm (Lodish H, 2000).

II. Les modifications de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique dont le degré de compaction influence directement l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, par conséquent, le niveau de transcription d'un gène. La chromatine peut subir différents types de modifications qui vont réguler son degré de compaction. Ce chapitre va traiter de cinq principales modifications de la chromatine, que sont : le remodelage de la chromatine par des complexes dépendants de ATP, la méthylation de l'ADN, l'incorporation de variants d'histones et les modifications post-traductionnelles des histones.

1. Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP

La chromatine peut être réorganisée par des complexes de remodelage dit dépendants de l'ATP (pour plus de facilité, je vais me permettre un anglicisme et les nommer « complexes ATP-dépendants »). Ce sont des complexes multiprotéiques qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour interrompre localement l'interaction entre les histones et l'ADN. Une fois cette interaction interrompue, plusieurs possibilités s'offrent. Le nucléosome peut, par exemple, glisser sur l'ADN, et permettre, ou au contraire empêcher, l'accessibilité d'une séquence d'ADN particulière aux facteurs de transcription, activateurs ou des répresseurs donc. Il est également possible d'enlever l'octamère d'histones, ou encore, de remplacer certaines histones du cœur du nucléosome (dites aussi canoniques) par des variants d'histones ((Dirscherl & Krebs, 2004; Morrison & Shen, 2009; Roberts & Orkin, 2004). Les complexes de remodelage ATP-dépendants sont classés en 4 familles se distinguant par la présence de différents domaines (Figure 3) : les complexes de la famille SWI/SNF (*Switching defective/Sucrose Non Fermenting*), ISWI (*Imitation SWI*), NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylation*) et INO80 (*Inositol requiring 80*) (pour revue (Morettini et al, 2008). L'intervention de ces complexes est essentielle pour la régulation transcriptionnelle, qu'elle

soit positive ou négative. De plus, ils sont impliqués dans l'assemblage chromatinien après la réplication, le maintien de l'organisation secondaire et tertiaire de la chromatine, ou encore la réparation de l'ADN (Osley et al, 2007).

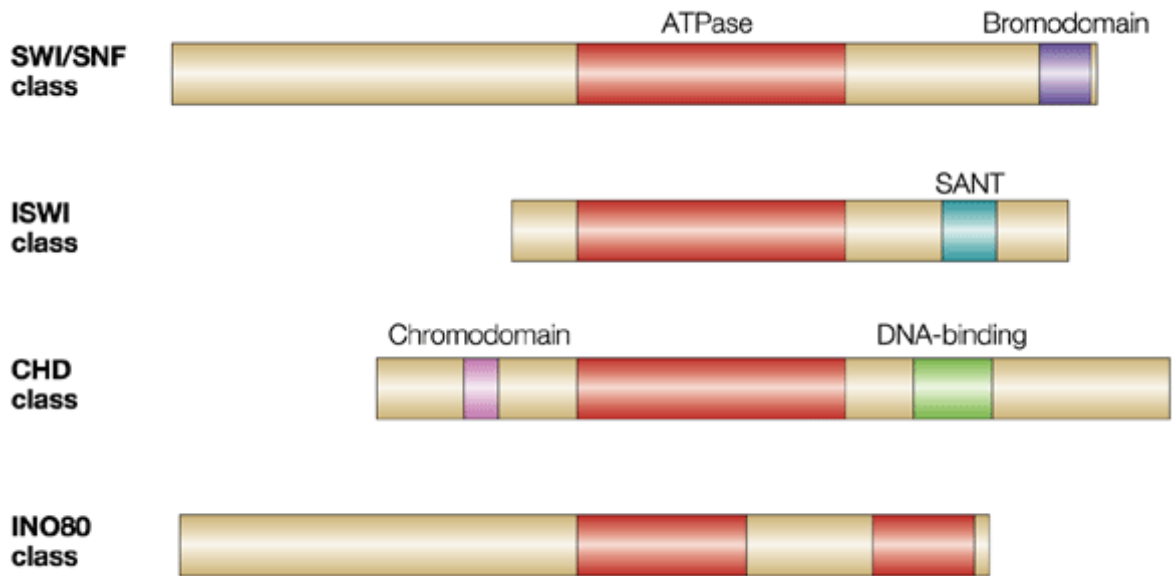


Figure 3: Représentation schématique des ATPases des quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine.

Les quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine se distinguent les unes des autres par les domaines protéiques qu'elles possèdent : le bromodomaine est porté par les ATPases de la famille SWI/SNF, le domaine SANT est caractéristique des protéines ISWI, les ATPases de la famille CHD ont un chromodomaine et le domaine ATPase des INO80 contient une longue insertion correspondant à des domaines d'interactions protéiques (tiré de la revue : (Tsukiyama, 2002)).

2. La méthylation de l'ADN

Chez les eucaryotes, l'ADN peut être méthylé sur le carbone 5 de la cytosine (5 méthylcytosine ou m5C), au niveau des di-nucléotides CpG. Cette modification est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT). Trois DNMT ont été identifiées: DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. DNMT3a et DNMT3b permettent la méthylation *de novo* (Okano et al, 1999), alors que DNMT1 est une méthyltransférase de maintenance, qui permet de recopier les patrons de méthylation de l'ADN parental au cours de la réplication (Pradhan et al, 1999). Entre 60 à 90 % des CpGs sont méthylés dans les cellules mammifères (Tucker, 2001), principalement au niveau des séquences d'ADN répétées. En revanche, il existe certaines

régions enrichies en CpG non méthylé que l'on appelle « îlots CpG ». Ces îlots sont retrouvés principalement au niveau des régions régulatrices de nombreux gènes (Bird et al, 1985), et certaines peuvent être méthylées au cours du développement, induisant une répression stable de l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN est, en effet, associée à l'inhibition de l'expression des gènes. Cette inhibition peut être directe en empêchant la fixation des facteurs de transcription à l'ADN (Liu et al, 2008; Watt & Molloy, 1988). Elle peut également être indirecte *via* le recrutement de protéines qui possède un domaine Methyl-Binding Domain (MBD), permettant de reconnaître les CpG méthylés, et qui, à leur tour, vont recruter des protéines capables de remodeler la chromatine. Les MBD possèdent un domaine très conservé capable de reconnaître et de fixer le m5C (Nan et al, 1993). Les MBDs font partie de complexes protéiques contenant des répresseurs transcriptionnels qui induisent un état chromatinien répressif de la transcription.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans divers processus biologiques tels que la régulation de la transcription, l'inhibition de la recombinaison dans les régions répétées (Chen et al, 1998), l'empreinte parentale, ou encore, l'inactivation du chromosome X (Reik & Dean, 2001), pour revue (Goto & Monk, 1998). Des défauts de méthylation de l'ADN sont associés à diverses pathologies, telles que le cancer (Suva et al, 2013).

Variant d'histone		Distribution génomique	REFERENCES
Famille	Variant		
H3	H3 {H3.1 H3.2 (réplication)	Global	(Tagami et al, 2004)
	H3.3	Gènes actifs, promoteurs, régions régulatrices. télomères, corps XY, centromères	(pour revue (Szenker et al, 2011))
	H3.Y	Euchromatine	(Wiedemann et al, 2010)
	CenH3	Centromères Régions où les histones sont souvent renouvelés, gènes d'ARNt	(pour revue(Nechemia-Arbely et al, 2012))
H4	H4	Global	
H2A	H2A (réplication)	Global	(pour revue (Kamakaka & Biggins, 2005))
	H2A.X	Global. Réparation des cassures double brin	(Kamakaka & Biggins, 2005)
	H2A.Z	Promoteurs, région régulatrice et site d'initiation de la transcription des gènes actifs. Nucléole. Région subtélomérique Centromère	
	macroH2A (mH2A)	Chromosome X inactif, promoteurs des gènes soumis à l'empreinte, promoteurs de gènes du développement, télomères, centromères, nucléole, meiotic XY body	
	H2A.B	Euchromatine et hétérochromatine péricentrique (sperme)	
H2B	H2B (réplication)	Global	
	H2B.1	Global (sperme) Télomères (cellules somatique)	(Zalensky et al, 2002)
	H2B.W	Télomères (sperme)	

Table 1 : les différents variants d'histones et leur localisation génomique.

Concernant l'histone H1, 126 variants ont été identifiés chez diverses espèces. H1 lie l'extérieur du nucléosome et facilite la compaction de la chromatine (Figure 2). En se basant sur cette propriété, les différents variants ont été classés en fonction de leur capacité : forte, intermédiaire ou faible à condenser la chromatine.

3. Les variants d'histones

Chez les eucaryotes, à l'exception de l'histone H4, chaque histone dite canonique possède diverses isoformes codées par des gènes différents que l'on appelle variants d'histones (Franklin & Zweidler, 1977). Ces variants sont exprimés en très faible quantité dans la cellule et sont incorporés dans les nucléosomes au niveau de régions spécifiques du génome. De plus, les variants peuvent être incorporés dans la chromatine de façon indépendante de la réplication. Les variants sont caractérisés par des différences plus ou moins grandes dans leur séquence en acides aminés, pouvant influencer la structure et la stabilité du nucléosome. Mais

aussi, du fait de ces différences de séquence, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être modifiées. De cette manière, l'incorporation de variants d'histones participe à la régulation de la structure chromatinienne (Henikoff, 2008). Ceci a un impact direct sur la régulation de la transcription génique, sur les processus de réparation ou de réplication de l'ADN, ou encore sur l'assemblage ou la ségrégation des chromosomes (pour revue (Arnaudo et al, 2011)). Les principaux variants d'histones et leur distribution sont répertoriés dans la Table 1.

4. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les extrémités N-terminales, et dans une moindre mesure les extrémités C-terminales, que l'on nomme également queues d'histones, sont exposées à la surface du nucléosome et sont la cible d'une grande variété de modifications post-traductionnelles. Ces modifications agissent sur la structure et la stabilité de la chromatine. Elles permettent de moduler les contacts chromatinien : soit en modifiant la nature biochimique des histones et ainsi influencer directement sur les interactions ADN-histones, soit en recrutant des facteurs de remodelage de la chromatine. Les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle fondamental dans la plupart des processus cellulaires qui requièrent un accès à l'ADN, tel que la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN.

Les modifications post-traductionnelles sont catalysées par des enzymes spécifiques et touchent des résidus spécifiques sur chaque histone. Les acides aminés le plus souvent modifiés sont les Lysines (K), les Arginines (R), les Sérines (S) et les Thréonines (T). Je traiterai dans cette partie de différentes modifications, en particulier les plus étudiées : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (figure 4). Cependant, d'autres modifications ont été décrites, telles que la déamination, l'isomérisation, l'ADP-ribosylation, la glycosylation, la biotinylation (Bannister & Kouzarides, 2011) ou

encore la propionylation et la butyrylation (Chen et al, 2007). A ce jour, 131 modifications différentes ont été décrites (Zentner & Henikoff, 2013).

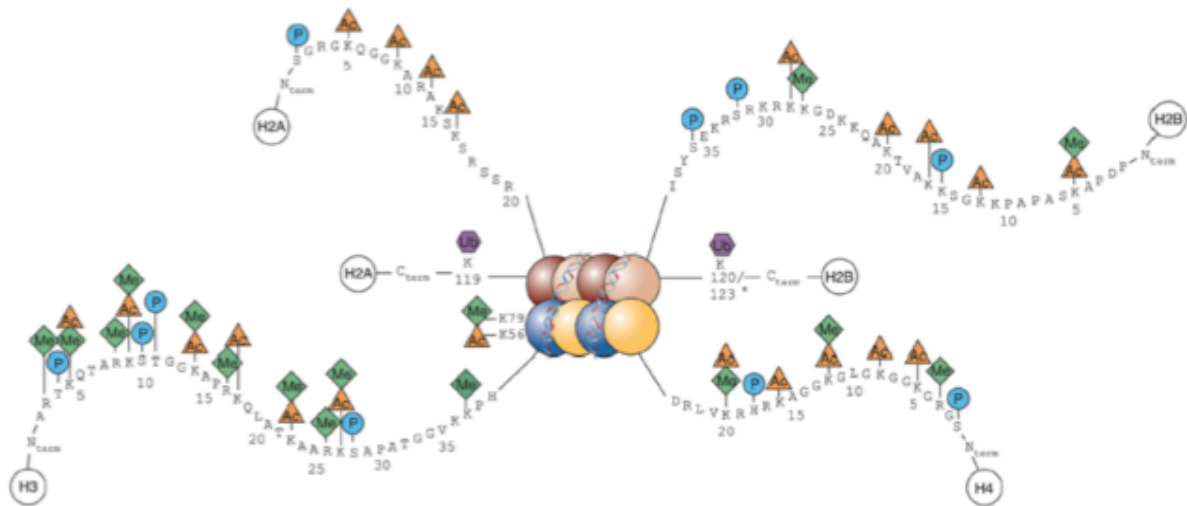


Figure 4 : Modifications post-traductionnelles des histones.

Schéma représentant, sur la séquence humaine, les principales modifications post-traductionnelles étudiées : acétylation (triangles orange), méthylation (losanges vert), ubiquitination (hexagones violet) et la phosphorylation (ronds bleu) (Kepler & Archer, 2008).

4.1. L'acétylation

L'acétylation des histones fut la première modification d'histone décrite (Phillips, 1963). La plupart des études révèlent une forte corrélation entre l'hyper-acétylation des histones et l'activation de la transcription (Allfrey & Mirsky, 1964).

Les queues d'histones sont normalement chargées positivement. De ce fait, elles ont une plus grande affinité pour l'ADN chargé négativement. Dans ces conditions, la chromatine est compacte et empêche la liaison des facteurs de transcription à l'ADN. L'acétylation qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyl au niveau des résidus lysines, neutralise cette charge positive. L'affinité des queues d'histone pour l'ADN étant ainsi diminuée, la chromatine se relâche et devient plus favorable à la transcription (Figure 5) (Kuo & Allis, 1998). Par ailleurs, l'acétylation des lysines peut influencer le remodelage de la chromatine et la transcription par des mécanismes autres que la modification de charge. En effet, les lysines

acétylées sont reconnues par un module protéique spécifique : le bromodomaine. On retrouve ce domaine au niveau de divers facteurs impliqués dans la modification de la chromatine. Il est notamment retrouvé au sein des complexes de remodelage dépendants de l'ATP, comme le complexe SWI/SNF, ou encore à dans des enzymes catalysant l'acétylation comme les protéines des familles GNAT (GCN5-related N-acetylTransférase) et CBP/p300 (CREB binding protein /E1A-associated protein of 300 kDA)(de la Cruz et al, 2005).

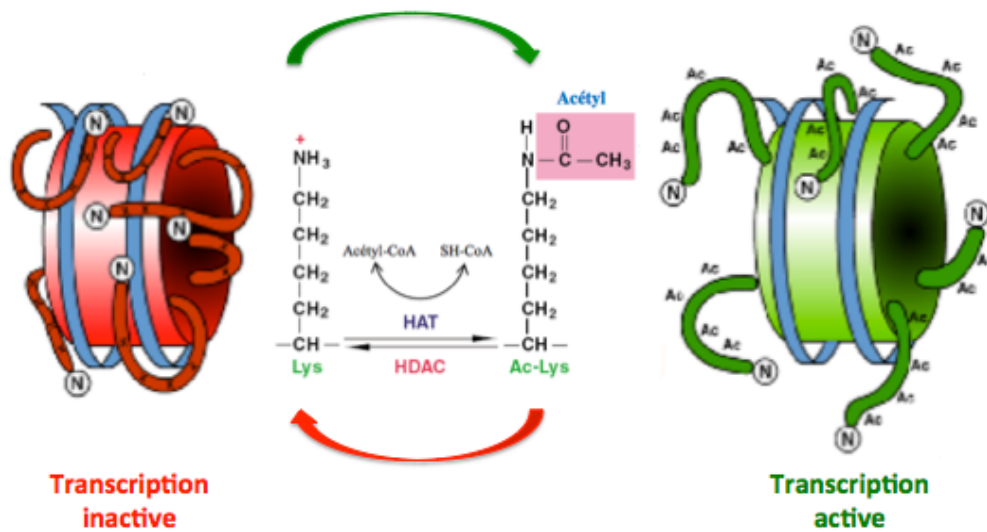


Figure 5 : Acétylation et désacétylation des lysines sur les extrémités N-terminales des histones.

Les HATs catalysent le transfert d'un groupement acétyl depuis l'acétyl-CoA sur le groupement amine de la lysine. A l'inverse, les HDACs éliminent le groupement acétyl. En absence d'acétylation, l'ADN chargé négativement interagit avec les queues d'histones chargées positivement. Il en résulte une conformation de la chromatine peu favorable à la transcription. En revanche, l'acétylation neutralise la charge portée par la lysine. L'interaction entre l'ADN et la queue d'histone est diminuée et permet une configuration favorable à la transcription (adapté de (Workman & Kingston, 1998; Yang & Seto, 2007).

Les enzymes responsables de l'acétylation sont les HATs (Histone Acétyl Transférases). Elles catalysent le transfert d'un groupement acétyl (provenant de l'acétyl Coenzyme A) au niveau du groupement amine des lysines. Les HATs sont classées en trois grandes familles : les GNATs, les MYST (MOZ Ybf2 Sas2 Tip60) et les p300/CBP (pour revue (Lee & Workman, 2007)). Ces enzymes sont le plus souvent associées à de larges complexes multiprotéiques nécessaires pour exercer leur activité catalytique sur la chromatine. L'activité des HATs est réversible par l'action des HDACs (Histones Désacétylases) qui possèdent un domaine

catalytique capable de retirer le groupement acétyl ((Yang & Seto, 2008)). Les HDACs sont divisées chez les mammifères en 4 classes, selon leur similarité de séquence et de l'organisation des domaines qui les composent : la classe I (HDAC 1, 2, 3 et 8), la classe II (HDAC 4-7, 9 et 10) et la classe III (SIRT 1-7) qui nécessitent la présence d'un co-facteur NAD⁺ pour leur activité et la classe IV (HDAC11)) (pour revue (Icardi et al, 2012)). Les HATs et les HDACs n'ont pas comme seul substrat les histones et peuvent aussi modifier d'autres protéines. Par exemple, p53 ou encore MyoD peuvent être acétylées et désacétylées ce qui influence leurs activités et la régulation transcriptionnelle de leurs gènes cibles (Sakaguchi et al, 1998; Sartorelli et al, 1999)

L'acétylation est un cas particulier d'acylation dont un certain type de variété a récemment été décrite tel que la crotonylation, la formylation, la succinylation, la malonylation, la propionylation et la butyrylation. Comme l'acétylation, ces modifications sont capables de neutraliser les charges positives des queues d'histones et donc de modifier les contacts ADN-histones (Olsen, 2012; Tan et al, 2011).

4.2. La phosphorylation

La phosphorylation des protéines est la modification chimique par laquelle la majorité des signaux extracellulaires décrits sont transduits dans la cellule. Au niveau des histones, la phosphorylation est catalysée par des kinases au niveau des Sérines (S) et des Thréonines (T) et des Tyrosines (Y) par ajout d'un groupement phosphate. Cette modification est réversible grâce à l'action de phosphatases. L'ajout du groupement phosphate apportant des charges négatives, il suggère un rôle similaire à l'acétylation dans la modulation de la structure chromatinienne. En effet, l'ajout de charges négatives sur les histones va créer une répulsion de charges entre l'ADN et le nucléosome et par conséquent, rendre l'ADN plus accessible et donc plus permissif à la transcription. Cependant, ce rôle n'est pas clairement démontré. En outre, il semblerait que la phosphorylation des histones, régule la transcription de manière

dépendante du cycle cellulaire. Par exemple, les phosphorylations des sérines 10 et 28 de l'histone H3 (H3S10P, H3S28P) ont tout d'abord été impliquées dans la condensation et la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (pour revue (Hans & Dimitrov, 2001)) (Prigent & Dimitrov, 2003). Cependant, en dehors de la mitose et selon le gène étudié, il a été montré que ces mêmes modifications sont impliquées dans l'activation de la transcription (Nowak & Corces, 2004). La phosphorylation peut également intervenir dans d'autres types de processus cellulaires. Par exemple, la phosphorylation est impliquée dans la réparation de l'ADN en permettant le recrutement de protéines de réponse aux dommages de l'ADN au niveau des cassures (Stucki et al, 2005).

4.3. L'ubiquitination

L'ubiquitination consiste en l'ajout d'un peptide ubiquitine au niveau des lysines d'histones. La réaction d'ubiquitination est catalysée par les enzymes de la famille E3 ubiquitine ligases et peut être inversée par les désubiquitinases. Pour les protéines non histone, la poly-ubiquitination est en général utilisée comme signal d'adressage au protéasome. L'ubiquitination des histones n'a cependant pas été impliquée dans ce mécanisme de dégradation et son rôle exact reste encore à définir. Toutefois, en fonction du résidu concerné, H2AK119 ou H2BK120, on assiste respectivement à une répression ou à une activation de la transcription (pour revue (Zhang, 2003)). L'ubiquitination est, semble-t-il, également impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN (Bergink et al, 2006).

4.4. La sumoylation

La sumoylation consiste en l'addition de peptide SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur les lysines des histones. Les groupements SUMO sont structurellement proches de ceux de l'ubiquitine. Cette modification est exclusive et empêche l'établissement de toute autre modification ayant le même substrat comme, par exemple, l'acétylation ou l'ubiquitination.

Ainsi, la sumoylation aurait un effet inhibiteur sur la transcription, en empêchant l'établissement de marques activatrices comme l'acétylation(Nathan et al, 2006).

4.5. La méthylation

Contrairement à l'acétylation ou encore la phosphorylation, la méthylation n'induit pas de changement de charge. L'effet de la méthylation sur la dynamique nucléosomale n'est donc pas aussi direct que l'acétylation. Cette modification est aussi bien associée à l'activation qu'à la répression de la transcription via le recrutement d'autres facteurs de remodelage de la chromatine. Les histones peuvent être méthylées au niveau de leurs acides aminés basiques, en particulier sur les Arginines (R) et les Lysines (K). Les Histidines (H) peuvent également être méthylées, cependant cette méthylation est rare et largement non caractérisée.

4.5.1 Méthylation des arginines

Chez les mammifères, il existe de très nombreuses protéines méthylées au niveau de leurs résidus arginine. Sur les histones, ces résidus peuvent être mono-méthylés (MMA) ou di-méthylés (DMA), de façon symétrique (DMAS) ou asymétrique (DMAA) (Figure 6). Ces modifications sont catalysées par un groupe d'enzymes spécifiques : les PRMTs (protéine arginine méthyltransférases). Les PRMTs sont classées en deux types selon qu'elles soient capables de générer une di-méthylation symétrique ou asymétrique, les types I et II, respectivement. Ces 2 types sont par ailleurs capables tous les deux de générer la mono-méthylation (Figure 6).

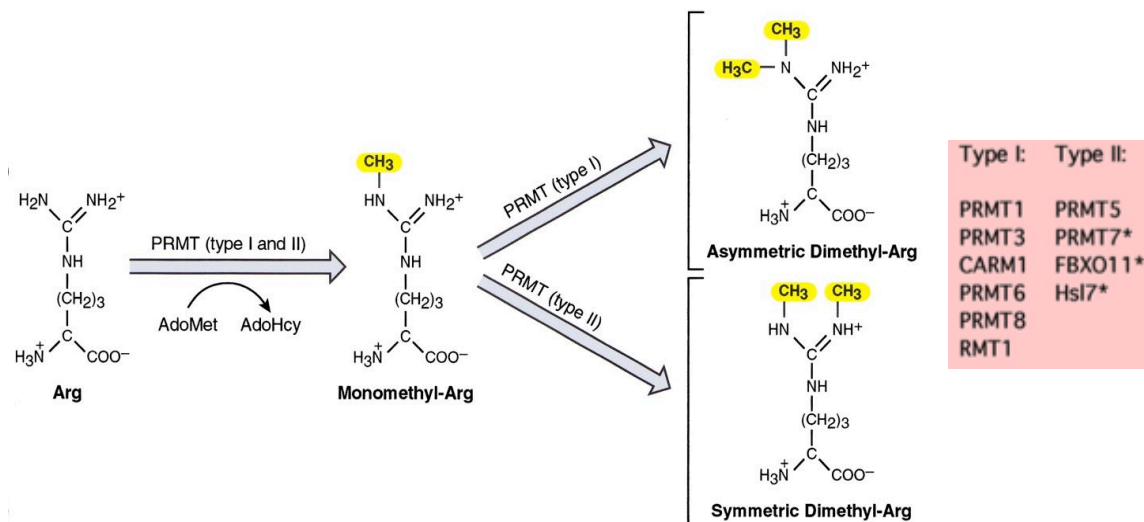


Figure 6 : Méthylation des arginines par les PRMTs.

Les groupements méthylés sont transférés de la S-adenosyl-l-méthionine (AdoMet / SAM) à l'arginine pour donner une arginine méthylée et S-adenosyl-l-homocystéines (AdoHcy). Les PRMTs de types I et II peuvent générer la mono-méthylation. La di-méthylation symétrique est catalysée par les PRMTs de type I, la di-méthylation asymétrique par les PRMTs de type II (Zhang & Reinberg, 2001).

Parmi les différentes PRMTs : PRMT1, CARM1 (également nommé PRMT4), PRMT5, PRMT6 et PRMT7 peuvent méthyler les histones (Figure 7). Ces modifications sont aussi bien associées à l'activation qu'à la répression transcriptionnelle. En effet, les effets sur la transcription peuvent dépendre du résidu concerné mais également de son type de méthylation. Par exemple, il a été montré que la di-méthylation symétrique de H4R3 est associée à l'inactivation de la transcription, tandis que sa di-méthylation asymétrique a un effet positif sur la transcription en favorisant l'acétylation de l'histone H3 (Li et al, 2010). D'autres études ont montré que la di-méthylation symétrique de H3R8 et H2AR2 est enrichie au niveau des promoteurs des gènes réprimés (Pal et al, 2004; Wang et al, 2008b). La di-méthylation symétrique de H3R2 est impliquée dans l'inactivation transcriptionnelle en empêchant la méthylation de H3K4 qui est associée à l'activation de la transcription par le complexe MLL1 (Hyllus et al, 2007; Kirmizis et al, 2009) (Figure 7).

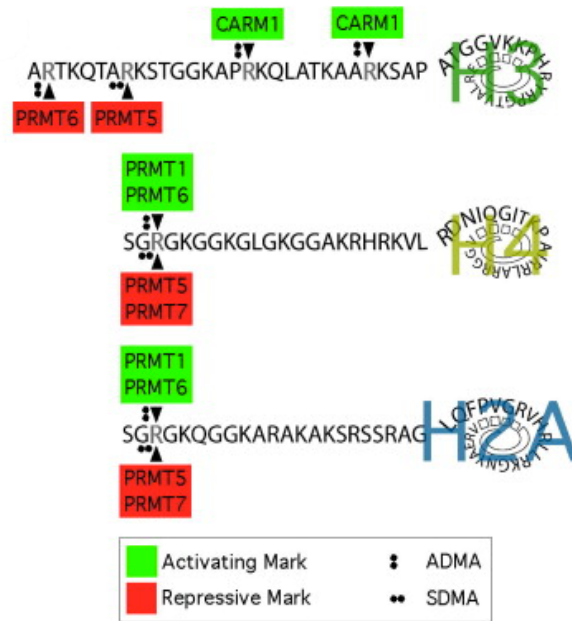


Figure 7 : Types et site de méthylation des arginines sur les queues d’histones.

Sites de méthylation connus sur les résidus arginine des histones H3, H4 et H2A. Les enzymes qui établissent ces modifications sont indiquées selon qu’elles soient associées à l’activation transcriptionnelle, en vert, ou à l’inhibition transcriptionnelle, en rouge. Le type de di-méthylation, asymétrique ou symétrique, qu’elles induisent est également indiqué (adapté ou d’après la revue : (Issa & Just, 2011)).

La méthylation des arginines est un mécanisme réversible. En effet, les arginines méthylées peuvent être converties en citruline. Cette réaction est catalysée par la peptidyl arginine deiminase PADI4 (Cuthbert et al, 2004; Wang et al, 2004) et ne peut agir que sur une arginine mono-méthylée. Il a cependant été montré que H3R2me et H4R3me peuvent être déméthylées par une enzyme de la classe des lysine déméthylases : la protéine JMJD6 (jumonji domain-containing protein 6) (Chang et al, 2007).

4.5.2 Méthylation des lysines

Les histones peuvent être modifiées par méthylation au niveau de leur résidu lysine. Cette réaction est catalysée par un groupe d’enzymes spécifiques que sont les KMTs (lysine méthyltransférase) et consiste en l’ajout d’un, deux ou trois groupements méthyle (me1, me2 ou me3) apportés par le donneur de méthyle SAM (S-Adénosyl méthionine) (Figure 8).

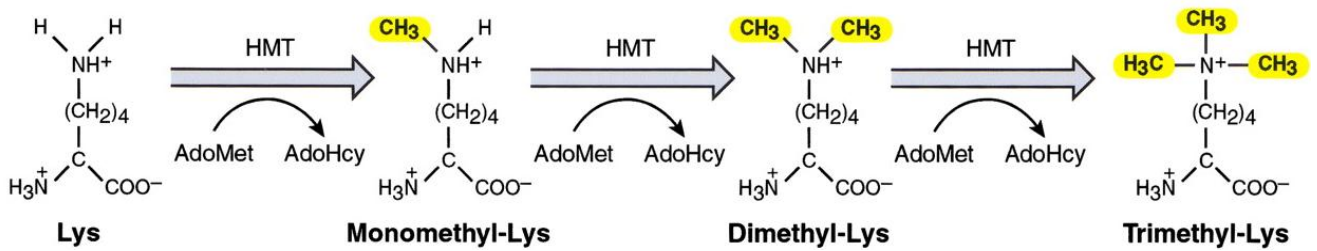


Figure 8 : Méthylation des lysines.

Méthylation d'une lysine (lys) par une KMT ou HMT (histone méthyltransférase). Les groupements méthyl sont transférés des S-adosyl-1-méthionines (AdoMet/ SAM) à la lysine pour donner une lysine mono-méthylée, di-méthylée ou encore tri-méthylée (Zhang & Reinberg, 2001).

4.5.2.1 Rôle fonctionnel de la méthylation des lysines sur les histones

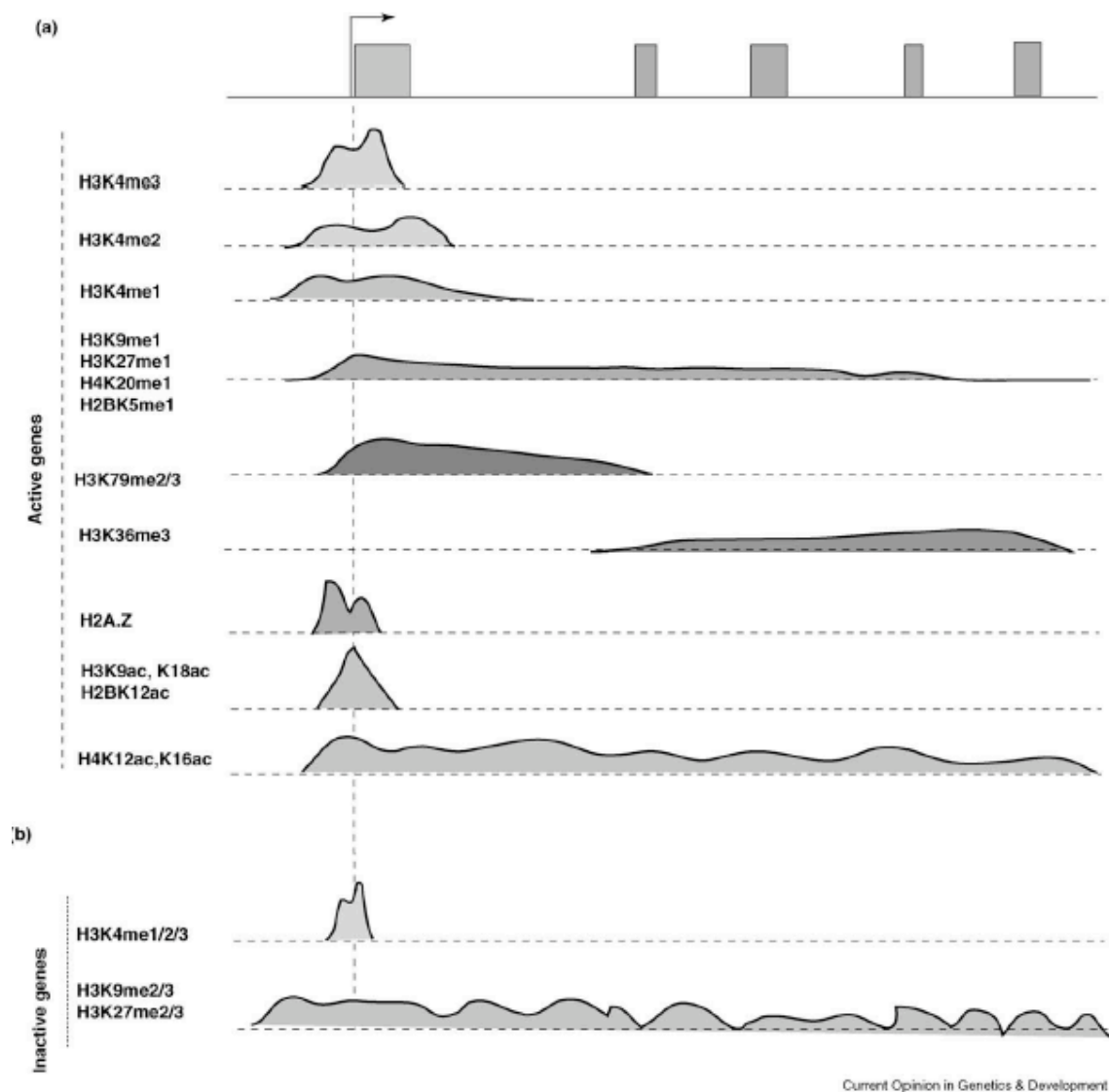
Contrairement à l'acétylation, la méthylation des lysines d'histones ne provoque par de changements de charges permettant d'influencer directement la structure chromatinienne. Le mécanisme d'action de la méthylation est donc différent et permettrait de créer des sites spécifiques de reconnaissance et de fixation pour certaines protéines régulatrices. Il existe, en effet, des protéines possédant des domaines capables de reconnaître les lysines méthylées. Cela inclut, par exemple, les protéines ayant un chromodomaine, qui permet de fixer spécifiquement les lysines méthylées ou encore les protéines à domaine TUDOR (qui reconnaît les arginines et les lysines méthylées et régule également les interactions protéine-protéine), MBT (Malignant Brain Tumor), PHD (plant homeodomain), WD40 etc... Parmi ces protéines, on trouve, entre autres, des enzymes de modification des histones telles que des KMT (Suv39h1/2, PRC1/2), des HAT (Gcn5, NuA4, SAGA), des complexes de remodelage de la chromatine (le complexe NURF, CHD1), des facteurs de transcription (TF_{II}D) ou encore des protéines servant de « plateforme » pour recruter d'autres protéines régulatrices. Par ailleurs, ces protéines sont, pour la majorité, sélectives du type de résidu lysine méthylé, dont je vais présenter quelques exemples.

La méthylation des résidus lysine est principalement étudiée au niveau de la queue N-terminale de l'histone de l'histone H3 sur ses résidus 4, 9, 27 et 36, sur la lysine 20 de

l'histone H4, mais également dans la partie globulaire de l'histone H3 sur les résidus 64 et 79 (Singh et al, 2010). D'autres résidus lysine peuvent être méthylés sur les histones H3 et H4 par exemple H3K14, H3K18 ou encore H4K5, H4K16, H4K59 et H4K77, cependant, les enzymes et les fonctions associées sont encore très peu caractérisées. De même, les histones H1, H2A, H2B peuvent être méthylés sur différents résidus (Tan et al, 2011).

La méthylation des histones est impliquée dans divers processus tels que la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN. En ce qui concerne la transcription, on associe généralement les méthylations de H3K9, H3K27, H3K64, H4K20 et H1K26 à l'inhibition de la transcription, tandis que les méthylations de H3K4, H3K36 et H3K79 sont plutôt associées aux régions transcriptionnellement actives. Cependant, ces effets dépendent du niveau de méthylation de la lysine (mono, di ou tri-méthylation), de la localisation de la lysine sur le gène (enhancer, région transcrite) et peuvent parfois être dépendants du cycle cellulaire (Figure 9).

Par exemple, dans le cas de H4K20, chaque niveau de méthylation est impliqué dans un processus biologique différent. En phase M, H4K20me1 est augmenté et joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire et la condensation des chromosomes ((Yang & Mizzen, 2009). En dehors de la phase M, H4K20me1 semble être associé à l'activation de la transcription (Vakoc et al, 2006). Une autre étude a par ailleurs montré que H4K20me1, au niveau des origines de réplication, était essentiel à l'assemblage du complexe de pré-initiation de la réplication (Tardat et al, 2010). De plus, H4K20me2 est impliquée dans la réparation de l'ADN et H3K20me3 est enrichie dans l'hétérochromatine et participe à la maintenance de l'hétérochromatine ainsi qu'à la stabilité des télomères (Wang & Jia, 2009).



Current Opinion in Genetics & Development

Figure 9 : répartition des marques sur les différentes régions d'un gène.

Répartition des différentes marques sur les différentes régions de gènes actifs (a) et inactifs (b). Les gènes actifs se caractérisent par la présence de marques actives, à la fois autour et en aval du TSS (Transcription Start Site). Les gènes inactifs portent des marques répressives et n'ont généralement pas de marques actives en aval du TSS, bien qu'ils puissent en avoir autour du TSS (Wang et al, 2009).

Dans le cas de H3K4, on trouve un fort enrichissement de H3K4me3 au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS) des gènes actifs (Vakoc et al, 2006). De plus, il a été montré chez la levure, que l'enzyme SET1, responsable de H3K4me3, s'associe à l'ARN polymérase II (ARN pol II) (Ng et al, 2003). La présence le long des gènes de H3K4me3 contribue à l'initiation de la transcription et est corrélée au recrutement de l'ARN pol II (Okitsu et al, 2010). De même, il a été montré que la di et tri-méthylation de H3K4 permettaient le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine ISWI et ainsi,

participaient à la correcte distribution de l'ARN pol II sur les régions transcrites des gènes (Pekowska et al, 2010; Santos-Rosa et al, 2003). Ou encore, la protéine CHD1 faisant partie du complexe HAT SAGA, est capable, à travers un de ses chromodomaines, d'interagir directement avec H3K4me_{2/3} et permettre ainsi le recrutement d'une HAT au niveau de promoteurs de gènes transcrits (Timmers & Tora, 2005).

La méthylation de H3K36 est associée à l'activation de la transcription, notamment H3K36me₃ qui est enrichie aux extrémités 3' des gènes transcrits (Bannister & Kouzarides, 2004). Cependant, au niveau des régions transcrites, la méthylation de H3K36 empêche au contraire l'initiation de la transcription inappropriée dans les séquences intragéniques (Lee & Shilatifard, 2007).

Le rôle dans la transcription de la méthylation de H3K79 est encore controversé. En effet, chez la Drosophile et la souris la méthylation de H3K79 agirait comme une marque activatrice (pour revue (Martin & Zhang, 2005)), alors que chez l'Homme H3K79me₁ est enrichie sur les gènes actifs tandis que H3K79me₃ est présente sur les gènes transcriptionnellement inactifs (Barski et al, 2007).

H3K27me_{2/3} est associé à la répression transcriptionnelle, en particulier, à l'inactivation du chromosome X (Plath et al, 2003) et joue un rôle important dans la répression des gènes spécifiques du développement, comme les gènes homéotiques HOX (Cao et al, 2008). Le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) permet la tri-méthylation de H3K27 qui est alors reconnue par une protéine à chromodomaine appartenant au complexe PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1). Le complexe PRC1 induit la répression des gènes notamment en inhibant le complexe PIC (RNA polymerase II Preinitiation Complex) (Lehmann et al, 2012).

La di et tri-méthylation de H3K9 au niveau des promoteurs des gènes est caractéristique des gènes réprimés. H3K9me₃ est, elle, fortement enrichie au niveau de l'hétérochromatine

constitutive. En effet, H3K9me3 fournit un site de liaison pour le chromodomaine de la protéine de l'hétérochromatine HP1 (Heterochromatin Protein 1), induisant une hétérochromatinisation et une répression transcriptionnelle (Hiragami & Festenstein, 2005). Dans l'euchromatine, H3K9me2/3 au niveau des promoteurs des gènes est impliquée dans la répression transcriptionnelle et ce processus est médié par des co-répresseurs, tels que pRb (rétinoblastome protéine) ou encore KAP1 (KRAB-associated protein-1) (Nielsen et al, 2001). Par ailleurs, H3K9me2 est principalement associée à des sites répliqués durant le milieu de la phase S tandis que les sites H3K9me3 sont répliqués en fin de phase S. Toutefois, la méthylation de H3K9 n'est pas toujours associée à une répression de la transcription. En effet, les régions transcrites de certains gènes semblent enrichies en H3K9 méthylé (Vakoc et al, 2005). La méthylation de H3K9 est également impliquée dans l'inactivation du chromosome X (Heard et al, 2001), et dans l'épissage alternatif (Ameyar-Zazoua et al, 2012; Sims et al, 2007).

4.5.2.2 Les lysines méthyltransférases

Les enzymes qui catalysent la réaction de méthylation des lysines d'histone sont les lysines méthyltransférases (KMT). A l'exception de DOT1L qui méthyle H3K79, toutes les KMTs contiennent un domaine conservé au cours de l'évolution d'environ 130 acides aminés : le domaine SET (Dillon et al, 2005). Ce domaine est responsable de l'activité catalytique des KMTs et tire son nom de 3 enzymes initialement identifiées chez la Drosophile, à savoir le suppresseur de variégation Su(var)3-9, Enhancer-of-Zeste et Trithorax. Depuis, on dénombre environ une cinquantaine de protéines à domaine SET chez l'Homme. Ces KMTs ont été subdivisées en différentes sous-familles en fonction des autres domaines qui les composent, telles que SUV3-9, SET1, SET2, E(Z), SMYD and SUV4-20. Quelques membres orphelins ont également été identifiés : SET7/9 et SET8/PRSET7 qui possèdent un domaine PR ayant une forte similarité de séquence avec le domaine SET (Dillon et al, 2005) (figure 10).

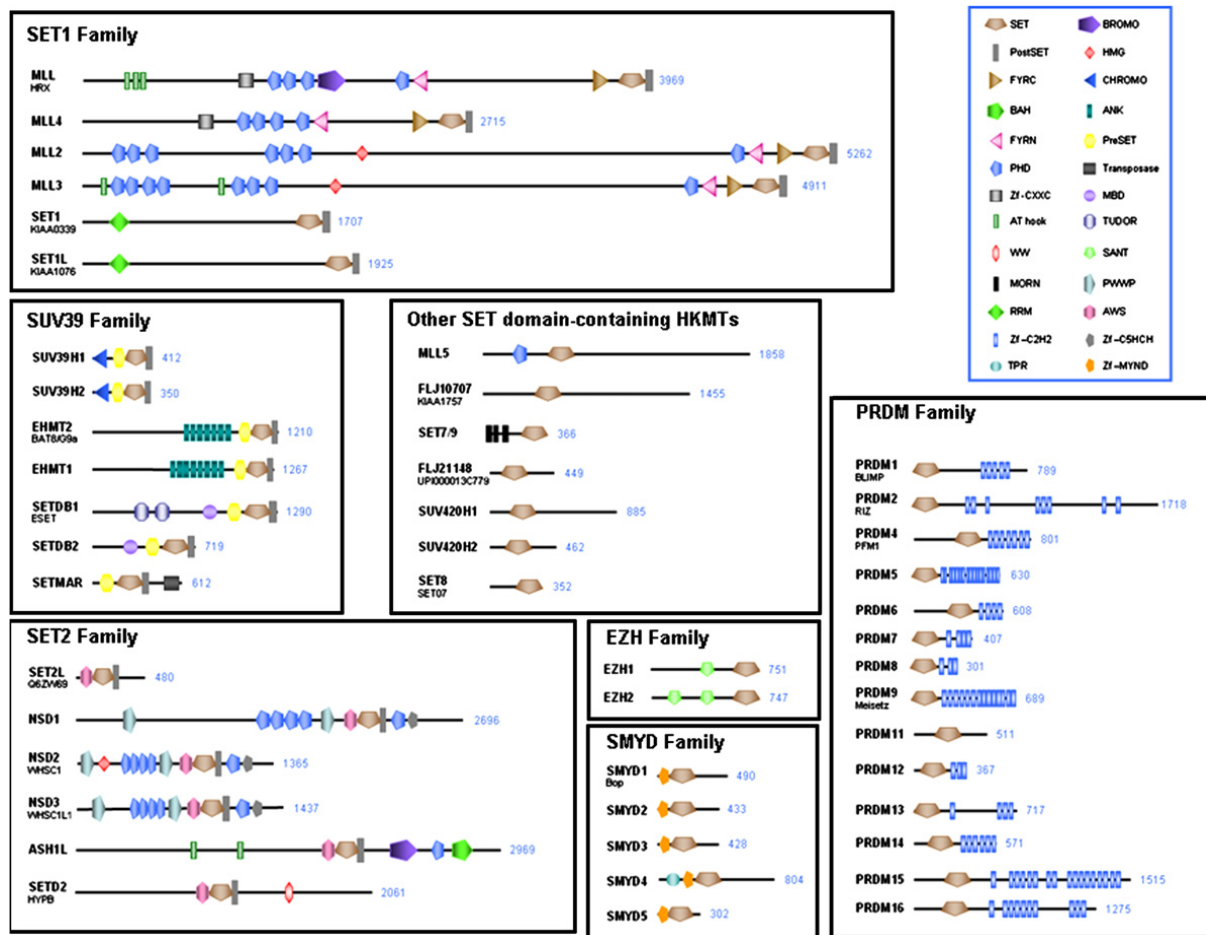


Figure 10 : Les différentes familles d’histone méthyltransférases.

Représentation schématique des familles d’histone méthyltransférases contenant un domaine SET ou un domaine PR-SET (adapté de la revue : (Volkel & Angrand, 2007)).

La famille SET1

La famille SET1 est composée des protéines MLL, MLL2, MLL3, MLL4, SET1 et SET1L. Cette famille se caractérise par la présence à l’extrémité C terminale d’un domaine SET suivi d’un domaine dit Post-SET, essentiel à leur activité enzymatique. Ces protéines, dont certaines interagissent avec l’ARN poll II, méthylent spécifiquement H3K4, et de ce fait sont associées à l’activation transcriptionnelle (pour revue (Volkel & Angrand, 2007)).

La famille SET2

La famille SET2 comprend trois protéines de la sous famille NSD : NSD1, NSD2 et NSD3, ainsi que trois autres protéines : ASH1L, SETD2/HYPB et SET2L. Toutes les protéines de cette famille possèdent un domaine SET encadré par une région à motif post-SET et une

région à motif AWS. SETD2 méthyle spécifiquement H3K36, mais de manière générale l'activité méthyltransférase de cette famille ne se réduit pas à ce seul résidu. NSD1 est notamment capable de méthyle aussi bien H3K36 que H4K20 (pour revue (Volkel & Angrand, 2007)).

La famille Suv3-9

La famille Suv3-9 comprend 7 protéines : Suv39h1, Suv39h2, G9a/EHMT2, GLP/EHMT1, SETDB1/ESET, SETDB2 et SETMAR. Elles possèdent toutes un domaine SET encadré par un domaine pre-SET et un domaine post-SET. Ces deux domaines additionnels sont essentiels à l'activité catalytique du domaine SET de cette famille (Rea et al, 2000). Les KMTs de cette famille, à l'exception de SETMAR qui méthyle H3K4 et H3K36, méthylent spécifiquement H3K9. Les KMTs spécifiques de H3K9 et leurs rôles dans la physiologie cellulaire seront approfondis dans la seconde partie de l'introduction de cette thèse.

La famille EZH

Cette famille se compose de deux homologues de Enhancer of Zeste (E(Z)) : EZH1 et EZH2. Ces protéines font partie du complexe Polycomb Répresseur 2 (PRC2) qui méthyle H3K27 (Czermin et al, 2002; Muller et al, 2002). Cette famille se caractérise par la présence en amont du domaine SET d'une région composée d'une quinzaine de cystéines qui pourraient avoir un rôle similaire au domaine post-Set en terme d'activité enzymatique (pour revue (Volkel & Angrand, 2007)).

La famille SMYD

Cette famille comprend cinq membres, les protéines SMYD 1-5 dont la particularité est de posséder un motif en doigt de zinc qui permet de lier l'ADN (Spadaccini et al, 2006). Ces protéines sont capable d'agir sur la transcription selon deux mécanismes différents : en modifiant la chromatine *via* la méthylation des histones ou en recrutant au niveau de l'ADN des co-facteurs *via* leur domaine de liaison MYND. Par exemple, SMYD3 peut méthyle

H3K4 mais aussi se fixer sur l'ADN *via* son motif MYND et recruter l'ARN polymérase II (Hamamoto et al, 2004).

Autres KMTs possédant un SET domaine

Comme autre protéine orpheline à domaine SET on retrouve SET7/9 et MLL5 qui méthylent H3K4. On trouve également certaines protéines ne possédant pas d'autre domaine particulier à l'exception du domaine SET. Ceci est le cas de la protéine SET8/PR-SET7 qui mono-méthyle H4K20, des deux protéines Suv4-20h1 et Suv4-20h2 qui sont spécifiques de la di et tri-méthylation de H4K20 et des protéines non encore caractérisées LJ10707 et FLJ21148 (pour revue (Upadhyay & Cheng, 2011)).

La famille PRDM

La famille PRDM est une vaste famille de protéines homologues qui possède un domaine PR-SET dont la fonction est similaire au domaine SET. Le pourcentage d'identité entre les domaines SET et PR-SET est de seulement 30%. Cependant, leur structure tridimensionnelle est très proche. L'activité catalytique des protéines de cette famille est controversée. Pour le moment, seules deux protéines ont été identifiées comme ayant une activité méthyltransférase : PRDM2/RIZ1 qui méthyle spécifiquement H3K9 et Meisetz qui méthyle H3K4. Par ailleurs, d'autres membres de la famille PRDM tels que PRDM1/BLIMP1 et PRDM6/PRISM interagissent spécifiquement avec la KMT G9a (Davis et al, 2006; Gyory et al, 2004).

4.5.2.3 La déméthylation des lysines

La méthylation des lysines a longtemps été considérée comme une modification irréversible. La récente découverte d'enzymes capables de déméthyliser les lysines, les lysines déméthylases (KDM), a remis en question cette idée. La première lysine à avoir été identifiée est la KDM LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1). Plus tard, de nombreuses autres KDMs ont été identifiées. Les KDMs sont classées en deux grandes familles en fonction du mécanisme de

déméthylation utilisé.

La première famille est constituée de deux membres : LSD1 et LSD2. Ces deux enzymes font partie du sous groupe KDM1. Ce sont des flavines monoamines oxydases qui dépendent du co-facteur Adénine Flavine Dinucléotide (FAD) pour catalyser la réaction de déméthylation au niveau des lysines mono et diméthylées. Ces KDMs ne peuvent cependant pas déméthyliser une lysine triméthylée. LSD1 est aussi bien impliquée dans l'activation que dans la répression transcriptionnelle. En effet, LSD1, en complexe avec CoREST (Corépresseur pour RE1-Silencing Transcription factor), inhibe la transcription de gène cible via la déméthylation de H3K4me1/2. A l'inverse, l'interaction de LSD1 avec le récepteur aux androgènes agit comme coactivateur de la transcription via la déméthylation de H3K9me1/2 (pour revue Hou et Yu, 2010). LSD2 déméthyle H3K4me1/2 et a été impliquée dans l'élongation de la transcription (Fang et al, 2010).

La deuxième famille de KDM correspond aux déméthylases à domaine Jumonji C (JmjC) (pour revue (Shi & Tsukada, 2013)). Contrairement aux LSDs qui n'ôtent que les formes mono et di-méthylées, les enzymes du groupe JmjC sont capables d'agir sur les trois niveaux de méthylation. Les JmjC ont été classées en sous familles selon les domaines additionnels qu'elles contiennent : KDM2-8.

La sous famille KDM2 comprend deux protéines: KDM2A et KDM2B qui sont spécifiques de H3K36me1/2, bien qu'une activité H3K4me2 déméthylase ait été décrite pour KDM2B (Frescas et al 2007).

La sous famille KDM3 contient trois membres: KDM3A et KDM3B qui sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle et ont pour substrat H3K9me1/2. Il n'a pas encore été identifié

d'activité déméthylase pour le troisième membre JHDM2 (pour revue Verrier et al 2011 ; Zhang et al 2011 ; Kim et al 2012).

La sous famille KDM4 comprend quatre membres: KDM4A-D capable de déméthyliser H3K9me_{2/3} et H3K36me_{2/3}. Cette famille d'enzyme a surtout été impliquée dans la réponse aux hormones, en agissant comme cofacteur pour les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes (pour revue Verrier et al 2011 ; Zhang et al 2011).

La sous famille des KDM5 regroupe quatre membres: KDM5A-D qui sont spécifiques de H3K4me_{2/3}. Ces protéines ont la particularité de posséder un domaine ARID qui leur permet de lier l'ADN de façon séquences spécifique, ainsi que différents domaines PHD. Par ailleurs, KDM5A participe à la répression des gènes cibles de E2F dans les cellules différenciées (Van Oevelen et al 2008).

La sous famille KDM6 compte trois membres : KDM6A-C. KDM6A et KDM6B sont spécifiques de H3K27me_{2/3} (Lan et al 2007). Aucune activité n'a été décrite pour KDM6C. Par ailleurs, KDM6A a été impliquée dans l'activation des gènes cibles de MyoD durant la différenciation musculaire (Seenundun et al 2010).

La sous famille KDM7 comprend 3 membres: KDM7A-C spécifique de H3K9me_{1/2}. KDM7A peut également déméthyliser H3K27me_{1/2} et KDM7B peut déméthyliser H4K20me₁ (pour revue Verrier et al ; Zhang et al 2011).

La dernière sous famille se compose de KDM8 qui favorise la transcription de la cycline A1 en empêchant le recrutement d'HDAC via la déméthylation de H3K36me₂ au niveau de la

région codante de la cycline A1 (Hsia 2010).

4.5.2.4 Le code des histones

Nous venons de voir que les histones peuvent subir de nombreuses modifications. Il apparaît que ces modifications peuvent avoir une influence les unes sur les autres. Par exemple, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 10 de H3 entraîne une acétylation plus importante de H3K14 (Lo et al, 2000). La double modification est interprétée comme reflétant l'activation transcriptionnelle, contrairement à la méthylation de H3K9 qui est réprimée par ces deux modifications (Rea et al, 2000). Par ailleurs, les différentes modifications des lysines sont mutuellement exclusives. Une lysine ne peut pas être méthylée ou ubiquitinylée lorsqu'elle est déjà acétylée. Ainsi, les acétylations des lysines 9 ou 27 de l'histone H3 s'opposent à leur méthylation et donc à la répression transcriptionnelle. L'influence d'une modification sur une autre peut également avoir lieu entre deux histones différentes. Par exemple, l'ubiquitination de la lysine 120 de l'histone H2B est essentielle à la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone H3 (Zhu et al, 2005); ou encore l'ubiquitination de H2AK119 dépend de la méthylation de H3K27 (figure 11).

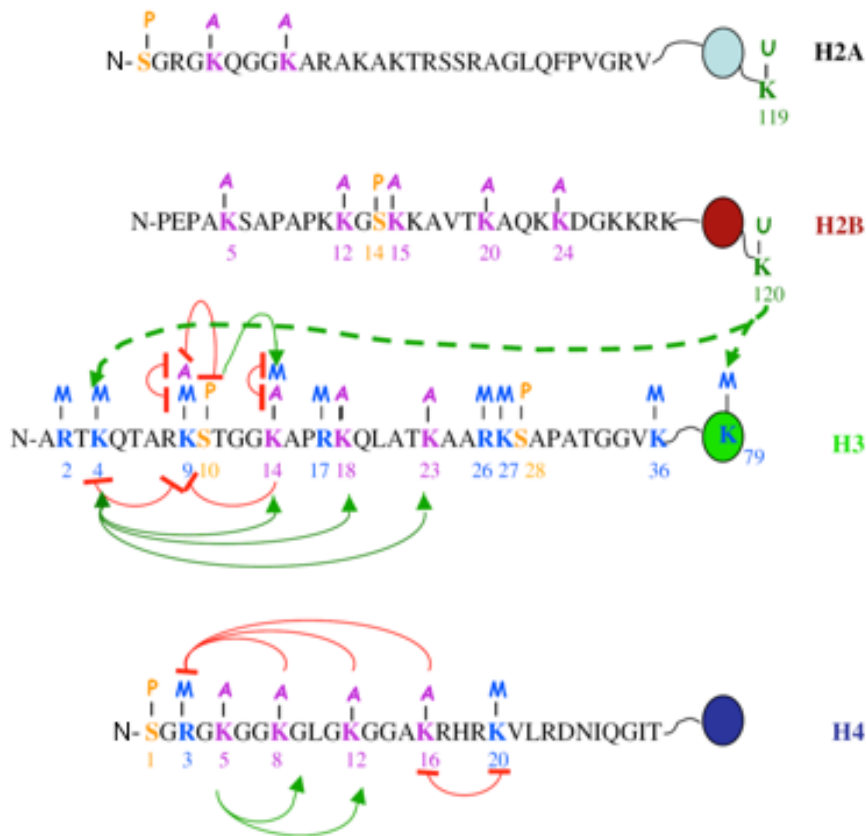


Figure 11 : Exemples d'inter-relations entre différentes modifications d'histones.

Les flèches vertes indiquent les influences positives possibles entre certaines modifications post-traductionnelles d'histones. Les flèches rouges indiquent les influences négatives (adapté de la revue : (Santos-Rosa & Caldas, 2005)).

Il a été suggéré que l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones constituait un code : le code des histones, dénommé ainsi par analogie au code génétique (pour revue (Jenuwein & Allis, 2001; Strahl & Allis, 2000)). Le code des histones propose l'hypothèse suivante : les différentes combinaisons de modifications forment un code qui peut être reconnu par des protéines régulatrices capables, par la suite, de traduire ce code en un état chromatinien spécifique : actif, permissif, restrictif ou inactif. Cette hypothèse est soutenue par l'existence de protéines dotées de domaines spécifiques capables d'interagir avec les modifications d'histones, permettant ainsi de traduire le message porté par les histones. Comme, par exemple, les protéines à bromodomaine qui reconnaissent les histones acétylées, ou encore les protéines à chromodomaine qui reconnaissent les histones méthylées (pour revue, (Taverna et al, 2007)).

Partie 2 : Rôle de la méthylation de H3K9 dans la physiologie cellulaire

Dans la première partie de la thèse, j'ai décrit différentes modifications de la chromatine, dont les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, durant ma thèse je me suis intéressée à une de ces modifications : la méthylation de H3K9 et en particulier aux enzymes qui établissent cette marque. Dans cette partie, je décrirai les différentes caractéristiques des KMTs de H3K9. Et, afin de mettre en évidence leur impact sur la physiologie cellulaire, je décrirai leurs implications dans certaines pathologies, en particulier dans le cancer. En effet, mon sujet de thèse porte sur l'étude des quatre principales KMTs de H3K9 dans la régulation de l'équilibre prolifération différenciation, or cet équilibre se trouve souvent dérégulé dans les cancers.

I. Les méthyltransférases spécifiques de H3K9

De manière générale, la méthylation de H3K9 est associée à la répression de l'expression des gènes. Cependant, certaines études ont montré que cette marque peut dans certains cas être associée aux gènes actifs. Par exemple, il a été montré que la méthylation de H3K9 dans les régions transcrites de gènes actifs peut être associée à l'élongation de la transcription (Vakoc et al, 2005). Chez différentes espèces, telles que les mammifères, la Drosophile ou encore Arabidopsis, il est possible de séparer partiellement, dans les différents compartiments chromatiniens, la localisation de H3K9me en fonction de son niveau de méthylation. En effet, H3K9 peut être mono-, di-, ou tri-méthylé et à ces différents niveaux de méthylation sont associés différentes réponses biologiques (Martin & Zhang, 2005). Par exemple, la tri-méthylation de H3K9 est associée à l'hétérochromatinisation *via* notamment le recrutement de la protéine HP1 et donc, à l'inhibition de l'expression des gènes tandis que la mono- et di-

méthylation de H3K9 sont enrichies dans les régions d'euchromatine. Différentes enzymes catalysent ces différents niveaux de méthylation. Ce sont principalement des enzymes de la famille SUV39 : Suv39h1, Suv39h2, G9a, GLP SETDB1 et SETDB2, mais aussi d'autres KMTs n'appartenant pas à cette famille, comme PRDM2/RIZ1 et ASH1L dont l'activité méthyltransférase sur H3K9 a été démontrée in vitro (Kim et al, 2003). Dans ce chapitre, je décrirai les principales caractéristiques des enzymes de la famille Suv39.

1. Suv39h1 et Suv39h2

Suv39h1 et son isoforme Suv39h2 sont les homologues humains de la protéine Su(var)3-9 de la Drosophile. Suv39h1 est la première à avoir été décrite chez l'Humain pour son activité méthyltransférase sur H3K9 (Rea et al, 2000). Bien que durant l'embryogenèse les deux isoformes présentent un profil d'expression similaire, chez l'adulte Suv39h1 s'exprime de manière ubiquitaire tandis que Suv39h2 est spécifiquement exprimé dans les testicules (O'Carroll et al, 2000). Chez la souris, les simples inactivations géniques ou knock-out (KO) de Suv39h1 ou Suv39h2 ne présentent pas de phénotype particulier, sauf pour quelques cas particuliers. En effet, bien que les souris mutantes nulles pour *Suv39h1* soit parfaitement viables, elles présentent une prédisposition aux lymphomes (Reimann et al, 2010). Ou encore, chez le poisson zèbre, où le KO de *Suv39h1* induit des défauts de différenciation terminale spécifiques d'organe (Rai et al, 2006). Le double KO Suv39h1 et *suv39h2* chez la souris entraîne une réduction de la viabilité durant le développement embryonnaire ainsi qu'un retard de croissance. Les doubles KO présentent aussi une instabilité génomique caractérisée notamment par un nombre anormal de chromosomes. Cette instabilité serait notamment due à une ségrégation anormale des chromosomes qui, durant la spermatogénèse, serait également la cause de la stérilité chez les mâles (Peters et al, 2003; Peters et al, 2001). Des expériences faites sur des cellules humaines doubles mutantes pour

Suv39h1 et *Suv39h2* montrent une perte de la tri-méthylation de H3K9 (Peters et al, 2003). Ces observations coïncident avec la distribution hétérochromatique de ces deux enzymes (Aagaard et al, 1999; Schotta et al, 2002) et démontrent qu'elles sont responsables de la tri-méthylation de H3K9 qui est une marque caractéristique de l'hétérochromatine chez les mammifères. De plus, la surexpression de l'homologue *su(var)3-9* chez la Drosophile, génère la formation ectopique d'hétérochromatine (Ebert et al, 2004). Ce processus d'hétérochromatinisation fait, entre autre, intervenir la protéine de l'hétérochromatine HP1. En effet, chez la souris, HP1 est délocalisée *in vivo* des domaines péri-centriques en absence de *Suv39h1/h2* (Peters et al, 2001; Schotta et al, 2002) et sa localisation peut être restaurée si la protéine active *Suv39h1* est exprimée de nouveau (Lachner et al, 2001). Les deux protéines *suv39h* sont capables de tri-métyler spécifiquement H3K9, mais utilisent comme substrat une forme déjà mono- ou di-méthylée de H3K9 (Peters et al, 2003; Rea et al, 2000). H3K9 doit donc être préalablement méthylée par une autre enzyme. On peut par ailleurs noter qu'outre les domaines SET, post-Set et pre-SET, ces deux protéines possèdent un chromodomaine (Figure 10) capable de reconnaître et de fixer H3K9^{me2/3} méthylée. Notre laboratoire a proposé une possible coopération avec d'autres mono et/ou di-méthyltransférases de H3K9 en démontrant l'existence de mégacomplexes contenant entre autres les 4 KMT spécifiques de H3K9 : G9a, GLP, SETDB1 et *Suv39h1* (Fritsch et al, 2010). Le laboratoire a également montré que *Suv39h1* est impliqué dans la répression *de novo* de gènes et dans la formation d'hétérochromatine facultative, notamment lors du déclenchement d'un programme de différenciation (Ait-Si-Ali et al, 2004; Guasconi et al, 2010). D'autre part, et en accord avec leur rôle dans l'inhibition des gènes, il a été montré que *Suv39h1* interagit avec l'ADN méthyltransférase DNMT3B (Lehnertz et al, 2003; Snowden et al, 2002). Enfin, il a été montré que la surexpression de *Suv39h1* chez la souris entraîne de sévères défauts de la ségrégation des chromosomes, la différenciation érythroïde et la

prolifération cellulaire (Czvitkovich et al, 2001).

2. SETDB1/ESET

La protéine humaine SETDB1 (pour SET Domain Bifurcated 1) (ESET chez la souris) a été décrite pour la première fois en 2002. Il a alors été montré que dans les cellules HeLa, SETDB1 est principalement localisée dans l'euchromatine où elle participerait à l'inhibition des gènes. Cette inhibition se fait entre autre *via* l'interaction de SETDB1 avec KAP1. KAP1 est un co-répresseur de la famille des Trim et interagissant des protéines de la superfamille KRAB à doigts de zinc qui permet son recrutement de façon spécifique au niveau des promoteurs des gènes (Schultz et al, 2002). Chez la Drosophile, SETDB1, aussi appelé Egg ou dmSETDB1, est principalement localisée au niveau du chromosome 4, mais aussi au niveau de l'euchromatine et du chromocentre des chromosomes géants polythène. Les mutants hypomorphes ou nuls de SETDB1 chez la Drosophile montrent une perte significative des trois niveaux de méthylation de H3K9 (Seum et al, 2007). SETDB1 semble avoir des activités enzymatiques différentes en fonction du complexe dans lequel elle se retrouve; en effet, SETDB1 est capable d'interagir avec une grande variété de protéines, notamment des facteurs de transcription (ERG), des HDAC (HDAC1/2), des ADN méthyltransférases (DNMT3A/B) et des co-répresseurs transcriptionnels, tels que mSin3A/B, MBD1, KAP1, mAM. Ainsi, SETDB1 est capable de mono- et de di-métyler H3K9, mais également de tri-métyler H3K9 en présence de son co-facteur mAM (murin ATFa-associated factor) chez la souris et hAM chez l'Homme (Wang et al, 2003).

SETDB1 intervient surtout au niveau de l'euchromatine où elle jouerait un rôle central dans la répression des gènes. SETDB1 serait également impliquée dans la formation et le maintien de l'hétérochromatine péricentrique. En effet, au cours de la réplication, SETDB1 peut s'associer avec HP1 et la protéine CAF1 (chromatin assembly factor 1). Ce complexe ainsi formé

méthyle H3K9me1 libre (non nucléosomale) permettant ensuite la tri-méthylation par Suv39h1/2 au niveau des régions d'hétérochromatine péricentrique (Loyola et al, 2009). Chez la souris, l'expression de ESET commence au stade blastocyte et devient ubiquitaire durant le développement peri-implantatoire. ESET est essentielle au développement embryonnaire ainsi qu'à la survie des cellules ES. En effet, le mutant nul homozygote de *ESET* entraîne une létalité embryonnaire entre E3,5 et E5,5 et la remise en culture des cellules de la masse interne de blastocystes *ESET*^{-/-} est impossible (Dodge et al, 2004). ESET intervient dans le maintien de la pluripotence. En effet dans les cellules ES, il a été montré que l'expression de SETDB1 diminue avec la différenciation induite par l'acide rétinoïque, et en absence de ce dernier, les cellules ES se différencient en cellules du trophoblaste (à l'origine des annexes embryonnaires). En collaboration avec le facteur de pluripotence Oct4 avec lequel elle interagit, ESET serait impliquée dans la répression des gènes spécifique du trophoblaste (Bilodeau et al, 2009; Cho et al, 2012; Yeap et al, 2009). Enfin, SETDB1 possède des domaines capables de reconnaître et de fixer des groupements méthyl (figure 10) : le domaine MBD (pour Méthyl Binding Domain) permet sa fixation au niveau de l'ADN méthylé, et le domaine TUDOR qui reconnaît les arginines et les lysines méthylées et régule également les interactions protéine-protéine. La présence de ces deux domaines permettrait, entre autre, de coordonner la méthylation des histones et de l'ADN.

3. G9a/EuHMT2 et GLP/EuHMT1

Les premières analyses fonctionnelles des protéines G9a et GLP (G9a-like protein) ont été réalisées respectivement par (Ogawa et al, 2002; Tachibana et al, 2001). Ces deux protéines se caractérisent par une forte homologie de séquence. Comme toute les protéines de la famille Suv39, elles possèdent un domaine SET encadré par un domaine pre- et post-SET. De plus, elles possèdent un domaine ankyrine répété qui intervient dans les interactions protéines-

protéines et par lequel elles peuvent fixer H3K9me1/2 (figure 10 et 13).

L'étude du mutant nul a permis de démontrer que G9a et GLP sont les principales mono- et di-méthyltransférases de H3K9 dans les régions d'euchromatine, et sont impliquées *via* ce mécanisme dans l'inhibition de l'expression des gènes de cette région (Stabell et al, 2006; Tachibana et al, 2001; Tachibana et al, 2002; Tachibana et al, 2005). En effet, il a été montré que les simple KO de *G9a* ou *GLP* dans les cellules ES de souris, entraînent une létalité embryonnaire précoce due à de sévères défauts de croissance et une perte globale de H3K9me1/2 au niveau de l'euchromatine. Cela entraîne notamment une levée de répression des gènes de la famille *Mage* (*Melanoma-associated-antigen*), associée à une perte de H3K9me1/2 sur les promoteurs de ces gènes. Les simple KO provoquent également une re-localisation des protéines HP1 de l'euchromatine vers l'hétérochromatine (Tachibana et al, 2002; Tachibana et al, 2005). Toujours dans les cellules ES, G9a est impliquée dans la répression irréversible du gène codant pour le marqueur de pluripotence Oct3/4 dont l'expression est rapidement réprimée de façon stable dès les premières étapes de différenciation (Epsztejn-Litman et al, 2008; Feldman et al, 2006). En outre, la méthylation de H3K9 établie par G9a a été impliquée dans l'inhibition de gènes régulés durant le développement, *via* l'interaction de G9a avec des facteurs de transcription spécifiques, tels que le facteur de transcription des cellules du plasma Blimp-1 (Gyory et al, 2004), le facteur myogénique MyoD (Ling et al, 2012a), le facteur de restriction neuronal NRSF/REST (Roopra et al, 2004) ou encore CDP/cut (Nishio & Walsh, 2004) et E2F6 qui sont également liés par GLP. Des études ont également impliqué G9a dans la régulation des gènes soumis à empreinte (Nagano et al, 2008; Wagschal et al, 2008). D'une façon générale, l'étude chez la souris tend à montrer le rôle indispensable de G9a et GLP dans la survie et la différenciation cellulaires.

In vitro, G9a et GLP exercent indépendamment une activité KMT au niveau des mêmes substrats et, comme nous venons de le voir, le niveau de H3K9me1 et H3K9me2 est sévèrement réduit aussi bien par le KO de *G9a* que de *GLP*. Par ailleurs le double KO *G9a/GLP* ne réduit pas plus le niveau de H3K9me1 et de H3K9me2 (Tachibana et al, 2005). De plus, l'expression de G9a ne peut pas compenser la perte de GLP et *vice versa*. G9a et GLP fonctionnent donc de manière coopérative pour méthyle H3K9. La caractérisation biochimique de ces deux protéines a permis de montrer qu'elles sont capables de s'homo- ou hétéro-dimériser *via* leur domaine SET. De plus, il a été montré dans différents types cellulaires humains et murins que ces deux protéines sont majoritairement présentes sous la forme d'un complexe hétéromérique fonctionnel G9a-GLP (Tachibana et al, 2008; Tachibana et al, 2005). D'autre part, les homo- et hétérodimères de G9a et GLP interagissent également *via* le domaine SET avec la protéine Wiz qui contient de multiples motifs en doigt de zinc permettant de lier l'ADN (Figure 13). Enfin, il a été montré que les KO et/ou la régulation négative de GLP et Wiz, diminuent fortement le niveau protéique de G9a (Tachibana et al, 2005; Ueda et al, 2006). Une étude sur le rôle exact de chacune de ces protéines au sein de l'hétéro-complexe a permis de mieux caractériser leur rôle dans la répression des gènes *de novo*. Ainsi, au sein de l'hétérodimère G9a/GLP, l'activité de GLP n'est nécessaire ni à la méthylation de H3K9 ni à la répression génique : seule l'activité de G9a semble nécessaire. Néanmoins, en absence de GLP, G9a seul n'a pas d'activité car la formation de l'hétérodimère semble indispensable. D'autre part, il a été montré que la présence de l'hétérodimère est associée à l'inhibition de la transcription *via* la méthylation de l'ADN et cela indépendamment de l'activité de G9a ou GLP (Tachibana et al, 2008). G9a est en effet capable *via* le domaine ankyrine d'interagir avec les ADN méthyltransférases DNMT3a/b (Epsztejn-Litman et al, 2008; Tachibana et al, 2008). De plus, G9a est également définie comme une KMT de maintenance. En effet, lors de la réplication, G9a interagit avec DNMT1

et PCNA et serait capable de méthylater les nucléosomes nouvellement incorporés (Esteve et al, 2006; Tachibana et al, 2007; Tachibana et al, 2005).

Ainsi, les protéines G9a et GLP sont considérées comme des KMTs de l'euchromatine, d'où leur première appellation de EuHMTase. Néanmoins, un rôle de G9a dans l'établissement de la méthylation de H3K9 au niveau de l'hétérochromatine constitutive n'est pas à exclure. En effet, la diminution de l'expression de G9a induit une perturbation de la taille des télomères (Kondo et al, 2008), la surexpression de G9a dans des cellules de mammifères entraîne une légère localisation de cette dernière au niveau de l'hétérochromatine (Esteve et al, 2005). Et l'expression chez la Drosophile d'un mutant de G9a induit une légère suppression de la variabilité par effet de position (Mis et al, 2006). De plus, il a été montré que l'activité de G9a et GLP ne se réduit pas à la mono- et di-méthylation de H3K9. Ces deux protéines sont capable de tri-méthylater (mais faiblement) H3K9, et également de méthylater H3K27 et l'histone H1 (Ogawa et al, 2002; Tachibana et al, 2005; Trojer et al, 2009; Weiss et al, 2010; Wu et al, 2011; Yokochi et al, 2009). Par ailleurs, G9a a également été montrée comme ayant un rôle de co-activateur transcriptionnel des gènes cibles des récepteurs nucléaires ou du récepteur aux hormones thyroïdiennes, en permettant notamment le recrutement d'autres co-activateurs comme CARM1, SWI/SNF ou p300 (Choi et al, 2007; Lee et al, 2006).

Enfin, G9a et GLP sont capable de méthylater des substrats non histones, notamment p53, Wiz, CDYL1, ACINUS, Reptine, MyoD et de s'auto-méthylater (Huang et al, 2010; Lee et al, 2010; Ling et al, 2012a; Rathert et al, 2008; Sampath et al, 2007). De plus, l'auto-méthylation de G9a permet de réguler son interaction avec d'autres protéines comme HP1 α ou HP1 γ .

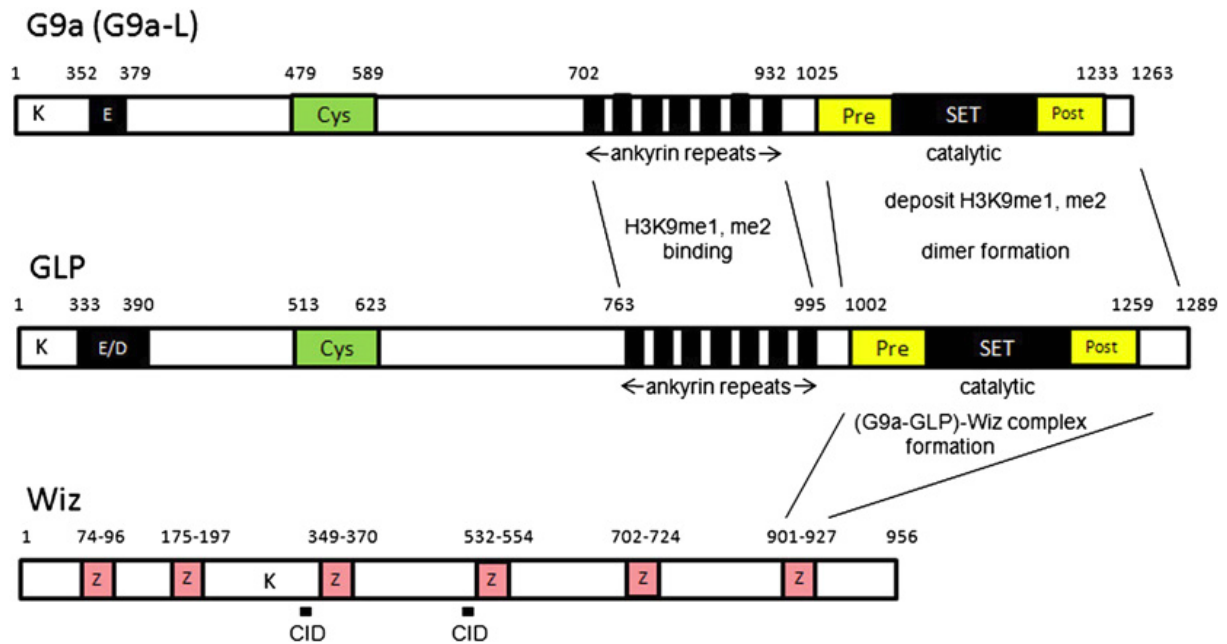


Figure 13 : Organisation des domaines composant le complexe G9a/GLP/Wiz.

Schéma représentant les séquences en acides aminés des protéines murines G9a, GLP et Wiz. Sont représentés les sites potentiels de méthylation de G9a et GLP (K), les régions riches en Glutamate (E), les régions riches en glutamate et acide aspartique (E/D), les régions riches en cystéine (Cys), les domaine pre-SET (Pre) et post-SET (Post), le domaine catalytique SET (SET), les motif en doigt de zinc (Z) et le domaine de répétitions ankyrine qui sert de module d'interaction avec d'autres protéines et H3K9m1/2 (tiré de : (Shinkai & Tachibana, 2011)).

II. Conséquences de la perturbation des fonctions des KMTs de H3K9

Les KMTs de H3K9 sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles sont par exemple impliquées dans la stabilité génomique et la survie cellulaire. Ainsi, une perturbation de la fonction de ces KMTs et notamment de la méthylation de H3K9, a été associée à de nombreuses pathologies. Je décrirai dans cette partie certaines pathologies associées à une dérégulation de G9a, GLP, Suv39h1 ou SETDB1. Comme nous allons le voir, les pathologies concernées par une dérégulation des KMTs sont très variées : telles que des maladies du développement, neurologiques ou encore métaboliques et aussi différents types de cancers. Cette grande diversité de maladies montre l'importance physiologique des KMTs de H3K9, et donc le grand intérêt que nous avons de comprendre et d'élucider leurs mécanismes d'action afin de mieux les cibler en thérapie.

1. Pathologies impliquant les KMTs G9a GLP SETDB1 et Suv39h1.

Les 4 KMTs de H3K9, G9a GLP, SETDB1 et Suv39h1 ont été impliquées dans différents types de pathologies. Chez l'homme, le syndrome associé à la délétion sub-télomérique du chromosome 9q34, également appelé syndrome de Kleefstra qui provoque un retard mental et d'autres défauts développementaux, est causé par une mutation ou haplo-insuffisance de *GLP* (Kleefstra et al, 2006; Kleefstra et al, 2005). Chez la souris il a été montré que le complexe G9a/GLP est important pour l'inhibition des gènes non-neuronaux ou gène neuronaux précoces, dans les neurones matures. Une perte de ce complexe provoque de sévères défauts comportementaux et cognitifs (Balemans et al, 2010). Un rôle similaire est observé chez la Drosophile où les mutants déficients pour *dG9a* ont des problèmes d'apprentissage et de mémoire (Kramer et al, 2011). D'autre part, G9a *via* H3K9me2 a été impliquée dans la dépendance à la cocaïne (Maze et al, 2010). Ainsi, G9a et GLP ont un rôle important dans le cerveau, tant au niveau du développement que son organisation et fonctionnement à l'âge adulte. SETDB1 est aussi impliquée dans certaines fonctions neuronales. Par exemple, la surexpression de SETDB1 chez la souris à un effet antidépresseur et accentue le phénotype neurologique des souris modèles du syndrome de Rett, qui est une maladie neurologique provoquée par une mutation du gène codant pour MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2) (Jiang et al, 2010; Jiang et al, 2011). D'autre part, il a été montré une surexpression de SETDB1 et de H3K9me3 chez les patients atteints de la maladie de Huntington, ainsi que chez les souris R6/2HD qui miment cette maladie (Ryu et al, 2006). Un traitement permettant de diminuer l'expression de SETDB1 permet une amélioration du comportement pathologique des souris R6/2HD, ainsi qu'un allongement de leur temps de survie de 40%.

Les KMTs de H3K9 sont aussi impliquées dans des maladies autres que neurologiques. Par exemple, G9a *via* la méthylation de H3K9, est impliquée dans l'inhibition de gènes soumis à

l’empreinte parentale (Wagschal et al, 2008). G9a est notamment impliquée dans le syndrome de Prader-Willi qui se caractérise par une hypotonie à la naissance ainsi qu’une hyperphagie aboutissant à une obésité morbide (Xin et al, 2003). La protéine Suv39h1 a été décrite comme ayant un rôle dans la FSHD (FacioScapuloHuméral Dystrophy). Cette pathologie est génétiquement corrélée, dans un grand nombre de cas, à une diminution du nombre de répétitions d’un certain type de séquence répétée appelés D4Z4, et cela au niveau du chromosome 4q. sans qu’un lien avec le phénotype pathologique n’ait pu être mis en évidence. Ainsi, il semblerait que la tri-méthylation de H3K9 par Suv39h1 sur ces séquences répétées dans des cellules normales serait perdue dans les cellules des patients FSHD (Zeng et al, 2009). D’autre part, il a été montré que la déplétion de Suv39h1 améliore la réparation de l’ADN et augmente la durée de vie de souris modèle pour la Progeria, qui est une maladie génétique donnant l’impression d’un vieillissement accéléré (Liu et al, 2013).

Enfin, il a été montré que dans les cellules ES de souris, G9a et GLP contrôlent la signature H3K9me2 et la méthylation de l’ADN de rétrovirus endogènes (ERV), de même que SETDB1 via H3K9me3 est impliqué dans l’extinction des ERV (Leung et al, 2011; Matsui et al, 2010). Une caractérisation plus poussée indique que les provirus actifs nouvellement intégrés ne sont pas inhibés efficacement dans les cellules ES KO pour *G9a*. Ceci suggère que G9a est indispensable pour l’entretien, mais est également essentielle pour la mise en place de l’inactivation provirale dans les cellules ES (Leung et al, 2011). G9a est aussi impliquée dans le maintien de la latence du VIH (Imai et al, 2010). Les KMTs sont également impliquées, comme nous allons le voir, dans divers cancers.

2. Implication des KMTs de H3K9 dans la tumorigenèse

Dans différentes formes de cancer, une altération du profil de méthylation de H3K9 est associée à une inhibition aberrante de certains gènes, comme les gènes suppresseurs de

tumeurs (Sharma et al, 2010). Une dérégulation des KMTs responsable de cette marque peut être la cause de cette distribution aberrante de H3K9me. Par exemple SETDB1 *via* son interaction avec DNMT3a, a été impliquée dans la régulation du gène *RASSF1A*, un gène fréquemment éteint dans les cancers humains (Li et al, 2006). Dans un modèle de poisson zèbre, il a été montré que SETDB1 agit comme oncogène en accélérant la formation de mélanomes (Ceol et al, 2011). Récemment, il a été montré que SETDB1 est amplifié dans les cellules cancéreuses du poumon et qu'une diminution de son expression réduit la croissance des cellules cancéreuses chez la souris (Rodriguez-Paredes et al, 2013).

Le rôle de Suv39h1 dans la tumorigenèse n'est pas clairement défini. Dans certains cas, Suv39h1 inhibe la tumorigenèse : par exemple il a été montré que Suv39h1 régule positivement la sénescence dans les lymphomes induits par Ras et inhibe la formation de rhabdomyosarcomes embryonnaires chez le poisson zèbre (Albacker et al, 2013; Braig et al, 2005; Reimann et al, 2010). D'autres études démontrent, au contraire, un rôle oncogénique de Suv39h1. Par exemple, Suv39h1 promeut la tumorigenèse dans le cancer du sein et la leucémie en favorisant la prolifération cellulaire, l'instabilité chromosomique et l'invasion tumorale (Dong et al, 2013; Khanal et al, 2013; Vajen et al, 2013). Ainsi, l'inhibition de Suv39h1 par un inhibiteur chimique spécifique, la chaetocine, induit l'apoptose dans les leucémies (Chaib et al, 2012). Une autre étude a montré que l'inhibition par siRNA de Suv39h1 et G9a induit l'apoptose dans les cellules humaines cancéreuses de l'épithélium bronchique (Watanabe et al, 2008).

G9a est surexprimée dans différents cancers. Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibition de G9a inhibe la croissance tumorale et l'invasion des cellules cancéreuses dans les souris *nude* et provoque la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses du pancréas (Kondo et al, 2008; Yuan et al, 2013). G9a est surexprimée dans des carcinomes hépatiques (Kondo et al, 2007),

et est également impliquée dans la répression des gènes suppresseurs de tumeurs comme la *desmocolline 3*, décrite comme ayant une activité anti-métastatique dans les cancers du sein (Wozniak et al, 2007), ou encore favorise la métastase dans le cancer du poumon (Chen et al, 2010). De manière générale, G9a semble favoriser la tumorigenèse et l'invasion cellulaire. Cependant, une étude a montré que G9a peut aussi agir comme suppresseur de tumeur. En effet, G9a en interaction avec le facteur YY1, réprime la protéine JAK2 dérégulée dans certaines leucémies (Son et al, 2012).

Contrairement à G9a, GLP a très peu été impliquée dans le cancer. Néanmoins, une étude a montré une diminution de son expression dans les méduloblastomes (Northcott et al, 2009). Une autre étude montre qu'à l'inverse, GLP en interaction avec la protéine MTh1 (Metallothionein h1), a un effet suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate (Han et al, 2013)

Partie 3 : Régulation de la différenciation musculaire squelettique et rôle des KMTs de H3K9 dans cette régulation.

Comme nous venons de le voir, les KMTs de H3K9 (sauf peut être GLP) sont largement impliquées dans le(s) cancer(s). Or, une dé-régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire peut souvent être la cause de cancers. Les recherches que j'ai menées durant ma thèse s'intéressent à cet équilibre et en particulier aux rôles des KMTs dans cet équilibre. Pour cela, le laboratoire dispose comme modèle d'étude le muscle strié, où la différenciation terminale est bien caractérisée *in vitro*. Dans le muscle strié, la prolifération et la différenciation sont mutuellement exclusives : l'arrêt de la prolifération est requis pour permettre aux cellules de s'engager dans le processus de différenciation terminale. Ainsi, les régulateurs positifs de la différenciation terminale sont généralement des répresseurs de la prolifération.

I. Présentation du modèle d'étude : le muscle squelettique.

Le muscle squelettique fait partie des muscles à contraction volontaire qui, contrairement aux muscles lisse et cardiaque, ne se contracte en conditions physiologiques qu'en présence de stimulations nerveuses. Les myofibres, qui constituent les cellules musculaires fonctionnelles, dérivent des cellules progénitrices du muscle, également appelées MPCs (Muscle Progenitor Cells) (Figure 14). Pour donner naissance aux myotubes, ces MPCs subissent d'abord une étape de détermination qui les convertit en myoblastes. Contrairement aux myotubes, les myoblastes ont encore la possibilité de se diviser, en revanche, ils ne sont plus multipotents, c'est-à-dire qu'ils sont déterminés à se différencier en muscle. Sous l'influence de signaux

extérieurs, les myoblastes se différencient, c'est-à-dire qu'ils sortent du cycle prolifératif, expriment des protéines spécifiques du muscle comme la créatine kinase musculaire (MCK) ou la chaîne lourde de la myosine (MHC), et fusionnent entre eux, donnant ainsi naissance aux myotubes (Figure 14). Les myotubes subissent finalement une étape de maturation pour donner les fibres musculaires striées.

Au niveau moléculaire, la différenciation terminale des myoblastes nécessite l'intervention des facteurs de transcription de la famille MRF (Myogenic Regulatory Factors) (Buckingham, 2001; Perry & Rudnick, 2000). Ce sont les protéines MyoD, Myf5, myogénine et MRF4 qui sont les « *master* » régulateurs du programme de différenciation musculaire terminale.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la différenciation musculaire terminale, la lignée de myoblastes murins C2C12 a été isolée et caractérisée (Blau et al, 1985; Yaffe & Saxel, 1977). Les C2C12 sont des myoblastes qui ont été isolés de cellules satellites de souris, puis mis en culture et immortalisés par passages successifs. Les cellules satellites sont une population de cellules mononuclées indifférenciées et quiescentes, situées sous la lame basale des fibres musculaires. Lors d'une lésion, les cellules satellites sont activées et retrouvent leur capacité à proliférer, pour pouvoir ensuite se différencier en myotubes et ainsi former de nouvelles fibres musculaire (Le Grand & Rudnicki, 2007). Les C2C12 sont devenus un outil de prédilection pour l'étude de la différenciation musculaire *ex vivo* et ont permis de mieux caractériser la différenciation musculaire et d'étudier notamment l'équilibre prolifération-différenciation du muscle squelettique. Cette lignée a la capacité de se différencier rapidement et de produire des myotubes contractiles exprimant des protéines caractéristiques du muscle.

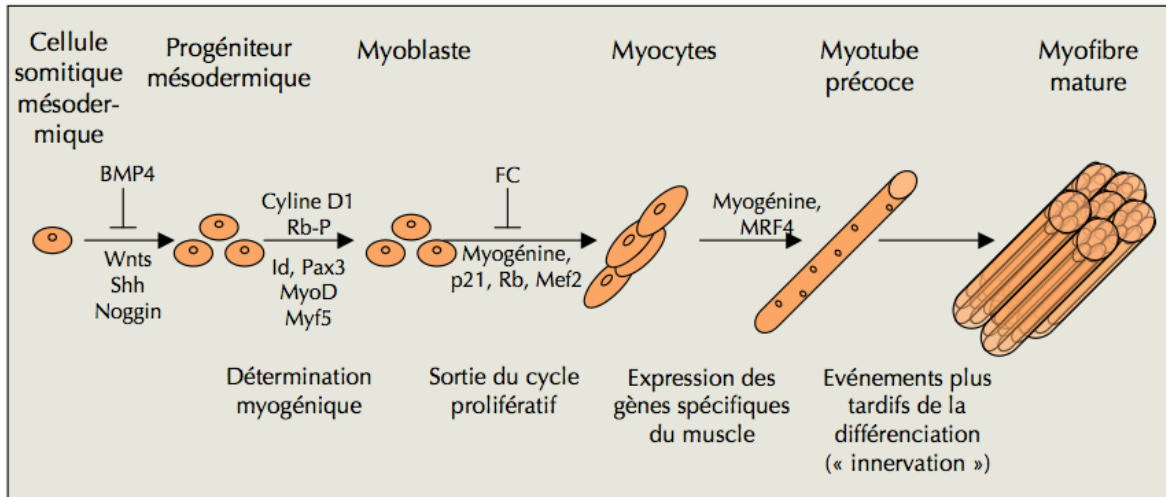


Figure 14. Mise en place du muscle strié.

Pendant le développement, les cellules souches mésodermiques s'engagent dans un des multiples lignages cellulaires possibles, notamment dans le lignage musculaire. L'expression de Pax3 dans les cellules progénitrices contribue à l'expansion myogénique. Après l'induction de MyoD et/ou Myf5, les cellules progénitrices mésodermiques sont engagées dans le lignage musculaire (myoblastes). Plus tard, l'activation des MRFs secondaires (myogénine et MRF4) induit la différenciation musculaire terminale des myoblastes en myocytes. Finalement, la fusion des myocytes donne naissance aux myotubes multinucléés qui subiront une dernière étape de maturation avec notamment leur innervation par les motoneurones, pour donner les myofibres striées (adaptée de : (Charge & Rudnicki, 2004))

1. Origine embryonnaire du muscle squelettique

Chez les vertébrés, les muscles squelettiques sont issus du mésoderme paraxial, qui se segmente en somites, sphères épithéliales qui s'alignent de part et d'autre du tube neural. Les somites donneront naissance aux muscles des membres et du tronc (Buckingham et al, 2003). Dans sa partie ventrale, le somite va donner naissance au sclérotome qui est à l'origine des côtes et des vertèbres. La partie dorsale du somite constituera le dermomyotome à l'origine du derme et donnera deux populations de cellules myogéniques. L'une de ces populations, issue de la partie dorso-médiane (épaxiale) du dermomyotome, donnera naissance aux muscles du dos ; l'autre, issue de sa partie ventro-latérale (hypaxiale), sera à l'origine des muscles des membres et des muscles de la paroi abdominale suivant la position du somite le long de l'axe rostro-caudal (antéro-postérieur).

2. Myogenic Regulatory Factors ou “MRFs”

2.1. Mise en évidence des MRFs

Les MRFs ont été mis en évidence pour la première fois par des expériences de traitement de fibroblastes par un agent déméthylant de l'ADN, la 5-azacytidine (5-aza). En effet, le traitement à la 5-aza de fibroblastes induisait spontanément leur conversion en myoblastes, qui pouvaient alors entrer en pseudo-différenciation musculaire terminale en absence de signaux mitogènes. Un criblage différentiel entre les fibroblastes traités ou non-traités à la 5-aza a permis d'isoler le gène *MyoD* lequel, exprimé de manière ectopique dans des cellules non musculaires (neurones, adipocytes, mélanocytes, chondrocytes), est capable de les convertir en myotubes (Choi et al, 1990; Davis et al, 1987; Weintraub et al, 1989). Sur la base de ces résultats, le gène *MyoD* a été proposé comme un des acteurs principaux du développement musculaire. Trois autres gènes ont été ainsi identifiés : *myogénine* (Edmondson & Olson, 1989; Wright et al, 1989), *Myf5* (Braun et al, 1989) et *MRF4* (Rhodes & Konieczny, 1989). Comme *MyoD*, les protéines codées par ces gènes sont capables d'induire la conversion myogénique de cellules non musculaires, démontrant leur rôle dans la détermination et différenciation myogéniques.

2.2. Structure des MRFs

Les quatre protéines *MyoD*, *Myf5*, *myogénine* et *MRF4* appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type bHLH (basic helix loop helix). Les MRFs présentent une homologie de séquence de 80% sur un fragment de 70 acides aminés qui regroupe une région basique (b) et un domaine hydrophobe hélice-boucle-hélice (HLH). Le motif bHLH définit une superfamille de protéines, dont font partie les bHLH myogéniques. La région basique des bHLH myogéniques joue un double rôle dans le contrôle de la transcription des gènes spécifiques du muscle, en permettant la liaison des MRFs à l'ADN et en conférant une

spécificité de transcription. Les bHLH myogéniques diffèrent des autres bHLH du fait qu'ils contiennent un motif de reconnaissance conservé au sein du domaine basique. D'autre part, le domaine HLH sert d'interface à la dimérisation. Le motif bHLH est également trouvé dans une classe de protéines ubiquitaires connues sous le nom de protéines E, qui inclut HEB/HTF4, E2-2/ITF-2 et l'épissage alternatif du produit du gène E2A : E12/E47. Ainsi, les bHLH myogéniques peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les facteurs de transcription bHLH de classe I, que sont les protéines E. Les dimères formés par les protéines bHLH diffèrent par leur affinité pour l'ADN. Par exemple, le dimère MyoD-E47 se forme efficacement et se fixe fortement sur l'ADN, alors que l'homodimère MyoD se fixe à l'ADN plus faiblement (Murre et al, 1989). Les hétérodimères MRF-protéines E se fixent sur la séquence consensus "CANNTG", appelée boîte E, présente notamment dans les régions régulatrices des gènes spécifiques du muscle comme par exemple *MCK*.

2.3. Détermination et différenciation des cellules musculaires au cours de la myogenèse embryonnaire

Pendant le développement embryonnaire, l'expression des MRFs est hautement régulée. *Myf5* est induite dans les somites dorsaux-médians. Elle est suivie par l'expression de *MyoD* dans les somites dorso-latéraux. Les voies Wnt, Sonic hedgehog (Shh) et d'autres voies de signalisation contribuent à la détermination du muscle, en induisant l'expression de *Myf5* et *MyoD* (Figure 14) dont le signal est antagonisé par BMP4 (pour revue (Buckingham, 2001)). En effet, BMP4 est un inhibiteur puissant de *MyoD* et *Myf5* (Pourquie et al, 1996). Ainsi, les voies de signalisation Wnt, Shh et BMP4 se combinent pour initier et restreindre la myogenèse dans les bonnes régions du dermomyotome (Cossu & Borello, 1999).

L'expression de *MyoD* et *Myf5* est une étape clé qui marque l'engagement des cellules somitiques multipotentes dans le lignage myogénique. L'activation de *MyoD* est retardée dans

les embryons où le gène *Myf5* est inactivé, montrant que l'expression de MyoD est initialement sous le contrôle de Myf5 (Tajbakhsh et al, 1997). Par la suite, MyoD est activé indépendamment et la myogenèse se déroule normalement avec une localisation correcte des cellules (Kassar-Duchossoy et al, 2004). De même, chez la souris, en absence de MyoD, la myogenèse se déroule apparemment normalement, suggérant une redondance fonctionnelle avec d'autres MRFs (Rudnicki et al, 1992). Dans ces souris, le niveau de Myf5 est augmenté, ce qui suggère, d'une part, que Myf5 pourrait être le facteur palliant l'absence de MyoD, et, d'autre part, que MyoD régule négativement Myf5. D'ailleurs, dans les doubles mutants *Myf5:MyoD*, la myogenèse n'a pas lieu (Braun & Arnold, 1996; Rudnicki et al, 1993).

Le rôle joué par MRF4 pendant la myogenèse est plus complexe. En effet, MRF4 est exprimé de manière transitoire dans le myotome de souris au jour E9, en suivant de près l'expression de Myf5. Son expression disparaît à E11,5 et est ré-initiée à E16 dans les fibres musculaires en différenciation. MRF4 a un rôle à la fois dans la spécification des somites en progéniteurs myogéniques, mais également au cours de la différenciation terminale. Enfin, la myogénine joue un rôle critique au cours de la différenciation terminale. En effet, chez les souris dont le gène *myogénine* a été inactivé, la deuxième phase d'expression de MRF4 et la formation des fibres secondaires sont sévèrement compromise (Ontell & Kozeka, 1984). Chez ces souris, les myoblastes sont présents, montrant que la myogénine n'est pas requise pour l'acquisition de l'identité des myoblastes, cependant, la différenciation terminale est fortement compromise (Venuti et al, 1995).

Pour résumer, les études d'inactivation géniques chez la souris montrent que Myf5 et MyoD sont requis pour l'engagement dans le lignage myogénique, la myogénine joue un rôle critique dans l'expression du phénotype musculaire final et MRF4 participe à ces deux fonctions. Ainsi, MyoD, Myf5, et dans une certaine mesure MRF4, sont considérés comme

des facteurs d'engagement ou de « détermination », alors que la myogénine est perçue comme un facteur de « différenciation » uniquement (Figure 14).

3. Les protéines MEF2, co-facteurs des MRFs

Parallèlement aux MRFs, une autre famille de facteurs de transcription joue un rôle clé dans la différenciation musculaire : les protéines de la famille des Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2). Les protéines MEF2 appartiennent à la famille de facteurs de transcription à domaine MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor) et sont induites quand les myoblastes entrent dans le programme de différenciation terminale (Gossett et al, 1989; Yu et al, 1992). L'inactivation de l'unique gène *Mef2* chez la Drosophile entraîne une létalité embryonnaire, ainsi qu'une perte complète de différenciation musculaire dans les trois lignages musculaires (squelettique, lisse et cardiaque). Cependant, dans ce cas, les myoblastes sont présents et correctement localisés, ce qui indique que c'est le processus de différenciation terminale et non de détermination qui est affecté (Bour et al, 1995). Chez les mammifères, les protéines de la famille MEF2 sont codées par 4 gènes différents, *Mef2 A* à *D*. Les transcrits de ces gènes sont exprimés dans une grande variété de tissus et de lignées cellulaires et sous la forme de nombreux transcrits. Cependant, les protéines elles-mêmes et leur activité de liaison à l'ADN semblent limitées aux cellules musculaires différenciées et aux neurones. Les protéines MEF2 se fixent ainsi sur un site riche en A/T retrouvé dans les promoteurs et les *enhancers* de nombreux gènes spécifiques du muscle : CTA(A/T)₄TAG (Gossett et al, 1989). Cependant, MEF2 ne peut pas activer seule les gènes du muscle, mais augmente de manière coopérative leur transcription induite par les MRFs. Plusieurs travaux ont identifié MEF2C comme le facteur MEF2 crucial impliqué dans le développement du muscle squelettique (Bour et al, 1995). Le gène *Mef2C* est le premier membre des MEF2 exprimé au début de la différenciation musculaire cardiaque et squelettique *in vivo* (Edmondson et al, 1994), et son

expression est maintenue tout au long du développement du muscle squelettique. D'une manière intéressante, Il a été montré que MEF2C est une cible transcriptionnelle directe des MRFs lors de la différenciation du muscle squelettique (Wang et al, 2001). Ce qui suggère une inter-relation plus complexe avec les MRFs.

Myf5 et la myogénine sont exprimés avant MEF2C, et sont initiateurs de la transcription de *Mef2C*, tandis que MRF4 maintient l'expression de MEF2C dans le muscle post-natal. En outre, il a été montré que MEF2C agit sur son propre promoteur afin d'amplifier et de maintenir son expression dans les myoblastes en différenciation et dans les muscles différenciés. Enfin, MFE2 active ses gènes cibles non seulement en se liant à ses propres sites de liaison de l'ADN, mais aussi par interactions protéine-protéine avec les hétérodimères bHLH myogéniques/protéines E liés eux mêmes à la séquence consensus E-box. Dans ce complexe, MEF2 agit comme un co-facteur essentiel à l'activation de gènes spécifiques du muscle (Molkentin et al, 1995).

II. L'équilibre prolifération différenciation dans le système musculaire

L'équilibre entre prolifération et différenciation implique la mise en place d'un programme génétique spécifique à l'un ou l'autre de ces deux états physiologiques : la prolifération implique l'activation de gènes associés à la prolifération et l'inhibition de ceux associés à la différenciation ; à l'inverse, la différenciation implique l'activation des gènes associés à la différenciation et l'extinction de ceux qui sont associés à la prolifération. Ainsi, les deux étapes de la différenciation terminale sont : la sortie irréversible du cycle prolifératif et l'expression des gènes spécifiques de la différenciation musculaire.

1. Régulation négative des gènes de la différenciation dans les myoblastes proliférants.

Comme nous l'avons vu, MyoD joue un rôle clé dans l'induction de la myogenèse. L'expression ectopique du facteur de transcription MyoD dans des fibroblastes, comme dans de nombreuses autres lignées cellulaires telles que les cellules nerveuses, adipeuses, pigmentaires ou hépatiques, suffit pour convertir ces cellules non musculaires en cellules myogéniques (Lassar et al, 1986; Tapscott et al, 1990; Tapscott et al, 1988; Weintraub et al, 1989). Cependant, MyoD est exprimé dans les myoblastes en prolifération, alors que ses principaux gènes cibles n'y sont pas activés. Cela implique donc une inhibition active de son activité. Par exemple, MyoD comporte plusieurs sites de modifications post-traductionnelles capables de réguler son activité et/ou de provoquer sa dégradation par le protéasome (Breitschopf et al, 1998; Floyd et al, 2001). Ainsi, MyoD est phosphorylé dans les myoblastes en prolifération et cette phosphorylation diminue lorsque les myoblastes se différencient en myotubes (Kitzmann et al, 1999). La phosphorylation de MyoD par le complexe cycline E/cdk2 est impliquée dans sa dégradation dépendante de l'ubiquitine pendant la phase G1-S (Tintignac et al, 2000). Parce que la cycline D1 est essentielle pour l'induction de la cycline E (Nurse, 1994; Sherr, 1994), le rôle du complexe cyc E/cdk2 dans la phosphorylation de MyoD, et sa dégradation consécutive, fournit une explication supplémentaire pour le rôle inhibiteur de la myogenèse par la cycline D1. En particulier, la surexpression de la cycline D1 induit l'accumulation de CDK4 dans le noyau, qui se lie alors à l'extrémité N-terminale de MyoD empêchant ainsi sa liaison à l'ADN (Zhang et al, 1999). D'autre part, l'activité de MyoD et des autres MRFs peut être modulée en régulant leur fixation à l'ADN. Notamment, l'activité de MyoD et celles de ses co-facteurs : les protéines E et les facteurs MEF2, sont hautement régulées par des interactions protéine-protéine. Toutes les protéines à domaine HLH ne possèdent pas de propriétés activatrices, au contraire, la plupart fonctionnent comme

des régulateurs négatifs de la transcription. Un cas bien illustré est celui des protéines Id, qui possèdent un motif HLH mais pas de domaine basique. Id est donc capable de former des hétérodimères avec les protéines bHLH et empêche leur liaison à l'ADN (Benezra et al, 1990). Un autre exemple sont les protéines MyoR et Mist1, qui forment des hétérodimères inactifs avec les MRFs, capables de se fixer sur les boîtes E, mais sans activer la transcription (Lemercier et al, 1998; Lu et al, 1999). Enfin, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, l'activité des MRFs peut être négativement régulée par association avec des facteurs de remodelage ou de modification de la chromatine.

2. La sortie irréversible du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle prolifératif est un pré-requis pour que la différenciation musculaire terminale puisse avoir lieu. Cette étape clé de la différenciation musculaire squelettique implique la diminution des activateurs du cycle cellulaire, tels que les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDKs), et l'augmentation des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p21, p27 et p57 ou la déphosphorylation de Rb. En particulier, Rb et p21 jouent un rôle très important dans l'arrêt de la croissance des myoblastes. Leur niveau d'expression et leur activité est régulé négativement par les facteurs de croissance, et positivement par MyoD, qui joue un rôle coopératif dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Notamment, l'arrêt irréversible du cycle cellulaire corrèle avec l'induction irréversible de p21, accélérant ainsi la différenciation myogénique

La sortie du cycle cellulaire a lieu à la transition G1/S, moment où la cellule va choisir de progresser vers un nouveau cycle de division cellulaire ou d'en sortir. Au niveau moléculaire, plusieurs régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire ont été identifiés. Parmi les régulateurs positifs du cycle se trouvent les complexes cycline/CDKs (pour revue (Nurse, 1994). Les régulateurs négatifs du cycle, qui sont aussi des co-activateurs de la différenciation

musculaire, comprennent entre autres les inhibiteurs de CDKs (CKIs) (pour revue (Sherr & Roberts, 1995; Sherr & Roberts, 1999)) et la famille des protéines à poche : la protéine Rb, le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome, et deux protéines apparentées à Rb : p107 et p130 (Mulligan & Jacks, 1998).

Le passage de la phase G1 vers la phase S est contrôlé par les cyclines D (associées aux CDK4 et CDK6), la cycline E et la cycline A (associées à Cdk2). Une des principales cibles de phosphorylation des complexes cycline A ou E/CDK2 à la transition G1/S est la protéine Rb. Dans sa forme hypophosphorylée, c'est à dire active, Rb régule négativement la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S. Rb hypophosphorylée agit au niveau transcriptionnel, en interagissant et en modulant l'activité de nombreux facteurs de transcription comme E2F, réprimant ainsi l'expression des gènes requis pour l'entrée en phase S (pour revue (Kouzarides, 1995; Taya, 1997)) (Figure 15). Trois facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1, E2F2 et E2F3) régulent notamment les gènes associés à la prolifération (Chellappan et al, 1991; Helin, 1998). Au cours de la phase G1, la phosphorylation de Rb par les complexes cyc/Cdk, induit sa dissociation de E2F ce qui permet l'entrée des cellules en phase S (pour revue (Mittnacht, 1998)). La protéine Rb reste alors hyperphosphorylée jusqu'à l'entrée en mitose, ce qui conduit à sa dégradation.

Au cours de la différenciation, l'inhibition de l'activité des CDK par, entre autre la surexpression de p21, empêche la phosphorylation de Rb. Ainsi activée, Rb interagit avec E2F, réprime son activité et provoque l'arrêt du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire est largement sous le contrôle de la régulation génique dépendante de Rb/E2F (Figure 15).

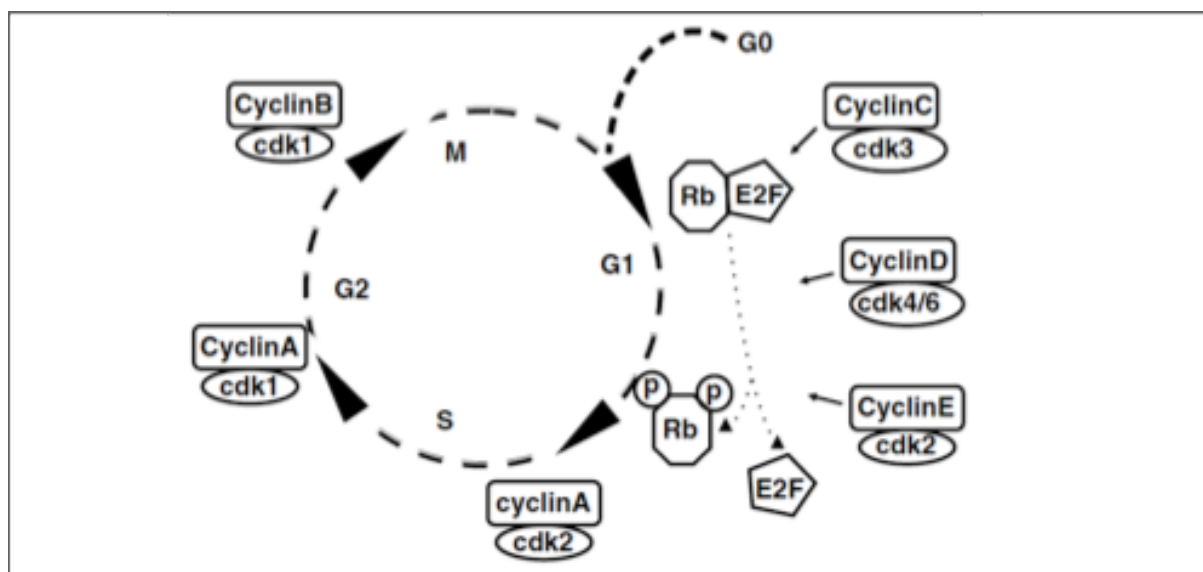


Figure 15. Régulation de l'activité de Rb au cours du cycle cellulaire.

Durant le début de la phase G1, la transcription des gènes de la phase S dépendante de E2F, est réprimée par la fixation de Rb à E2F. Au point de restriction R, des complexes cyclines/CDKs phosphorylent Rb, qui se décroche alors de E2F, permettant à celui-ci d'activer la transcription de ses gènes cibles et le passage en S. La sortie du cycle précédant la différenciation cellulaire se fait au cours de la phase G1 lorsque l'inhibition de E2F par Rb est restée active (adapté de la revue(Giacinti & Giordano, 2006)).

La cycline D1 est un élément primordial dans la coordination entre la prolifération cellulaire et la différenciation musculaire terminale (Latella et al, 2001; Skapek et al, 1995). Son expression est induite par les facteurs de croissance tels que le FGF (fibroblast growth factor) et le TGF- β (Tumor Growth Factor-beta), et son niveau d'expression est maximal pendant la phase G1 (Sherr, 1994). La surexpression de la cycline D1 accélère la progression G1/S (Quelle et al, 1993) et inhibe la transactivation des gènes spécifiques du muscle en partie par la voie Rb/E2F (Guo & Walsh, 1997; Skapek et al, 1996). Des expériences de trans-différenciation musculaire de fibroblastes en culture montrent que les cyclines A et E bloquent la différenciation. La présence d'une protéine Rb mutante non-phosphorylable abolit l'effet négatif des cyclines A et E sur la différenciation musculaire (Skapek et al, 1996). En revanche, l'expression de la cycline D1 réussit quand même à inhiber la différenciation musculaire, même en présence de ce mutant Rb. Ceci indique que l'activité des cyclines/CDK bloque la différenciation musculaire à la fois par un mécanisme dépendant de la phosphorylation de Rb et par un second mécanisme indépendant de la phosphorylation de Rb

(Skapek et al, 1996).

3. L'activation des gènes spécifiques du muscle

Pour induire la différenciation terminale *ex vivo*, les signaux mitogènes sont diminués artificiellement en cultivant les myoblastes dans un milieu à faible teneur en sérum et en laissant les cellules à confluence. Ce n'est qu'après l'arrêt permanent de la prolifération que les myoblastes vont exprimer les protéines spécifiques du muscle et fusionner entre eux pour former des cellules multi-nucléées appelées myotubes. Simultanément, à l'arrêt du cycle, MyoD active l'expression d'autres acteurs importants de la différenciation comme la myogénine et MEF2 (Black & Olson, 1998; Edmondson et al, 1992). La myogénine, qui intervient donc en aval de MyoD dans le processus de différenciation, peut aussi activer les gènes de la famille MEF2 (Cserjesi & Olson, 1991) et permettrait de prendre le relais de MyoD et/ou de contribuer à la reprogrammation transcriptionnelle des noyaux des myoblastes en cours de différenciation. Plus tard au cours de la différenciation, MyoD participe à l'activation de gènes codant des protéines fonctionnelles du muscle, comme la créatine kinase musculaire (MCK), la Troponine I et la chaîne lourde de la myosine (MHC), qui sont indispensables à la fois à la structure et au fonctionnement des myotubes (Bergstrom et al, 2002; Lassar et al, 1989).

III. Facteurs épigénétiques impliqués dans la régulation de la myogenèse.

Le remodelage de la chromatine et divers facteurs épigénétiques ont été impliqués dans la régulation des gènes durant la myogenèse.

1. Facteurs épigénétiques impliqués dans le maintien des cellules en prolifération.

Comme nous venons de le voir, la régulation de la différenciation musculaire passe par la régulation de la prolifération cellulaire, et le maintien de cet état implique une régulation des gènes au niveau épigénétique. Par exemple, la méthylation de l'ADN a été montrée comme l'un des principaux systèmes répressifs agissant sur les gènes musculaires. Des expériences pionnières ont montré que la 5-azacytidine (un inhibiteur de la méthylation de l'ADN) était capable d'induire la trans-différenciation des fibroblastes en myoblastes (Taylor & Jones, 1979). Ainsi, la déméthylation de *MyoD* et de la *myogénine* au niveau de leur promoteur conduit à leur de-répression fournissant une explication du phénotype observé avec les fibroblastes traités à la 5-aza (pour revue (Palacios & Puri, 2006)). La modification des histones est également impliquée dans cette régulation. Il a ainsi été observé dans les cellules en prolifération, que certains gènes spécifiques de la différenciation musculaire sont hypoacétylés et portent les marques H3K9me2 et H3K27me3 au niveau de leurs promoteurs. Cet environnement répressif est instauré par les HDACs et les KMTs spécifiques de H3K9 et du groupe Polycomb (Sartorelli & Caretti, 2005). De manière intéressante, il a été montré que les HDACs et les KMTs peuvent réguler négativement l'expression des gènes spécifiques du muscle *via* leur interaction avec les protéines MyoD et MEF2. En effet, dans les myoblastes en prolifération, MyoD et MEF2 sont associés à la répression de leurs propres gènes cibles. Pour cela, plusieurs membres de la classe I et II des HDAC (HDAC 1, 2, 3, 4 et 5) et des Sirtuines (aussi appelées HDACs de classe III; Sir2), interagissent avec MyoD et MEF2 et régulent leur activité transcriptionnelle. Cette régulation peut se faire à deux niveaux : d'une part en dé-acétylant MyoD et MEF2 eux-mêmes, ce qui inactive les deux facteurs, d'autre part en dé-acétylant les histones sur leurs promoteurs cibles (Di Padova et al, 2007; Dressel et al, 2001; Fulco et al, 2003; Lu et al, 2000; Mal, 2006; Perdiguero et al, 2009).

Par ailleurs, il a été montré que le recrutement de complexes HDACs, pour désacétyler les histones sur les promoteurs des gènes musculaires avant la différenciation, contribue à la méthylation de H3K9 par les KMTs sur ces mêmes promoteurs (Zhang et al, 2002). Mal et Harter montrent que dans les myoblastes en prolifération, MyoD est associé à HDAC1 sur le promoteur de la *myogénine* et que ce promoteur présente alors une désacétylation ainsi qu'une méthylation de H3K9 (Mal & Harter, 2003). Par ailleurs, les KMTs Suv39h1 et G9a, interagissent avec MyoD dans les cellules en prolifération et participent à la répression des gènes cibles de MyoD *via* la méthylation de H3K9. De plus, G9a méthyle MyoD et cette méthylation est nécessaire à la répression des gènes cibles de MyoD (Ling et al, 2012a; Mal, 2006). Par ailleurs il a été montré que Suv39h1 et G9a étaient présentes sur le promoteur du gène *p21* afin de réprimer son expression dans des cellules cyclantes (Cherrier et al, 2009).

D'autres KMTs régulent négativement la différenciation musculaire. Notamment Ezh2, qui est recrutée sur les gènes musculaires dans les myoblastes en prolifération. Ezh2 est retrouvée dans un complexe protéique contenant HDAC1. Les promoteurs des gènes musculaires sont hyperméthylés sur H3K27 et donc réprimés. L'enclenchement de la différenciation est couplé à la disparition de ce complexe sur ces mêmes *loci*. H3K27 devient donc hypométhylé, permettant la transcription de leurs gènes cibles. La diminution de Ezh2 est corrélée avec une activation de l'expression des gènes du muscle et sa surexpression inhibe la différenciation musculaire (Caretta et al, 2004).

2. Facteurs épigénétiques impliqués dans l'activation du programme de différenciation.

De même que les HDACs, les HATs sont capables d'interagir avec MyoD et MEF2. Il est ainsi possible de faire basculer ces deux facteurs d'un état répresseur à un état activateur sur

certaines loci. Ainsi, il a été montré que MyoD forme un complexe avec les HATs p300/CBP et PCAF (McKinsey et al, 2002; Puri et al, 1997a; Puri et al, 1997b; Sartorelli et al, 1999). A l'inverse des HDACs, les HATs favorisent l'activation transcriptionnelle par MyoD via l'acétylation des histones mais également par acétylation de MyoD lui-même. L'acétylation de MyoD augmente notamment sa capacité de liaison à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle (Polesskaya et al, 2000; Puri et al, 1997a). Par ailleurs, il a été montré que la protéine Rb peut déplacer HDAC1 de MyoD (Puri et al, 2001), laissant MyoD libre d'activer la transcription. D'ailleurs, la libération de MyoD de la contrainte HDAC1 est un préalable requis à l'association de MyoD avec la HAT PCAF (Mal et al, 2001). De même que MyoD, l'activité de MEF2 est régulée grâce à son interaction avec des HATs. En particulier, MEF2 interagit avec p300/CBP (Eckner et al, 1996; Sartorelli et al, 1997).

La liaison de MyoD à certains promoteurs spécifiques est concomitante à l'acétylation des histones (Bergstrom et al, 2002). Cette acétylation favoriserait le recrutement du complexe de remodelage SWI/SNF sur ces gènes cibles (de la Serna et al, 2005). Des études ont montré que le complexe SWI/SNF est requis pour l'activation des gènes cibles de MyoD de même que MEF2 (de la Serna et al, 2001; Simone et al, 2004). Le complexe SWI/SNF faciliterait notamment la liaison et la formation du complexe ARN polymérase II (Pol II). Par ailleurs, les arginines méthyltransférases PRMT5 et CARM1/PRMT4 sont requises pour le recrutement du complexe SWI/SNF. Ces deux arginines méthyltransférases induisent la diméthylation de H3R8 et H3R17 sur les promoteurs des gènes musculaires, tel que la *myogénine* et *MCK* (Dacwag et al, 2009; Dacwag et al, 2007). Les miARN sont également impliqués dans l'activation du programme de différenciation. Par exemple, miR-181 cible Hox-A11, un répresseur de la différenciation terminale. Cela se traduit par l'induction de l'expression de MyoD (Naguibneva et al, 2006). Un autre régulateur positif de la myogenèse est miR-29 qui inhibe le facteur de transcription YY1 qui, associé avec Ezh2 agit comme

répresseur de l'expression des gènes spécifiques du muscle (Wang et al, 2008a).

Outre l'activation des gènes musculaires, le programme de différenciation terminale nécessite l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. La cinétique précise des événements moléculaires sous-jacents reste encore floue. Il a cependant été montré que Suv39h1 et DNMT1 sont nécessaires à la sortie du cycle en permettant notamment la tri-méthylation de H3K9 au niveau des promoteurs des gènes cibles de E2F (Ait-Si-Ali et al, 2004; Campanero et al, 2000; Nielsen et al, 2001; Robertson et al, 2000; Vandel et al, 2001).

Résultats

Contexte et présentation du projet de recherche

Mon projet de thèse, débuté en 2009, avait pour but d'étudier le rôle des 4 KMTs spécifiques de la méthylation de H3K9 dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire. Pour étudier cet équilibre, mon équipe d'accueil dispose d'un modèle de différenciation terminale de cellules du muscle squelettique (C2C12). En effet, durant la différenciation terminale, les myoblastes arrêtent de proliférer et fusionnent entre eux pour former de longues cellules multinucléées que sont les myotubes. En particulier, ce processus implique, d'une part, l'expression des gènes musculaires et, d'autre part, la répression irréversible des gènes associés à la prolifération cellulaire. Ainsi, notre laboratoire a montré que durant la différenciation terminale, les gènes cibles de E2F (associés à la prolifération cellulaire) sont éteints par triméthylation de H3K9 par Suv39h1 (Ait-Si-Ali et al, 2004; Guasconi et al, 2010). Or, la tri-méthyltransférase Suv39h1 utilise comme substrat H3K9 déjà mono- ou diméthylée (Rice et al, 2003), suggérant que Suv39h1 coopérerait avec des mono-/di-méthyltransférases de H3K9. De fait, notre laboratoire a montré que Suv39h1 forme un mégacomplexe fonctionnel avec les mono- et di-méthyltransférases GLP, G9a et SETDB1 (Fritsch et al, 2010).

D'après ces différentes observations, l'hypothèse suivante a été proposée : au cours de la différenciation musculaire terminale, les KMTs G9a, GLP, SETDB1 coopéreraient avec Suv39h1 dans l'arrêt irréversible du cycle cellulaire en inhibant par tri-méthylation de H3K9 les gènes spécifiques de la prolifération.

Ainsi, mon projet initial avait pour but d'étudier la possible interdépendance fonctionnelle entre ces 4 KMTs de H3K9 et leurs rôles dans la régulation de l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaires.

J'ai pu montrer que les 4 KMTs interagissent entre elles dans notre modèle, aussi bien dans

les myoblastes en prolifération qu'en différenciation. J'ai ensuite cherché quels étaient les effets d'une modification de l'expression de chaque KMTs de H3K9 sur la différenciation musculaire terminale. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de gain (lignées surexprimant stablement une des 4 KMTs) ou de perte de fonction (siARN). De cette manière, j'ai pu montrer que les 4 KMTs Suv39h1, G9a, GLP et SETDB1 sont toutes essentielles à la différenciation musculaire terminale. Une modification de leur expression (augmentation ou diminution) affecte le programme de différenciation. Cependant, les effets observés pour chacune des KMTs étaient différents. De manière tout à fait inattendue, j'ai pu observer que G9a et GLP, surtout connues pour agir en hétérodimère, avaient des rôles antagonistes dans les cellules en prolifération : G9a favorise la prolifération associée à une surexpression de la cycline D1 ainsi qu'à la répression des gènes de différenciation ; à l'inverse, GLP défavorise la prolifération et régule positivement la différenciation. Je développerai ce sujet dans la première partie de mes résultats.

Dans une seconde partie, je décrirai les résultats que j'ai obtenus en étudiant le rôle de SETDB1 dans la différenciation musculaire terminale. Je développerai en particulier le rôle potentiellement activateur de SETDB1 sur la transcription des gènes spécifiques de la différenciation. Je présenterai aussi dans cette partie quelques résultats que j'ai obtenus en étudiant la localisation subcellulaire de SETDB1, encore non étudiée.

Partie 1 : Les lysines méthyltransférases G9a et GLP agissent de manière antagoniste sur la régulation de la différenciation musculaire squelettique.

I. Introduction

Une partie de ma thèse a porté sur le rôle de ces deux protéines, G9a et GLP, dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire dans le modèle musculaire squelettique.

De manière générale, la plupart des études associent à G9a et GLP des rôles fonctionnels similaires. En effet, il a été montré que G9a et GLP fonctionnent de manière coopérative pour mono- et di-métyler H3K9 dans l'euchromatine dans les cellules ES (Tachibana et al, 2005). De plus, dans différents types cellulaires, humains et murins, ces deux protéines sont majoritairement présentes sous la forme d'un hétérodimère stable et fonctionnel G9a/GLP (Tachibana et al, 2008; Tachibana et al, 2005).

En résumé, en accord avec l'idée que G9a et GLP forment un complexe stable dans la cellule, j'ai montré que les deux protéines interagissent entre elles, aussi bien dans les myoblastes en prolifération que dans les myotubes en différenciation. Cependant, en étudiant les effets d'une dérégulation de ces deux protéines sur mon modèle de différenciation musculaire, j'ai observé, de façon tout à fait inattendue, que G9a et GLP avaient des rôles antagonistes dans les cellules en prolifération : G9a favorise la prolifération associée à une surexpression de la cycline D1 ainsi qu'à la répression des gènes de différenciation ; à l'inverse, GLP défavorise la prolifération et régule positivement la différenciation.

II. Résultats

1. G9a et GLP interagissent et présentent le même profil d'expression durant la différenciation musculaire terminale

D'après les travaux de Tachibana *et al.*, G9a et GLP sont majoritairement présentes dans la cellule sous forme d'un hétéro-complexe fonctionnel. Cependant, la présence de ce complexe n'avait pas encore été validée dans le modèle de différenciation musculaire terminale. Afin de vérifier cela, j'ai co-immunoprécipité G9a et GLP dans les C2C12. Les résultats montrent que G9a et GLP interagissent dans les myoblastes en prolifération et en différenciation (Figure 16).

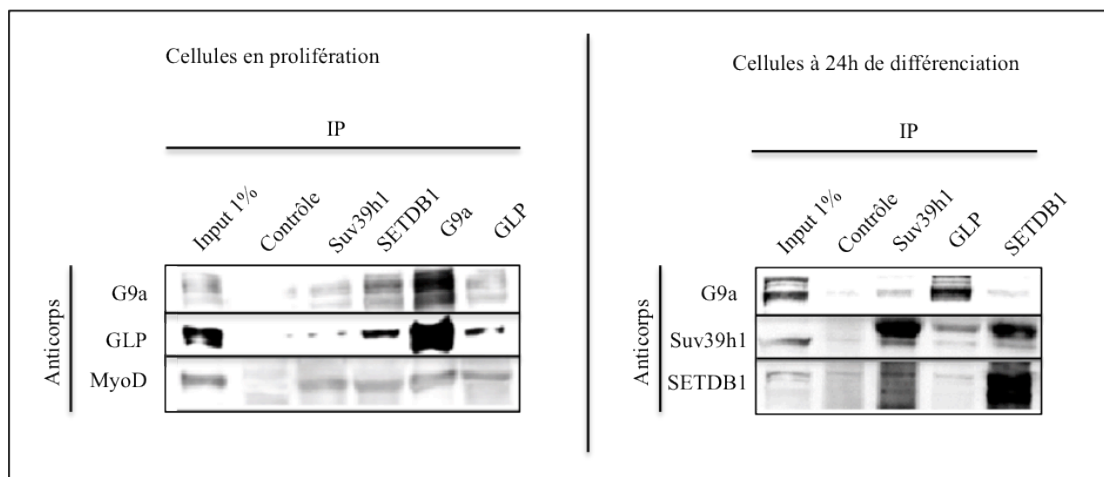


Figure 16 : Co-immunoprécipitation des KMTs de H3K9.

Nous avons utilisé des anticorps dirigés contre chacune des 4 KMTs afin de les immunoprécipiter (IP) et vérifier leur interaction réciproque par western blot, dans des C2C12 en prolifération (à gauche) ou après 24h de différenciation (à droite).

De plus, j'ai également testé si G9a et GLP étaient capable d'interagir avec SETDB1 et Suv39h1. En effet, notre laboratoire avait montré que les 4 KMTs de H3K9 sus-citées peuvent former un mégacomplexe dans les cellules MEFs, ES et HeLa (Fritsch et al, Mol Cell 2010). Mes résultats montrent que les 4 KMTs interagissent entre elles au moins deux à deux, dans les C2C12 en prolifération (Figure 16). A l'exception de SETDB1 et GLP, les KMTs

interagissent également dans les C2C12 à 24h de différenciation (Figure 16). Sur la figure 16 on peut également voir que les 4 KMTs interagissent dans les cellules en prolifération avec MyoD, le régulateur transcriptionnel majeur de la différenciation musculaire terminale.

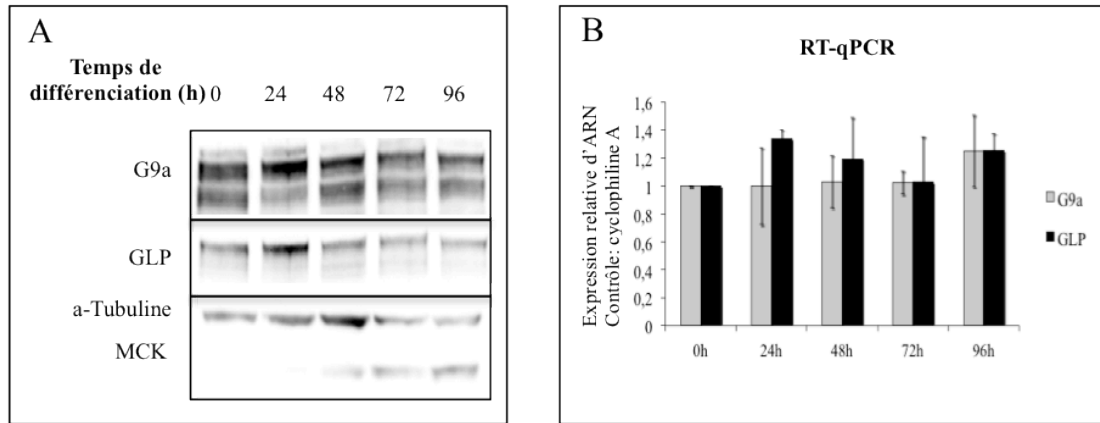


Figure 17 : Profils d'expression de G9a et GLP dans les C2C12.

L'expression de G9a et GLP a été étudiée dans des myoblastes C2C12 en prolifération (0h) et à différents temps de différenciation (après privation en sérum). **A)** Niveau d'expression protéique des 4 KMTs étudiée par western blot. MCK (Muscle Creatine Kinase) sert de marqueur tardif de différenciation terminale et α -tubuline sert de contrôle de dépôt. **B)** Niveaux d'expression ARNm mesurés par qRT-PCR normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A.

La Figure 17 montre que le profil d'expression protéique de G9a et de GLP est similaire durant la différenciation musculaire terminale. Leur expression augmente aux étapes précoces de la différenciation (vers 24h de différenciation), avant de diminuer dans les stades tardifs. Le profil d'expression ARN de G9a et GLP ne traduit pas le profil d'expression protéique. En effet, le profil ARN de G9a ne bouge pas durant la différenciation. L'ARN de GLP ne diminue pas non plus durant la différenciation tardive. Par contre, on observe un pic d'expression ARN de GLP à 24h de différenciation qui corrèle avec le pic protéique observé. L'équipe de Y. Shinkai (Tachibana et al, 2008) a montré que la formation du complexe G9a/GLP stabilise leur niveau protéique. De même, l'inhibition de G9a ou de GLP diminuait le niveau protéique, et non ARNm, de l'autre (données non montrées pour les niveaux ARNm) (Figure 22). On peut alors supposer qu'à 24h, l'augmentation de l'ARN puis de la protéine GLP permettrait de stabiliser G9a sous forme de complexe. Mes résultats de co-immunoprécipitation montrent d'ailleurs que G9a et GLP sont capables d'interagir dans ce

modèle de différenciation (Figure 16). Ainsi, ces premiers résultats suggèrent un rôle associé de ces deux protéines, notamment sous forme de complexe, durant la différenciation terminale. En particulier pendant les phases précoces de différenciation, comme le suggère le pic protéique observé à 24h de différenciation.

2. La surexpression de G9a inhibe la différenciation musculaire terminale, à l'inverse de GLP.

Il est possible de suivre la différenciation musculaire terminale *in vitro* grâce à des marqueurs de différenciation. En général, on utilise la myogénine comme marqueur précoce de différenciation et MCK comme marqueur tardif. Par exemple, dans les myoblastes murins C2C12 que j'utilise, il est possible de détecter l'expression de la protéine myogénine dès 24h de différenciation et de MCK vers 48h de différenciation. Il est également possible d'évaluer l'état de différenciation au niveau morphologique. En effet, dès 24h de différenciation, on peut voir que les myoblastes (contrôle) s'orientent les uns par rapport aux autres et se rapprochent pour commencer, vers 48h de différenciation, à fusionner. On peut ainsi distinguer la formation de myotubes, dont la grosseur va continuer à augmenter avec l'avancée en différenciation. Lorsque l'on surexprime G9a, on constate que la différenciation est inhibée. En effet, les cellules surexprimant G9a montrent, par rapport aux cellules contrôle, de petits et peu nombreux myotubes après 96h de différenciation (Figure 18). Cela corrèle avec le fait qu'il n'y a pas d'expression protéique de MCK même après 96h de différenciation dans les cellules surexprimant G9a. De même, il n'y a quasiment pas d'expression ARN de MCK ni de la myogénine. Il est à noter que ce sont des cellules polyclonales surexprimant G9a qui ont été utilisées dans les expériences montrées en Figure 18. Il est ainsi possible que les quelques pseudo-myotubes de petit volume observés soient

issus de cellules surexprimant faiblement G9a. Afin de tester cette hypothèse, nous avons trié les myoblastes en fonction du niveau d'expression de la protéine G9a. J'ai ainsi pu observer que l'effet inhibiteur sur la différenciation est positivement corrélé au niveau de surexpression de G9a (données non montrées).

D'une manière totalement inattendue, et à l'inverse de G9a, la surexpression de GLP semble favoriser la différenciation de myoblastes même en conditions de prolifération. En effet, on peut voir dans les myoblastes en prolifération qui surexpriment GLP, que MCK est déjà exprimée aussi bien au niveau ARN que protéique (Figure 18).

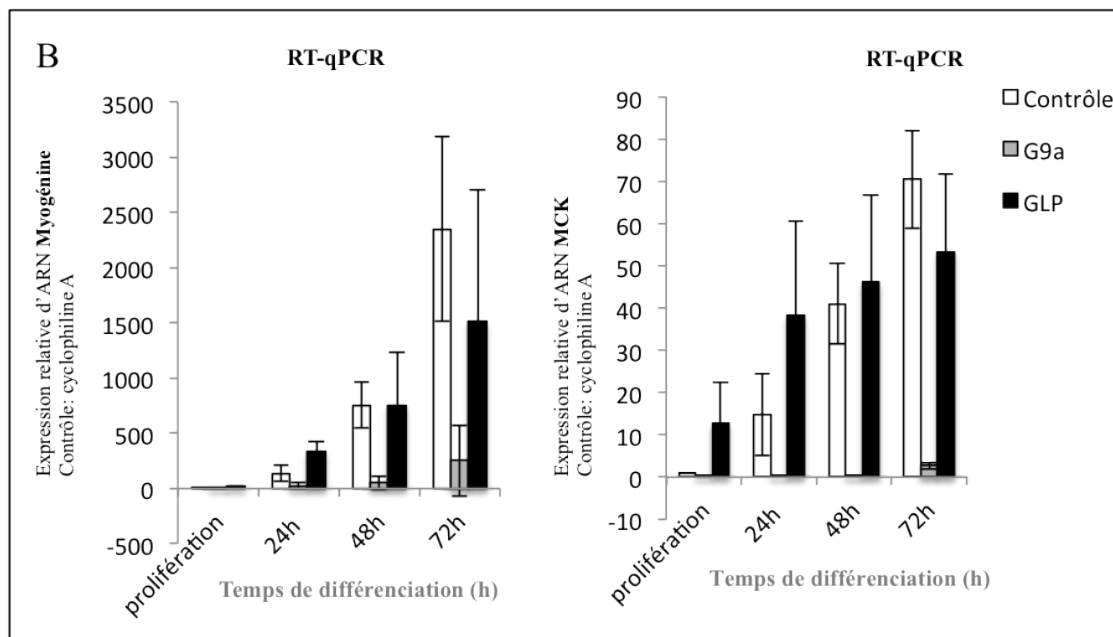
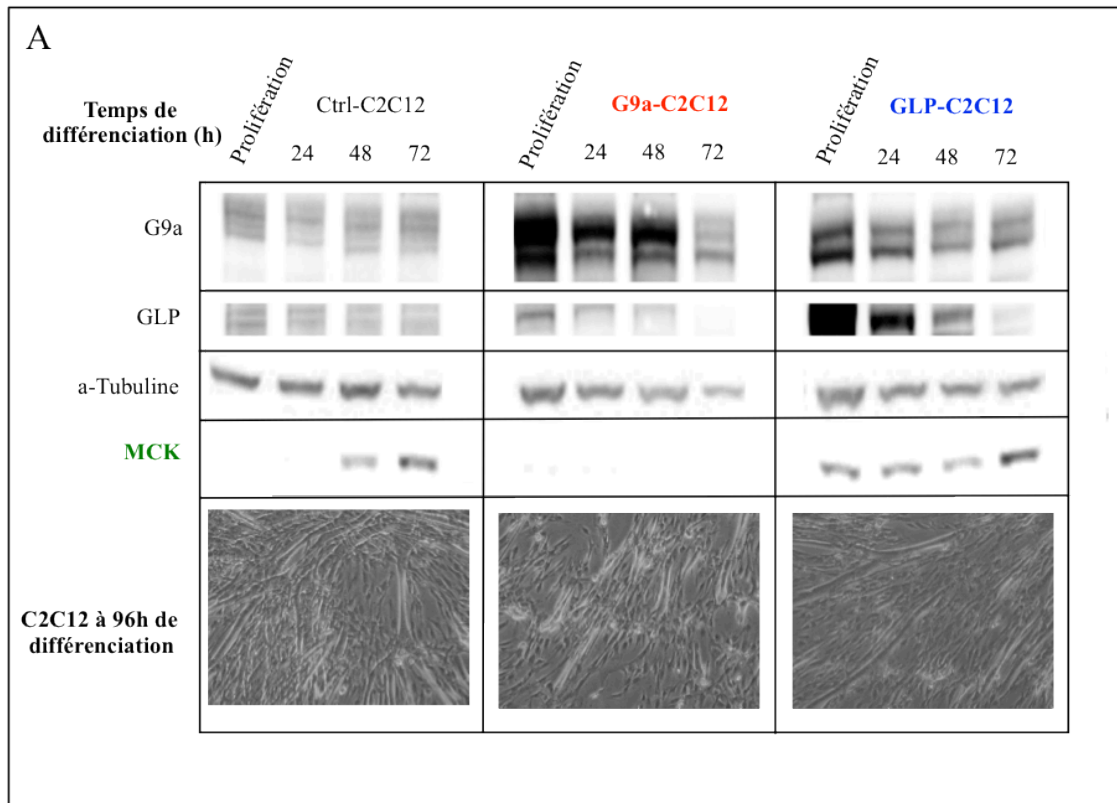


Figure 18 : La différenciation musculaire terminale est affectée par un gain de fonction de G9a ou GLP. Des myoblastes murins C2C12 portant stablement soit un vecteur vide (contrôle) soit surexprimant G9a ou GLP ont été analysés en prolifération (0 h) et à différents temps de différenciation. **A)** Analyse par western blot d'extraits protéiques de ces myoblastes C2C12. MCK sert de marqueur tardif de différenciation terminale et α -tubuline sert de contrôle de dépôt. Pour chaque lignée C2C12, des images de microscopie (x10) des cellules à 96h de différenciation sont montrées en dessous. **B)** Niveaux d'expression ARNm de la myogénine (panneau de gauche) et MCK (panneau de droite) mesurés par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, fait à partir des ARNs extraits des lignées C2C12 surexprimant G9a ou GLP.

3. La perte de fonction de GLP inhibe la différenciation musculaire tandis que celle de G9a la favorise.

J'ai, par la suite, étudié l'effet d'une perte de fonction de GLP sur la différenciation musculaire terminale. Pour cela, j'ai utilisé différents siARN dirigés contre l'ARNm GLP. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 19. On constate que l'expression de la protéine MCK est inhibée dans les C2C12 transfectées avec les siARN 1 et 2 contre GLP. Ceci n'est pas le cas avec le siARN 3. Les siARN 1 et 2 diminuent correctement le niveau de la protéine GLP dans les myoblastes en prolifération et en différenciation, tandis que le siARN 3 inhibe la protéine GLP seulement après 48h de différenciation. On peut supposer que l'inhibition de MCK nécessite une perte de fonction de GLP déjà en prolifération, avant l'entrée des myoblastes en différenciation terminale. Dans le panneau B, on peut voir que le niveau d'expression des ARNm de la myogénine et de MCK à 48h de différenciation est diminué à près de 50% avec le siARN 1. Ceci corrèle avec le fait que l'on n'observe quasiment pas de myotubes avec ces cellules après 96h de différenciation (Figure 19, panneau C). Afin de confirmer les résultats obtenus avec les siARN, j'ai également étudié les effets de la perte de fonction de GLP en utilisant des C2C12 stablement transfectées avec des shARN contre GLP (Figure 20). Par rapport aux cellules contrôles, on observe peu de myotubes après 72h de différenciation dans les C2C12 exprimant le shARN contre GLP (Figure 20). Ainsi, l'expérience avec le shARN confirme les résultats obtenus avec les siARN, à savoir que la perte de GLP inhibe la différenciation musculaire terminale.

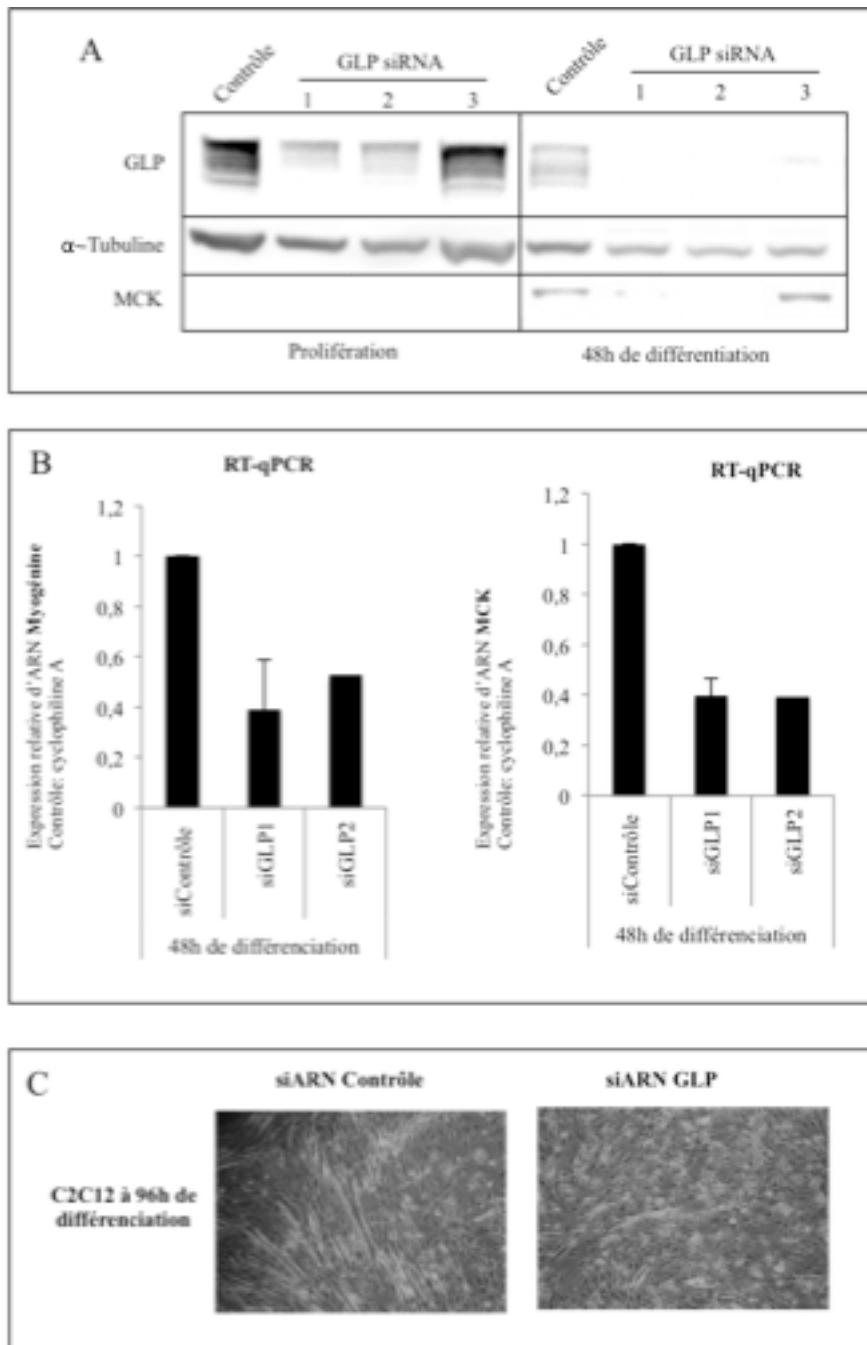


Figure 19 : La différenciation musculaire terminale est affectée par une perte de fonction de GLP.

Des myoblastes murins C2C12 transfectées avec un siARN contrôle ou avec des siARN ciblant GLP. **A)** Analyse par western blot d'extraits protéiques de cellules collectées à 48h post-transfection (prolifération) ou après 48h de différenciation. Trois séquences de siARN différentes notées 1, 2 et 3, ont été utilisées contre GLP. **B)** Niveau d'expression ARNm de la myogénine (panneau de gauche) et de MCK (panneau de droite) mesuré par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, fait à partir des ARNs extrait des expériences réalisées avec le siARN noté 1 ciblant GLP. **C)** Des images de microscopie photonique (X10) correspondant à des C2C12 après 96h de différenciation et transfectées avec un siARN contrôle ou avec le siARN 1 ciblant GLP.

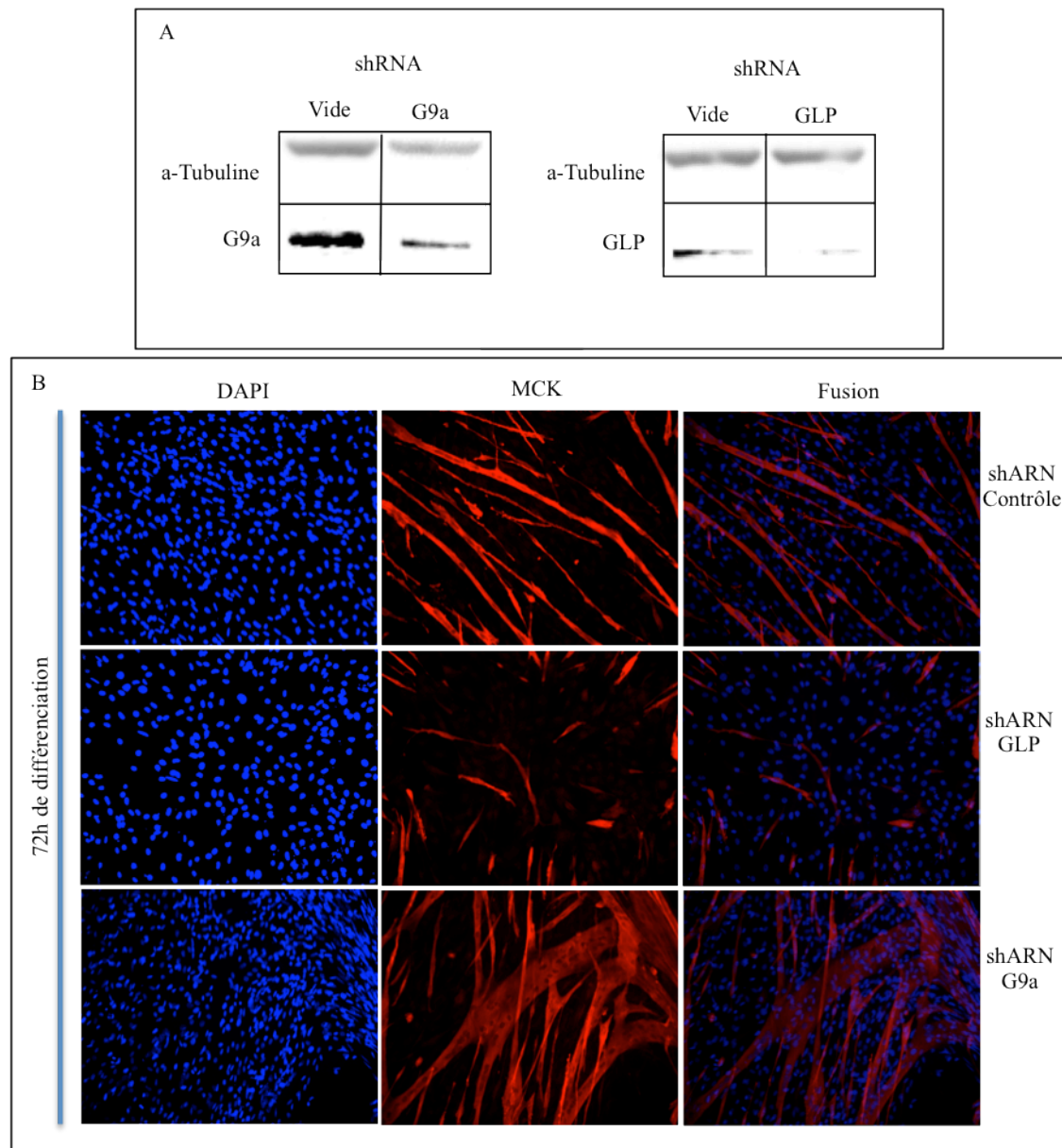


Figure 20 : La perte de fonction de GLP inhibe la différenciation terminale tandis que la perte de G9a la favorise.

Myoblastes murins C2C12 exprimant stablement un shARN contrôle ou un shARN ciblant GLP ou G9a.

A) Analyse par western blot montrant l'expression de G9a et GLP dans des myoblastes en prolifération, exprimant le shARN contrôle ou ciblant G9a ou GLP. **B)** Immunofluorescence marquant la protéine MCK et les noyau au Dapi des C2C12 exprimant les différents shARN après 72h de différenciation.

De la même manière, j'ai étudié l'effet d'une perte de fonction de G9a en utilisant un shARN (Figure 20). Les résultats montrent qu'à l'inverse de GLP, une perte de G9a favoriserait la différenciation. On observe, en effet, la formation de myotubes plus gros avec les C2C12 exprimant le shARN contre G9a par rapport aux C2C12 contrôles. Ce phénotype concorde avec le phénotype inverse observé dans les C2C12 surexprimant G9a (Figure 20). Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec les résultats publiés durant ma thèse (Ling et al, 2012a).

4. La surexpression de G9a favorise l'expression de la cycline D1

La différenciation terminale du muscle squelettique implique l'expression des gènes spécifiques du muscle. Cependant, une autre étape est nécessaire au bon déroulement de la différenciation terminale : la sortie irréversible du cycle cellulaire, qui implique l'extinction des gènes associés à la prolifération cellulaire. Pour le moment, nous avons constaté qu'une dérégulation de l'expression de G9a ou GLP influence l'expression des gènes de la différenciation. Je me suis ensuite intéressée au rôle de G9a et de GLP dans la prolifération cellulaire et la sortie du cycle cellulaire.

Pour cela, j'ai d'abord étudié l'effet de la surexpression de G9a et de GLP sur la prolifération des myoblastes (Figure 21). Ainsi, comme le montre la courbe de croissance, les myoblastes surexprimant G9a prolifèrent plus rapidement que les myoblastes contrôles (Figure 21C). Cette observation est en accord avec le niveau d'expression protéique de la cycline D1 (impliquée dans la transition G1/S) qui est plus élevé dans les myoblastes surexprimant G9a comparées aux cellules contrôles (Figure 21A). Cependant, la surexpression de G9a ne modifie pas le niveau protéique de la cycline A2 (Figure 21A) ni de la cycline E1 (données non montrées). Cependant d'une manière intéressante, le niveau ARNm de la cycline D1 dans les myoblastes en prolifération n'est pas significativement différent entre les cellules surexprimant G9a et les cellules contrôles (Figure 21B). Cela suggère que, tout du moins en prolifération, la surexpression de G9a augmente la quantité protéique de la cycline D1 et non sa transcription. Par ailleurs, j'ai pu montrer que cette stabilisation est spécifique de la cycline D1 nucléaire, compartiment subcellulaire où elle est active (données non montrées). En différenciation, par contre, la surexpression de G9a a un effet transcriptionnel positif la cycline D1. En effet, l'inhibition durant la différenciation de la transcription de la cycline D1 semble retardée dans les myoblastes surexprimant G9a par rapport aux contrôles. On peut par ailleurs remarquer sur la Figure 21 que l'expression ARN de la cycline D1 est plus rapidement

inhibée durant la différenciation dans les cellules surexprimant GLP comparées aux cellules contrôles.

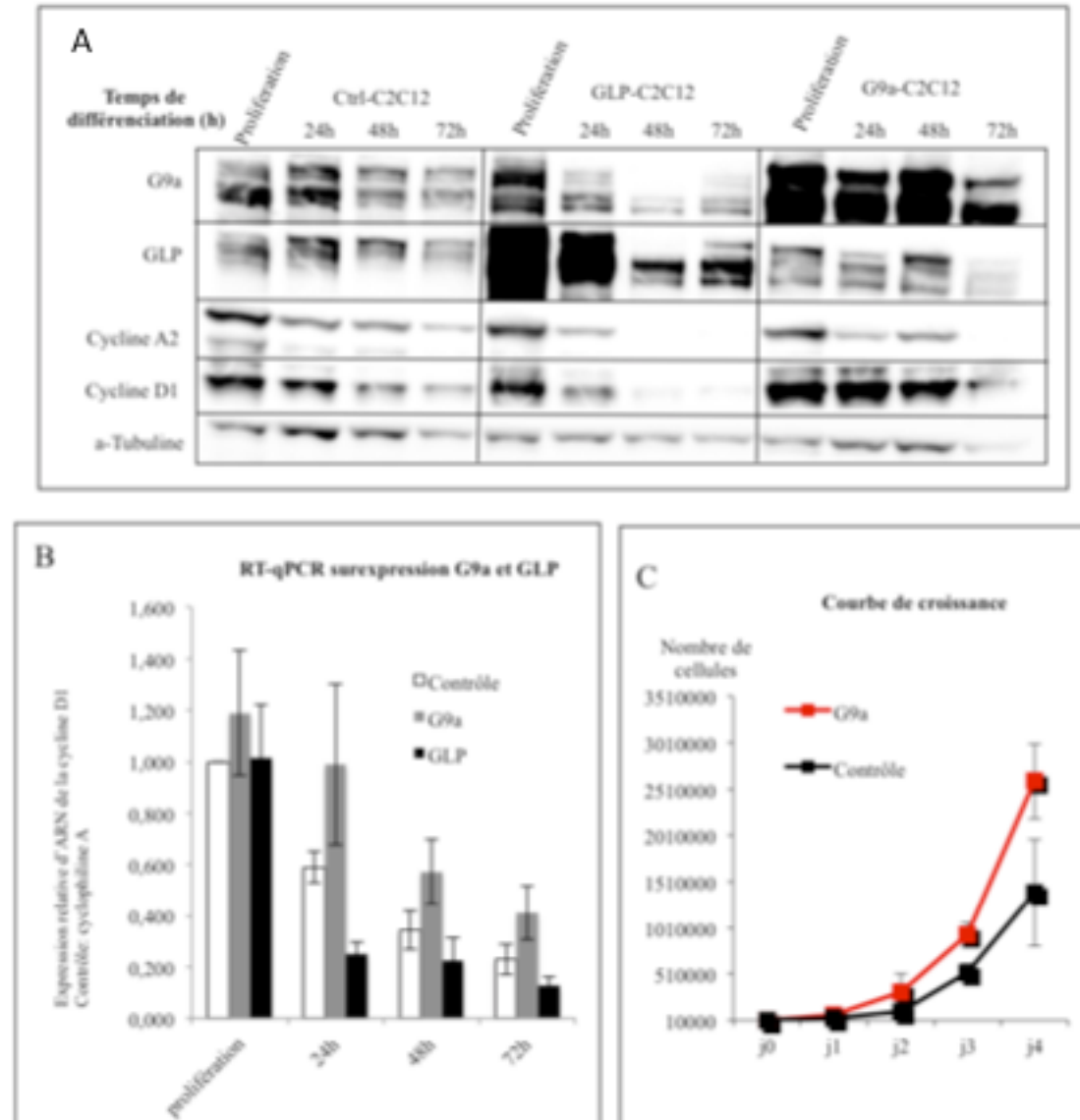


Figure 21 : La surexpression de G9a et GLP affecte l'expression des gènes associés à la prolifération cellulaire.

Myoblastes murins C2C12 surexprimant G9a ou GLP analysés en prolifération (0h) et à différents temps de différenciation. **A)** Analyse par western blot montrant l'expression de la cycline D1 et de la cycline A2 durant la différenciation musculaire terminale dans les cellules surexprimant G9a ou GLP. **B)** Niveau d'expression ARNm de la cycline D1 mesuré par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, fait à partir des ARNs extrait des sur-expression de G9a et GLP. **C)** Courbe de croissance sur 5 jours de myoblastes en prolifération, contrôle ou surexprimant G9a.

5. La perte d'expression de G9a et GLP a un effet antagoniste dans les myoblastes primaires en prolifération.

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les myoblastes C2C12, j'ai étudié l'effet de la perte de fonction de G9a et GLP dans des myoblastes primaires (induite par des siARN). Les cellules primaires étant très difficiles à transfecter, je n'ai pu obtenir de résultats concluants que dans les myoblastes en prolifération (Figure 22).

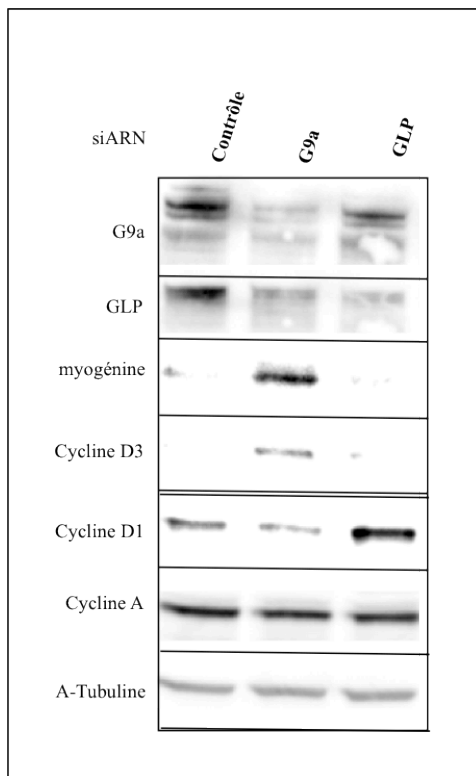


Figure 22 : L'inhibition de G9a ou de GLP a un effet antagoniste dans les myoblastes primaires.

Analyse par western blot faite à partir de myoblastes primaires de souris en prolifération transfectés avec des siARNs soit contrôle soit ciblant G9a ou GLP. La myogénine et la cycline D3 servent de marqueurs précoces de différenciation.

Nous avons pu observer que dans les myoblastes de la lignée C2C12, l'inhibition de G9a favorisait la différenciation (Figures 18 et 20). Cet effet est encore plus fort dans les myoblastes primaires. En effet, on peut voir que les myoblastes primaires transfectés avec un siARN dirigé contre G9a expriment les marqueurs de différenciation que sont la myogénine et la cycline D3 même en prolifération. A l'inverse, l'expression de la cycline D1 est réduite avec le siARN G9a. De manière tout à fait antagoniste, l'inhibition de GLP favorise l'expression de la cycline D1. Par contre, et de même que dans les C2C12, je n'ai pas pu observer un effet sur l'expression d'autres cyclines. Par exemple, on ne voit pas de

modification d'expression de la cycline A (Figure 22).

6. Etude du transcriptome global de myoblastes transfectés par des siARNs ciblant G9a ou GLP

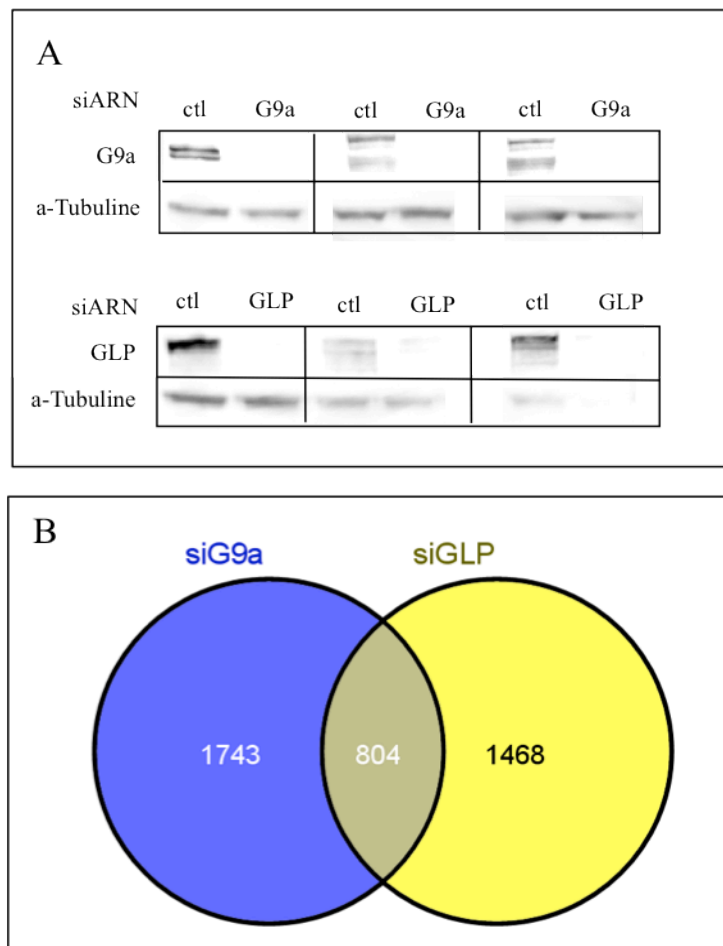


Figure 23: Transcriptome de myoblastes C2C12 en prolifération transfectés par des siARNs ciblant G9a ou GLP.

A) Efficacité des siARNs : analyse par western blot de l'expression de G9a ou de GLP dans les myoblastes C2C12 transfectés avec les siARN indiqués, ayant servi pour l'étude transcriptomique. Le même siARN contre G9a et contre GLP a été utilisé dans ces trois expériences qui représentent trois réplicats biologiques. **B)** Diagramme de Venn représentant les gènes dérégulés (positivement ou négativement) dans le transcriptome.

J'ai réalisé une étude du transcriptome global (par puces Affymetrix) de myoblastes C2C12 en prolifération transfectés avec des siARN dirigés contre GLP ou G9a. Le but de cette approche était d'avoir une idée globale des gènes différenciellement régulés par G9a et GLP, afin de trouver des pistes permettant d'expliquer les effets antagonistes de G9a et GLP sur la

prolifération des myoblastes. Le diagramme de Venn (Figure 23) montre que de nombreux gènes ne sont pas régulés de la même façon par une inhibition de G9a ou de GLP. En effet, sur les 3211 gènes qui sont ressortis des analyses du transcriptome comme étant dérégulés par G9a et/ou GLP, seuls 804 sont communs aux conditions siARN G9a et GLP. A ces 804 gènes, il faut en enlever 15 qui sont régulés de manière totalement antagoniste par les siARN G9a ou GLP. Au total, on peut compter plus de 75% de gènes qui ne sont pas régulés de la même façon par G9a et GLP.

	siARN G9a	siARN GLP
Gènes régulés négativement	<ul style="list-style-type: none"> > Cycle cellulaire (1,79E-11) > Apoptose (7,98E-03) 	<ul style="list-style-type: none"> > Fibre musculaire, (4,60E-06) > Kinases dépendantes des cyclines (3,24E-03)
Gènes régulés positivement	<ul style="list-style-type: none"> > Régulation de l'activité des protéines ubiquitine ligase (2,74E-05) > Apoptose (1,61E-08) > régulation positive de l'apoptose (5,37E-06) > Différenciation des cellules du muscle strié (7,98E-05) 	<ul style="list-style-type: none"> > Complexe du protéasome (2,41E-19) > Protéolyse (1,73E-09) > Progression du cycle cellulaire (1,83E-05)

Table 2 : Tableau non exhaustif représentant les différents processus biologiques mis en évidence par le transcriptome des C2C12 en prolifération transfectés par des siARN G9a ou GLP.

Dans la deuxième colonne du tableau sont indiqués les processus dérégulés par le siARN de G9a et dans la troisième les gènes dérégulés par le siARN de GLP. La deuxième ligne correspond aux gènes dérégulés négativement et la troisième ligne aux gènes dérégulés positivement. La *p-value* pour chaque processus mis en évidence ici est indiquée entre parenthèses.

En réalisant une analyse à l'aide de genomix, des gènes régulés, d'un côté positivement et de l'autre négativement par les siARN de G9a et GLP, différentes voies biologiques ont été mises en évidence. La table 2 décrit quelques processus qui, après analyse, présentent la plus grande relevance biologique et la *p-value* la plus significative.

Les résultats ainsi obtenus dans cette analyse semblent corrélés avec les phénotypes observés précédemment. En effet, nos résultats précédents semblent montrer que G9a favorise la prolifération. Or, l'étude du transcriptome met en évidence une grande variété de gènes positivement régulés par G9a et qui sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. A l'inverse, les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont plutôt négativement régulés par

GLP. On peut aussi constater que les gènes associés à la différenciation musculaire sont positivement régulés par GLP à l'inverse de G9a. D'une manière intéressante, G9a semble réguler les gènes associés à l'apoptose. Enfin, parmi les gènes régulés négativement par GLP, un processus biologique est particulièrement représenté : la voie de régulation par ubiquitination. En particulier, sont dérégulés positivement les gènes impliqués dans la régulation positive de l'activité des protéines ubiquitine ligase impliquées dans le cycle cellulaire. On retrouve aussi un grand nombre de gènes codants pour des sous-unités du protéasome.

Afin de valider les résultats de notre analyse par *microarray*, j'ai réalisé des RT-qPCR sur des ARNs extraits de C2C12 en prolifération dont l'expression de GLP ou de G9a est diminuée par siARNs (Figure 24). On constate que de manière générale, les gènes régulés négativement par les siARNs G9a et GLP dans les microarrays le sont aussi dans cette expérience de RT-qPCR. Il est à noter que les variations sont faibles, mais cela est également le cas dans les résultats de microarrays. Cependant, les résultats des RT-qPCR ne sont pas toujours en accord avec les résultats du transcriptome dans le cas des gènes censés être régulés positivement dans l'étude transcriptomique. Par exemple, dans les microarrays, le gène *sema6a* est régulé positivement (+1,4) par le siRNA G9a. Ceci est le contraire dans les RT-PCR. Cependant, j'aimerais faire remarquer que les cellules utilisées pour l'étude de transcriptome ont été transfectées deux fois avec les siARN alors que celles utilisées pour les RT-QPCR ont été transfectées une seule fois. De ce fait, l'expression de l'ARN de G9a est diminuée de 80% dans l'étude du transcriptome alors qu'elle n'est diminuée que de 40 à 50% pour les RT-QPCR.

Par ailleurs, la technique de RT-qPCR étant plus sensible que l'étude par microarray, elle permet de mettre en évidence une régulation antagoniste entre les siARN de G9a et GLP pour certains gènes. Par exemple, les gènes *MyoD*, *bre* et *lifr* apparaissent seulement dérégulés

dans les microarrays par le siARN G9a. Cependant avec les RT-qPCR, on constate que ces gènes sont également dérégulés par le siARN GLP. Ceci est également le cas pour tous les gènes dérégulés négativement par le siARN GLP, qui apparaissent régulés positivement par le siARN G9a (Figure 24C). Enfin, j'ai également vérifié par RT-qPCR le niveau ARNm de 2 gènes censés, d'après le transcriptome, être dérégulés de la même façon par le siARN de G9a et de GLP. Dans ce cas, la RT-qPCR confirme le résultat de l'étude par microarray (Figure 24E).

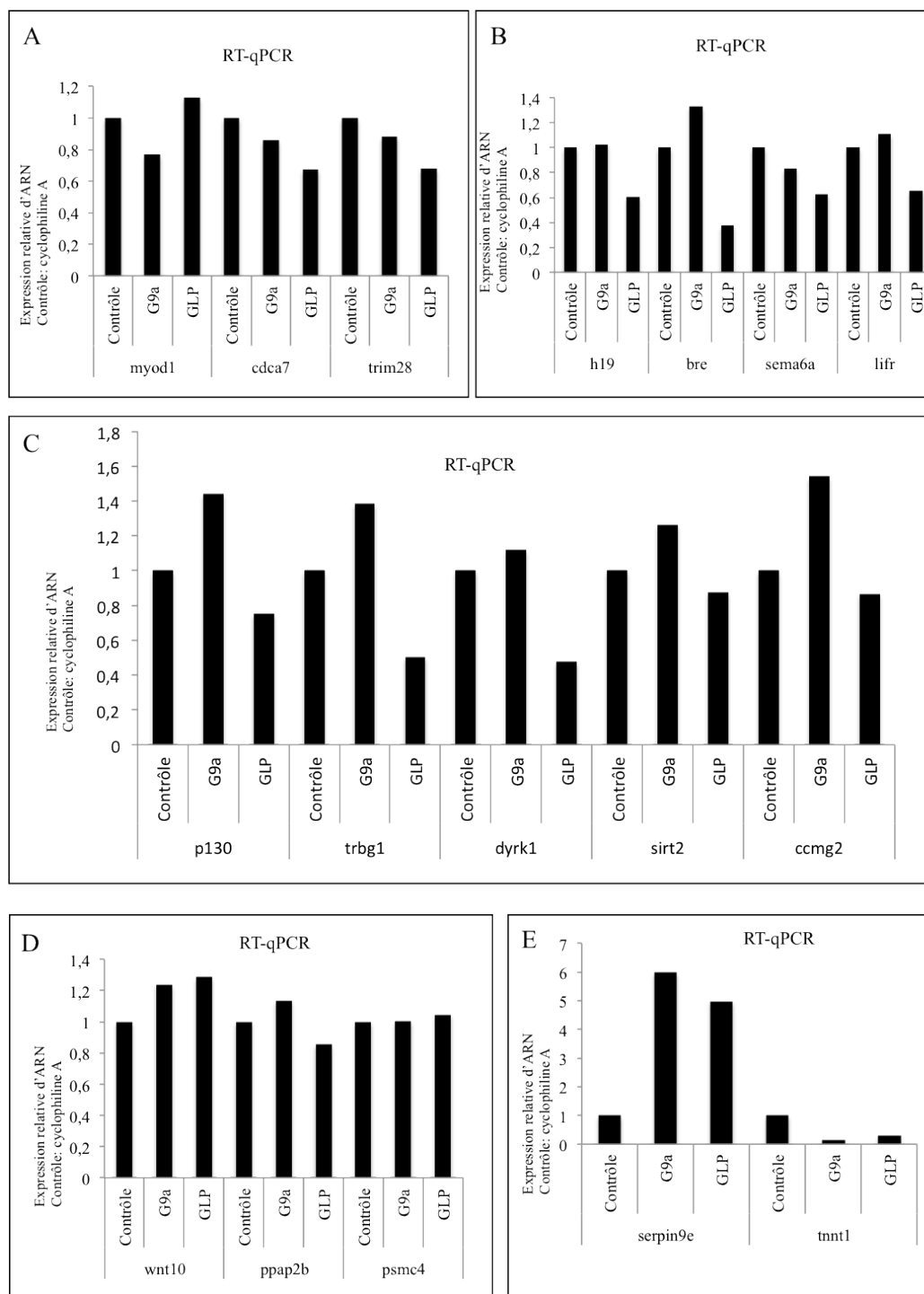


Figure 24: Analyse par RT-qPCR des gènes dérégulés dans le transcriptome par les siARN G9a ou GLP. Niveaux d'expression ARNm mesurés par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, faits à partir des ARNs extraits de C2C12 en prolifération transfectés avec des siARNs dirigés contre G9a et GLP. Chaque barre présentée dans cette figure correspond à la moyenne de deux expériences indépendantes. Par rapport au résultat du transcriptome, sont présentés les gènes dérégulés par le siARN de G9a négativement en **A)** positivement en **B)** et **C)** par le siARN de GLP positivement en **D)**. en **E)** sont représentés les gènes communément dérégulés par les siARN de G9a et GLP.

J'ai ensuite voulu étudier si les effets des siARN de G9a et GLP sur la transcription des gènes pouvaient être directs. En effet, G9a et GLP ont, avant tout, été identifiées comme les mono-

et di-méthyltransférases de H3K9. Pour cela, j'ai testé, par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), si les protéines G9a et GLP étaient recrutées au niveau des promoteurs des gènes régulés dont l'expression a augmenté dans notre étude par microarrays (Figures 25 et 26). Sur la figure 25, on peut voir que les gènes issus de l'étude du transcriptome et régulés positivement par le siARN de G9a sont fixés au niveau de leur promoteur par la protéine G9a. Cependant, on constate que ces gènes sont également fixés par la protéine GLP. Ceci est aussi le cas pour les gènes régulés positivement par le siARN GLP (Figure 26). Ainsi, que le gène soit régulé positivement par le siARN de G9a et pas GLP ou, à l'inverse, par le siARN de GLP et pas G9a, on retrouve quand même G9a et GLP ensemble sur son promoteur. Bien qu'elles puissent avoir des effets différents sur la régulation des gènes, les protéines G9A et GLP semblent bien être présente ensemble sous la forme d'un hétéro-complexe

L'analyse du transcriptome a mis en évidence une dérégulation de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, de même que dans la physiologie et/la différenciation musculaires. La voie d'ubiquitination et du protéasome également est fortement ressortie des analyses pour le siARN de GLP. Pour les expériences de ChIP que j'ai faites, j'ai donc choisi de m'intéresser aux gènes impliqués dans ces différents processus. Les résultats montrent que G9a, aussi bien que GLP, sont retrouvées au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, G9a et GLP fixent les gènes *ngf*, *E2F1*, *mdm2* ou encore *mcts* (Figure 26A). Les deux protéines fixent aussi les promoteurs de gènes impliqués positivement dans la différenciation musculaire, tels que *syne1*, *Hdac9*, *Errbb2*, *wnt10b* et *Dyrk*, ou encore le gène *pfkm* qui est spécifique du muscle. A présent, je n'ai pas réussi à valider par RT-qPCR une régulation dépendante de GLP des gènes impliqués dans la voie du protéasome (Figure 24D). Cependant, les résultats montrés sur la Figure 26B montrent que G9a et GLP sont toutes deux retrouvées au niveau des promoteurs de nombreux gènes codant pour des sous-

unités 26S du protéasome.

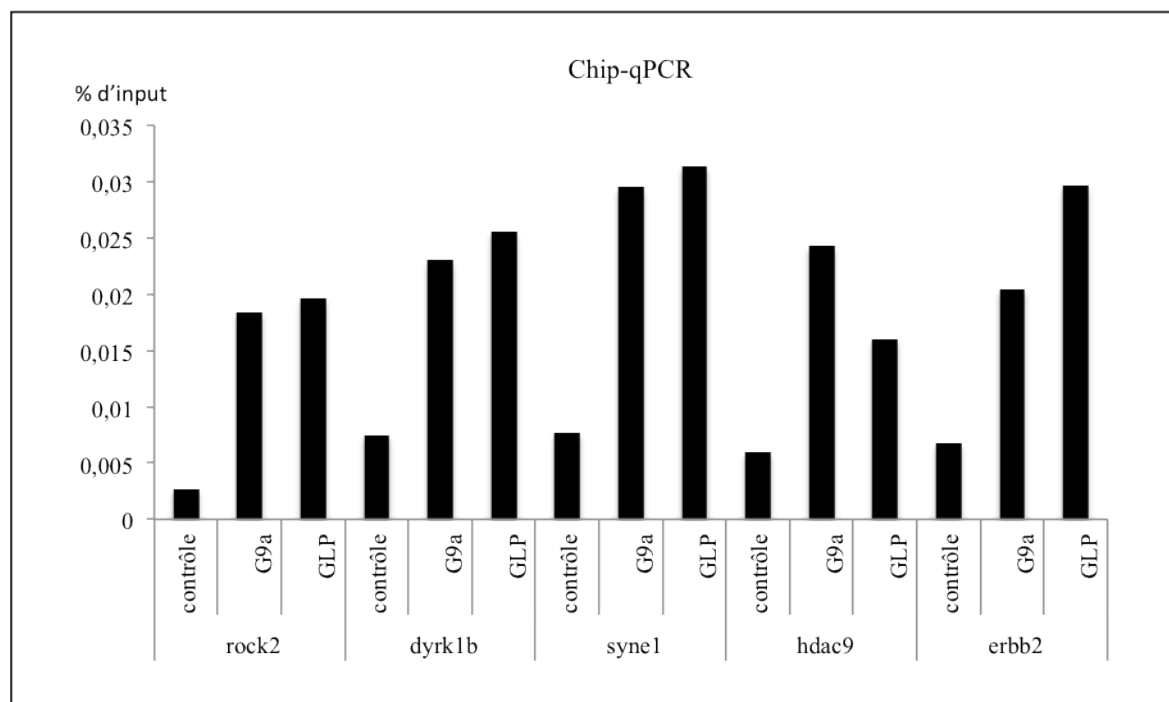


Figure 25: Recrutement des protéines G9a et GLP au niveau des promoteur des gènes identifiés comme étant dérégulés positivement par le siARN G9a dans l'étude du transcriptome.

La fixation de G9a et GLP a été étudiée par CHIP dans des myoblastes C2C12 en prolifération. Les expériences de CHIP sont présentées en fonction du pourcentage d'input obtenu et ont été réalisées sur deux échantillons indépendants.

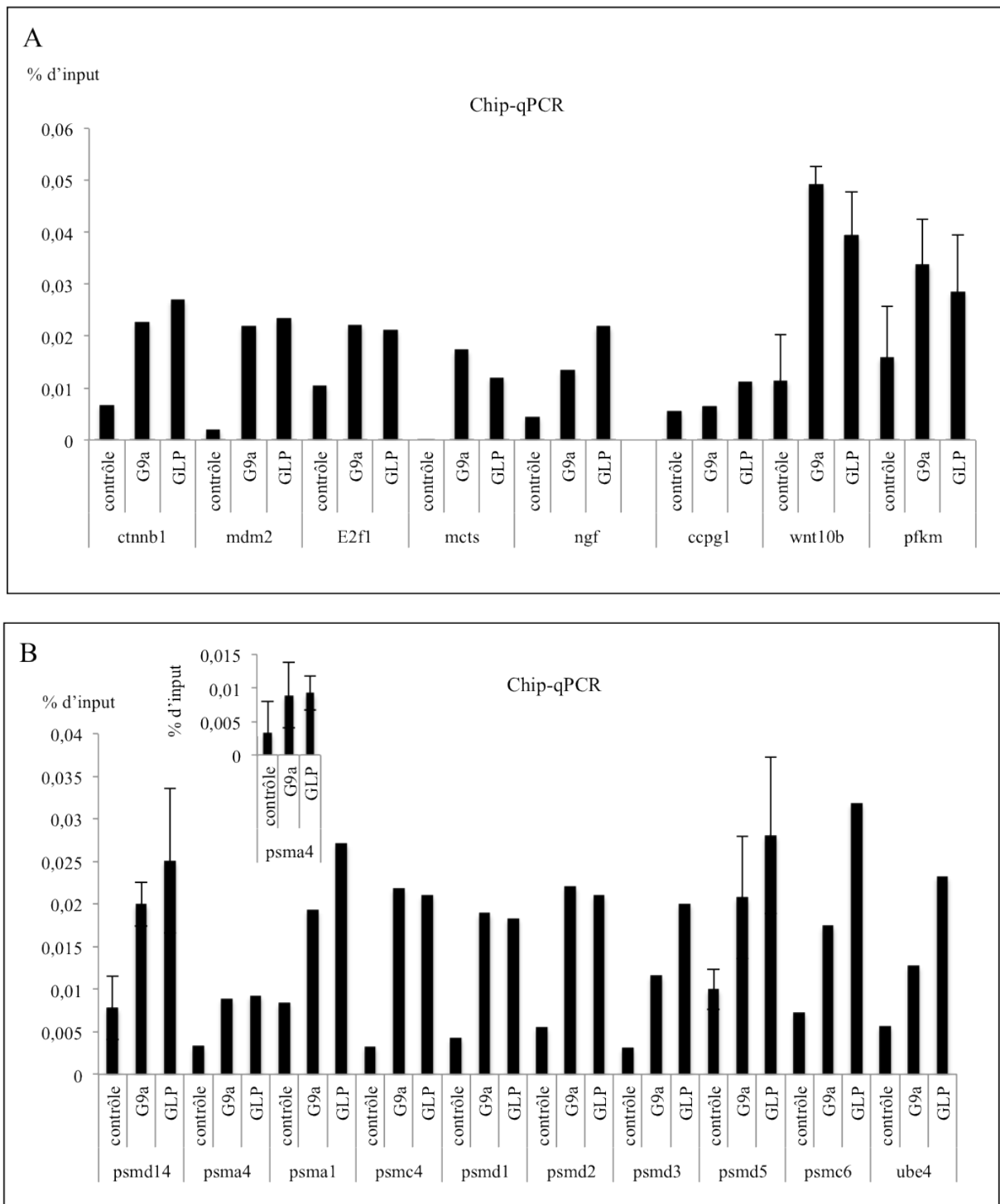


Figure 26 : Recrutement des protéines G9a et GLP au niveau des promoteur des gènes identifiés comme étant dérégulés positivement par le siARN de GLP dans l'étude du transcriptome.

La fixation de G9a et GLP a été étudiée par CHIP dans des C2C12 en prolifération. Les expériences de CHIP sont présentées en fonction du pourcentage d'input obtenu et ont été réalisées sur deux échantillons indépendants et sur trois là où il y a des barres d'erreurs. **A)** Gènes impliqués dans la différenciation du muscle ou la prolifération cellulaire. **B)** Gènes codant pour des composants des sous-unités du protéasome ou impliqués dans la régulation de l'ubiquitine ligase. Le gène psma4 sert de contrôle négatif.

III. Conclusion et perspectives à court terme

Les rôles fonctionnels de G9a et GLP sont, dans la plupart des publications, étroitement associés. En effet, ces deux protéines, de structure très semblable, sont connues pour former un hétérodimère stable qui serait la seule forme fonctionnelle de ces deux protéines (Tachibana et al, 2008; Tachibana et al, 2005). Mes résultats montrent que G9a et GLP interagissent ensemble aussi bien dans les myoblastes en prolifération que dans les myoblastes en différenciation et sont souvent présentes, toutes les deux, au niveau des promoteurs des gènes potentiellement cible de l'une ou l'autre. De plus, la modification de l'expression de l'une influence la stabilité protéique de l'autre. Ces résultats semblent montrer que, effectivement, G9a et GLP sont présentes dans la cellule sous forme d'un complexe, nécessaire notamment à leur stabilité. Cependant, même si mes résultats semblent confirmer l'existence du complexe, ils montrent également, et cela de manière totalement inattendue, que G9a et GLP auraient des rôles antagonistes dans les myoblastes en prolifération. Ainsi, mes résultats montrent que G9a favoriserait la prolifération cellulaire et inhiberait la différenciation. A l'inverse, GLP défavoriserait la prolifération et régulerait positivement la différenciation.

1. G9a inhibe la différenciation musculaire squelettique terminale et favorise la prolifération

Mes résultats montrent que G9a inhibe la différenciation musculaire terminale. La surexpression de G9a inhibe la différenciation tandis que l'inhibition par shARN ou siARN induit l'effet contraire. Ces résultats sont en accord avec des résultats publiés pendant ma

thèse par deux autres équipes (Ling et al, 2012a; Wang & Abate-Shen, 2012). Il a en effet été montré que, dans les cellules en prolifération, G9a interagit avec MyoD et régule négativement son activité transcriptionnelle en permettant la di-méthylation de H3K9 sur le promoteur des gènes cibles de MyoD (Ling et al, 2012a). Cette régulation négative passe notamment par la méthylation de MyoD lui-même par G9a sur la lysine K104 (Ling et al, 2012a). La même équipe a aussi montré que cette régulation négative des gènes cibles de MyoD par G9a se fait en coopération avec la protéine Sharp-1 avec laquelle G9a interagit (Ling et al, 2012b). Sharp-1 est un facteur de transcription de type bHLH qui régule négativement MyoD en entrant en compétition avec les protéines E, notamment la protéine E47 et forme ainsi un hétérodimère inactif (Azmi et al, 2004). J'ai confirmé que G9a interagit avec MyoD dans les cellules en prolifération (Figure 16). Une autre étude, publiée la même année, a montré que G9a peut aussi inhiber la différenciation musculaire en régulant négativement directement la transcription du gène *MyoD* (Wang & Abate-Shen, 2012). Dans cette étude, il a été montré que G9a participe, en interaction avec Msx1, à la répression de la différenciation musculaire dans les cellules en prolifération. La protéine Msx1 est une homéoprotéine qui peut lier l'ADN et réprimer l'expression des gènes, notamment en induisant une modification de la chromatine au niveau de ces gènes. Msx1 protéine n'est exprimée que dans les cellules qui n'ont pas encore commencé à se différencier. Une augmentation forcée de son expression inhibe la différenciation des myoblastes. Il a été montré que Msx1 réprime ses gènes cibles notamment *via* son interaction avec G9a qui diméthyle H3K9 sur ces gènes. En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que G9a régule négativement la différenciation musculaire en coopérant avec des facteurs de transcription, tels que MyoD et Msx1, qui permettent de cibler G9a sur les gènes spécifiques de la différenciation afin d'inhiber leur expression dans les myoblastes en prolifération *via* la diméthylation de H3K9.

Mes résultats apportent cependant une nouvelle explication au rôle répresseur de G9a sur la différenciation musculaire. En effet, comme je l'ai expliqué dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, pour que la différenciation musculaire terminale se passe correctement il faut, d'une part, pouvoir exprimer les gènes spécifiques de la différenciation et, d'autre part, inhiber les gènes de la prolifération. Or, d'après mes résultats, G9a favorise la prolifération des myoblastes. En effet, les cellules surexprimant G9a ont une croissance accélérée qui pourrait être expliquée par l'augmentation de la cycline D1 dans ces cellules. A l'inverse, le siARN G9a diminue l'expression protéique de la cycline D1. De façon tout à fait surprenante, je n'ai observé de différence d'expression des autres cyclines que j'ai testées, telles que les cycline A2, B1 et E1 (données non montrées pour B1 et E1). Comment expliquer que les cellules surexprimant G9a puissent présenter une prolifération accrue sans une augmentation générale des cyclines régulant le cycle cellulaire? Ce phénomène a néanmoins déjà été observé notamment dans les myocytes cardiaques. En effet, une hyperprolifération des myocytes cardiaques due à une augmentation de l'expression de la Cycline D1 a été observée dans des embryons de souris mutés pour le gène *jumonji* (dont la protéine appartient à la famille des Jmj connue pour avoir une activité déméthylase de lysines), et cela sans ou avec une très faible variation de l'expression d'autres cyclines, telles les Cyclines E1 et D2 (Toyoda et al, 2003). Par ailleurs, la surexpression de la Cycline D1 a été associée à un certain nombre de cancers, notamment le gliome, où il a été montré que la surexpression de la Cycline D1 est associée à l'expression de la protéine PCNA donc à la prolifération, tandis que l'expression des Cyclines D2 et D3 présente une faible corrélation avec l'expression de PCNA. Une possibilité pour expliquer cela serait que la surexpression d'une cycline peut compenser l'expression plus faible des autres (Zhang et al, 2005). En effet, par exemple la perte d'expression de la Cycline D1 peut être compensée par le gain d'expression de la Cycline E (Geng et al, 1999).

Par ailleurs, mes résultats montrent cependant que de la cycline D3 est sensible aux niveaux de G9a. Néanmoins, la cycline D3 présente la particularité d'être surexprimée durant la différenciation musculaire terminale. D'ailleurs, la surexpression de la cycline D3 dans les myoblastes en prolifération provoque une activation précoce du programme de différenciation terminale, notamment en augmentant l'expression des MRFs (Gurung & Parnaik, 2012). Ces données apportent un nouvel argument supportant le fait que G9a inhibe la différenciation en régulant négativement les gènes de différenciation. En effet, mes résultats montrent que dans les cellules en prolifération, la cycline D3 est surexprimée par le siARN de G9a. Donc, à part la cycline D3, seule la cycline D1 semble être influencée par une modification de l'expression de G9a. Or, il a été montré que la surexpression seule de la cycline D1, et non des d'autres cyclines telles que A2, B1, B2, C ou E, suffit à inhiber la différenciation terminale en inhibant notamment l'activation des gènes spécifiques du muscle (Rao et al, 1994). Ainsi, en régulant positivement la cycline D1, G9a favoriserait la prolifération cellulaire et inhiberait la différenciation musculaire terminale. Dans les myoblastes en prolifération, mes résultats montrent que G9a ne régule pas la transcription de la cycline D1 (données non montrées pour le siARN G9a). G9a augmenterait donc le niveau protéique de la cycline D1. Une des premières hypothèses est que G9a stabiliserait directement la cycline D1 en formant un complexe avec cette dernière ou en la régulant par méthylation. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé plusieurs expériences de co-immunoprécipitation. Cependant, je n'ai jamais pu mettre en évidence une quelconque interaction entre les deux protéines (données non montrées). Malgré cela, il serait intéressant de réaliser des tests de méthylation *in vitro* afin de vérifier si G9a peut, ou non, méthyler la cycline D1. Une autre façon de réguler la cycline D1 serait de réguler sa dégradation par le protéasome. En effet, durant la phase S, la cycline D1 se relocalise dans le cytoplasme où elle va pouvoir être dégradée par le protéasome. Or, d'après mes résultats, la surexpression de G9a stabilise la cycline D1 dans le noyau. G9a

pourrait donc être impliquée dans la stabilité de la cycline D1 en empêchant son transport vers le cytoplasme et/ou sa dégradation par le protéasome. Pour tester cette hypothèse, je compte tester prochainement si j'observe toujours une diminution de la cycline D1 avec le siARN G9a en présence de MG132, un inhibiteur du protéasome.

L'analyse du transcriptome de myoblastes transfectés avec le siARN de G9a semble montrer que G9a régulerait négativement la voie d'ubiquitine ligase notamment impliquée dans la dégradation des protéines par le protéasome. Si l'on analyse en détail les gènes qui sont dérégulés par le siARN G9a, on peut voir que le gène *Dyrk1B* est régulé positivement par le siRNA G9a. Une des voies impliquant la dégradation de la cycline D1 par le protéasome implique sa phosphorylation au niveau de la thréonine 286 (Diehl et al, 1997). Or, il se trouve que la protéine Dyrk1B est capable de phosphoryler la cycline D1 sur cette thréonine. Ainsi, une diminution du niveau Dyrk1B par siARN provoque la surexpression protéique et non ARN de la cycline D1 (Zou et al, 2004). Ces données pourraient fournir une piste sur la régulation de la cycline D1 par G9a. J'ai pu montrer par CHIP que G9a fixe bien le promoteur de *Dyrk1B*, mais la RT-qPCR que j'ai réalisée ne met pas en évidence l'augmentation de son niveau ARN dans les cellules transfectées avec le siARN G9a. Cela est peut être dû, comme je l'ai expliqué dans la partie résultats, au fait que l'expression de l'ARN de G9a est diminuée plus fortement dans l'étude du transcriptome que dans les expériences de RT-qPCR. Je compte donc refaire cette expérience en utilisant les shRNA dont l'inhibition du niveau de G9a est aussi efficace que la double transfection avec les siARN. Enfin G9a pourrait également être impliqué dans la régulation positive de la cycline D1 en intervenant dans la régulation de sa traduction. Je discuterai de ce point dans la partie régulation de la cycline D1 et cancer de la discussion.

En conclusion, mes résultats, comme ceux déjà publiés pendant ma thèse par d'autres équipes, montrent que G9a régule négativement la différenciation musculaire terminale en inhibant,

entre autres, les gènes spécifiques de la différenciation terminale. Cependant, j'ai aussi pu montrer que G9a favorise la prolifération, notamment en stabilisant la protéine cycline D1. Cela pourrait fournir une nouvelle explication au rôle répresseur de G9a sur la différenciation terminale. Par ailleurs, j'aimerais tester l'hypothèse suivante : G9a stabilise-t-il la cycline D1 en empêchant sa dégradation par le protéasome? Cela implique-t-il la régulation négative (par exemple via la diméthylation de H3K9) de Dyrk1B responsable de la phosphorylation de la cycline D1 sur la thréonine 286 qui permet sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome?

2. GLP défavorise la prolifération et favorise la différenciation musculaire terminale

A l'inverse de G9a, mes résultats montrent que GLP régule positivement la différenciation dans les myoblastes en prolifération. En effet, on peut voir que MCK est déjà exprimée dans les myoblastes en prolifération surexprimant GLP. Le siARN GLP provoque l'effet inverse et inhibe la différenciation. Les marqueurs de différenciation, tels que MCK et la myogénine sont, en effet, inhibés transcriptionnellement par le siARN GLP. L'étude du transcriptome des myoblastes transfectés avec le siARN GLP a notamment révélé un certain nombre de gènes impliqués dans la physiologie et la différenciation musculaire. Par exemple, on retrouve *MEF2a* et *MEF2c* qui sont régulés négativement par le siARN GLP. La question est maintenant de comprendre par quel mécanisme GLP peut réguler positivement la différenciation musculaire. Deux principales pistes sont mises en évidence dans mon étude : la première impliquerait le rôle inhibiteur de GLP sur la prolifération, qui favoriserait ainsi l'entrée en différenciation. En effet, GLP régule négativement la cycline D1 et également, comme le montre l'étude du transcriptome, un certain nombre de gènes impliqués dans la

régulation positive du cycle cellulaire. La seconde piste est la voie ubiquitine-protéasome qui est fortement ressortie des analyses du transcriptome en absence de GLP et dont le rôle a été mis en évidence dans les maladies musculaires (Altun et al, 2010; Gazzero et al, 2010; Winder et al, 2011). Je développerai plus en détail ce rôle du protéasome dans le muscle dans le chapitre « Discussion ».

L'analyse de transcriptome semble montrer que GLP pourrait réguler négativement la voie d'ubiquitination et du protéasome. On observe notamment un très grand nombre de gènes codants des sous-unités du protéasome 26S dérégulés par le siARN GLP. GLP pourrait donc réguler directement, *via* la di-méthylation de H3K9, l'expression des gènes impliqués dans le protéasome. Mes analyses de ChIP montrent bien que GLP (et G9a) est présent au niveau des promoteurs d'un certain nombre de gènes codants pour les sous-unités du protéasome. Je voudrais maintenant, à l'aide du shRNA de GLP et de sa surexpression, vérifier par RT-qPCR que le niveau ARN de ces gènes est bien régulé par GLP. Afin de savoir si cette régulation se fait directement *via* la diméthylation de H3K9, je vais réaliser des expériences de ChIP anti-H3K9me2 dans myoblastes transfectés avec les shRNA GLP ou, au contraire, surexprimant GLP.

En conclusion, l'étude que j'ai menée sur le rôle de G9a et GLP durant la différenciation musculaire squelettique terminale a mis en évidence un rôle antagoniste de ces deux protéines sur la prolifération et la différenciation des myoblastes, qui pourrait passer par une régulation différente de l'activité du protéasome.

Partie 2 : Etude du rôle de SETDB1 dans la différenciation musculaire squelettique terminale.

I. Introduction

Durant ma thèse, je me suis également intéressée au rôle de la protéine SETDB1, une autre méthyltransférase de H3K9, durant la différenciation musculaire squelettique. Avant mon arrivée, mon laboratoire avait pu observer que SETDB1, jusqu'alors connue pour son rôle et sa localisation dans le noyau, était également présente dans le cytoplasme. J'ai donc dans un premier temps vérifié cette observation dans mon modèle d'étude de différenciation musculaire mais également dans d'autres types cellulaires. Je me suis ensuite intéressée aux effets d'une dérégulation de SETDB1 sur la différenciation musculaire terminale. Les résultats obtenus semblent montrer que SETDB1 favorise la différenciation. De plus, et de manière extrêmement intéressante, SETDB1 pourrait avoir un rôle potentiellement activateur sur la transcription des gènes spécifiques de la différenciation.

II. Résultats

1. Profil d'expression de SETDB1 durant la différenciation musculaire terminale.

Avant mon arrivée, le laboratoire avait généré des lignées stables de myoblastes C2C12 surexprimant la protéine SETDB1. En faisant des expériences d'immunofluorescence sur ces cellules, le laboratoire a pu constater que SETDB1, dont on connaissait seulement la localisation nucléaire, était aussi localisée dans le cytoplasme. Cette observation a ensuite été faite dans des cellules HeLa. Afin de vérifier que le signal observé par immunofluorescence

était bien spécifique de SETDB1, j'ai vérifié si en changeant le niveau d'expression de la protéine, il était possible de changer également l'intensité de fluorescence observée pour SETDB1. Pour cela, j'ai utilisé, d'une part, la lignée qui surexprime SETDB1 et, d'autre part, des myoblastes transfectés avec un siARN ciblant SETDB1 (Figure 27A), où il est possible de constater que l'intensité de fluorescence obtenue avec l'anticorps anti-SETDB1 change avec le niveau d'expression de SETDB1 comme attendu. Le signal serait donc spécifique à la protéine SETDB1. Et comme nous pouvons le voir dans cette première figure, SETDB1 présente, en effet, une localisation nucléaire et cytoplasmique dans les C2C12 en prolifération. J'ai vérifié si cette localisation cytoplasmique était maintenue ou non dans les myotubes. Sur la Figure 27 B-C on peut voir que SETDB1 est présente aussi bien dans le noyau des myoblastes que dans le cytoplasme. En effet, dans le cytoplasme SETDB1 est présente partout où il y a de la tubuline. J'ai également observé cette localisation nucléaire et cytoplasmique dans des cellules musculaires primaires. Cependant, dans les cellules musculaires primaires on constate que le signal pour SETDB1 est plus fort dans le noyau que dans le cytoplasme. En utilisant un autre protocole d'immunofluorescence qui permet d'amplifier beaucoup plus fortement le signal, on peut en effet constater que le profil de SETDB1 est différent entre les C2C12 et les myoblastes primaires (Figure28). Dans les myoblastes primaires, le signal pour SETDB1 est plus fort dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans les myoblastes C2C12, qui sont plus gros et qui ont un cytoplasme plus conséquent, on observe que SETDB1 a surtout une localisation peri-nucléaire.

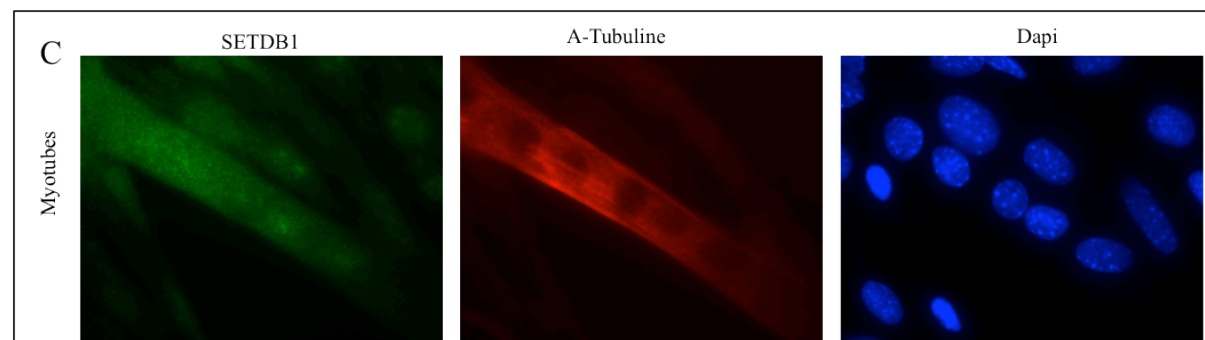
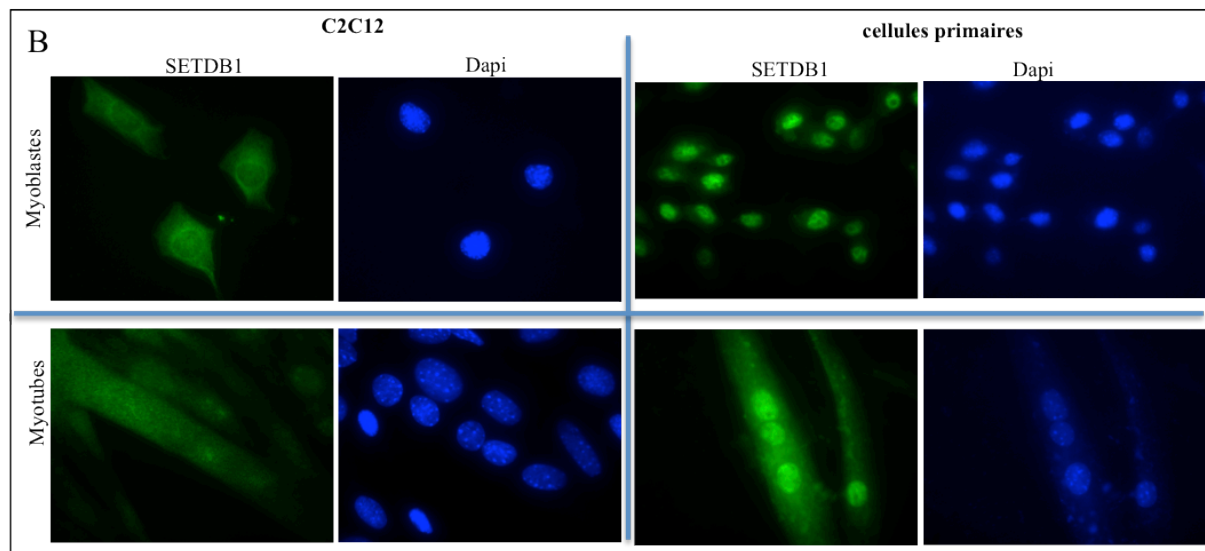
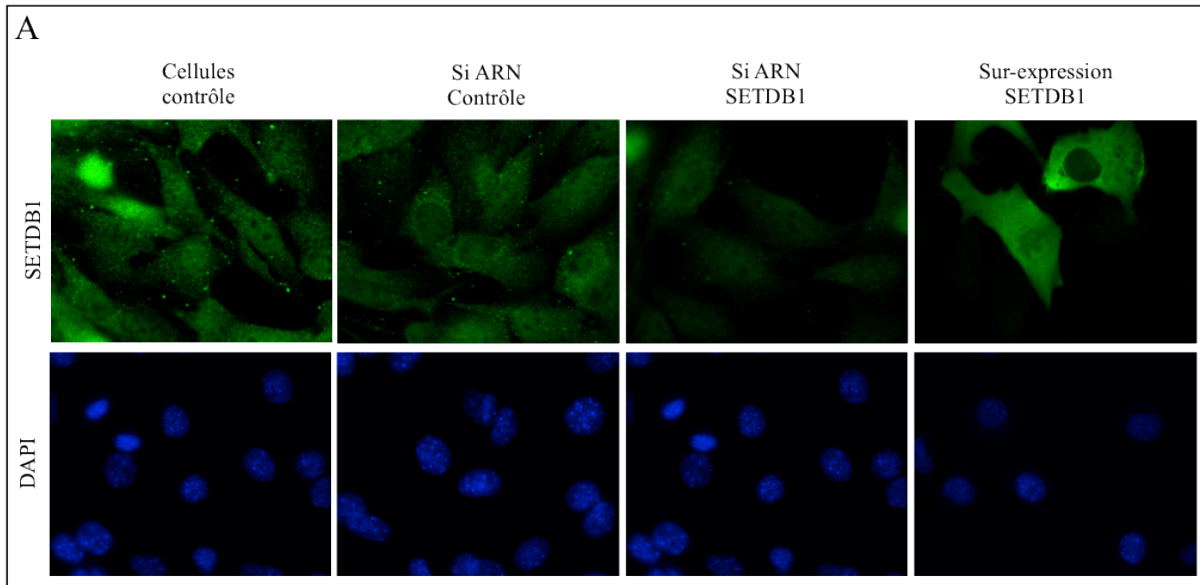


Figure 27 : Expression de SETDB1 observée par immunofluorescence dans les myoblastes et myotubes.

A) Immunofluorescence révélant SETDB1 et les noyaux (DAPI) dans des myoblastes murins C2C12 soit contrôle, soit transfectés avec un siARN contrôle ou un siARN ciblant SETDB1, soit dans des C2C12 surexprimant la protéine SETDB1. **B)** Immunofluorescence révélant SETDB1 dans des myoblastes C2C12 et des cellules satellites primaires en prolifération (myoblastes) ou après 96h de différenciation (myotubes). **C)** Immunofluorescence révélant SETDB1, la tubuline et les noyaux (DAPI) dans des myotubes issus de myoblastes C2C12 après 96h de différenciation.

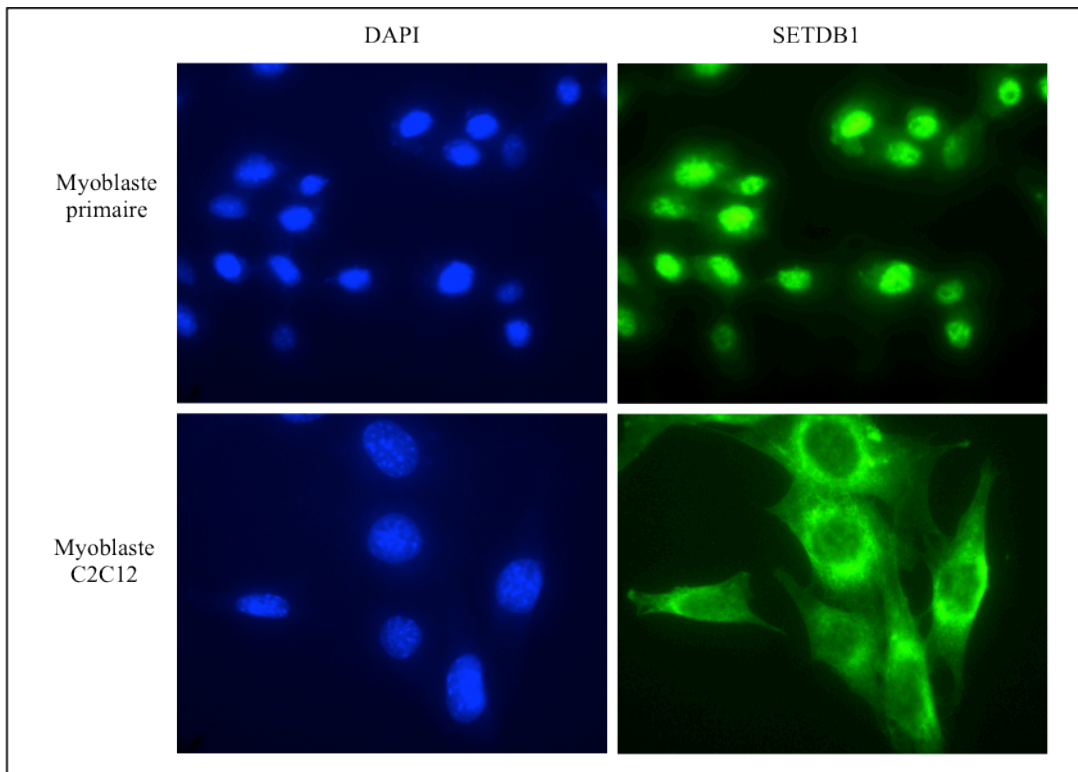


Figure 28 : Expression de SETDB1 dans des myoblastes murins C2C12 *versus* des myoblastes murins primaires.

Immunofluorescence révélant SETDB1 et les noyaux (DAPI) dans des myoblastes C2C12 et des myoblastes primaires en prolifération.

J'ai ensuite étudié par western blot quel était le profil d'expression protéique de SETDB1 au cours de la différenciation. Tout comme G9a et GLP, SETDB1 présente un pic d'expression protéique au tout début de la différenciation (Figure 29). Chose très intéressante, on peut voir que dès 24h de différenciation, une forme un peu plus légère de SETDB1 apparaît (indiquée par la croix rouge sur la Figure 29A). Cette bande, qui est en fait un doublet, est déjà, mais très faiblement, présente en prolifération. On peut effectivement voir le doublet sur la Figure 29B lorsque l'on augmente le temps d'exposition de la membrane du western blot. Dans cette figure, on voit que le doublet disparaît avec les siARNs SETDB1. Ceci laisse penser que ce sont bien des bandes spécifiques de la protéine SETDB1. On peut par exemple supposer que ce sont des isoformes ou encore des formes modifiées post-traductionnellement de SETDB1. Par ailleurs, ce doublet semble sensible à la présence de sérum. La figure 29C montre que le doublet disparaît quant on remet du sérum sur les cellules après 96h de différenciation. Enfin, lorsque l'on sépare

la fraction cytoplasmique et nucléaire, on s'aperçoit que le doublet est principalement présent dans le cytoplasme. Ceci est également le cas dans les cellules ES de souris où l'on peut constater que le doublet est majoritairement présent dans le cytoplasme, et dont l'intensité augmente dans les cellules ES différenciées par ajout d'acide rétinoïque.

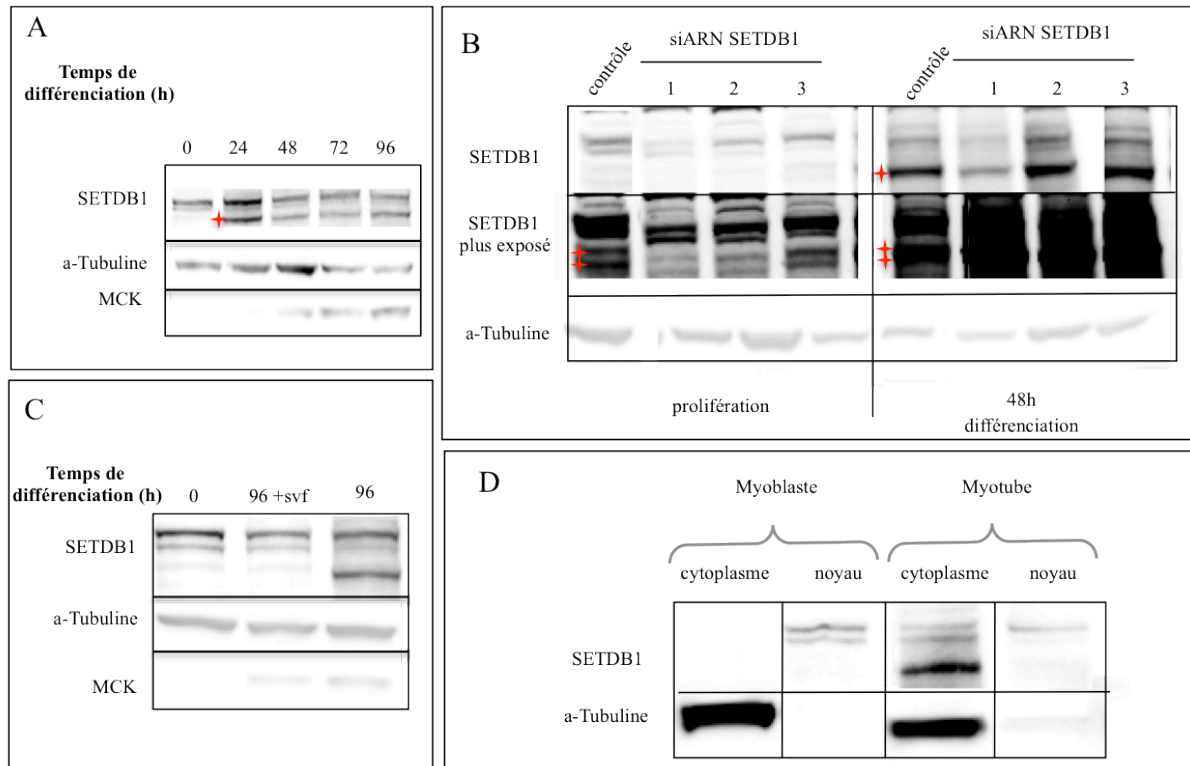


Figure 29 : Profil d'expression de SETDB1 dans les myoblastes murins C2C12.

L'expression protéique de SETDB1 a été mesurée dans des myoblastes C2C12 et des cellules ES de souris. **A)** Niveau d'expression protéique de SETDB1 durant la différenciation. MCK (Muscle Creatine Kinase) sert de marqueur tardif de différenciation terminale et l' α -tubuline sert de contrôle de dépôt. L'étoile rouge marque l'apparition d'une nouvelle bande ou doublet spécifique de SETDB1. **B)** Des myoblastes C2C12 ont été transfectés soit avec un vecteur vide (contrôle) soit avec un des trois siARN différents notés 1, 2 et 3, ciblant SETDB1. Les protéines ont été extraites des cellules collectées à 48h post-transfection (prolifération) ou après 48h de différenciation. **C)** Niveau d'expression protéique de SETDB1 dans des myoblastes C2C12 en prolifération (0h), en différenciation (96h) ou après 96h de différenciation les cellules sont remises dans un milieu contenant du sérum (96h + SVF). **D)** Niveau d'expression protéique de SETDB1 dans le noyau et dans le cytoplasme dans des myoblastes en prolifération et dans des myotubes après 72h de différenciation. L' α -tubuline sert de contrôle de dépôt dans le cytoplasme. **E)** Niveau d'expression protéique de SETDB1 dans le noyau et dans le cytoplasme de cellules ES de souris traitées (+) ou non (-) à l'acide rétinoïque.

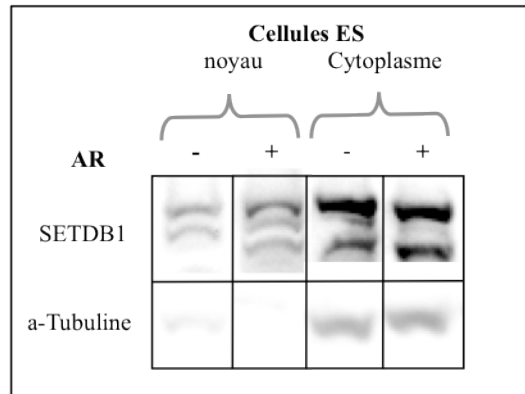


Figure 30 : Profil d'expression de SETDB1 dans les cellules souches embryonnaires de souris.

Niveau d'expression protéique de SETDB1 dans le noyau et dans le cytoplasme de cellules ES de souris traitées (+) ou non (-) à l'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque permet la différenciation neuronale des cellules ES.

2. SETDB1 interagit différemment avec les HDACs selon que les cellules sont en prolifération ou en différenciation

SETDB1 est capable d'interagir avec une grande variété de protéines, notamment avec certaines HDACs, dont les rôles au cours de la différenciation musculaire ont été très étudiés. Par exemple, dans les myoblastes en prolifération, HDAC5 interagit avec MEF2 et réprime son activité. En différenciation, MEF2 est libéré de HDAC5 qui se relocalise dans le cytoplasme (McKinsey et al, 2000). D'après ces différentes observations, j'ai voulu savoir si SETDB1 pouvait également interagir avec des HDACs dans le cytoplasme. Les résultats présentés dans la Figure 31 montrent que SETDB1 est capable d'interagir avec HDAC3 dans le noyau des cellules en prolifération tandis qu'en différenciation, SETDB1 interagit avec HDAC3 dans le cytoplasme. En effet il a été montré que bien qu'étant une HDAC de classe I, HDAC3 est présente dans le cytoplasme. Par ailleurs, on peut voir une interaction entre SETDB1 et HDAC5 dans le cytoplasme des cellules en différenciation. J'ai également testé l'interaction de SETDB1 avec ces HDACs dans le cytoplasme des cellules en prolifération et dans le noyau des cellules en différenciation, cependant je n'ai observé aucune interaction. Ainsi, en fonction du compartiment cellulaire et de l'état de la cellule, SETDB1 interagit

différemment avec les HDACs.

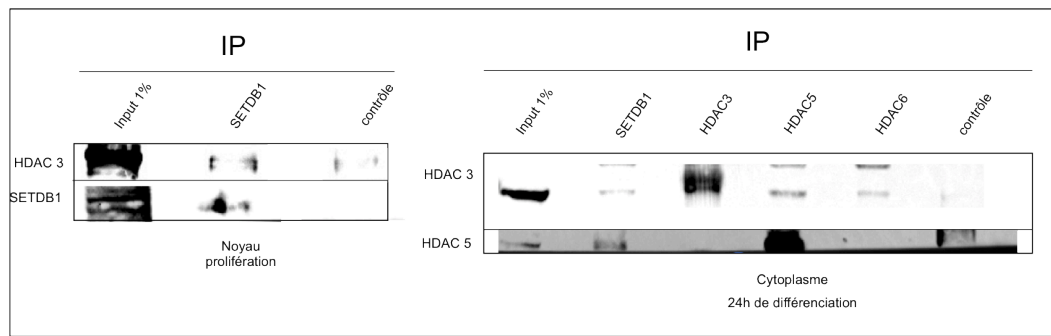


Figure 31 : Interaction de SETDB1 avec les HDACs dans le cytoplasme ou le noyau de myoblastes C2C12. J'ai immunoprécipité SETDB1 et HDAC 3, 5 ou 6 et vérifié par western blot leur interaction réciproque dans le noyau de myoblastes C2C12 en prolifération (à gauche) ou le cytoplasme de myoblastes C2C12 en différenciation (à droite).

3. Une dérégulation de SETDB1 perturbe l'équilibre entre la prolifération et la différenciation musculaire terminale

J'ai étudié l'effet d'une perte de fonction de SETDB1 sur la différenciation musculaire terminale. Pour cela, j'ai inhibé SETDB1 à l'aide de siARNs. Les résultats présentés sur la figure 32 montrent que lorsque l'on diminue l'expression de SETDB1, on inhibe les marqueurs de différenciation, aussi bien précoces que tardifs. En effet, l'expression ARN et, par conséquent, protéique de MCK (marqueur tardif) est inhibée par le siARN SETDB1, de même que l'expression de la myogénine (marqueur précoce). SETDB1 semble donc nécessaire à la différenciation musculaire terminale.

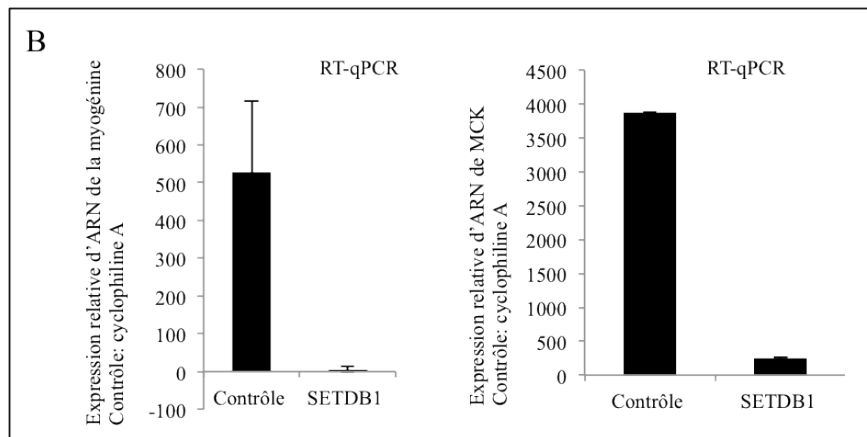
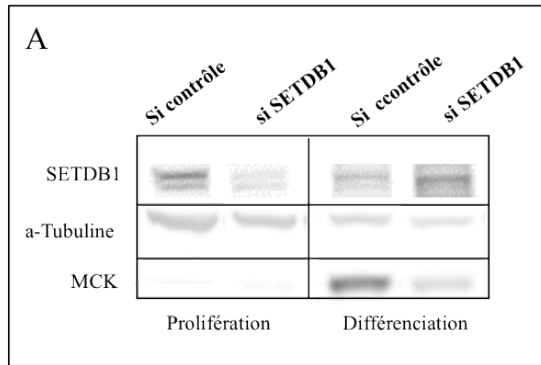


Figure 32 : La différenciation musculaire terminale est inhibée par une perte de fonction de SETDB1.

Des myoblastes murins de C2C12 ont été transfectés avec un siARN contrôle ou un siARN ciblant SETDB1. **A)** Analyse par western blot d'extraits protéiques de cellules collectées 48h post-transfection (prolifération) ou après 48h de différenciation. MCK : marqueur de différenciation. **B)** Niveaux d'expression ARNm à 48h de différenciation, de la myogénine (panneau de gauche) et de MCK (panneau de droite) mesurés par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, fait à partir des ARNs extraits des cellules transfectées ou non avec le siARN contre SETDB1.

J'ai ensuite étudié l'effet d'un gain de fonction de SETDB1 sur la différenciation. Pour cela j'ai utilisé une lignée C2C12, déjà établie par mon laboratoire, qui surexprime de manière stable SETDB1. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 33. Lorsque l'on compare le niveau d'expression de la myogénine dans les myoblastes contrôles et dans ceux surexprimant SETDB1, il semble que le début de la différenciation (entre 24 et 48 heures) est retardé par la surexpression de SETDB1 (Figure 33A). Ce retard est également observé dans la figure 33B, où l'on peut voir que le niveau de MCK augmente plus doucement dans les cellules surexprimant SETDB1. L'expression ARN de MCK est également retardée comme on peut le voir sur la Figure 33C. Cependant, en analysant la Figure 33A on peut constater

qu'à 72h de différenciation, le retard de la surexpression est rattrapé, voir même inversé. En effet, la protéine MHC (Myosine heavy chain) qui commence à être exprimée faiblement dans le contrôle, est déjà très intense dans la surexpression. De même, la protéine myogénine semble légèrement plus exprimée dans la surexpression à 72h de différenciation (Figure 33A). Cette augmentation de la protéine myogénine semble être due à un effet transcriptionnel (Figure 33C). Ainsi, avec la surexpression de SETDB1, le processus de différenciation semble démarrer avec retard. Ce retard par rapport au contrôle est ensuite rattrapé et même dépassé. L'expression de la cycline D1, qui est un marqueur de la prolifération cellulaire, peut apporter une explication à ce phénomène. En effet, dans la figure 33B on peut constater que dans la surexpression comparée au contrôle, la protéine cycline D1 est plus fortement exprimée en prolifération. Son niveau d'expression reste plus élevé jusqu'à 48h de différenciation puis à 72h atteint le même niveau que dans le contrôle. Or, il a été montré que la surexpression ectopique de la cycline D1 empêche la différenciation musculaire (Rao et al, 1994). Ainsi, puisque le niveau ARN de la cycline D1 ne varie pas (voir même diminue) (Figure 33C), la surexpression de SETDB1 favoriserait la stabilisation protéique de la cycline D1 en prolifération ce qui retarderait alors l'entrée en différenciation terminale. Une fois le niveau de cycline D1 revenu au même niveau que dans le contrôle, la différenciation semble alors accélérée par la surexpression de SETDB1. Cependant, dans la Figure 33A le niveau de la cycline D1 ne semble pas affecté par la surexpression de SETDB1 ni par le mutant. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que dans l'expérience présentée sur la Figure 33A, j'ai mis les cellules en conditions de différenciation à un stade où celles-ci étaient bien trop confluentes, notamment par rapport à la confluence des cellules utilisées pour l'expérience présentée sur la Figure 33B. Ainsi, sur la Figure 33A, la forte confluence des cellules, empêchant donc celles-ci de se multiplier encore plus, ne permet pas de mettre en évidence des effets sur la prolifération.

En parallèle de ces expériences de surexpression de SETDB1, j'ai également vérifié si les effets observés avec la surexpression de SETDB1 sur la différenciation et la prolifération nécessitaient son activité méthyltransférase. Pour cela, j'ai utilisé une lignée de myoblastes C2C12 qui surexprime la protéine SETDB1 mutée ponctuellement de façon à ne plus avoir d'activité méthyltransférase. Comme on peut le voir sur la Figure 33, les résultats sont les mêmes que pour le siARN SETDB1, c'est à dire que l'expression de SETDB1 mutant inhibe la différenciation musculaire. On a en effet une perte ou une forte diminution de l'expression des différents marqueurs de différenciation. Par ailleurs, le niveau de la cycline D1 n'est pas modifié par rapport au contrôle. Ces résultats laissent penser que l'activité méthyltransférase de SETDB1 est, d'une part, impliquée dans la stabilisation protéique de la cycline D1 en prolifération et, d'autre part, impliquée dans la régulation positive de la différenciation musculaire.

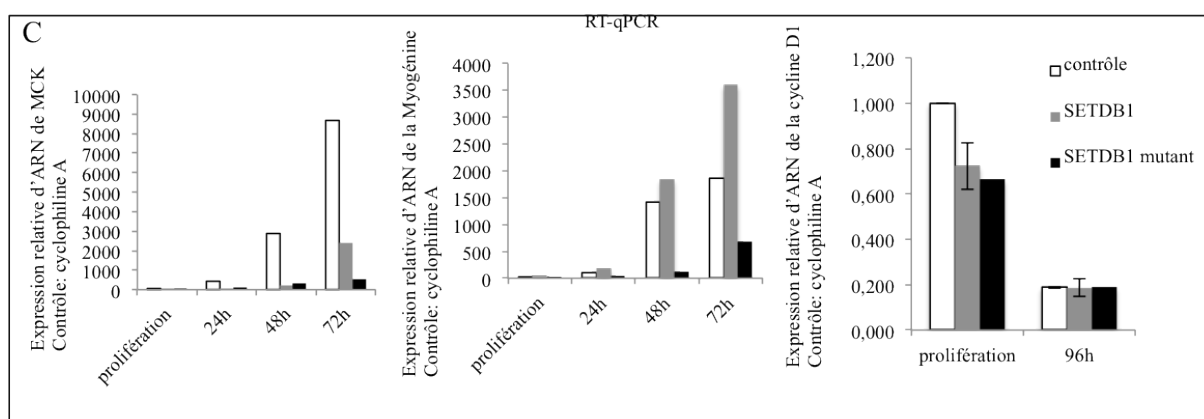
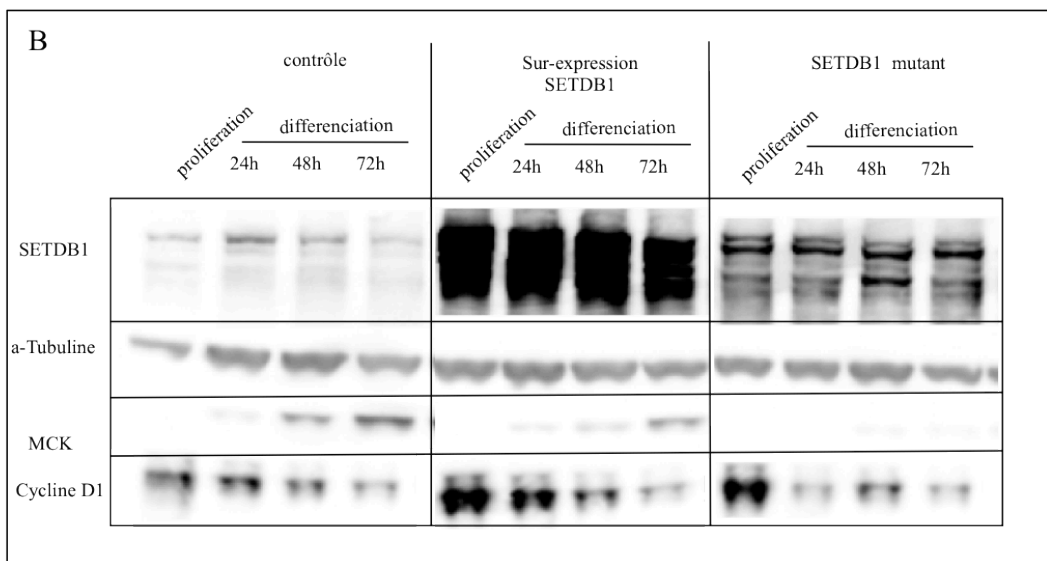
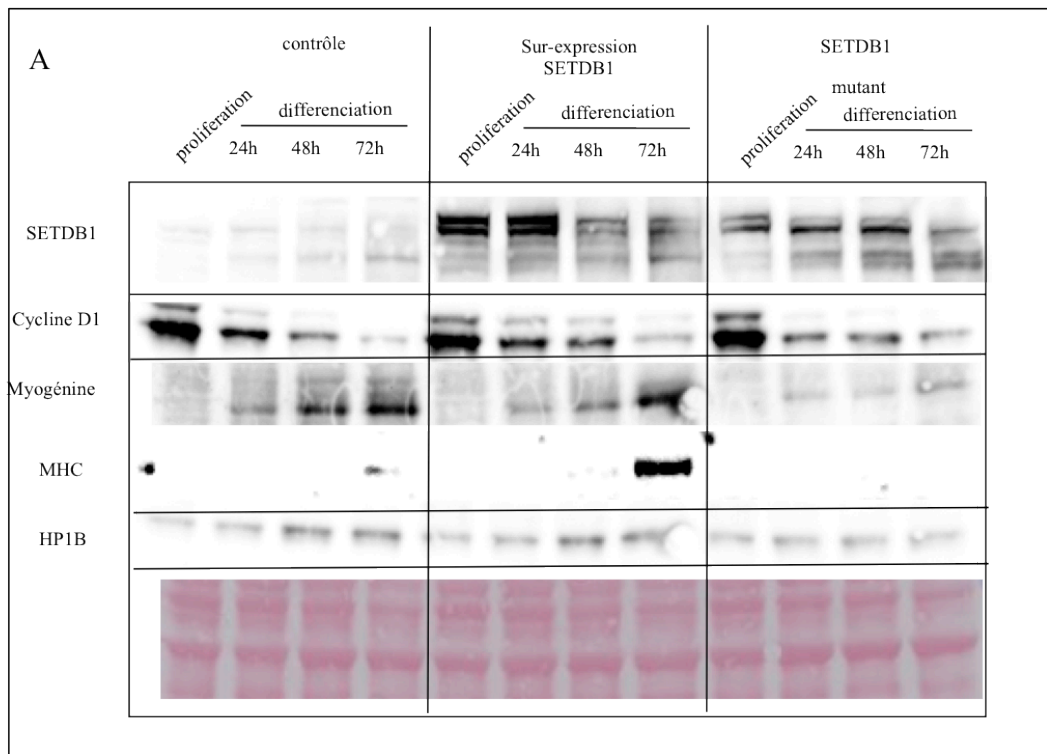


Figure 33 : La différenciation terminale est affecté par une dérégulation de SETDB1.

Des myoblastes C2C12 murins portant soit un vecteur vide (contrôle) soit surexprimant la protéine SETDB1 sauvage soit surexprimant la protéine SETDB1 mutée pour ne plus avoir d'activité catalytique méthyltransférase, ont été analysés en prolifération (0h) et à différents temps de différenciation **A)** et **B)** Analyses par western blot montrant l'expression de la cycline D1 qui sert de marqueur de prolifération, et de la myogénine, MCK et MHC qui servent de marqueurs de différenciation respectivement : précoce, tardif et très tardif. L' α -tubuline sert de contrôle de dépôt de même que la protéine HP1B et le rouge ponceau. **C)** Niveau d'expression ARNm de MCK (panneau de gauche), de la myogénine (panneau du milieu) et de la cycline D1 (panneau de droite) mesuré par RT-qPCR et normalisés contre l'ARNm Cyclophiline A, fait à partir des ARNs extraits des cellules surexprimant SETDB1 sauvage ou muté. Je n'ai pas pu mettre de barre d'erreur pour les niveaux de myogénine et de MCK qui étaient trop variables entre les différentes expériences faites (5 expériences). Une expérience représentative est montrée.

4. SETDB1 interagit avec des régulateurs positifs de la différenciation

musculaire

Afin de mieux comprendre comment SETDB1 pouvait réguler les gènes spécifiques de la différenciation musculaire terminale, j'ai cherché à savoir quel était son rapport avec le régulateur de la différenciation musculaire MyoD. Pour cela, j'ai tout d'abord vérifié si SETDB1 et MyoD étaient capables d'interagir ensemble. En effet, de précédentes études ont montré que Suv39h1 et G9a régulaient négativement les gènes de la différenciation musculaire en prolifération *via* leurs interactions avec MyoD (Mal & Harter, 2003) (Ling et al, 2012a). Les résultats présentés sur la Figure 34A montrent, en effet, que G9a et Suv39h1 interagissent avec MyoD dans les myoblastes en prolifération, tout comme GLP et SETDB1. Par ailleurs, on peut noter que MyoD interagit aussi bien avec le SETDB1 sauvage qu'avec le mutant catalytique de SETDB1 (Figure 34B). Pour que la différenciation terminale ait lieu, il faut que MyoD puisse activer ses gènes cibles. Ainsi, j'ai vérifié si les KMTs pouvaient encore interagir avec MyoD en différenciation. Sur la Figure 34A on ne voit plus d'interaction entre MyoD et les deux KMTs : G9a et GLP. Ce résultat est cohérent avec nos résultats précédents, puisque G9a inhibe MyoD qui a besoin d'être actif en différenciation. Par contre, on peut voir que Suv39h1, qui a un rôle similaire à celui de G9a, continue à interagir avec MyoD en différenciation. Il est cependant intéressant de faire remarquer que

dès les premières heures de différenciation, l'expression de Suv39h1 est fortement inhibée, et qu'à 24h de différenciation, il reste très peu de protéine Suv39h1. On peut alors supposer que le peu de Suv39h1 restant ne suffit plus à inhiber l'activité de MyoD. Par ailleurs, si on regarde la présence de G9a et de Suv39h1 au niveau du promoteur de la *myogénine*, qui est, entre autres, une cible de MyoD, on peut voir que les deux protéines sont comme attendu, présentes en prolifération et disparaissent peu à peu en différenciation (Figure 35). Maintenant si on s'intéresse à SETDB1, on constate qu'en différenciation, SETDB1 interagit encore avec MyoD et, comme le montre la Figure 34A, cette interaction semble encore plus forte qu'en prolifération. De plus, la présence de SETDB1 au niveau du promoteur de la *myogénine* augmente avec la différenciation (Figure 35). Ce résultat est fortement surprenant si l'on considère le rôle inhibiteur de SETDB1 *via* la méthylation de H3K9. Cependant, les résultats précédents semblent montrer que SETDB1 favorise la différenciation. Or, d'après les différentes études réalisées sur SETDB1, il semblerait que cette protéine peut avoir des activités enzymatiques différentes en fonction du complexe dans lequel elle fait partie. Par exemple, SETDB1 est capable d'interagir avec des HDAC, des DNA méthyltransférases ou encore, en présence de mAM SETDB1 qui est une mono- et diméthyltransférase, est alors capable de triméthyliser H3K9 (Wang et al, 2003). Ainsi, il est possible de supposer que SETDB1, en coopération avec d'autres protéines, pourrait aussi avoir un rôle positif sur la régulation de la transcription. Par exemple, on sait qu'en différenciation, l'interaction des HATs p300 et CBP avec MyoD favorise l'activation transcriptionnelle dépendante de MyoD *via* l'acétylation des histones mais également par acétylation de MyoD lui-même (Polesskaya et al, 2000; Puri et al, 1997a). Or, le résultat présenté Figure 34C montre que SETDB1 est capable d'interagir avec ces deux HATs dans les myoblastes en différenciation.

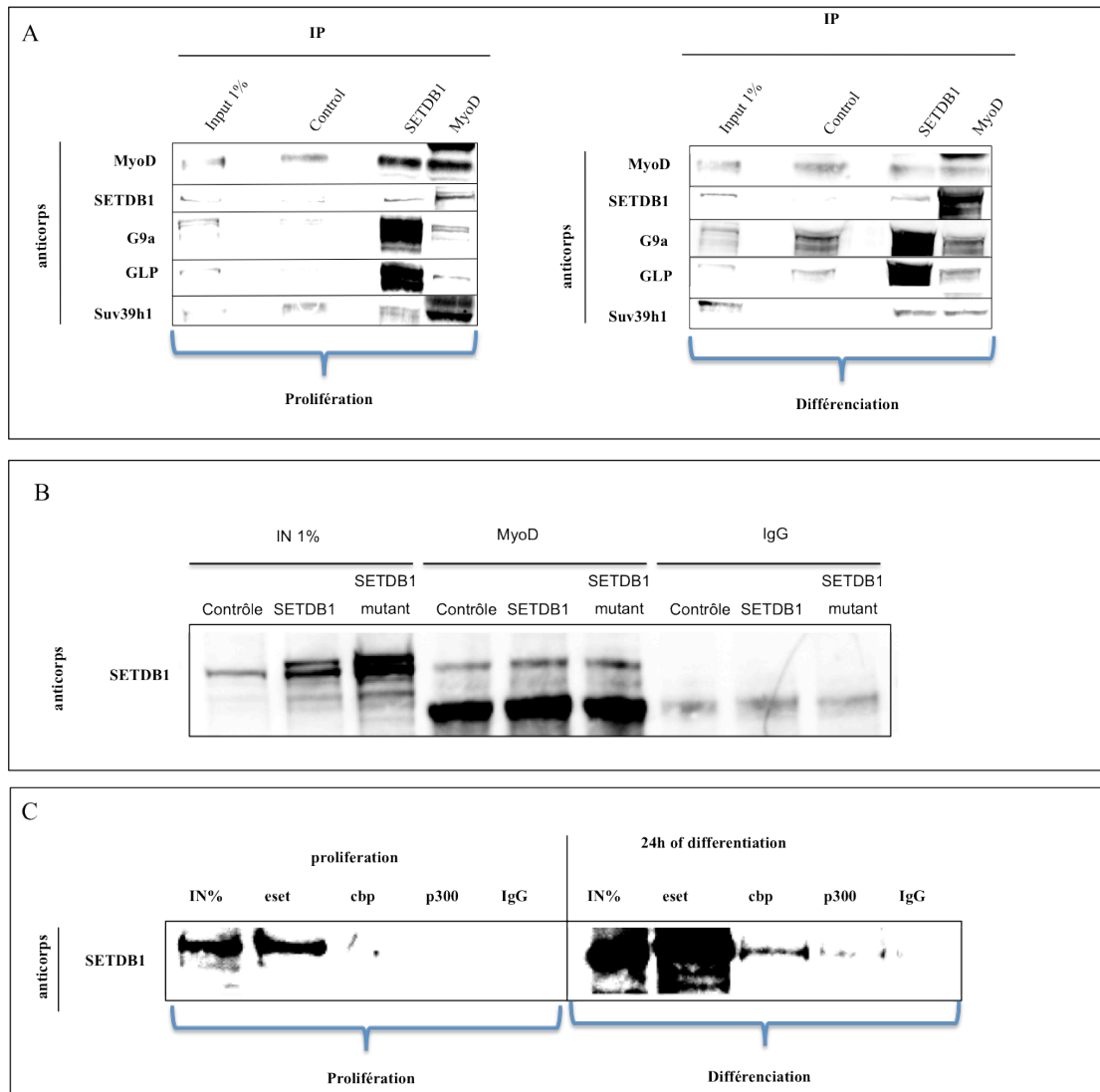


Figure 34 : Co-immunoprécipitation de SETDB1 avec MyoD et les acétyltransférases CBP et p300 dans le noyau de myoblastes C2C12 murin.

A) J'ai immunoprécipité SETDB1 et MyoD et vérifié par western blot leur interaction réciproque et avec les autres KMTs de H3K9 dans des C2C12 en prolifération (à gauche) ou après 24h de différenciation (à droite). **B)** J'ai immunoprécipité MyoD et vérifié par western blot, son interaction avec SETDB1 dans des C2C12 normale, surexprimant SETDB1 ou le mutant catalytique de SETDB1. **C)** J'ai immunoprécipité les acétylméthyltransférases CBP et p300 et vérifié leur interaction avec SETDB1 dans des C2C12 en prolifération (à gauche) ou après 24h de différenciation (à droite).

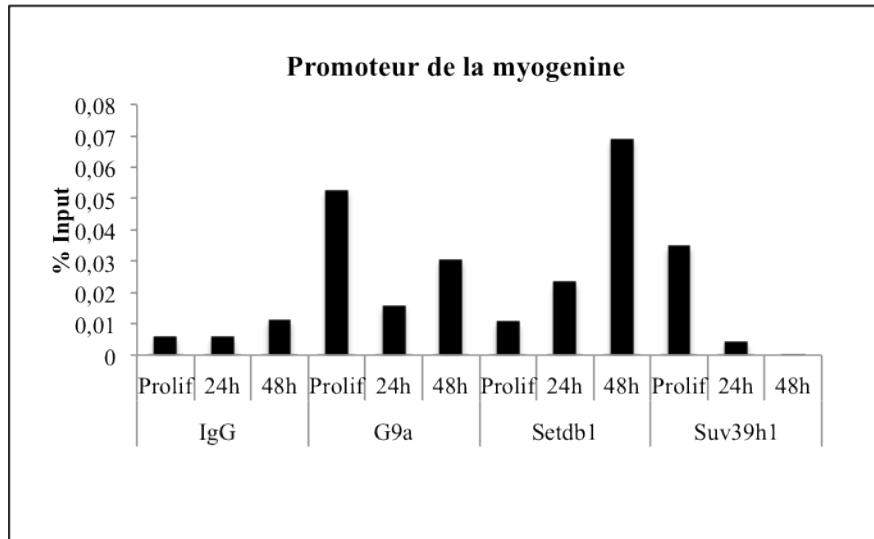


Figure 35 : Profils de ChIP pour les protéines G9a, Suv39h1 et SETDB1 au niveau du promoteur du gène myogénine.

Cette expérience de ChIP a été réalisée dans des myoblastes C2C12 en prolifération, à 24 ou 48h de différenciation.

III. Conclusions et perspectives à court terme

1. SETDB1 est présent dans le cytoplasme des cellules

La protéine SETDB1 a principalement été étudiée dans le noyau pour son rôle de méthyltransférase spécifique de H3K9. Mon laboratoire avait cependant remarqué, en faisant des expériences d'immunofluorescence sur des cellules surexprimant SETDB1 (HeLa et C2C12), que cette protéine était aussi présente dans le cytoplasme. Ce fait avait déjà été mentionné dans deux articles où il avait été remarqué que SETDB1 était présente dans le cytoplasme des neurones et des cellules HeLa (Loyola et al, 2009; Ryu et al, 2006). J'ai donc voulu, dans un premier temps, vérifier que c'était bien le cas de SETDB1 endogène dans mon modèle d'étude. C'est à dire le modèle de différenciation musculaire terminale. Mes résultats montrent que SETDB1 est effectivement présente aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme des myoblastes en prolifération et des myotubes différenciés. J'ai, par ailleurs, pu vérifier ce fait dans des C2C12, des myoblastes primaires, des cellules ES et des fibroblastes

primaires de souris. Mes expériences d'extraction nucléaire et cytoplasmique ont révélé l'apparition de nouvelles formes de SETDB1 (qui est en fait un doublet) spécifique du cytoplasme. Ces formes de SETDB1, qui sont très faiblement présentes dans les myoblastes en prolifération, sont fortement exprimées dès que l'on différencie les cellules. SETDB1 possède différents variants alternatifs (séquencés et annotés par l'institut Sanger). Le doublet de SETDB1 pourrait donc correspondre à l'expression de deux isoformes de SETDB1, différentes de celles présentes dans le noyau. Par ailleurs, les formes de SETDB1 qui augmente dans les cellules différenciées, diminuent de nouveau si l'on remet du sérum dans le milieu des ces cellules. Hypothétiquement, SETDB1 pourrait, en présence de sérum, subir une modification post-traductionnelle permettant, par exemple, sa dégradation dans le cytoplasme ou sa relocalisation dans le noyau. Une étude récemment publiée montre, en utilisant une surexpression de SETDB1 couplée à la GFP, que sa localisation dans le noyau requière sont export actif du cytoplasme (Cho et al, 2013). Cette étude montre également que c'est la région N-terminale de SETDB1 qui est nécessaire à son import nucléaire. Or, dans cette région, deux motifs d'export nucléaire ont été identifié. Ainsi, d'après cette étude, la rétention cytoplasmique de SETDB1 permettrait sa régulation en limitant son activité dans le noyau.

Après avoir clairement établi la localisation cytoplasmique de SETDB1, j'ai voulu savoir si sa présence dans ce compartiment pouvait avoir un rôle. Pour cela, je me suis intéressée aux HDACs. En effet, les HDACs sont, comme SETDB1, des enzymes qui participent à la régulation de la transcription des gènes en modifiant la structure de la chromatine. L'activité des HDACs durant la différenciation musculaire terminale a été bien décrite. Notamment, certaines HDACs, comme les HDAC 4, 5, 7 et 9, répriment la différenciation musculaire terminale en interagissant avec MEF2. Par exemple, dans les myoblastes en prolifération, HDAC5 est présente dans le noyau où elle se lie à MEF2 et réprime son activité

transactivatrice. En différenciation, HDAC5 est exportée dans le cytoplasme, libérant ainsi MEF2 qui peut alors exercer son rôle d'activateur transcriptionnel des gènes spécifiques de la différenciation notamment en recrutant des histones acétyltransférases. De plus, on sait que SETDB1 est présente dans des complexes contenant des HDACs, notamment HDAC1 et 2. Mes résultats montrent que SETDB1 interagit avec HDAC3 dans le noyau des myoblastes en prolifération et dans le cytoplasme en différenciation. De même, j'ai pu montrer que SETDB1 interagit avec HDAC5, mais seulement dans le cytoplasme des cellules en différenciation. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite donc d'être confirmée. Cependant, elle apporte, bien que de manière préliminaire, une possible piste quant au rôle de SETDB1 dans le cytoplasme. Par exemple, SETDB1 pourrait avoir le même rôle que HDAC5. C'est à dire qu'en prolifération, Une fraction de SETDB1 aurait un rôle répresseur dans le noyau et serait désactivée en différenciation par sa relocalisation cytoplasmique. Il serait, par exemple, intéressant de voir si SETDB1 interagit avec et régule MEF2. Ou encore, il serait possible que SETDB1 ait pour rôle, dans le cytoplasme, de séquestrer les HDACs durant la différenciation.

2. SETDB1 régule positivement la différenciation musculaire terminale, potentiellement via un nouveau rôle d'activateur de la transcription.

Mes résultats montrent que la dérégulation de SETDB1 perturbe la différenciation musculaire terminale. L'inhibition de SETDB1 réprime la différenciation musculaire terminale, et sa surexpression a deux effets qui peuvent sembler antagonistes. En effet, la surexpression de SETDB1 stabilise (tout comme G9a) la protéine cycline D1. Cela provoque un retard de l'entrée en différenciation. Cependant, cet effet est rapidement compensé par une surexpression de certains gènes spécifiques de la différenciation musculaire, tels que *MHC* et *myogénine*, qui sont respectivement deux marqueurs très tardif et très précoce de la

différenciation terminale. Ceci n'est cependant pas le cas de *MCK*. SETDB1 régulerait donc de manière sélective les gènes de la différenciation. Par ailleurs, mes résultats montrent que SETDB1 interagit avec MyoD durant la différenciation terminale. Notamment, il apparaît en cours de différenciation sur le promoteur de la *myogénine* qui est une cible transcriptionnelle majeure de MyoD. De plus, SETDB1 est également capable d'interagir avec des HATs, qui sont essentiellement des régulateurs positifs de la transcription. J'ai pu observer cette interaction seulement en différenciation, c'est à dire là où les HATs sont connues pour former un complexe actif avec MyoD afin de réguler positivement la transcription de gènes cibles de celui-ci, comme la *myogénine*. D'après ces différentes observations, il est possible d'envisager un rôle potentiel de SETDB1 dans l'activation de la transcription. Il serait donc intéressant maintenant de vérifier par CHIP si la surexpression de SETDB1, ou encore le siARN contre SETDB1, modifie les marques activatrices (en particulier l'acétylation) ou répressives sur les histones au niveau des promoteurs des gènes cibles de MyoD comme la *myogénine*. Ou encore, de vérifier si la fixation même de MyoD sur ces gènes cibles est changée par une dérégulation de SETDB1. De plus, mes résultats montrent que l'activité méthyltransférase de SETDB1 pourrait être impliquée dans ce mécanisme. En effet, la surexpression d'un mutant catalytique de SETDB1 présente le même phénotype que l'inhibition de SETDB1 par siARN, sans modifier pour autant son interaction avec MyoD. La méthylation par SETDB1 pourrait donc réguler positivement MyoD. Par exemple, SETDB1 pourrait méthyler directement MyoD et, à l'inverse de G9a, cela aurait un effet activateur sur MyoD. Ou encore, SETDB1 pourrait, en les méthylant, réguler la présence d'autres protéines en complexe avec MyoD. On pourrait, par exemple, imaginer que SETDB1 favorise l'association de MyoD avec les HATs. De nombreuses hypothèses restent donc à tester afin de comprendre comment SETDB1 pourrait agir positivement sur la transcription.

Discussion et perspectives à long terme

L'homéostasie tissulaire résulte d'un équilibre entre l'extinction et l'activation de gènes. Cet équilibre est perturbé dans de nombreuses maladies. Des défauts épigénétiques peuvent être la cause de telles perturbations, tels qu'une dérégulation de la méthylation des histones et notamment de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9). Ainsi, une dérégulation des KMTs de H3K9 a été associée, comme je l'ai décrit dans l'introduction de ma thèse, à une très grande variété de maladies, tels que des maladies de développement, neurologiques, métaboliques, à différents types de cancers et même à la latence du VIH. Cette grande diversité de maladies montre l'importance physiologique des KMTs de H3K9 et donc le grand intérêt que nous avons de comprendre et d'élucider leurs mécanismes d'action dans le but futur de mieux les cibler en thérapie.

I. G9a et GLP sont présentes sous forme de complexe mais peuvent avoir différentes fonctions.

Jusqu'à présent, les rôles de G9a et GLP ont souvent été associés. G9a et GLP (G9a-Like-Protein) sont, en effet, deux protéines présentant une très forte similarité de séquence et une structure très conservée au niveau de leurs domaines fonctionnels. Le domaine SET, qui est le domaine catalytique, est ainsi celui qui présente la plus forte homologie entre les deux protéines (Tachibana et al, 2005). Au niveau de ce domaine, G9a et GLP sont capables de s'homo ou hétérodimériser. De plus, il a été montré que c'est sous la forme hétérodimérique que G9a et GLP sont le plus stables et le plus représentées dans la cellule (Tachibana et al, 2005). Par ailleurs, il a été montré que bien que G9a et GLP soient indépendamment capables d'exercer une activité méthyltransférase *in vitro*, la formation de l'hétérodimère est indispensable à leur activité de mono-et diméthylation de H3K9 (Tachibana et al, 2008; Tachibana et al, 2005). Enfin, une étude cristallographique de G9a et GLP, a montré que,

d'après leur structure, les deux protéines devraient avoir les mêmes spécificités de substrat (Wu et al, 2010). L'ensemble de ces observations laissent penser que G9a et GLP ont les mêmes rôles dans les cellules et cela en coopérant sous la forme d'un complexe. Mes résultats ne remettent pas en doute l'existence du complexe. En effet, j'ai montré que G9a et GLP interagissent dans le modèle de différenciation musculaire terminale. J'ai aussi montré que les deux protéines sont toujours présentes au niveau des mêmes gènes qu'elles régulent pourtant différemment. Différentes études de ChIP-seq, notamment une qui a été réalisée dans les myoblastes C2C12 par mon laboratoire, confirment que G9a et GLP sont globalement retrouvées au niveau des mêmes cibles génomiques (Mozetta et Pontis en révision) (Pontis non publié) (Chen et al, 2012). Malgré ces différentes observations, l'étude que j'ai menée sur G9a et GLP montre, de manière totalement inattendue, que G9a et GLP auraient des rôles différents et même antagonistes dans les cellules en prolifération. Malgré le fait que le rôle antagoniste de G9a et GLP n'ait jamais été décrit auparavant, quelques observations vont néanmoins dans le sens de rôles différents entre G9a et GLP. Tout d'abord, dans l'étude qui a mis en évidence le rôle essentiel du complexe G9a/GLP, il a été montré que la dimérisation de G9a et GLP, ainsi que l'activité méthyltransférase de G9a, étaient nécessaires à la mono- et diméthylation de H3K9. Par contre, il a été montré que l'activité de GLP n'était pas requise dans ce cas là (Tachibana et al, 2008). D'autre part, on sait que G9a et GLP sont capables de méthyler des cibles autres que les histones. Par exemple, G9a et GLP sont capables de méthyler, toutes les deux, la protéine p53 (Huang et al, 2010). Une étude réalisée récemment a permis, en utilisant un analogue marqué de la SAM couplé à des analyses de spectrométrie de masse, d'identifier un certain nombre de cibles méthylées par G9a ou GLP (Islam et al, 2012). Les résultats de cette étude montrent que les deux protéines ont beaucoup plus de cibles indépendantes (46 pour GLP et 64 pour G9a) que de cibles communes (18 cibles). Ce qui suggère donc un rôle différent pour ces deux protéines. Enfin, on peut considérer la

séquence en acides aminés de G9a et GLP qui, bien qu'étant très similaire, n'est tout de même pas exactement identique. On peut alors imaginer que différentes modifications post-traductionnelles pourraient réguler différemment les deux protéines, notamment leurs activités. Ainsi, une étude des modifications post-traductionnelles de G9a et GLP devrait être réalisée afin de mettre en évidence des mécanismes de régulation différents pour les deux protéines. Au niveau transcriptionnel, l'étude transcriptomique utilisant les siARN G9a ou GLP montre que la majorité des gènes sont indépendamment régulés par G9a ou GLP. Au laboratoire, une autre étude de transcriptome a été faite dans des cellules ES de souris *KO* pour *G9a* ou *GLP* (Mozetta et Pontis en révision). Les résultats, similaires à ceux que j'ai obtenus dans les myoblastes, montrent qu'une majorité des gènes sont régulés de manière indépendante par G9a et GLP (62% des gènes sont régulés différemment par G9a et GLP). Ainsi, bien que présentes sous forme d'un complexe, G9a et GLP peuvent avoir des rôles indépendants.

II. Rôles de G9a, GLP, SETDB1 et Suv39h1 dans la différenciation musculaire

1. La dérégulation de G9a, GLP, SETDB1 ou Suv39h1 impacte la différenciation terminale

Avant mon arrivée, le laboratoire avait montré que les 4 KMTs de H3K9 : G9a, GLP, SETDB1 et Suv39h1 pouvaient être présentes au sein d'un même complexe protéique (Fritsch et al, 2010). Le but initial de mon projet de thèse était d'élucider le rôle fonctionnel de ce complexe composé des 4 KMTs dans l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire. Pour cela, j'ai utilisé le modèle de différenciation terminale de cellules du muscle

squelettique. Mes résultats ont montré que ces 4 KMTs de H3K9 sont bien capables d'interagir en prolifération et en différenciation. J'ai également pu montrer que les 4 KMTs étaient essentielles à la régulation correcte de la différenciation terminale (données non montrées pour Suv39h1, publiées par ailleurs : (Ait-Si-Ali et al, 2004). En effet, une dérégulation de chacune des 4 KMTs (par perte ou gain de fonction), avait un impact sur le déroulement de la différenciation terminale. Cependant, et de manière inattendue, mes résultats ont montré que les 4 KMTs pouvaient avoir des rôles différents dans le processus de différenciation, en plus des rôles coopératifs.

2. Selon le contexte cellulaire, Suv39h1 est nécessaire à l'inhibition des gènes de différenciation et de prolifération

Mes résultats avec Suv39h1, que je n'ai pas présentés dans ce manuscrit, montrent qu'une modification positive ou négative de son expression inhibe la différenciation musculaire terminale. Ces résultats corrélaient tout à fait avec les observations précédemment faites sur les rôles de Suv39h1 dans la différenciation musculaire terminale. En effet, comme expliqué plus haut, la différenciation des myoblastes en myotubes requiert deux événements indépendants : d'une part, il faut inhiber de manière irréversible les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, d'autre part, il faut pouvoir exprimer les gènes spécifiques de la différenciation musculaire. Or, il se trouve que Suv39h1 est impliquée dans ces deux événements. En effet, il a été montré par notre laboratoire que Suv39h1 participait, *via* la tri-méthylation de H3K9, à la répression irréversible des gènes cibles de E2F durant la différenciation (Ait-Si-Ali et al, 2004; Guasconi et al, 2010). Ainsi, l'inhibition de Suv39h1 empêche l'arrêt irréversible du cycle cellulaire et inhibe ainsi la différenciation terminale. Il a par ailleurs été montré qu'en prolifération, Suv39h1 interagit avec MEF2 et MyoD et inhibe leur activité transactivatrice (Jang et al, 2007; Mal, 2006). Pour MyoD il a été montré que cette répression passe par la

méthylation de H3K9 au niveau des promoteurs des ses gènes cibles. L'expression de Suv39h1 diminue très rapidement après les premières heures de différenciation, libérant ainsi MyoD qui peut alors activer la transcription de ses gènes cibles. J'ai pu montrer que Suv39h1 est encore capable d'interagir avec MyoD dans les cellules différenciées. Or, dans la lignée surexprimant Suv39h1 que j'ai utilisée, la protéine est encore fortement exprimée en différenciation. On peut donc supposer que dans ces circonstances, Suv39h1 continue de réprimer l'activité de MyoD. Ce qui explique pourquoi la différenciation terminale est inhibée.

3. G9a pourrait coopérer avec Suv39H1 pour inhiber la différenciation musculaire

De la même façon que Suv39h1, G9a inhibe l'activité de MyoD et de MEF2. En effet, il a été montré que G9a réprime la différenciation en interagissant avec MyoD et/ou MEF2 et inhibe leur gènes cibles *via* la diméthylation de H3K9 (Ling et al, 2012a; Ling et al, 2012b; Wang & Abate-Shen, 2012). Cette répression fait notamment intervenir la méthylation de MyoD et MEF2 par G9a. Si l'on considère, d'une part, que Suv39h1 est une triméthyltransférase qui nécessite un substrat déjà mono ou diméthylé et que, d'autre part, elle possède un chromodomaine capable de reconnaître et de fixer H3K9 méthylé, on peut alors imaginer le mécanisme suivant : G9a interagit avec MyoD ou MEF2, les méthyle afin que ces derniers soit reconnus et fixés par Suv39h1. De plus, G9a diméthyle H3K9 au niveau des cibles de MyoD et MEF2, cette di-méthylation servirait ainsi de substrat à la triméthylation par Suv39h1.

Comme je l'ai expliqué dans la discussion de la partie résultats, l'interaction de G9a avec deux autres facteurs de transcription, Msx1 et Sharp1, est également impliquée dans l'inhibition des gènes de la différenciation. Par ailleurs, il est intéressant de faire remarquer

que G9a interagit également avec d'autres facteurs de transcription (REST, CDP, Blimp-1...) impliqués dans des processus développementaux différents et permet notamment la méthylation de H3K9 sur leurs gènes cibles (Gyory et al, 2004; Nishio & Walsh, 2004; Roopra et al, 2004). Ainsi, de manière générale, G9a pourrait participer à la régulation négative des gènes impliqués dans le développement en interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques de tissu qui permettraient son recrutement au niveau des promoteurs des gènes à réprimer.

Enfin, de la même façon que cela a été montré pour Suv39h1 (Ait-Si-Ali et al, 2004), j'ai cherché à savoir si G9a pouvait aussi être impliqué dans l'inhibition irréversible des gènes de la prolifération. Je n'ai pas présenté ces résultats, cependant ils montrent que ni G9a ni GLP ne sont impliquées dans ce processus. Par contre, des résultats extrêmement préliminaires semblent montrer que SETDB1 pourrait être impliquée dans l'extinction des gènes de la prolifération.

4. SETDB1 a un rôle bivalent durant la différenciation musculaire terminale

Mes résultats montrent que l'entrée en différenciation est retardée par la surexpression de SETDB1. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que la surexpression de SETDB1, tout comme celle de G9a, stabilise la protéine cycline D1. Or, comme je l'ai expliqué dans la discussion des résultats obtenus avec G9a et GLP, la surexpression seule de la cycline D1 suffit à bloquer la différenciation. SETDB1 inhibe donc la différenciation des cellules en prolifération. A l'inverse, dans les cellules en différenciation, mes résultats montrent que SETDB1 favorise l'expression des gènes spécifiques de la différenciation. Bien que diverses expériences soient encore nécessaires afin de confirmer cette hypothèse, il semblerait que SETDB1 joue un rôle dans la régulation positive de MyoD. Notamment, SETDB1 pourrait

participer à la formation d'un complexe activateur permettant de réguler positivement l'activité de MyoD. Le rôle de SETDB1 dans un tel complexe reste cependant à définir (quelques pistes sont proposées dans la discussion des résultats sur l'étude de SETDB1).

En conclusion, SETDB1 aurait un rôle bivalent dans la régulation de la différenciation puisque, d'un côté, en favorisant l'expression de la cycline D1, il bloque la différenciation. Mais, d'un autre côté, en favorisant l'activité positive de MyoD, il favorise la différenciation. Cette conclusion est, bien sûr, hypothétique et nécessite de multiples expériences afin d'être confirmée. par exemple il serait intéressant de comparer les données de Chip-seq de MyoD déjà publié ((Cao et al, 2010) avec les Chip-seq de SETDB1 faite dans notre laboratoire (Pontis non publié), et corrélér l'ensemble de ces analyse à une étude du transcriptome de cellules traitées avec le siARN SETDB1.

5. Contrairement à G9a, GLP favorise la différenciation musculaire.

Les différentes expériences que j'ai réalisées pour étudier le rôle de GLP dans la différenciation musculaire montrent que GLP, contrairement à G9a, régule positivement la différenciation musculaire. La question est maintenant de comprendre par quel mécanisme GLP est impliquée dans cette régulation. L'étude transcriptomique que j'ai réalisée permet de fournir certaines pistes. En effet, l'analyse du transcriptome des cellules traitées avec le siARN GLP a mis en évidence un certain nombre de gènes dérégulés impliqués dans la voie de dégradation par le protéasome. En particulier, un très grand nombre de gènes codants pour des membres des sous-unités du protéasome 26S sont régulés positivement par le siARN GLP. Cela reste à confirmer, mais ces résultats semblent montrer que GLP a un effet répresseur, direct ou indirect, sur l'activité du protéasome. Ceci est particulièrement intéressant lorsque l'on s'intéresse au rôle du protéasome dans le muscle. Par exemple, le

protéasome joue un rôle important dans la régulation de MyoD. En effet, dans les myoblastes en prolifération, le niveau de MyoD est régulé au cours du cycle cellulaire : au cours de la phase G1, le niveau de MyoD augmente jusqu'à atteindre son plus haut niveau d'expression. Si les stimuli extérieurs sont favorables, alors les myoblastes sortent du cycle cellulaire pour s'engager dans le processus de différenciation terminale, sinon, MyoD est dégradé *via* le protéasome (pour revue voir (Kitzmann & Fernandez, 2001))(Song et al, 1998). Ces données pourraient expliquer les effets que j'ai pu observer lors de la surexpression de GLP dans les cellules en prolifération. En effet, j'ai pu constater que la surexpression de GLP permettait d'induire l'expression des gènes spécifiques des cellules en différenciation, cela même dans les cellules en prolifération. Ainsi, en supposant que GLP inhibe bien le protéasome, on peut alors imaginer que sa surexpression empêche la dégradation de MyoD en fin de phase G1 permettant une activation anormale et précoce de la différenciation. A l'inverse, il a été montré que le fait d'accélérer la dégradation de MyoD (par hypoxie par exemple) bloque l'expression des marqueurs précoces de différenciation, tels que p21, RB et la myogénine et inhibe la différenciation terminale (Di Carlo et al, 2004). La dérégulation du protéasome a particulièrement été étudiée dans le cas de l'atrophie musculaire. En effet, en conditions d'atrophie musculaire, le système d'ubiquitine protéasome a été impliqué dans la dégradation anormale de myofibrilles, qui sont notamment impliquées dans la contraction musculaire (Solomon & Goldberg, 1996), de même que la dégradation de la myogénine dans les cellules différenciées (Jogo et al, 2009). Enfin, le dysfonctionnement du protéasome a été mis en évidence dans plusieurs types de maladies liées au muscle comme, par exemple, la sarcopénie (Altun et al, 2010), et de plus en plus d'études montrent que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du protéasome pourrait servir de moyen thérapeutique. Par exemple, il a été montré que l'utilisation de MG132, un inhibiteur du protéasome, améliore le phénotype de souris modèle pour la dystrophie musculaire de Duchenne et prévient la dystrophie

musculaire chez le poisson zèbre (Gazzerro et al, 2010; Winder et al, 2011). Ainsi, étant donné le rôle de GLP dans la différenciation musculaire et la régulation du protéasome, il serait intéressant d'étudier la contribution de GLP dans ce type de maladies.

III. G9a et SETDB1 régulent positivement la cycline D1, à l'inverse de GLP.

1. Régulation post-transcriptionnelle de la cycline D1 et cancer

Mes résultats préliminaires montrent qu'avec la surexpression de SETDB1 et de G9a, la croissance des cellules est augmentée (données non montrées pour SETDB1). Ce phénomène peut, entre autre, être expliqué par une augmentation de la cycline D1. La cycline D1 régule la transition G1/S du cycle cellulaire et a été décrite comme un puissant pro-oncogène. En effet, il a été montré que la cycline D1 est fortement impliquée dans le développement et la progression de nombreux cancers. Par exemple, dans le cancer du sein, la cycline D1 est nécessaire à l'induction de tumeurs du sein par certains stimuli oncogéniques. En l'absence de cette cycline, les tumeurs ne peuvent se développer (pour revue (Musgrove et al, 2011)). La surexpression de la cycline D1 est, en effet, un phénomène communément observé dans les cancers. Cette surexpression peut être la conséquence d'une amplification génique mais aussi d'une surexpression de la protéine elle-même. La protéine cycline D1, et non l'ARN, est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers comme le cancer du foie, du poumon, du sein, du pancréas, du colon, de l'œsophage, dans des lymphomes, mélanomes, etc... (pour revue (Musgrove et al, 2011)). Il est fréquemment observé dans les cancers où la cycline D1 est surexprimée, que cette dérégulation découle d'un défaut de sa dégradation. En effet, la

cycline D1 est une protéine très instable avec une demi-vie très courte (environ 24 minutes). Elle est principalement dégradée par le protéasome 26S *via* la voie de poly-ubiquitination. Un dysfonctionnement de cette voie peut provoquer une accumulation anormale de cycline D1 et a été impliqué dans certains cancers (Musgrove et al, 2011). Par exemple, Fbxo4 est une ubiquitine ligase qui assure la médiation de la dégradation de la cycline D1 après la transition G1/S. Or, une mutation provoquant une perte de fonction du gène *Fbxo4* a été retrouvée dans le cancer de l'œsophage et dans le mélanome où la cycline D1 est surexprimée (Lee et al, 2013). Ainsi, l'étude de mécanismes, telle que la voie ubiquitine-protéasome, qui permettent d'induire la dégradation de la cycline D1, ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer. D'ailleurs, il a été montré *in vitro*, qu'un certain nombre d'agents anticancéreux induisaient la dégradation de la cycline D1. Par exemple, l'acide rétinoïque (AR) inhibe la prolifération cellulaire et prévient la formation de tumeurs secondaires, notamment dans les cancers des voies digestives et respiratoires. Il a été montré que l'AR permet de diminuer l'expression protéique de la cycline D1 en favorisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S (Langenfeld et al, 1997; Spinella et al, 1999). Ou encore, il a été montré, dans un modèle de cancer du sein où la cycline D1 est surexprimée (MCF7), que la rapamycine inhibe la prolifération en réprimant la transcription de la cycline D1 mais aussi en induisant sa dégradation de façon dépendante de l'ubiquitine (Dong et al, 2005). De même, les inhibiteurs des HDACs (HDACis) sont particulièrement intéressants. En effet, les HDACis se sont révélés avoir une puissante activité anticancéreuse aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et apparaissent comme une nouvelle génération d'agents anticancéreux (pour Revu (Kim & Bae, 2011)). Par exemple, le HDACi Vorinostat est utilisé pour le traitement d'un certain type de lymphomes. La TSA (Trichostatine A), un autre inhibiteur d'HDAC, présente une forte activité anti-tumorale contre le cancer du sein où, de manière très intéressante, elle induit la dégradation de la cycline D1 (pour revue (Alao,

2007)). Notamment, cette dégradation de la cycline D1 implique la voie de dégradation par le protéasome dépendante de l'ubiquitine (Alao et al, 2004; Alao et al, 2006). Deux autres types de régulation post-transcriptionnelle de la Cycline D1 ont également été mis en évidence. En effet, un certain nombre d'études a montré que l'expression de la Cycline D1 pouvait être régulée au niveau de l'expression de son ARNm (Knudsen, 2006). Par exemple il a été montré que la protéine IMP-3 était capable de lier l'ARNm Cycline D1 et de réguler son expression protéique (Rivera Vargas et al, 2013). Ce niveau de régulation a notamment été impliqué dans un certain nombre de cancers, tels que le cancer du sein et du colon (pour revue(Knudsen, 2006). Enfin, l'existence d'un variant alternatif de la Cycline D1 a également été décrit : la Cycline D1b. Ce variant a été impliqué dans un certain nombre de cancers, et il a été montré que son potentiel oncogénique semble plus fort encore que celui de la Cycline D1 canonique (Knudsen, 2006).

2. G9A et SETDB1 stabilisent la cycline D1

Mes résultats montrent que G9a et SETDB1 régulent positivement la cycline D1 en la stabilisant au niveau protéique. Etant donné les rôles primordiaux de la cycline D1 dans la biologie de la cellule et en particulier dans le cancer, il serait extrêmement intéressant de comprendre par quels mécanismes G9a et SETDB1 régulent cette cycline en particulier. L'étude du transcriptome que j'ai réalisée a mis en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans régulation de l'activité ubiquitine ligase et du protéasome. D'après mes résultats, j'aimerais proposer l'hypothèse selon laquelle G9a favorise l'accumulation de la cycline D1 en inhibant potentiellement sa dégradation par le protéasome. On pourrait imaginer un mécanisme similaire pour SETDB1 (à tester également). Ainsi, en favorisant la dégradation de la cycline D1, l'inhibition spécifique de G9a, et éventuellement de SETDB1, pourrait fournir une nouvelle piste thérapeutique contre le cancer. D'ailleurs, comme je l'ai montré en introduction de ce manuscrit, G9a et SETDB1 (également Suv39h1), sont impliquées dans une très grande variété de cancers. Et l'effet de leur inhibition est déjà testé dans certains modèles cancéreux. Par exemple, il a été montré que l'inhibition de G9a et de Suv39h1 réduisait la prolifération de cellules immortalisées de l'épithélium bronchique et de cellules cancéreuses de prostate (Kondo et al, 2008; Watanabe et al, 2008).

Une étude a montré que l'utilisation de BIX-01294, un inhibiteur chimique de G9a (et GLP aussi), induisait l'apoptose dans les cellules cancéreuses du foie. Par ailleurs, dans la même étude, il est montré que BIX-01294 inhibe l'expression ARN de la cycline D1 (poster (Lu et al, 2010)). Une autre étude montre que le BRD4770, un autre inhibiteur chimique de G9a, induit l'autophagie de cellules cancéreuses du pancréas (Yuan et al, 2013). L'ensemble de ces études montre, par ailleurs, que l'effet anticancéreux de l'inhibition de G9a implique différents mécanismes, tels que l'autophagie, l'apoptose ou la croissance cellulaire.

3. GLP : un anti-oncogène ?

Alors que G9a, SETDB1 et même SUV39h1 ont largement été associées à des cancers, très peu d'études ont impliqué GLP. D'après mes résultats, la surexpression de GLP inhibe la prolifération cellulaire notamment en régulant négativement la cycline D1 au niveau protéique. GLP aurait donc un effet anti-prolifératif. Ainsi, la surexpression de GLP pourrait, à l'inverse de G9a, avoir des effets anti-cancéreux. Il serait intéressant de tester cette hypothèse. Au laboratoire, nous possédons un modèle de cellules cancéreuses du sein (MCF7) dont il a notamment été montré que la cycline D1 était surexprimé. Il serait intéressant de vérifier si la surexpression de GLP limiterait la croissance des cellules cancéreuses.

IV. Rôle de SETDB1 dans le cytoplasme

Durant ma thèse, je me suis également intéressée à la localisation cytoplasmique de SETDB1. On connaît, en effet, la protéine SETDB1 pour son rôle de méthyltransférase dans le noyau. Cependant, avant de commencer ma thèse, il n'avait jamais été question d'un rôle quelconque de SETDB1 dans le cytoplasme. Il a été montré qu'une certaine proportion d'histone H3 était mono- et diméthylé dans le cytoplasme, avant de passer dans le noyau et d'être incorporé au sein du nucléosome (Loyola et al, 2006). Puisque SETDB1 est spécifique de la mono- et di-méthylation et est présente dans le cytoplasme, on pouvait alors imaginer que sa fonction était de méthyler les histones H3 libres, dans le cytoplasme. Cette hypothèse a cependant été réfutée par l'équipe de Jenuwein qui a montré que deux autres KMTs (PRDM3 et PRDM16), et non SETDB1, étaient responsables de la monométhylation de H3K9 dans le cytoplasme (Pinheiro et al, 2012).

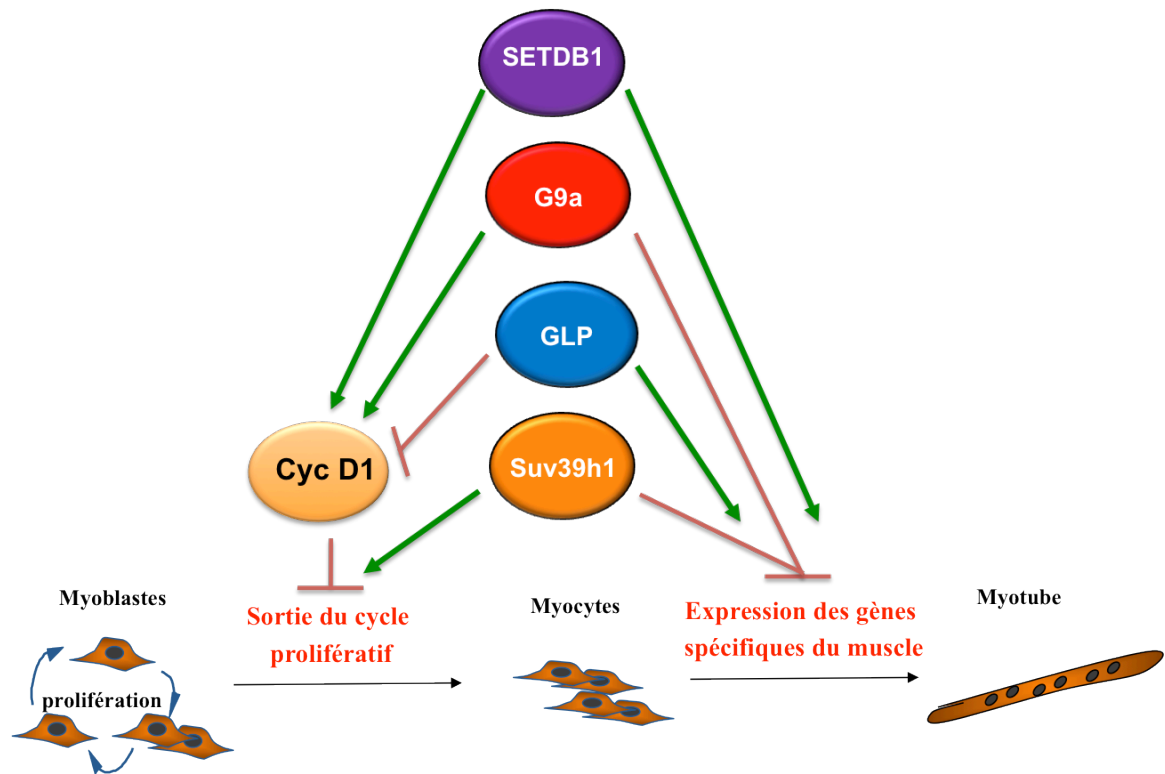
Une autre hypothèse que j'ai proposée, dans la discussion des résultats, est que SETDB1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la localisation cytoplasmique des HDACs,

notamment inhibitrice de la différenciation musculaire. D'autres pistes sont encore envisageables pour identifier un rôle de SETDB1 dans le cytoplasme. Tout d'abord, mes expériences d'immunofluorescence m'ont fait remarquer que SETDB1 était présent partout où il y avait de la tubuline et, en particulier (données non montrées), j'ai pu voir qu'au moment de la mitose, SETDB1 co-localisait parfaitement avec la tubuline au niveau des fuseaux mitotiques. Or, il a été montré que la polymérisation et dépolymérisation de l' α -tubuline pouvait être régulées par son acétylation ou désacétylation (Maruta et al, 1986; Zhang et al, 2003). Par ailleurs, il a également été montré que la tubuline pouvait être méthylée et que sa méthylation pourrait être impliquée dans le même type de régulation que son acétylation (Szasz et al, 1993). Cependant, jusqu'à présent, aucune méthyltransférase spécifique de la tubuline n'a été mise en évidence. Ainsi, SETDB1 pourrait être un candidat envisageable.

V. Conclusion

Mon projet de recherche portait initialement sur l'étude d'une possible interdépendance fonctionnelle entre les 4 KMTs spécifiques de H3K9 : G9a, GLP, SETDB1 et Suv39h1. Les résultats que j'ai obtenus durant ma thèse ont permis de montrer que bien que les 4 KMTs soit toutes impliquées lors de la différenciation musculaire, elles ont cependant des rôles distincts dans ce processus. En particulier, mes résultats ont permis de révéler deux faits inattendus. Tout d'abord que SETDB1 pourrait avoir un rôle dans l'activation de la transcription. D'autre part que les deux protéines G9a et GLP ont des rôles différents, voire même antagonistes. Comme je l'ai présenté plus haut, les mécanismes dérégulés par ces trois protéines sont impliqués dans différents types de maladies et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de G9a, SETDB1 ou GLP pourrait être envisagée comme moyen thérapeutique. Cependant, dans le cas de G9a et GLP, la plupart des inhibiteurs chimiques ne sont pas spécifiques de l'une ou

l'autre protéine. Par exemple, le BIX-01294 inhibe l'activité de G9a en rentrant en compétition avec la SAM. Cependant, du fait que les structures de G9a et GLP soient très similaires, le BIX-01294 inhibe aussi, bien que plus faiblement, GLP. Pour cette raison, comprendre les mécanismes d'action qui sont spécifiques de G9a et de GLP, serait nécessaire si l'on veut, dans le futur, établir une stratégie thérapeutique ciblant spécifiquement l'action de G9a ou de GLP.



Modèle : Rôle des 4 KMTs dans la régulation de la différenciation terminale du muscle squelettique

Les 4KMTs de H3K9 sont différemment impliquées durant la différenciation terminale du muscle. Suv39h1 est essentielle à la sortie irréversible du cycle cellulaire en inhibant les gènes cibles de E2F. Suv39h1, de même que G9a, empêche l'expression des gènes spécifiques de la différenciation dans les myoblastes en prolifération. Pour cela, G9a et Suv39h1 interagissent avec MyoD qui permet leur recrutement au niveau des gènes cibles de ce dernier. G9a, de même que SETDB1, inhibe la sortie du cycle cellulaire en favorisant la surexpression de la Cycline D1. Dans les cellules en différenciation, SETDB1 semble être impliquée dans la régulation positive des gènes spécifiques du muscle en interagissant avec des régulateurs positifs de la transcription, tels que MyoD et des HATs. Enfin, et d'une manière inattendue, GLP semble avoir un effet tout à fait antagoniste à G9a dans ce modèle de différenciation.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

- Les C2C12, en condition de prolifération, ont été cultivés dans un milieu DMEM contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de sodium de pyruvate et 15% de sérum de veau fœtal (FBS). Afin d'induire la différenciation des C2C12, le sérum de veau fœtal est remplacé par du sérum de cheval à 2%.
- Les myoblastes primaires de souris ont été cultivés dans un milieu DMEM contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de sodium de pyruvate et 20% de sérum de veau fœtal (FBS) et 2,5ng/ml de bFGF. La différenciation des myoblastes primaires est induite de la même façon que pour les C2C12.
- Les cellules ES de souris ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de sodium de pyruvate, 1% d'acide aminée non essentiel, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1000 U/mL de LIF ESGRO et 15% de sérum de veau fœtal (FBS).
- Les cellules humaine 293T sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de sodium de pyruvate et 10% de sérum de veau fœtal (FBS)

Lignées cellulaires

J'ai utilisé des lignées établies par le laboratoire, avant mon arrivée. Ce sont des lignées polyclonales de C2C12, surexprimant stablement une forme doublement taguée HA (Haemagglutinin) et FLAG de G9a GLP, Suv39h1, SETDB1 et un mutant de SETDB1 ne possédant pas d'activité méthyltransférase (mutation ponctuel dans le domaine SET). Pour établir ces lignées, le laboratoire a utilisé un transgène codant pour la protéine humaine de chaque KMTs. Une lignée transfectée avec un vecteur a été utilisée comme contrôle.

Préparation des extraits protéiques totaux, nucléaire et cytoplasmique

Les extraits protéiques totaux sont préparés en lysant les cellules dans une solution de RIPA (50mM de Tris PH8, 150 mMNaCl, 1% NP40, 0,5% Na-deoxycholate, 0,1 % SDS et 10mM EDTA). Les cellules sont ainsi incubées 10 minutes à 4°C dans le RIPA puis soniquées et centrifugées. Le supernatant est récupéré et dosé à l'aide du kit de dosage BCA Protein Assay (Pierce).

Pour la séparation des extraits nucléaire et cytoplasmique : Les cellules sont incubées 5 minutes à 4°C dans une solution NIB (Nucleus Isolation buffer) contenant 5mM Tris/CL PH 7,5, 40mM KCL, 2mM MgCL₂, 0,5mM EDTA, 0,05mM Spermidine, 0,05mM Spermine et 0,1% NP-40, puis passées 5 fois dans une aiguille 21G et Centrifugées 10 minutes à 5000rpm. Le surnageant représente la fraction cytosolique. Le culot est de nouveau, deux fois de suite, incubé dans la solution NIB, passé à l'aiguille, et centrifugé. Pour finir, le culot qui représente la fraction nucléaire, est resuspendu dans du RIPA et traité de la même façon que les extraits totaux.

Co-immunoprécipitation endogène

Les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées à partir de 1g de culot de cellules congelées. Les cellules sont resuspendus dans un tampon hypotonique (10 mM Tris-HCL PH 7,65 ; 1,5mMMgCL₂ ; 10mM KCL) puis passées au douce (20 coup de piston) afin de caser les membranes plasmiques. A la fin de la lyse cellulaire, nous ajoutons un tampon sucrose contenant de la spermidine et de la spermine afin limiter la fuite des extraits du noyaux. La fraction cytosolique est séparée de la fraction nucléaire en centrifugeant 7 minutes à 4 ° C et 9000 rpm. Le culot, qui correspond à la fraction nucléaire est resuspendu dans un tampon sucrose et ensuite incubé 30 minutes dans de la glace avec un tampon à forte teneur en sel

(NaCl 900 mM , Tris 20 mM, pH 7,65 , 25 % glycerol , 1,5 mM de MgCl₂ , 0,2 mM d'EDTA), pour obtenir 300 mM de NaCl. L'extrait est ensuite incubé à 10 minutes à 37°C en présence de nucléase micrococcale (cat # N3755 , Sigma) qui va digérer l'ADN jusqu'à obtenir une chromatine composée principalement de mono-nucléosomes. L'extrait est ensuite ultracentrifugé à 4°C et 40000 rpm pendant 30 minutes. La fraction soluble est récupérée et prélavée pendant 2h à 4°C avec des billes A/G (53133, Pierce), puis immunoprécipitée toute la nuit à 4°C avec 5µg de l'anticorps correspondant. Les extraits nucléaires sont incubés pendant 2h à température ambiante avec de nouvelles billes A/G qui sont ensuite soigneusement lavées avec un tampon de lavage (50 mM Tris pH 7,65, NaCl 150 mM, 0,5% de Triton 100). Pour finir les billes sont remises en suspension dans un tampon Laemmli et analysés par Western blot.

Western blot

Les extraits protéiques sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes en présence de Laemmli 1X final avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide (SDS PAGE) dénaturant à 4-12% BIS-TRIS (Life Technologies). Pour les grosses protéines tel que p300 et CBP, j'ai utilisé des gels bis-tris acetate 3-8%. Les protéines sont ensuite transférées en milieu liquide ou semi liquide sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h30 dans un tampon de transfert Tris-Glycine, 20% de méthanol et 0,01% SDS. Après transfert, la membrane est bloquée dans une solution de lait 5% TBS-Tween 0,2% pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Elle est ensuite incubée avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages dans du TBS-Tween 0,2%, la membrane est incubée pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire approprié, couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxidase). Enfin, après plusieurs lavages, les protéines d'intérêts sont révélées par chimioluminescence en utilisant le kit west dura (Perbio, Rockford, USA). Si nécessaire, l'anticorps secondaire TrueBlot (Clinisciences) a été utilisé pour réduire les interférences avec les chaînes lourdes (~ 55 kDa) et les chaînes légères (~ 23 kDa) causées par l'immunoprécipitation des IgGs.

Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur des Labtecks en permanox (Falcon) et fixées pendant 10 minutes avec 4% de formaldéhyde dans du PBS froid. La formaldéhyde résiduelle est neutralisée avec 0,1 M de Glycine PH 8.0, et lavée avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées et bloquées dans une solution de PBS contenant 1% de BSA, 1% de sérum de chèvre, et 0,3% de Triton-X100. Les anticorps primaires et secondaires sont également dilués dans cette solution. Entre chaque étapes, les lames sont lavées au PBS. Les noyaux sont marqués au Dapi puis les lames sont recouvertes d'une lamelle avec une solution de montage de chez Dako Cytomation.

Transfection avec les siARN

Les cellules en prolifération sont cultivées dans des boîtes de culture de diamètre 10cm et sont transfectées avec 0,2umol de siARN, en utilisant le réactif Hi perfect (Qiagen).

Production des lentivirus et infection des C2C12 avec les shRNA.

Les cellules 293T sont mises en culture dans des boîtes de diamètre 10 cm. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 70%, elles sont transfectées avec les vecteurs suivants : 10ug du shARN d'intérêt, 10ug de pCR 48 (sPAX2=gag-pol) et 10ug de pCR47 (pMD2.G=VSV-G Env). Les 3 vecteurs sont préparés dans une solution contenant 500ul d'eau, 62,5 ul de CaCl₂ à 2M et du HSB 1X. Les cellules sont incubées avec cette solution à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, le milieu des cellules est changé avec un milieu classique sans sérum. Les cellules sont ainsi laissées pendant 48h pour produire suffisamment de virus. Le milieu de culture contenant les virus produits, est collecté dans des tubes, centrifugé à 1500rpm afin d'éliminer les cellules mortes flottantes en surface, filtré à l'aide d'un filtre de 0,45um afin d'éliminer les débris cellulaires, et concentré en le centrifugeant à 25000rpm pendant 2h à 4°C. Le culot contenant les virus est ressuspendu dans du PBS et utilisé pour

infecter les C2C12. On utilise 10 particules virale par cellules. Le vecteur contenant le shARN d'intérêt porte également un gène de résistance à la puromycine. Les cellules infectées sont ainsi sélectionnées en rajoutant de la puromycine à 1ug/ml dans le milieu de culture.

Etude de la prolifération cellulaire

Pour chaque lignée, 10000 cellules ont été initialement mises en culture dans des boites de culture cellulaire. Les cellules vivantes ont été comptées toutes les 24 heures en utilisant du bleu de trypan et à l'aide du compteur automatisé de cellules Countess (Life Technologies).

RT-QPCR et Microarray

Les ARNs ont été extraits à l'aide du mini-kit RNeasy (Qiagen) en suivant la procédure indiquée par le fabricant. 0,5 à 1 ug d'ARN totaux a été utilisé pour la transcription inverse à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Pour analyser les niveaux relatifs d'expression des gènes, des PCR quantitative en temps réel ont été réalisées en utilisant du SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) et en suivant les indications du fabricant. Les valeurs relatives de l'expression des gènes ont été normalisées par rapport à l'ARNm de la Cyclophiline A.

Pour les microarray, les données brutes ont été normalisées en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multichip Algorithm) à l'aide du logiciel Bioconductor qui utilise le langage R. Tout les contrôles qualités et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Partek GS . Afin de contrôler les données, une classification hiérarchique a été réalisée en utilisant les méthodes de calcul de lien moyen (Average linkage) et de coefficient de corrélation de Pearson. Une analyse classique de variance pour chaque gène et des tests de comparaison multiple post hoc de Tukey ont été utilisés pour trouver les gènes différentiellement exprimés. Enfin, les valeurs des p-values et des fold changes ont été utilisées pour filtrer et sélectionner les gènes différentiellement exprimés.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et Q-PCR

Les cellules sont d'abord fixées en ajoutant du DSG (Di - Succinimidyl Glutarate , Santa Cruz) au milieu de culture, à une concentration finale de 2mM et en incubant pendant 45minutes à température ambiante. Une deuxième étape de fixation est réalisée avec 1% de la Formaldéhyde (Sigma) pendant 10 minutes à température ambiante. La formaldéhyde est ensuite neutralisée en ajoutant de la Glycine à une concentration finale de 0,125 M. Les cellules fixées sont ensuite lavées et récoltées dans du PBS. La Chromatine est préparée par deux étapes d'extraction successives de 10 min à 4 ° C avec le tampon 1 (50 mM de HEPES / KOH pH 7,5 , NaCl 140 mM , EDTA 1 mM , glycérol 10% ; 0,5 % de NP- 40 , 0,25 % de Triton) et le tampon 2 (NaCl 200 mM , EDTA 1 mM , 0,5 mM EGTA , 10 mM Tris pH 8). Les noyaux sont culotés par centrifugation, et remis en suspension dans le tampon 3 (50 mM Tris pH 8 , 0,1% SDS , 1 % de NP- 40; 0,1 % de Na - Deoxycholate , EDTA 10 mM , NaCl 150 mM) puis soniqués à l'aide du sonicateur Bioruptor Power-up (Diagenode) de manière à obtenir des fragments d'ADN génomique d'une taille allant de 150 à 300 pb. La chromatine ainsi obtenue est prélevée avec des billes A/G UltraLink (53133, Pierce) pendant 2 h à 4°C et immunoprécipitée avec des anticorps spécifiques pendant une nuit à 4°C. Les complexes immunoprécipités sont récupérés par l'ajout de billes A/G UltraLink préalablement bloquées (BSA et sperme de saumon soniqué) et incubés pendant 2h à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec un tampon de faible teneur en sel (0,1% SDS , 1% de Triton , EDTA 2 mM , Tris 20 mM pH 8 , NaCl 150 mM), puis deux fois avec un tampon de forte teneur en sel (0,1 % SDS , 1% de Triton , 2 mM EDTA ; Tris 20 mM pH 8 , NaCl 500 mM), une fois avec un tampon de lavage LiCl (10 mM Tris pH 8,0 , 1% Na - désoxycholate , 1 % de NP- 40, 250 mM LiCl , 1 mM EDTA) et deux fois avec du TE + 50 mM NaCl. Les billes sont éluées dans du TE + 1% de SDS à 65°C et la chromatine est *décrosslinké* pendant une nuit à 65°C. Le matériel élué est extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol.

L'ADN est remis en suspension dans de l'eau. Les Q-PCR sont effectuées en utilisant du SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) et en suivant les indications du fabricant. Les résultats de ChIP-qPCR sont représentés en pourcentage (%) d'imput.

Anticorps

Protéine	Compagnie	Référence	WB	Co-IP	ChIP	IF
anti-mouse IgG TRITC	Sigma	T7657				✓
Anti-rabbit IgG-Alexa 488	Life technologies	A-11008				✓
Anti-rat IgG-Alexa 488	Life technologies	A-11006				✓
CBP	Santa cruz	sc-369	✓	✓		
Cycline A2	Santa cruz	C19, sc-596	✓			
Cycline D1	Santa cruz	72-13G, sc-450	✓			
Cycline D3	Santa cruz	C-16, sc-182	✓			
G9a	Upstate	07-551		✓		
G9a	Cell Signalling Technologies	3306	✓		✓	
GLP	R&D Systems	PP-B0422-00	✓	✓	✓	
HDAC(123)	BD Biosciences	611125	✓	✓		
HDAC 5	Cell Signalling Technologies	2162	✓			
HP1B	Euromedex	1MOD1A9AS	✓			
IgG (mouse)	Santa cruz	sc-2025		✓	✓	
IgG (Rabbit)	Santa cruz	sc-2027		✓	✓	
Setdb1	Santa Cruz	sc-66884	✓	✓	✓	✓
Suv39h1	Upstate	07-550	✓	✓	✓	
MCK	Dr ITO	Fait maison	✓			✓
MHC	Sigma		✓			
myoD	Santa cruz	Sc-304	✓	✓		
myoD	Santa cruz	sc-32758	✓	✓		
Myogénine	Santa cruz	M-225	✓			
P300	Santa cruz	Sc-584	✓	✓		
Tubuline	Sigma aldrich	T9026	✓			

Primers

Target genes	Forward	Reverse
RT-qPCR		
<i>Cyclophilin A</i>	GTCAACCCCACCGTGTCTT	GTCAACCCCACCGTGTCTT
<i>Bre</i>	GCAACATTCCCACATACCTTCTC	GACAGAAAGAAGGGCCACATCT
<i>Ccng2</i>	GGATAGATTCTTGGCCCTTATGAA	GCAGCAGACGCCAATGC
<i>Cdca7</i>	CGATGACAGTTGTGACAGCTTTG	GTGGCATCTGGCCTTGGT
<i>Cycline D1</i>	TTCTTTCCAGAGTCATCAAGTGTGA	CCAGAAGGGCTTGAATCTGTTC

<i>Dyrk1</i>	GGAGCTGATGAACCAGCATGA	AACATGAAGTGCCGCTTAAGG
<i>G9a</i>	CACAAGCACATCGATGTGATT	ATGGTAGTTGACAGCATGGAG
<i>GLP</i>	TCAACCAGCATGAGAAGCAC	GTGCTTCTCATGCTGGTTGA
<i>H19</i>	GCAGTCATCCAGCCTTCTTGA	GAACAGACGGCTTCTACGACAA
<i>Lifr</i>	CGGAACGGTGGTCTTTGC	GTGTCTCACAGCTCAGCTTCTGA
<i>MCK</i>	CACCATGCCGTTTCGGCAACA	GGTTGTCCACCCCAGTCT
<i>MyoD1</i>	GGCGACTCAGATGCATCCA	GCTGTAATCCATCATGCCATCA
<i>Myogénine</i>	GAATCACATGTAATCCACGGA	ACGCCAACTGCTGGGTGCCA
<i>Ppap2b</i>	GCTCATCTGCCTGGACCTCTT	TGCTTGTCTCGATGATGAGGAA
<i>Psmc4</i>	GGATCAGAACACAGCCATCGT	GGTACTCAGGATGCGCACATAA
<i>P130</i>	GCCAACAATGGGCAACG	CCCTCCATTTTCATTGGCAAT
<i>Sema6a</i>	GAAGATTCCGAGCCAATCAGTATT	CCCACAAACACCCGATACTGT
<i>Serpin9e</i>	GTGGGTCTCCAAACAGACTAAAGG	GCCTGGTCTGTGAATCAACTGA
<i>SETDB1</i>	GCAATGGAGAAGAAGCAAGG	ATAGGCTGTAGGGGCTCCAT
<i>Sirt2</i>	CACCTCCTGCAGAAAAGAATACAC	CCTGGGAGTTGCTTCTGAGAA
<i>Tnnt1</i>	TCCCCGAAGATTCCAGAA	TGCGCTTCCGGTGGAT
<i>Tbrg1</i>	CTGTGTTCCCATCGGACTAG	CCAGGTCCGGTTGGTGATGAT
<i>Trim28</i>	CGCGACTGCCAGCTCAA	CCTCACTGCATCTTCCAAAA
<i>Wnt10b</i>	GAGAATGCGGATCCACAACA	CGCTTCAGGTTTTCCGTTACC
Chip-qPCR		
<i>Cepgl</i>	CGGGAGTCGTAGTTCTTTTTGC	GCATGCTGGGACTTGAAGTTC
<i>Ctnnb1</i>	TTCCCTGTCCGGATTCCA	TTTACCGCTCCCAGGAGTGT
<i>E2f1</i>	GGTCTCCACCCCTCAGTTT	GCTTTGGAGGTGAGCCTGAA
<i>Mcts1</i>	GCACTTCACTGTCCAATGATTATAGC T	CGTTTTGACCTTGCTTATGCTAA G
<i>Mdm2</i>	AATTCTGTCATTGCAGGGTACTCA	CACAGGTGCGGTTGCTCAT
<i>Myogénine</i>	GAATCACATGTAATCCACGGA	ACGCCAACTGCTGGGTGCCA
<i>Ngf</i>	CACCAAAAATTCAAGATATGACCAA A	CCACTCTTAGCTGCTGCAGAAC
<i>Pfkm</i>	CGCCGTCCTTTGGTTTTCT	ACCGAACGGAACCAGATGAC
<i>Psmal</i>	TGTGGTAGCCCATGCCTTTAA	GATCAGGCTGGCCTTGGA
<i>Psma4</i>	TCGCCGCGGATGCTT	CAGATCAGCGCCTCTTACTCA
<i>Psmc4</i>	GGGCAAAAAGCCTACGGAAA	TATGGTGCTTCTACTTGTTTTAAA TGG
<i>Psmc6</i>	GGGAATCATGTGGTTTTTTCTGA	ATGTGTGTGCAGCACGTGTGT
<i>Psmd1</i>	TTCTGCCTTTTCTCTGCTT	GCTGGGTGTTGTGGTTCACA
<i>Psmd14</i>	CCAACACCCAAGTCAGAAAGC	GGCATCAGATCATGCGTAGCT
<i>Psmd2</i>	AGCAATGGGCTGTTCAATCTCT	CATCCATTTCCACTGCCAATG
<i>Psmd3</i>	GCCCGGCAACTCATGATG	ACATGTAAGTGGGTAGGACCTAT CG
<i>Psmd5</i>	GGAGGTCAGAGGGCAACTTG	CACCACACCTGAAGAATTAAGTT CA

Ube4b	GGGCTGTGATGGTTTGTATCTG	AAGGCCACACCTCCAAATAATG
Wnt10b	GGGTTACTATTGAGTGCTTCCTTGA	CTCCCGCTGTGGTCTAGCTT

gènes	séquences
siARN	
Contrôle	ACUUAACCGGCAUACCGGCTT
GLP1	GCACCUUUGUCUGCGAAUAAU
GLP2	GGAUCAAAACCGUCUCGGAAUU
GLP3	GCACCUUUGUCUGCGAAUAAU
SETDB1 1	GCGCAGAGUUAACCGCAAAUU
SETDB1 2	GAACCUAUGUUUAGUAUGA
SETDB1 3	GUGGAAGUCUCGAGUUGAA
shARN	
Contrôle	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
GLP	CCGGAAGGATCAAACCTGCTCGGAACTCGAGTCCGAGCAGGTTTGATCCTTTTTT
G9a	CCGGAATAACAAGGATGGCGAGGTTCTCGAGAACCTCGCCATCCTTGTTATTTTTT

Références bibliographiques

Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, 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. *The EMBO journal* **18**: 1923-1938

Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Fritsch L, Yahi H, Sekhri R, Naguibneva I, Robin P, Cabon F, Poleskaya A, Harel-Bellan A (2004) A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *Embo J* **23**: 605-615

Alao JP (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular cancer* **6**: 24

Alao JP, Lam EW, Ali S, Buluwela L, Bordogna W, Lockey P, Varshochi R, Stavropoulou AV, Coombes RC, Vigushin DM (2004) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 8094-8104

Alao JP, Stavropoulou AV, Lam EW, Coombes RC, Vigushin DM (2006) Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A induces ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular cancer* **5**: 8

Albacker CE, Storer NY, Langdon EM, Dibiasi A, Zhou Y, Langenau DM, Zon LI (2013) The histone methyltransferase SUV39H1 suppresses embryonal rhabdomyosarcoma formation in zebrafish. *PloS one* **8**: e64969

Allfrey VG, Mirsky AE (1964) Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science (New York, NY)* **144**: 559

Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL, Ulfhake B (2010) Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry* **285**: 39597-39608

Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, Morozova N, Fenouil R, Descostes N, Andrau JC, Mathieu J, Hamiche A, Ait-Si-Ali S, Muchardt C, Batsche E, Harel-Bellan A (2012) Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* **19**: 998-1004

Arnaudo AM, Molden RC, Garcia BA (2011) Revealing histone variant induced changes via quantitative proteomics. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **46**: 284-294

Azmi S, Ozog A, Taneja R (2004) Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. *The Journal of biological*

chemistry **279**: 52643-52652

Balemans MC, Huibers MM, Eikelenboom NW, Kuipers AJ, van Summeren RC, Pijpers MM, Tachibana M, Shinkai Y, van Bokhoven H, Van der Zee CE (2010) Reduced exploration, increased anxiety, and altered social behavior: Autistic-like features of euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mice. *Behavioural brain research* **208**: 47-55

Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone methylation: recognizing the methyl mark. *Methods in enzymology* **376**: 269-288

Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* **21**: 381-395

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-837

Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, Weintraub H (1990) Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **599**: 1-11

Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TA, de Waard H, Wu J, Yuan L, Citterio E, Houtsmuller AB, Neeffjes J, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Dantuma NP (2006) DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes & development* **20**: 1343-1352

Bergstrom DA, Penn BH, Strand A, Perry RL, Rudnicki MA, Tapscott SJ (2002) Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Molecular cell* **9**: 587-600

Bilodeau S, Kagey MH, Frampton GM, Rahl PB, Young RA (2009) SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev* **23**: 2484-2489

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**: 91-99

Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **14**: 167-196

Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science (New York, NY)* **230**: 758-766

Bour BA, O'Brien MA, Lockwood WL, Goldstein ES, Bodmer R, Taghert PH, Abmayr SM, Nguyen HT (1995) Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes & development* **9**: 730-741

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H,

Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**: 660-665

Braun T, Arnold HH (1996) Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *The EMBO journal* **15**: 310-318

Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *The EMBO journal* **8**: 701-709

Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, Admon A, Ciechanover A (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *The EMBO journal* **17**: 5964-5973

Buckingham M (2001) Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current opinion in genetics & development* **11**: 440-448

Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of anatomy* **202**: 59-68

Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6481-6486

Cao R, Wang H, He J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y (2008) Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. *Molecular and cellular biology* **28**: 1862-1872

Cao Y, Yao Z, Sarkar D, Lawrence M, Sanchez GJ, Parker MH, MacQuarrie KL, Davison J, Morgan MT, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tapscott SJ (2010) Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Developmental cell* **18**: 662-674

Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V (2004) The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes & development* **18**: 2627-2638

Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, Fritsch L, Lin WM, Hollmann TJ, Ferre F, Bourque C, Burke CJ, Turner L, Uong A, Johnson LA, Beroukhim R, Mermel CH, Loda M, Ait-Si-Ali S, Garraway LA, Young RA, Zon LI (2011) The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* **471**: 513-517

Chaib H, Nebbioso A, Prebet T, Castellano R, Garbit S, Restouin A, Vey N, Altucci L, Collette Y (2012) Anti-leukemia activity of chaetocin via death receptor-dependent apoptosis and dual modulation of the histone methyl-transferase SUV39H1. *Leukemia* **26**: 662-674

Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruck RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science (New York, NY)* **318**: 444-447

Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* **84**: 209-238

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**: 1053-1061

Chen MW, Hua KT, Kao HJ, Chi CC, Wei LH, Johansson G, Shiah SG, Chen PS, Jeng YM, Cheng TY, Lai TC, Chang JS, Jan YH, Chien MH, Yang CJ, Huang MS, Hsiao M, Kuo ML (2010) H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. *Cancer research* **70**: 7830-7840

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **395**: 89-93

Chen X, Skutt-Kakaria K, Davison J, Ou YL, Choi E, Malik P, Loeb K, Wood B, Georges G, Torok-Storb B, Paddison PJ (2012) G9a/GLP-dependent histone H3K9me2 patterning during human hematopoietic stem cell lineage commitment. *Genes Dev* **26**: 2499-2511

Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, Falck JR, Peng J, Gu W, Zhao Y (2007) Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 812-819

Cherrier T, Suzanne S, Redel L, Calao M, Marban C, Samah B, Mukerjee R, Schwartz C, Gras G, Sawaya BE, Zeichner SL, Aunis D, Van Lint C, Rohr O (2009) p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* **28**: 3380-3389

Cho S, Park JS, Kang YK (2013) Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**: 694-703

Cho S, Park JS, Kwon S, Kang YK (2012) Dynamics of Setdb1 expression in early mouse development. *Gene expression patterns : GEP* **12**: 213-218

Choi HK, Choi KC, Oh SY, Kang HB, Lee YH, Haam S, Ahn YH, Kim KS, Kim K, Yoon HG (2007) The functional role of the CARM1-SNF5 complex and its associated HMT activity in transcriptional activation by thyroid hormone receptor. *Experimental & molecular medicine* **39**: 544-555

Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H (1990) MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7988-7992

Cossu G, Borello U (1999) Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *The EMBO journal* **18**: 6867-6872

Cserjesi P, Olson EN (1991) Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Molecular and cellular biology* **11**: 4854-4862

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-553

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**: 185-196

Czvitkovich S, Sauer S, Peters AH, Deiner E, Wolf A, Laible G, Opravil S, Beug H, Jenuwein T (2001) Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mechanisms of development* **107**: 141-153

Dacwag CS, Bedford MT, Sif S, Imbalzano AN (2009) Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation. *Molecular and cellular biology* **29**: 1909-1921

Dacwag CS, Ohkawa Y, Pal S, Sif S, Imbalzano AN (2007) The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling. *Molecular and cellular biology* **27**: 384-394

Davis CA, Haberland M, Arnold MA, Sutherland LB, McDonald OG, Richardson JA, Childs G, Harris S, Owens GK, Olson EN (2006) PRISM/PRDM6, a transcriptional repressor that promotes the proliferative gene program in smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology* **26**: 2626-2636

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000

de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005) Do protein motifs read the histone code? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **27**: 164-175

de la Serna IL, Carlson KA, Imbalzano AN (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nature genetics* **27**: 187-190

de la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, Bergstrom DA, Dacwag CS, Tapscott SJ, Imbalzano AN (2005) MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Molecular and cellular biology* **25**: 3997-4009

Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, Pompilio G, Capogrossi MC, Germani A (2004) Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 16332-16338

Di Padova M, Caretti G, Zhao P, Hoffman EP, Sartorelli V (2007) MyoD acetylation influences temporal patterns of skeletal muscle gene expression. *The Journal of biological chemistry* **282**: 37650-37659

Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & development* **11**: 957-972

Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology* **6**: 227

Dirscherl SS, Krebs JE (2004) Functional diversity of ISWI complexes. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **82**: 482-489

Dodge JE, Kang YK, Beppu H, Lei H, Li E (2004) Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol* **24**: 2478-2486

Dong C, Wu Y, Wang Y, Wang C, Kang T, Rychahou PG, Chi YI, Evers BM, Zhou BP (2013) Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene* **32**: 1351-1362

Dong J, Peng J, Zhang H, Mondesire WH, Jian W, Mills GB, Hung MC, Meric-Bernstam F (2005) Role of glycogen synthase kinase 3beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity. *Cancer research* **65**: 1961-1972

Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, Downes M, Evans RM, Muscat GE (2001) A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* **276**: 17007-17013

Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila. *Genes & development* **18**: 2973-2983

Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM (1996) Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes & development* **10**: 2478-2490

Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN (1992) Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Molecular and cellular biology* **12**: 3665-3677

Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN (1994) Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* **120**: 1251-1263

Edmondson DG, Olson EN (1989) A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & development* **3**: 628-640

Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda J, Deplus R, Fuks F, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y (2008) De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1176-1183

Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, Zhang X, Wang L, Issner R, Coyne M, Ku M, Durham T, Kellis M, Bernstein BE (2011) Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**: 43-49

Esteve PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & development* **20**: 3089-3103

Esteve PO, Patnaik D, Chin HG, Benner J, Teitell MA, Pradhan S (2005) Functional analysis of the N- and C-terminus of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. *Nucleic acids research* **33**: 3211-3223

Fang R, Barbera AJ, Xu Y, Rutenberg M, Leonor T, Bi Q, Lan F, Mei P, Yuan GC, Lian C et al. 2010. Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. *Mol Cell* 39(2): 222-233.

Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y (2006) G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature cell biology* **8**: 188-194

Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* **143**: 212-224

Floyd ZE, Trausch-Azar JS, Reinstein E, Ciechanover A, Schwartz AL (2001) The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD. *The Journal of biological chemistry* **276**: 22468-22475

Franklin SG, Zweidler A (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* **266**: 273-275

Frescas D, Guardavaccaro D, Bassermann F, Koyama-Nasu R, Pagano M. 2007. JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*. 8;450(7167):309-13.

Fritsch L, Robin P, Mathieu JR, Souidi M, Hinaux H, Rougeulle C, Harel-Bellan A, Ameyar-Zazoua M, Ait-Si-Ali S (2010) A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol Cell* **37**: 46-56

Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Molecular cell* **12**: 51-62

Gazzerro E, Assereto S, Bonetto A, Sotgia F, Scarfi S, Pistorio A, Bonuccelli G, Cilli M, Bruno C, Zara F, Lisanti MP, Minetti C (2010) Therapeutic potential of proteasome

inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *The American journal of pathology* **176**: 1863-1877

Geng Y, Whoriskey W, Park MY, Bronson RT, Medema RH, Li T, Weinberg RA, Sicinski P (1999) Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* **97**: 767-777

Giacinti C, Giordano A (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**: 5220-5227

Gilbert DM (2002) Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 377-383

Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN (1989) A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Molecular and cellular biology* **9**: 5022-5033

Goto T, Monk M (1998) Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**: 362-378

Grigoryev SA, Arya G, Correll S, Woodcock CL, Schlick T (2009) Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 13317-13322

Guasconi V, Pritchard LL, Fritsch L, Mesner LD, Francastel C, Harel-Bellan A, Ait-Si-Ali S (2010) Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **5**: 704-709

Guo K, Walsh K (1997) Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. *The Journal of biological chemistry* **272**: 791-797

Gurung R, Parnaik VK (2012) Cyclin D3 promotes myogenic differentiation and Pax7 transcription. *Journal of cellular biochemistry* **113**: 209-219

Gyory I, Wu J, Fejer G, Seto E, Wright KL (2004) PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nature immunology* **5**: 299-308

Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature cell biology* **6**: 731-740

Han YC, Zheng ZL, Zuo ZH, Yu YP, Chen R, Tseng GC, Nelson JB, Luo JH (2013) Metallothionein 1 h tumour suppressor activity in prostate cancer is mediated by euchromatin methyltransferase 1. *The Journal of pathology* **230**: 184-193

Hans F, Dimitrov S (2001) Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**: 3021-3027

Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL (2001) Methylation

of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* **107**: 727-738

Helin K (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current opinion in genetics & development* **8**: 28-35

Henikoff S (2008) Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nature reviews Genetics* **9**: 15-26

Hiragami K, Festenstein R (2005) Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**: 2711-2726

Hsia DA, Tepper CG, Pochampalli MR, Hsia EY, Izumiya C, Huerta SB, Wright ME, Chen HW, Kung HJ, Izumiya Y. 2010. KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;107(21):9671-6.

Huang J, Dorsey J, Chuikov S, Perez-Burgos L, Zhang X, Jenuwein T, Reinberg D, Berger SL (2010) G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *The Journal of biological chemistry* **285**: 9636-9641

Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & development* **21**: 3369-3380

Icardi L, De Bosscher K, Tavernier J (2012) The HAT/HDAC interplay: multilevel control of STAT signaling. *Cytokine & growth factor reviews* **23**: 283-291

Imai K, Togami H, Okamoto T (2010) Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *The Journal of biological chemistry* **285**: 16538-16545

Islam K, Bothwell I, Chen Y, Sengelaub C, Wang R, Deng H, Luo M (2012) Bioorthogonal profiling of protein methylation using azido derivative of S-adenosyl-L-methionine. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 5909-5915

Issa JP, Just W (2011) Epigenetics. *FEBS letters* **585**: 1993

Jang H, Choi DE, Kim H, Cho EJ, Youn HD (2007) Cabin1 represses MEF2 transcriptional activity by association with a methyltransferase, SUV39H1. *The Journal of biological chemistry* **282**: 11172-11179

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**: 1074-1080

Jiang Y, Jakovcevski M, Bharadwaj R, Connor C, Schroeder FA, Lin CL, Straubhaar J, Martin G, Akbarian S (2010) Setdb1 histone methyltransferase regulates mood-related behaviors and expression of the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 7152-7167

Jiang Y, Matevossian A, Guo Y, Akbarian S (2011) Setdb1-mediated histone H3K9 hypermethylation in neurons worsens the neurological phenotype of Mecp2-deficient mice. *Neuropharmacology* **60**: 1088-1097

Jogo M, Shiraishi S, Tamura TA (2009) Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS letters* **583**: 2715-2719

Kamakaka RT, Biggins S (2005) Histone variants: deviants? *Genes & development* **19**: 295-310

Karytinis A, Forneris F, Profumo A, Ciossani G, Battaglioli E, Binda C, Mattevi A (2009) A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. *The Journal of biological chemistry* **284**: 17775-17782

Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**: 466-471

Keppler BR, Archer TK (2008) Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1. *Expert opinion on therapeutic targets* **12**: 1301-1312

Khanal P, Kim G, Lim SC, Yun HJ, Lee KY, Choi HK, Choi HS (2013) Prollyl isomerase Pin1 negatively regulates the stability of SUV39H1 to promote tumorigenesis in breast cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*

Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, Linder-Basso D, Plachetka A, Shanower G, Tolstorukov MY, Luquette LJ, Xi R, Jung YL, Park RW, Bishop EP, Canfield TK, Sandstrom R, Thurman RE, MacAlpine DM, Stamatoyannopoulos JA, Kellis M, Elgin SC, Kuroda MI, Pirrotta V, Karpen GH, Park PJ (2011) Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**: 480-485

Kim HJ, Bae SC (2011) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American journal of translational research* **3**: 166-179

Kim KC, Geng L, Huang S (2003) Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer research* **63**: 7619-7623

Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Green RD, Kouzarides T (2009) Distinct transcriptional outputs associated with mono- and dimethylated histone H3 arginine 2. *Nature structural & molecular biology* **16**: 449-451

Kitzmann M, Fernandez A (2001) Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**: 571-579

Kitzmann M, Vandromme M, Schaeffer V, Carnac G, Labbe JC, Lamb N, Fernandez A

(1999) cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity. *Molecular and cellular biology* **19**: 3167-3176

Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, Nillesen WM, Magee A, Genevieve D, Cormier-Daire V, van Esch H, Fryns JP, Hamel BC, Siskens EA, de Vries BB, van Bokhoven H (2006) Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *American journal of human genetics* **79**: 370-377

Kleefstra T, Smidt M, Banning MJ, Oudakker AR, Van Esch H, de Brouwer AP, Nillesen W, Siskens EA, Hamel BC, de Bruijn D, Fryns JP, Yntema HG, Brunner HG, de Vries BB, van Bokhoven H (2005) Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Journal of medical genetics* **42**: 299-306

Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews Genetics* **7**: 715-727

Knudsen KE (2006) The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Div* **1**: 15

Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Bumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP (2008) Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PloS one* **3**: e2037

Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y (2007) Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **37**: 974-983

Kouzarides T (1995) Transcriptional control by the retinoblastoma protein. *Seminars in cancer biology* **6**: 91-98

Kramer JM, Kochinke K, Oortveld MA, Marks H, Kramer D, de Jong EK, Asztalos Z, Westwood JT, Stunnenberg HG, Sokolowski MB, Keleman K, Zhou H, van Bokhoven H, Schenck A (2011) Epigenetic regulation of learning and memory by Drosophila EHMT/G9a. *PLoS Biol* **9**: e1000569

Kuo MH, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**: 615-626

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120

Langenfeld J, Kiyokawa H, Sekula D, Boyle J, Dmitrovsky E (1997) Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12070-12074

Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H (1986) Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* **47**: 649-656

Lassar AB, Thayer MJ, Overell RW, Weintraub H (1989) Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell* **58**: 659-667

Latella L, Sacco A, Pajalunga D, Tiainen M, Macera D, D'Angelo M, Felici A, Sacchi A, Crescenzi M (2001) Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Molecular and cellular biology* **21**: 5631-5643

Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 628-633

Lee DY, Northrop JP, Kuo MH, Stallcup MR (2006) Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors. *The Journal of biological chemistry* **281**: 8476-8485

Lee EK, Lian Z, D'Andrea K, Letrero R, Sheng W, Liu S, Diehl JN, Pytel D, Barbash O, Schuchter L, Amaravaradi R, Xu X, Herlyn M, Nathanson KL, Diehl JA (2013) The FBXO4 tumor suppressor functions as a barrier to BrafV600E-dependent metastatic melanoma. *Molecular and cellular biology*

Lee JS, Kim Y, Kim IS, Kim B, Choi HJ, Lee JM, Shin HJ, Kim JH, Kim JY, Seo SB, Lee H, Binda O, Gozani O, Semenza GL, Kim M, Kim KI, Hwang D, Baek SH (2010) Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Molecular cell* **39**: 71-85

Lee JS, Shilatifard A (2007) A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutation research* **618**: 130-134

Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 284-295

Lehmann L, Ferrari R, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Kurdistani SK, Carey M (2012) Polycomb repressive complex 1 (PRC1) disassembles RNA polymerase II preinitiation complexes. *The Journal of biological chemistry* **287**: 35784-35794

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current biology : CB* **13**: 1192-1200

Lemercier C, To RQ, Carrasco RA, Konieczny SF (1998) The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *The EMBO journal* **17**: 1412-1422

Leung DC, Dong KB, Maksakova IA, Goyal P, Appanah R, Lee S, Tachibana M, Shinkai Y, Lehnertz B, Mager DL, Rossi F, Lorincz MC (2011) Lysine methyltransferase G9a

is required for de novo DNA methylation and the establishment, but not the maintenance, of proviral silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5718-5723

Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabo PE, Riggs AD, Pfeifer GP (2006) The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **281**: 19489-19500

Li X, Hu X, Patel B, Zhou Z, Liang S, Ybarra R, Qiu Y, Felsenfeld G, Bungert J, Huang S (2010) H4R3 methylation facilitates beta-globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation. *Blood* **115**: 2028-2037

Ling BM, Bharathy N, Chung TK, Kok WK, Li S, Tan YH, Rao VK, Gopinadhan S, Sartorelli V, Walsh MJ, Taneja R (2012a) Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 841-846

Ling BM, Gopinadhan S, Kok WK, Shankar SR, Gopal P, Bharathy N, Wang Y, Taneja R (2012b) G9a mediates Sharp-1-dependent inhibition of skeletal muscle differentiation. *Molecular biology of the cell* **23**: 4778-4785

Liu B, Wang Z, Zhang L, Ghosh S, Zheng H, Zhou Z (2013) Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nature communications* **4**: 1868

Liu H, Zhang L, Niu Z, Zhou M, Peng C, Li X, Deng T, Shi L, Tan Y, Li G (2008) Promoter methylation inhibits BRD7 expression in human nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC cancer* **8**: 253

Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Molecular cell* **5**: 917-926

Lodish H BA, Zipursky SL (2000) *Molecular Cell Biology* 4th edition. *Book*

Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G (2006) PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular cell* **24**: 309-316

Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A, Nakatani Y, Dent SY, Almouzni G (2009) The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports* **10**: 769-775

Lu H, Li Y, Zhong X, Klaassen C, D. (2010) Inhibition of histone methyltransferase G9a as a promising new target for the treatment of liver cancer. *Inhibition of histone methyltransferase G9a as a promising new target for the treatment of liver cancer*

Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2000) Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Molecular cell* **6**: 233-244

Lu J, Webb R, Richardson JA, Olson EN (1999) MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 552-557

Mal A, Harter ML (2003) MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1735-1739

Mal A, Sturniolo M, Schiltz RL, Ghosh MK, Harter ML (2001) A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *The EMBO journal* **20**: 1739-1753

Mal AK (2006) Histone methyltransferase Suv39h1 represses MyoD-stimulated myogenic differentiation. *The EMBO journal* **25**: 3323-3334

Martin C, Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 838-849

Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *The Journal of cell biology* **103**: 571-579

Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* **464**: 927-931

Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* **327**: 213-216

McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**: 106-111

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002) Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 763-772

Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436-439

Mis J, Ner SS, Grigliatti TA (2006) Identification of three histone methyltransferases in Drosophila: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing. *Molecular genetics and genomics* : *MGG* **275**: 513-526

Mittnacht S (1998) Control of pRB phosphorylation. *Current opinion in genetics & development* **8**: 21-27

Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**: 1125-1136

Morettini S, Podhraski V, Lusser A (2008) ATP-dependent chromatin remodeling enzymes and their various roles in cell cycle control. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 5522-5532

Morrison AJ, Shen X (2009) Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 373-384

Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**: 197-208

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

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**: 537-544

Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (2011) Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews Cancer* **11**: 558-572

Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, Fraser P (2008) The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science (New York, NY)* **322**: 1717-1720

Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature cell biology* **8**: 278-284

Nan X, Meehan RR, Bird A (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic acids research* **21**: 4886-4892

Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & development* **20**: 966-976

Nechemia-Arbely Y, Fachinetti D, Cleveland DW (2012) Replicating centromeric chromatin: spatial and temporal control of CENP-A assembly. *Experimental cell research* **318**: 1353-1360

Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* **11**: 709-719

Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561-565

Nishio H, Walsh MJ (2004) CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11257-11262

Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Sunil Rao J, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillespie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van Meter T, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD (2009) Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature genetics* **41**: 465-472

Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in genetics : TIG* **20**: 214-220

Nurse P (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**: 547-550

O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Schweizer D, Jenuwein T (2000) Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Molecular and cellular biology* **20**: 9423-9433

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

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257

Okitsu CY, Hsieh JC, Hsieh CL (2010) Transcriptional activity affects the H3K4me3 level and distribution in the coding region. *Molecular and cellular biology* **30**: 2933-2946

Olsen CA (2012) Expansion of the lysine acylation landscape. *Angewandte Chemie (International ed in English)* **51**: 3755-3756

Ontell M, Kozeka K (1984) The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *The American journal of anatomy* **171**: 133-148

Osley MA, Tsukuda T, Nickoloff JA (2007) ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mutation research* **618**: 65-80

Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 9630-9645

Palacios D, Puri PL (2006) The epigenetic network regulating muscle development and regeneration. *Journal of cellular physiology* **207**: 1-11

Pekowska A, Benoukraf T, Ferrier P, Spicuglia S (2010) A unique H3K4me2 profile marks tissue-specific gene regulation. *Genome research* **20**: 1493-1502

Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ballestar E, Munoz-Canoves P (2009) Epigenetic regulation of myogenesis. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **4**: 541-550

Perry RL, Rudnick MA (2000) Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **5**: D750-767

Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell* **12**: 1577-1589

Peters AH, 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, Jenuwein T (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**: 323-337

Phillips DM (1963) The presence of acetyl groups of histones. *The Biochemical journal* **87**: 258-263

Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritzsche C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M, Son J, Reinberg D, Lachner M, Jenuwein T (2012) Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* **150**: 948-960

Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science (New York, NY)* **300**: 131-135

Polesskaya A, Duquet A, Naguibneva I, Weise C, Vervisch A, Bengal E, Hucho F, Robin P, Harel-Bellan A (2000) CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation. *The Journal of biological chemistry* **275**: 34359-34364

Pourquie O, Fan CM, Coltey M, Hirsinger E, Watanabe Y, Breant C, Francis-West P, Brickell P, Tessier-Lavigne M, Le Douarin NM (1996) Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* **84**: 461-471

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 33002-33010

Prigent C, Dimitrov S (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of cell science* **116**: 3677-3685

Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero

M (1997a) p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *The EMBO journal* **16**: 369-383

Puri PL, Iezzi S, Stiegler P, Chen TT, Schiltz RL, Muscat GE, Giordano A, Kedes L, Wang JY, Sartorelli V (2001) Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Molecular cell* **8**: 885-897

Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JY, Graessmann A, Nakatani Y, Levrero M (1997b) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Molecular cell* **1**: 35-45

Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes & development* **7**: 1559-1571

Rai K, Nadauld LD, Chidester S, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA (2006) Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Molecular and cellular biology* **26**: 7077-7085

Rao SS, Chu C, Kohtz DS (1994) Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Molecular and cellular biology* **14**: 5259-5267

Rathert P, Dhayalan A, Ma H, Jeltsch A (2008) Specificity of protein lysine methyltransferases and methods for detection of lysine methylation of non-histone proteins. *Molecular bioSystems* **4**: 1186-1190

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599

Reik W, Dean W (2001) DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* **22**: 2838-2843

Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, Dorr JR, Tabor V, Aichele P, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2010) Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer cell* **17**: 262-272

Rhodes SJ, Konieczny SF (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & development* **3**: 2050-2061

Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Molecular cell* **12**: 1591-1598

Rivera Vargas T, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvellier S, Pinna G, Polesskaya A (2013) Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene*

Roberts CW, Orkin SH (2004) The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nature*

reviews *Cancer* **4**: 133-142

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature genetics* **25**: 338-342

Rodriguez-Paredes M, Martinez de Paz A, Simo-Riudalbas L, Sayols S, Moutinho C, Moran S, Villanueva A, Vazquez-Cedeira M, Lazo PA, Carneiro F, Moura CS, Vieira J, Teixeira MR, Esteller M (2013) Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene*

Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley TJ, Morrison JF (2004) Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell* **14**: 727-738

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**: 383-390

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**: 1351-1359

Ryu H, Lee J, Hagerty SW, Soh BY, McAlpin SE, Cormier KA, Smith KM, Ferrante RJ (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19176-19181

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development* **12**: 2831-2841

Sampath SC, Marazzi I, Yap KL, Sampath SC, Krutchinsky AN, Mecklenbrauker I, Viale A, Rudensky E, Zhou MM, Chait BT, Tarakhovskiy A (2007) Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Molecular cell* **27**: 596-608

Santos-Rosa H, Caldas C (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **41**: 2381-2402

Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsov N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2003) Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular cell* **12**: 1325-1332

Sartorelli V, Caretti G (2005) Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Current opinion in genetics & development* **15**: 528-535

Sartorelli V, Huang J, Hamamori Y, Kedes L (1997) Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Molecular and cellular biology* **17**: 1010-1026

Sartorelli V, Puri PL, Hamamori Y, Ogryzko V, Chung G, Nakatani Y, Wang JY, Kedes

L (1999) Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Molecular cell* **4**: 725-734

Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002) Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO journal* **21**: 1121-1131

Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & development* **16**: 919-932

Seenundun S, Rampalli S, Liu QC, Aziz A, Palii C, Hong S, Blais A, Brand M, Ge K, Dilworth FJ. 2010. UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J.* 21;29(8):1401-11.

Seum C, Reo E, Peng H, Rauscher FJ, 3rd, Spierer P, Bontron S (2007) Drosophila SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS genetics* **3**: e76

Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**: 27-36

Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-555

Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development* **9**: 1149-1163

Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**: 1501-1512

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953

Shi YG, Tsukada Y (2013) The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**

Shinkai Y, Tachibana M (2011) H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev* **25**: 781-788

Simone C, Stiegler P, Forcales SV, Bagella L, De Luca A, Sartorelli V, Giordano A, Puri PL (2004) Deacetylase recruitment by the C/H3 domain of the acetyltransferase p300. *Oncogene* **23**: 2177-2187

Sims RJ, 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D (2007) Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Molecular cell* **28**: 665-676

Singh P, Cho J, Tsai SY, Rivas GE, Larson GP, Szabo PE (2010) Coordinated allele-

specific histone acetylation at the differentially methylated regions of imprinted genes. *Nucleic acids research* **38**: 7974-7990

Skapek SX, Rhee J, Kim PS, Novitch BG, Lassar AB (1996) Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Molecular and cellular biology* **16**: 7043-7053

Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB (1995) Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science (New York, NY)* **267**: 1022-1024

Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO (2002) Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Current biology : CB* **12**: 2159-2166

Solomon V, Goldberg AL (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* **271**: 26690-26697

Son HJ, Kim JY, Hahn Y, Seo SB (2012) Negative regulation of JAK2 by H3K9 methyltransferase G9a in leukemia. *Molecular and cellular biology* **32**: 3681-3694

Song A, Wang Q, Goebel MG, Harrington MA (1998) Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Molecular and cellular biology* **18**: 4994-4999

Spadaccini R, Perrin H, Bottomley MJ, Ansieau S, Sattler M (2006) Structure and functional analysis of the MYND domain. *Journal of molecular biology* **358**: 498-508

Spinella MJ, Freemantle SJ, Sekula D, Chang JH, Christie AJ, Dmitrovsky E (1999) Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 22013-22018

Stabell M, Eskeland R, Bjorkmo M, Larsson J, Aalen RB, Imhof A, Lambertsson A (2006) The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic acids research* **34**: 4609-4621

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45

Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**: 1213-1226

Suva ML, Riggi N, Bernstein BE (2013) Epigenetic reprogramming in cancer. *Science (New York, NY)* **339**: 1567-1570

Szasz J, Yaffe MB, Sternlicht H (1993) Site-directed mutagenesis of alpha-tubulin. Reductive methylation studies of the Lys 394 region. *Biophysical journal* **64**: 792-802

Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G (2011) The double face of the histone variant

H3.3. *Cell research* **21**: 421-434

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* **27**: 2681-2690

Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y (2007) Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO journal* **26**: 3346-3359

Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* **276**: 25309-25317

Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* **16**: 1779-1791

Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y (2005) Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* **19**: 815-826

Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**: 51-61

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M (1997) Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* **89**: 127-138

Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**: 1016-1028

Tapscott SJ, Davis RL, Lassar AB, Weintraub H (1990) MyoD: a regulatory gene of skeletal myogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* **280**: 3-5; discussion 5-6

Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB (1988) MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science (New York, NY)* **242**: 405-411

Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefevbre C, Callanan M, Sardet C, Julien E (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature cell biology* **12**: 1086-1093

Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature*

structural & molecular biology **14**: 1025-1040

Taya Y (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends in biochemical sciences* **22**: 14-17

Taylor SM, Jones PA (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* **17**: 771-779

Timmers HT, Tora L (2005) SAGA unveiled. *Trends in biochemical sciences* **30**: 7-10

Tintignac LA, Leibovitch MP, Kitzmann M, Fernandez A, Ducommun B, Meijer L, Leibovitch SA (2000) Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Experimental cell research* **259**: 300-307

Toyoda M, Shirato H, Nakajima K, Kojima M, Takahashi M, Kubota M, Suzuki-Migishima R, Motegi Y, Yokoyama M, Takeuchi T (2003) jumonji downregulates cardiac cell proliferation by repressing cyclin D1 expression. *Dev Cell* **5**: 85-97

Trojer P, Zhang J, Yonezawa M, Schmidt A, Zheng H, Jenuwein T, Reinberg D (2009) Dynamic Histone H1 Isozyme 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *The Journal of biological chemistry* **284**: 8395-8405

Tsukiyama T (2002) The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 422-429

Tucker KL (2001) Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience. *Neuron* **30**: 649-652

Ueda J, Tachibana M, Ikura T, Shinkai Y (2006) Zinc finger protein Wiz links G9a/GLP histone methyltransferases to the co-repressor molecule CtBP. *The Journal of biological chemistry* **281**: 20120-20128

Upadhyay AK, Cheng X (2011) Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* **67**: 107-124

Vajen B, Modlich U, Schienke A, Wolf S, Skawran B, Hofmann W, Busche G, Kreipe H, Baum C, Santos-Barriopedro I, Vaquero A, Schlegelberger B, Rudolph C (2013) Histone methyltransferase Suv39h1 deficiency prevents Myc-induced chromosomal instability in murine myeloid leukemias. *Genes, chromosomes & cancer* **52**: 423-430

Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular cell* **19**: 381-391

Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA (2006) Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Molecular and cellular biology* **26**: 9185-9195

Vandel L, Nicolas E, Vaute O, Ferreira R, Ait-Si-Ali S, Trouche D (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Molecular and cellular biology* **21**: 6484-6494

van Oevelen C, Wang J, Asp P, Yan Q, Kaelin WG Jr, Kluger Y, Dynlacht BD. 2008. A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing. *Mol Cell*. 7;32(3):359-70.

Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH (1995) Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *The Journal of Cell Biology* **128**: 563-576

Verrier L, Vandromme M, Trouche D. 2011. Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biol Cell*. 2011 103(8):381-401.

Volkel P, Angrand PO (2007) The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**: 1-20

Wagschal A, Sutherland HG, Woodfine K, Henckel A, Chebli K, Schulz R, Oakey RJ, Bickmore WA, Feil R (2008) G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. *Molecular and cellular biology* **28**: 1104-1113

Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN (2001) The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development (Cambridge, England)* **128**: 4623-4633

Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG, Zhang Y (2003) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Molecular cell* **12**: 475-487

Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC (2008a) NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer cell* **14**: 369-381

Wang J, Abate-Shen C (2012) The MSX1 homeoprotein recruits G9a methyltransferase to repressed target genes in myoblast cells. *PloS one* **7**: e37647

Wang L, Pal S, Sif S (2008b) Protein Arginine Methyltransferase 5 Suppresses the Transcription of the RB Family of Tumor Suppressors in Leukemia and Lymphoma Cells □ †. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 6262-6277

Wang Y, Jia S (2009) Degrees make all the difference: the multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **4**: 273-276

Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science (New York, NY)* **306**: 279-283

Wang Z, Schones DE, Zhao K (2009) Characterization of human epigenomes. *Current opinion in genetics & development* **19**: 127-134

Watanabe H, Soejima K, Yasuda H, Kawada I, Nakachi I, Yoda S, Naoki K, Ishizaka A (2008) Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer cell international* **8**: 15

Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development* **2**: 1136-1143

Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5434-5438

Weiss T, Hergeth S, Zeissler U, Izzo A, Tropberger P, Zee BM, Dundr M, Garcia BA, Daujat S, Schneider R (2010) Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D. *Epigenetics & chromatin* **3**: 7

Wiedemann SM, Mildner SN, Bonisch C, Israel L, Maiser A, Matheisl S, Straub T, Merkl R, Leonhardt H, Kremmer E, Schermelleh L, Hake SB (2010) Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *The Journal of Cell Biology* **190**: 777-791

Winder SJ, Lipscomb L, Angela Parkin C, Juusola M (2011) The proteasomal inhibitor MG132 prevents muscular dystrophy in zebrafish. *PLoS currents* **3**: Rrn1286

Workman JL, Kingston RE (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry* **67**: 545-579

Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW (2007) 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 dimethylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* **26**: 77-90

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**: 607-617

Wu H, Chen X, Xiong J, Li Y, Li H, Ding X, Liu S, Chen S, Gao S, Zhu B (2011) Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell Res* **21**: 365-367

Wu H, Min J, Lunin VV, Antoshenko T, Dombrovski L, Zeng H, Allali-Hassani A, Campagna-Slater V, Vedadi M, Arrowsmith CH, Plotnikov AN, Schapira M (2010) Structural biology of human H3K9 methyltransferases. *PLoS one* **5**: e8570

Xin Z, Tachibana M, Guggiari M, Heard E, Shinkai Y, Wagstaff J (2003) Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *The Journal of biological chemistry* **278**: 14996-15000

- Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**: 725-727
- Yang H, Mizzen CA (2009) The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **87**: 151-161
- Yang XJ, Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**: 5310-5318
- Yang XJ, Seto E (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Molecular cell* **31**: 449-461
- Yeap LS, Hayashi K, Surani MA (2009) ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophoblast lineage. *Epigenetics & chromatin* **2**: 12
- Yokochi T, Poduch K, Ryba T, Lu J, Hiratani I, Tachibana M, Shinkai Y, Gilbert DM (2009) G9a selectively represses a class of late-replicating genes at the nuclear periphery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19363-19368
- Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B (1992) Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes & development* **6**: 1783-1798
- Yuan Y, Tang AJ, Castoreno AB, Kuo SY, Wang Q, Kuballa P, Xavier R, Shamji AF, Schreiber SL, Wagner BK (2013) Gossypol and an HMT G9a inhibitor act in synergy to induce cell death in pancreatic cancer cells. *Cell death & disease* **4**: e690
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *The Journal of biological chemistry* **277**: 43474-43480
- Zeng W, de Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, Winokur ST, Pyle A, Robertson KD, Schmiesing JA, Kimonis VE, Balog J, Frants RR, Ball AR, Jr., Lock LF, Donovan PJ, van der Maarel SM, Yokomori K (2009) Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS genetics* **5**: e1000559
- Zentner GE, Henikoff S (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 259-266
- Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN (2002) Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Molecular and cellular biology* **22**: 7302-7312
- Zhang JM, Wei Q, Zhao X, Paterson BM (1999) Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *The EMBO journal* **18**: 926-933
- Zhang X, Zhao M, Huang AY, Fei Z, Zhang W, Wang XL (2005) The effect of cyclin

D expression on cell proliferation in human gliomas. *J Clin Neurosci* **12**: 166-168

Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & development* **17**: 2733-2740

Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO journal* **22**: 1168-1179

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* **15**: 2343-2360

Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2005) Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular cell* **20**: 601-611

Zou Y, Ewton DZ, Deng X, Mercer SE, Friedman E (2004) Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *The Journal of biological chemistry* **279**: 27790-27798

ANNEXES

SPOC1 modulates DNA repair by regulating key determinants of chromatin compaction and DNA damage response

Andreas Mund¹, Tobias Schubert¹, Hannah Staeger¹, Sarah Kinkley¹, Kerstin Reumann¹, Malte Kriegs², Lauriane Fritsch³, Valentine Battisti³, Slimane Ait-Si-Ali³, Anne-Sophie Hoffbeck⁴, Evi Soutoglou⁴ and Hans Will^{1,*}

¹Heinrich-Pette-Institute, Leibniz-Institute for Experimental Virology, Department of General Virology, Martinistrasse 52, 20251 Hamburg, ²University Medical Center Hamburg, Clinic and Policlinic of Radiation Biology and Experimental Radiooncology, Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiooncology, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany, ³University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Epigénétique et Destin Cellulaire, UMR7216, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, 35 rue Hélène Brion, F-75013 Paris and ⁴Department of Cancer Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR 7104, INSERM U 596, Centre Universitaire de Strasbourg, 67404 Illkirch CEDEX, France

Received March 23, 2011; Revised August 24, 2012; Accepted August 29, 2012

ABSTRACT

Survival time-associated plant homeodomain (PHD) finger protein in Ovarian Cancer 1 (SPOC1, also known as PHF13) is known to modulate chromatin structure and is essential for testicular stem-cell differentiation. Here we show that SPOC1 is recruited to DNA double-strand breaks (DSBs) in an ATM-dependent manner. Moreover, SPOC1 localizes at endogenous repair foci, including OPT domains and accumulates at large DSB repair foci characteristic for delayed repair at heterochromatic sites. SPOC1 depletion enhances the kinetics of ionizing radiation-induced foci (IRIF) formation after γ -irradiation (γ -IR), non-homologous end-joining (NHEJ) repair activity, and cellular radioresistance, but impairs homologous recombination (HR) repair. Conversely, SPOC1 overexpression delays IRIF formation and γ H2AX expansion, reduces NHEJ repair activity and enhances cellular radiosensitivity. SPOC1 mediates dose-dependent changes in chromatin association of DNA compaction factors KAP-1, HP1- α and H3K9 methyltransferases (KMT) GLP, G9A and SETDB1. In addition, SPOC1 interacts with KAP-1 and H3K9 KMTs, inhibits KAP-1 phosphorylation and enhances H3K9 trimethylation. These findings provide the first evidence for a

function of SPOC1 in DNA damage response (DDR) and repair. SPOC1 acts as a modulator of repair kinetics and choice of pathways. This involves its dose-dependent effects on DNA damage sensors, repair mediators and key regulators of chromatin structure.

INTRODUCTION

Elevated SPOC1 RNA levels of the human *SPOC1* gene are associated with unresectable carcinomas and shorter survival in ovarian cancer patients, implicating a possible role in oncogenesis (1). The SPOC1 protein was recently also demonstrated to function in chromatin condensation and decondensation (2). The ability of SPOC1 to associate with, and structurally alter chromatin depends on its plant homeodomain (PHD) (2), predicted to bind to H3K4me2/3 (3). In a mouse *SPOC1* knockout model, SPOC1 protein expression was also recently shown to be indispensable for testis stem-cell differentiation and sustained spermatogenesis (4). These findings imply that SPOC1 plays a role in stem-cell maintenance, chromatin structure, and presumably also in oncogenesis. Considering these data and published evidence that chromatin structure plays a crucial role in radiosensitivity, DNA repair and mutation rates in cancer cells (5), we wanted to examine whether SPOC1 also has an impact on DNA damage response (DDR) and DNA repair.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 40 4805 1221; Fax: +49 40 4805 1222; Email: hans.will@hpi.uni-hamburg.de
Present address:

Hans Will, Department of General Virology, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz-Institute for Experimental Virology, Martinistr. 52, 20251 Hamburg, Germany.

Upon DNA damage, cells undergo a coordinated cascade of events which can result in DNA repair, which preserves genome stability and is critical in preventing tumorigenesis (6). DNA damage activates the DDR, which in turn induces cell-cycle arrest, and ensuing DNA repair or apoptosis. DDR proteins are hierarchically recruited to DNA damage sites and can be visualized as repair foci. In response to double-strand breaks (DSBs), the histone variant H2AX is phosphorylated (γ H2AX) by the ATM kinase, which then associates with the MRN complex, triggering further chromatin alterations and the focal recruitment of additional DDR mediators, including 53BP1 (7). γ H2AX and 53BP1 play distinct roles in DDR initiation and DNA repair of heterochromatin (8,9).

Two main DDR pathways drive repair of DSBs: homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) (10–12). HR requires a sister chromatid and can precisely repair DSBs primarily in the S phase of the cell cycle (13). In contrast, NHEJ functions throughout the cell cycle and is the main repair pathway for cells in G1 and G2. Since NHEJ does not require a homologous template and is error prone, it is potentially mutagenic (14).

Repair of DNA damage in euchromatin and heterochromatin are divergent due to different accessibility and requirements for DDR proteins. Approximately 10–25% of nuclear DNA is heterochromatic and characterized by H3K9me2/3 epigenetic marks (15,16). Recruitment of corepressors such as KAP-1 and the H3K9 KMTs (SUV39H1, SETDB1, G9A and GLP) to chromatin promotes its compaction by increasing histone H3K9 di and trimethylation, thereby potentiating the binding of chromodomain (CD) containing condensing ‘mediators’ such as HP1 (17,18).

In the event of DNA damage, the DNA repair machinery must overcome the physical barrier of heterochromatin (19–22). To achieve this, histones and chromatin-affiliated proteins are specifically post-translationally modified; then ATP-dependent chromatin remodeling factors are engaged to unwind the chromatin locally and facilitate access to the damaged DNA (6,23). For instance, regulation of H3K9me3 levels by several KMTs is intimately linked to the activation of ATM via TIP60-mediated acetylation at DSBs, a key process in coordinating DNA repair pathways (24). ATM helps locally to overcome the barrier to DDR signaling posed by heterochromatin by enhancing γ H2AX expansion at repair foci, as shown with cells deficient in several heterochromatin components (25). This study also showed that heterochromatin has a substantial impact on the magnitude of ATM signaling and contributes to an inefficient G2/M checkpoint response.

Modulation of chromatin structure is a fundamental feature of DDR and DNA repair pathways (21,22). The heterochromatin building factors, KAP-1 and HP1, which are linked to H3K9 methylation, are important for, and affected by the DDR (26–28). After γ -IR, KAP-1 is phosphorylated at Ser824 by ATM, promoting chromatin decondensation at repair sites and enhancing cellular survival (29). It was previously demonstrated that

phosphorylated KAP-1 (pKAP-1) is essential for repairing heterochromatin DSBs (9,30). Likewise, HP1 proteins are also phosphorylated in response to DNA damage, and appear important for recruiting DDR factors and dynamically reorganizing chromatin (27,31). Recently, HP1- α was shown to regulate KAP-1’s phosphorylation and accumulation at repair foci (32), linking both proteins to chromatin structural changes during DNA repair in heterochromatin.

Here we show that SPOC1 modulates DDR, NHEJ and HR repair pathways, and influences the radiosensitivity of cells by alternating key determinants of chromatin structure and interacting with DDR modifiers. Thus our data identify SPOC1 as a novel player in DDR and argue for its involvement in cancer development.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

U2OS, U2OS DR-GFP, U2OS19 ptight13 GFP-LacR, HEK293, CV1 cells, HeLa-S3 and C2C12 myoblasts were cultured according to the supplier’s instructions or as described previously (33–35).

SPOC1 inducible CV1 cell lines were generated with the Tet-On system (Invitrogen) by cotransfecting pcDNA6/TR Tet-repressor and pcDNA4-TO-FLAG-SPOC1-expression plasmids. Cells were selected with 300 μ g/ml zeocin and 1.8 μ g/ml blasticidine (Invitrogen) before isolating single colonies. FLAG-SPOC1 expression was induced with 1 μ g/ml doxycycline (Dox, Sigma). All cells were γ -irradiated with 2 Gy, unless indicated otherwise, using a 137 Cs source.

Polyclonal HeLa-S3 cell lines stably expressing either FLAG-HA-tagged SETDB1 or pREV control vector (33) were analyzed before and after superinfection with lentiviruses (LeGO-iG2) expressing human SPOC1 wt or a PHD domain mutant (M246A+W255A). Detailed protocols for LeGO vector production and titration are reported elsewhere (36).

Plasmids

Expression constructs for human SPOC1, SPOC1 mutants lacking amino acids 21–70 (Δ N), mutated in the PHD domain (M246A+W255A), or N-terminally FLAG-tagged SPOC1 constructs were generated in the pcDNA4-TO vector (Invitrogen). GST-fusion proteins for human SPOC1 full-length fragments, and deletion derivatives were produced with vector pGEX4T3 (GE Healthcare) in *Escherichia coli*. For the LUMIER assay, cDNAs for human SPOC1 and KAP-1 full-length and fragments were subcloned into pTREX-dest30nt-PrA (N-terminal protein A tag fusion) and/or pcDNA3-RL GW (N-terminal renilla luciferase fusion), provided by M. Koegel, DKFZ, Heidelberg.

siRNA-mediated knockdown

CV1 cells were transfected with 100 nM SPOC1-specific siRNA (5'-UCACCUGUCCUGUGCGAAA-3') or control siRNA (5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUG-3')

as described before (2) using Rotifect plus (Roth) and subsequently γ -irradiated.

Drug treatments

Cells were treated with 100 ng/ml neocarzinostatin (NCS) (Sigma) for 15 min and afterwards cells were washed 2× with PBS and fixed at indicated time points. ATM inhibitor (KU55933) (37) (Tocris) was used at 20 μ M.

Antibodies

Indirect immunofluorescence and immunoblotting were performed using antibodies to γ H2AX (05-636; Millipore), 53BP1 (NB100-304; Novus), β -actin (A-5441; Sigma), ATM (1549-1, Epitomics), pATM-S1981 (2152-1; Epitomics), Chk2 (sc-56297; Santa Cruz), pChk2-T68 (2661; Cell signaling), CtIP (D4) (sc-271339; Sigma), FLAG (F1804; Sigma), G9A (D141-3; Clinisciences), G9A (A300-933A; Bethyl), GAPDH (sc-32233; Santa Cruz), GLP (PP-B0422-00; R&D Systems), GLP (Bethyl; A301-642A), H3 (1326-1; Epitomics), H3K9me3 (07-442; Upstate), HP1- α (05-689; Upstate), HP1- β (ab10811; Abcam), HP1- γ (ab10817; Abcam), Tif1- β /KAP-1 (MAB3662; Millipore), pKAP-1-S824 (A300-767A-1; Bethyl), SETDB1 (ab12317; Abcam), SETDB1 (A300-121A; Bethyl), SUV39H1 (05-615; Upstate), SUV39H1 (07-550; Upstate). SPOC1 was detected with 6F6 rat monoclonal antibody (2) unless stated otherwise. Rabbit polyclonal anti-SPOC1 (CR56) was raised against amino acids 286–300 of human SPOC1 and rat monoclonal anti-SPOC1 (1D3) was raised against human SPOC1 fused to GST.

Proliferation assay

CV1 cells and three different FLAG-SPOC1 (#14, #17, #23) expressing cell lines were seeded at a concentration of 2×10^5 cells per 6-cm dish at Day 0. FLAG-SPOC1 cells were induced with Dox (1 μ g/ml) or treated with ethanol on Day 0, which was replenished every 3 days. The cells were counted every 2–3 days in triplicates and cultivated over a period of 9 days.

Extraction protocol, immunoblotting and immunoprecipitation

SPOC1 protein was extracted from cell pellets using either (i) a sodium dodecyl sulfate (SDS) total-cell lysate extraction buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS and 10% glycerol) or (ii) a fractionated lysate protocol. (i) In brief, the cell pellet (1×10^7 cells) was resuspended in 100 μ l of SDS total-cell lysis buffer supplemented with 1× protease inhibitor cocktail (EDTA-free complete, Roche), 1 mM NaF (Sigma), 1 mM NaVO₃ (Sigma) and 1 mM PMSF (Calbiochem), heated at 99°C for 5 min, supplemented with Laemmli buffer and then reheated for an additional 5 min at 99°C before loading on a SDS-PAGE. (ii) The fractionated lysate protocol was performed as follows: soluble cellular proteins from $\sim 1 \times 10^7$ cells were extracted with 100 μ l of E1A buffer [150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.1% NP-40 supplemented with 5 mM NaF, 5 μ g/ml Trasylol[®] (Aprotinin), 250 μ g/ml

Pefablock[®] SC, 1 mM NaVO₃, 1× PhosSTOP (Roche) and 1× complete (EDTA-free, Roche)] for 25 min on ice and were then centrifuged (15 min, 16 100g, 4°C). Chromatin-associated proteins were extracted from the remaining pellet in 100 μ l of a chromatin extraction buffer [0.4 M NaCl, 50 mM HEPES, 1% Triton[®] X-100, 0.1% NP-40, 2.5 mM MgCl₂, 25 U of Benzonase (Novagen)] supplemented with 5 mM NaF, 5 μ g/ml Trasylol[®] (Aprotinin), 250 μ g/ml Pefablock[®] SC, 1 mM NaVO₃, 1× PhosSTOP (Roche) and 1× complete (EDTA-free, Roche) for 25 min on ice and were then centrifuged (15 min, 16 100g, 4°C). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting were performed using standard protocols. Immunoblot signals were quantified by densitometry using ImageQuant LAS4000 and the ImageQuant TL Software or by using the ImageJ Software. Nuclear extracts used for immunoprecipitation of H3K9 KMTase complexes shown in Supplementary Figure S6 were prepared as described above, except that before use, we added Turbo DNase buffer and preheated for 1 min at 37°C before treating with 1.7 KU/ μ l Turbo DNase I (Ambion) for 20 min at 37°C (repeated twice). Finally we incubated the nuclear extract with 0.06 μ g/ μ l RNase (Sigma) for 15 min on ice. Alternatively, the extract were preheated the samples for 1 min at 37°C in the presence of 1 mM CaCl₂ and then treated with 0.0125 U/ μ l MNase at 37°C for 15 min. With 4 mM EDTA the MNase digestion was stopped and the extract incubated with or without 1% ethidium bromide (Etbr) on ice before use. Nuclear extracts were subjected to either G9A complex purification or used for immunoprecipitation of the endogenous SPOC1 protein, essentially as described (33).

Immunofluorescence and ionizing radiation-induced foci quantification

Cell lines were fixed and immunostained as described before (2). In γ -irradiated cells the number of ionizing radiation-induced foci (IRIF) per cell was determined by automated high-content imaging (700–1000 cells/timepoint, BD Pathway 855 Bioimager) using the BD AttoVision-Software v1.6.

DNA DSB repair reporter assay

H1299.EJ, H1299.GC and U2OS DR-GFP reporter cells were used to measure NHEJ and HR repair as described (35,38–41). For SPOC1 depletion, cells were cotransfected with 100 nM control or SPOC1-specific siRNA and 2 μ g pDsRed-I-SceI-GR. For SPOC1 overexpression, 1 μ g of pcDNA4/TO-SPOC1, SPOC1 M246A/W255A or SPOC1 Δ NTD expression plasmid was cotransfected with 1 μ g pDsRed-I-SceI-GR. 24 h after transfection, I-SceI site-specific DSBs were induced by addition of 100 ng/ml triamcinolone acetonide (TA, Sigma) and cells were harvested 24 h (NHEJ) or 48 h (HR) thereafter. The number of DNA repair indicating GFP positive cells were determined by FACS (FACScan, BD Biosciences) and normalized to the fraction of pDsRed-I-SceI-GR positive cells. For additional controls performed see Supplementary Information.

Comet assay

The Comet assay was performed as described previously (42). SPOC1 knockdown cells and two different FLAG-SPOC1 (#17, #23) expressing cell lines were irradiated with 2 Gy on ice and harvested immediately. The olive tail moment was measured with the Comet analysis software VisComet 4.0 (Impuls Bildanalyse GmbH). Sixty comets were scored for each treated sample.

LUMIER assay

The LUMIER assay was performed as described (43). In brief, the indicated KAP-1 and SPOC1 sequences fused to either protein A or luciferase were expressed in HEK293 cells. Protein A fusion proteins were purified from cell lysates, mixed with sheep anti-rabbit IgG-coated magnetic beads (Dynabeads M280, Invitrogen). Luciferase activity of copurified luciferase-tagged proteins was measured in four lysates and the corresponding washed beads. Lysates from cells expressing the luciferase fusion protein and a protein A dimer served as negative controls (nc). Normalized interaction signals were calculated $\text{Log}(\text{bound})/\text{log}(\text{input}) - \text{log}(\text{bound nc})/\text{log}(\text{input nc})$ and z-transformed by subtracting the mean and dividing by the standard deviation. The mean and standard deviation were calculated from large data sets of protein pairs not expected to interact. Normalized signal to noise ratios were calculated as $(\text{bound}/\text{input})/(\text{bound nc}/\text{input nc})$ (44).

GST pull-down

U2OS cells were lysed for 10 min with buffer 1 [150 mM NaCl, 25 mM HEPES, 2.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 5 mM NaF, 250 µg/ml Pefablock[®] SC, 1 mM NaVO₃ and 1× protease inhibitor cocktail (Roche)] and centrifuged at 16000g at 4°C for 10 min. The supernatant was discarded and pellets were lysed for 30 min in ice-cold buffer 2 (150 mM NaCl, 25 mM HEPES, 2.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 250 µg/ml Pefablock[®] SC and 1× Complete)+25–50 units benzonase (Novagen) and cleared by centrifugation at 16000g at 4°C for 10 min. Cell lysates were incubated with recombinant GST-fusion proteins produced in *E. coli* and bound to glutathione-S-transferase beads for 1–2 h at 4°C under rotation. Beads were washed three times with PBS and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Histone methylation assay

Histone methylation assay was monitored as previously described (33). Briefly, immunoprecipitated material was incubated with 5 µg of core histones (ref. 13-107, Upstate) and 1.5 µCi of Adenosyl-L-Methionine, S-[methyl-3H] (ref. NET155050UC, PerkinElmer) in a buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM DTT and protease inhibitors (reaction volume 30 µl). The mixture was incubated 1 h at 30°C followed by SDS-PAGE analysis. The gel was stained by SimplyBlue kit (Invitrogen), and analyzed by autoradiography. IP efficiency was monitored by immunoblot (IB).

Clonogenic survival assays

CV1 cells transfected with control or SPOC1-specific siRNA for 24 h and uninduced CV1 FLAG-SPOC1 cell lines were γ -irradiated with 0, 2, 4, 6 and 8 Gy. Cells were plated at different concentrations (125–1000 cells/6-cm plate) in triplicate and grown for 9–12 days. Colonies were fixed with methanol, stained with Giemsa (Merck) and counted.

Statistical tests

Data significance was determined using an unpaired two tailed Student's *t*-test.

RESULTS

SPOC1 is recruited to DSBs

To determine whether SPOC1 is specifically recruited to DSBs, we used the reporter cell line U2OS19 ptight13 GFPlacR, which carries a stably integrated lac-operator array upstream of a I-SceI restriction site followed downstream by an array of Dox response elements (34). In addition, this cell line contains two transgenes, one constitutively expressing GFP-LacR, and the other expressing Dox-inducible HA-I-SceI endonuclease in most cells, but due to leaky expression also Dox-independently in a few cells. The I-SceI site is converted into DSBs in most cells after Dox-induced I-SceI endonuclease expression. The GFP-LacR protein binds to lac-operator sequences, forming a single green dot independently of I-SceI restriction site cleavage by the endonuclease (45) (Figure 1A). In these non-treated cells endogenous SPOC1 protein was concentrated at many, but not all endogenous 53BP1-positive repair foci (Figure 1A). Prior to Dox-induced I-SceI expression, SPOC1 did not accumulate at GFP-LacR stained LacO arrays devoid of focal 53BP1 staining (Figure 1A, -I-SceI-). In contrast, 16 h after Dox-induced I-SceI expression SPOC1 localized to a large number of foci double-labeled by GFP-LacR/53BP1 (Figure 1A, +I-SceI-). Determining the frequency of SPOC1 foci accumulation at GFP-LacR/53BP1 double-labeled repair foci before and 16 h after Dox-induced I-SceI-expression revealed an increase from 8% to 40% (Figure 1B). Detailed analysis of the recruitment kinetics showed rather late accumulation of SPOC1 at these foci compared to 53BP1.

We also examined whether ATM kinase activity is required for recruiting SPOC1 to I-SceI-induced DSBs. Inhibition of ATM kinase almost completely reduced SPOC1 recruitment to repair foci 16 h after Dox-induced I-SceI expression (Figure 1D). Next, we examined whether SPOC1 is present at large (2–3 µm) 53BP1 containing domains, also called OPT domains, which occur occasionally in G1 cells (46,47). OPT domains are frequently located at the periphery of nucleoli (48) and carry features of DSBs in condensed chromatin regions (46,47). In fact, in non-treated U2OS cells we observed a small number of discrete 53BP1/SPOC1 positive foci that fulfill the criteria of OPT domains (Figure 1E). Taken together, these data demonstrate that SPOC1 is recruited to I-SceI-induced DSBs in an ATM-dependent manner, as well as to OPT domains that arise at sites of DNA damage.

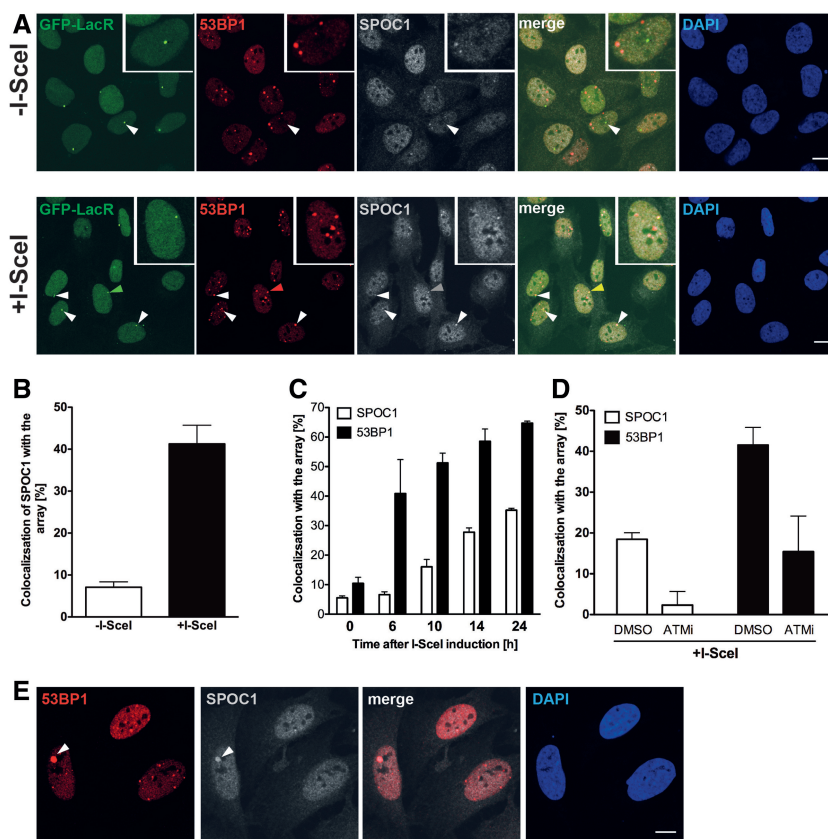


Figure 1. SPOC1 is recruited to I-SceI-induced DSBs where it colocalizes with 53BP1. (A) *In situ* immunofluorescence studies with U2OS19 ptight13 GFP-LacR cells with a stably integrated I-SceI cleavage site flanked by lac operator repeats reveals localization of the GFP-lac repressor protein (GFP-LacR) at the lac-operator DNA sequences in the nucleus before (–I-SceI) and 16 h after I-SceI-induced (+ I-SceI) DSB. In contrast, SPOC1 (white) and 53BP1 (red) are distributed throughout the nucleus in the absence of I-SceI, and partially colocalized in naturally occurring repair foci. After I-SceI cleavage to generate DSBs, SPOC1 and 53BP1 colocalize at distinct foci, including the cleaved DNA adjacent to DNA-bound GFP-LacR. Proteins were visualized by immunostaining and confocal microscopy. Scale bars = 10 μ m. (B) Quantitative analysis of SPOC1 recruitment to the 53BP1 and GFP-LacR positive lacO array before and 16 h after I-SceI induction. (C) Monitoring of the kinetics of SPOC1 and 53BP1 recruitment to DSBs between 0 and 24 h post-I-SceI induction. (D) Quantifying ATM kinase inhibitor-mediated effects on recruitment of SPOC1 and 53BP1 to DSBs as evident 16 h after I-SceI-induced cleavage. (E) SPOC1 and 53BP1 colocalize at a large discrete endogenous repair focus as observed in some non-irradiated U2OS cells by immunostaining. Scale bar = 10 μ m.

Furthermore, using the radiomimetic drug NCS we could show that SPOC1 is recruited to DSBs induced by the drug, although its accumulation at repair foci is rather late compared to 53BP1 (Figure 2). These data and the reported similar repair kinetics of γ -IR- and NCS-induced DSBs (30) provide evidence for SPOC1 accumulation at naturally occurring replication stress-, I-SceI-, radiomimetic drug- and γ -IR-induced repair foci with slow repair kinetics, a well documented feature of DSB repair in highly compacted chromatin regions (28). The findings and the known function of SPOC1 in chromatin compaction/decondensation are consistent with the assumption that SPOC1 contributes to structural changes in chromatin required for repair of DSBs in heterochromatin.

SPOC1-expression levels influence the DDR after γ -irradiation

We next investigated the role of SPOC1 in DDR and repair, and measured the effect of SPOC1 expression on the formation of γ H2AX and 53BP1 foci post- γ -IR with 2 Gy.

Expression of endogenous or exogenous FLAG-tagged SPOC1 in CV1 cell lines was either diminished by specific siRNA (Figure 3A) or induced by Dox (Figure 3B). Thirty minutes post- γ -IR, the number of γ H2AX and 53BP1 foci per cell counted in SPOC1-deficient cells was significantly more than in control cells (Figure 3C and E). At later time points during DNA repair, we detected little difference between numbers of γ H2AX and 53BP1 foci, whereas the repair kinetics were faster (1.5-fold γ H2AX and 1.9-fold 53BP1) between 30 min and 2 h, but not between 8 and 24 h later (Figure 3C and E).

In contrast, SPOC1 overexpression significantly reduced the number of γ H2AX, but not 53BP1 foci (Figure 3B, D and F) 30 min post- γ -IR. Interestingly, the γ H2AX and 53BP1 foci in SPOC1 overexpressing cells decreased, in other words were repaired at a significantly slower rate (3.1-fold γ H2AX and 2.7-fold 53BP1) between 30 min and 24 h post- γ -IR compared to control cells (Figure 3D and F). These findings suggest that increased SPOC1 expression interferes with the kinetics of IRIF formation/disappearance and DNA repair.

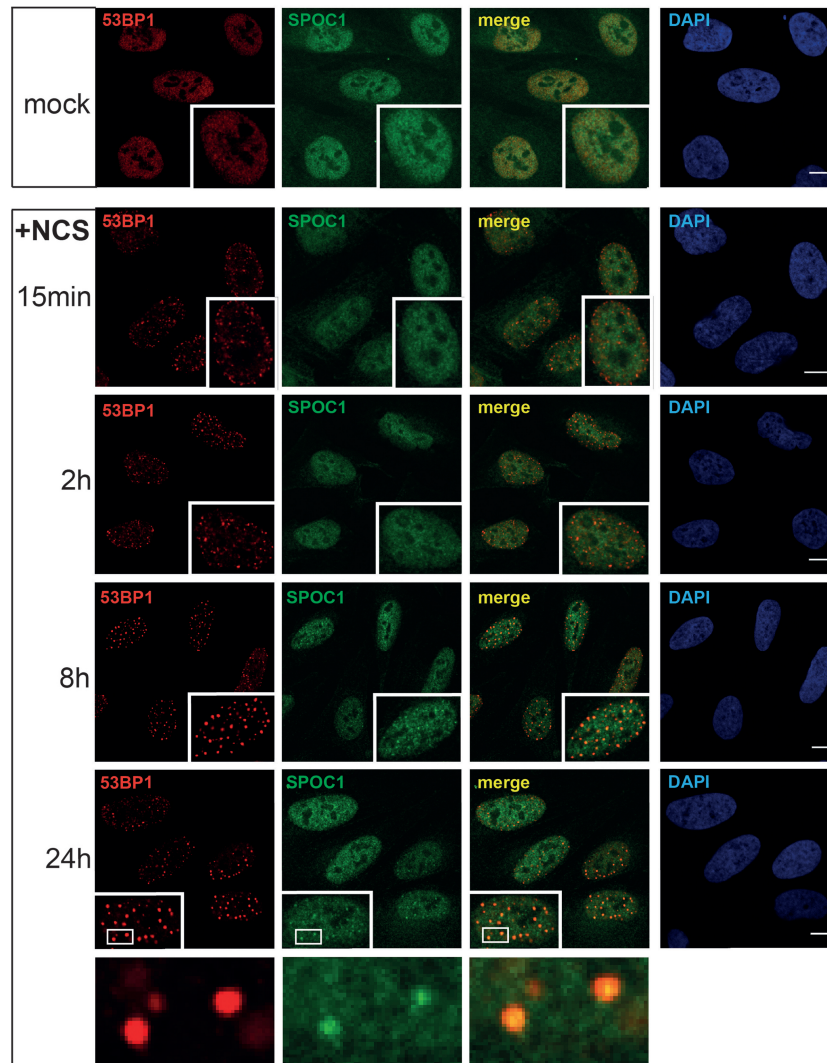


Figure 2. Comparative kinetics of 53BP1 and SPOC1 recruitment to radiomimetic drug NCS-induced DSBs. U2OS cells fixed before (mock) or at the indicated times post-treatment (+NCS), immunostained for SPOC1 (green) and 53BP1 (red) and analyzed by confocal microscopy. At the earliest observation period after NCS treatment (15 min) a large number of small 53BP1 stained DSB repair foci emerged, but were not detectably stained by SPOC1. Between 2 to 24h post-NCS treatment the number of small 53BP1 stained foci gradually, then almost completely disappeared, concomitant with emerging larger repair foci. At around 8h post-NCS treatment most of the large 53BP1-stained repair foci were also strongly stained by SPOC1, suggesting SPOC1 is recruited to and accumulates at DSBs in heterochromatin known for their slow repair kinetics. Scale bars = 10 μ m.

To investigate whether the SPOC1 levels affect the extent of inflicted DNA damage we performed Comet assays using cells immediately after γ -irradiation with 2Gy kept on ice. Neither SPOC1 knockdown nor SPOC1 overexpression revealed significant differences in the initial number of DSB (Supplementary Figure S1A and C). In the context of this experiment we also analyzed by FACS whether altered SPOC1 levels are associated with detectable changes in the cell cycle. We did not see obvious differences between control cells, SPOC1-depleted and SPOC1 overexpressing cells (Supplementary Figure S1B and D). Taken together, up and down-regulation of SPOC1 expression does not alter the radiosensitivity of chromatin but inversely modulates the kinetics of IRIF formation and DNA repair.

SPOC1 inversely affects NHEJ and HR activity

To evaluate which DNA DSB repair pathways SPOC1 influences we used the well-established H1299.EJ (NHEJ) and H1299.GC (HR) reporter cell lines (39,41). Both cell lines contain chromosomally integrated EGFP that is only expressed after I-SceI-mediated cleavage and repair (Supplementary Figure S2). By quantifying *in vivo* EGFP expression, we observed \sim 20% more NHEJ activity after SPOC1 knockdown, but no change in HR activity (Figure 4A and C). In contrast, SPOC1 overexpression in H1299.EJ cells decreased NHEJ activity by 40% compared to control cells, as did a SPOC1 N-terminal domain deletion (Δ N) (Figure 4B). Interestingly, this inhibitory effect was not observed with SPOC1 containing two critical amino acid

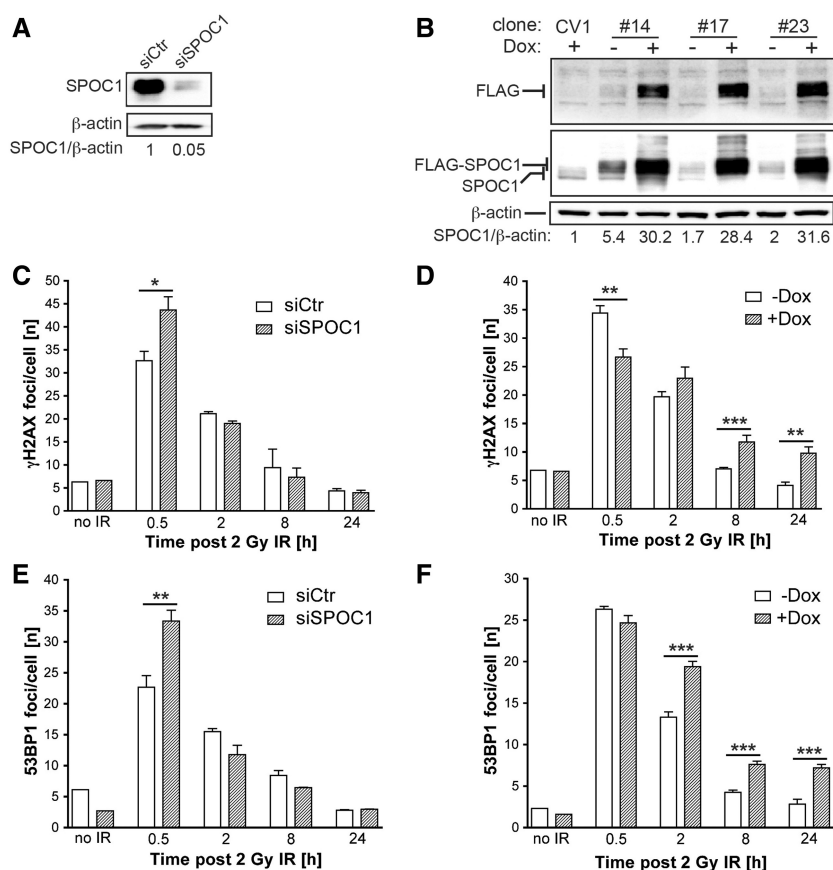


Figure 3. SPOC1 dose-dependent modulation of DDR after γ -IR. SPOC1 expression in CV1 cell lines was determined by immunoblotting cell extracts with the indicated antibodies (Supplementary Information). (A) SPOC1 protein levels 72 h post-siRNA transfection; (B) Endogenous and FLAG-SPOC1 expression in three stably transformed CV1 cell lines (clones #14, #17 and #23) pre- or 24 h post-Dox treatment. Signals were quantified by densitometry. (C–F) IRIF visualized by indirect immunofluorescence of CV1 cells (unpublished observations) were counted by automated imaging at various times after γ -irradiation. (C, E) γ H2AX and 53BP1 foci in CV1 cells 72 h after siRNA-mediated reduction of SPOC1 (siSPOC1) compared to control cells (siCtrl). (D, F) γ H2AX and 53BP1 IRIF in CV1 clone #14 before and after Dox-induced (24 h) expression of FLAG-SPOC1. The IRIF of 700–1000 cells were counted in each of three independent radiation experiments and at different time points, and are represented as the mean/cell \pm SEM. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

mutations in the H3K4me3-binding pocket (PHDmt). The effect of SPOC1 on NHEJ is specific since EGFP-reporter expression was not significantly changed by transfection of H1299.EJ cells with SPOC1-expression vectors or siRNA (Supplementary Figure S3). These data indicate that NHEJ DNA repair activity is modulated by SPOC1 in a dose- and PHD-dependent manner.

In contrast, SPOC1 overexpression strongly suppressed EGFP reporter expression in H1299.GC cells (unpublished observations), making it impossible to evaluate specific effects of SPOC1 overexpression on HR activity in this system. Since we supposed that a SPOC1-mediated effect on HR may be cell context dependent, we also studied this in the well-established and frequently used HR-reporter cell line U2OS DR-GFP (35). Compared to the H1299.GC cell line, this reporter cell line differs in p53 status and the I-SceI chromosomal integration sites and its associated chromatin structure. Using the U2OS DR-GFP cell line we observed $\sim 60\%$ less HR-mediated gene conversion upon SPOC1-depletion. As a positive control we induced siRNA-mediated depletion of CtIP, a protein critical for the initial step of HR (49) (Figure 4D) and

observed that HR activity decreased by $\sim 90\%$. These data and no apparent effect of SPOC1 depletion in the H1299.GC cell line (Figure 4C) indicate a cell context-dependent role of SPOC1 in HR. Combined with the increase of NHEJ induced by SPOC1 knockdown as observed in the NHEJ H1299.EJ reporter cell line, the findings suggest that SPOC1 can shift the balance between NHEJ and HR.

SPOC1 influences radiosensitivity after γ -IR

To clarify the biological relevance of SPOC1-modulated DDR and DSB repair, we analyzed the radiosensitivity of CV1 cells lacking or overexpressing SPOC1 by clonogenic survival assays. CV1 cells with reduced SPOC1 levels formed more colonies than control cells after γ -IR (Figure 5A–C).

In contrast, CV1 cells stably overexpressing SPOC1 protein (clones in Figure 3B) formed fewer colonies after γ -IR (Figure 5D and E). Proliferation of non-irradiated cells depleted for SPOC1 did not significantly differ from control cells, and was marginally slower in cells with enhanced SPOC1 expression (Supplementary Figure S4).

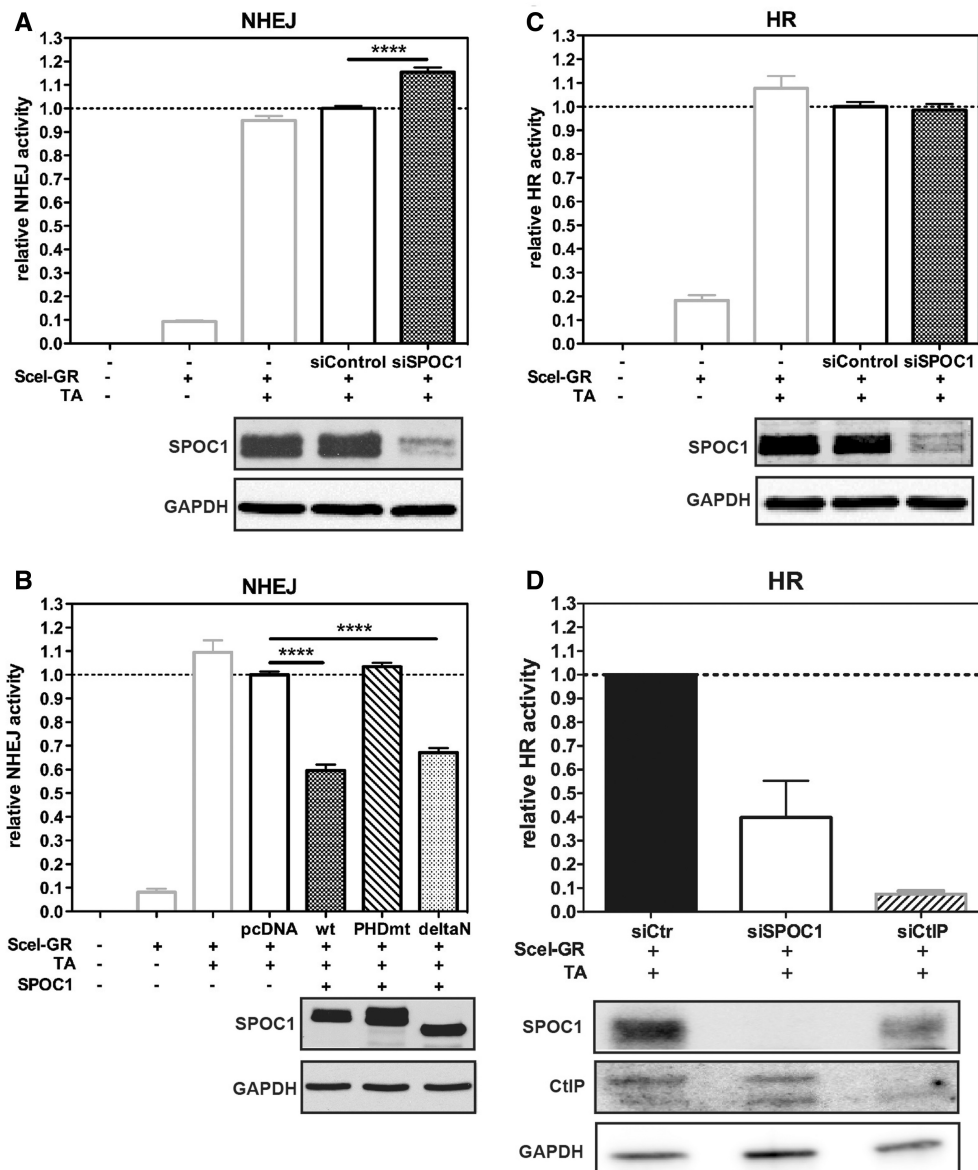


Figure 4. SPOC1-expression levels modulate NHEJ activity. (A) siRNA-mediated SPOC1 depletion increases NHEJ activity in H1299.EJ reporter cells compared to control siRNA-transfected cells as quantified by flow cytometry detecting EGFP expression. NHEJ activity is only evident after I-SceI-mediated cleavage in cells transfected with a plasmid expressing cytoplasmic SceI fused to glucocorticoid receptor ligand-binding domain (SceI-GR), plus TA to translocate the fusion protein into the nucleus. (B) Enhanced expression of SPOC1wt and a SPOC1 N-terminal domain deletion (deltaN), but not a PHD-deficient derivative (PHDmt) strongly reduced NHEJ activity when analyzed and quantified as in (A). (C) DNA repair activity by HR in H1299.GC reporter cells after SPOC1 siRNA or control siRNA transfection, quantified as in (A), were similar. (D) HR-mediated DNA repair activity in U2OS-DR-GFP reporter cells was reduced by >60% after siRNA-induced SPOC1 knockdown compared to control siRNA treated cells. Knockdown of CtIP, a protein critical for the initial steps of HR, reduced HR activity by ~90% compared to the control siRNA transfected cells. All data are from triplicates derived from three independent experiments (\pm SEM) **** $P \leq 0.0001$. (A–D) Successful SPOC1 and CtIP knockdown as well as equivalent expression levels of SPOC1 wt and mutant proteins were confirmed by immunoblotting of cell extracts using anti-SPOC1, anti-CtIP and anti-GAPDH antibodies.

These data imply that SPOC1 modulates cellular radiosensitivity.

SPOC1 modulates DDR and heterochromatin building factors

SPOC1's ability to alter chromatin compaction, DDR, DNA repair and radiosensitivity could be linked. To identify SPOC1 regulated factors with functions in more than one of these processes, we explored SPOC1- and

γ -IR-dependent changes in expression, subnuclear localization and post-translational modifications of candidate nuclear proteins. Cell extracts from control or SPOC1-depleted CV1 cells either mock treated or γ -irradiated with 2 Gy and collected 30 min later were subfractionated into soluble and chromatin-bound proteins and analyzed by immunoblotting (Figure 6A). Upon γ -IR of the control cells SPOC1 protein levels decreased (2.1-fold) in the soluble fraction and increased (1.3-fold) in the

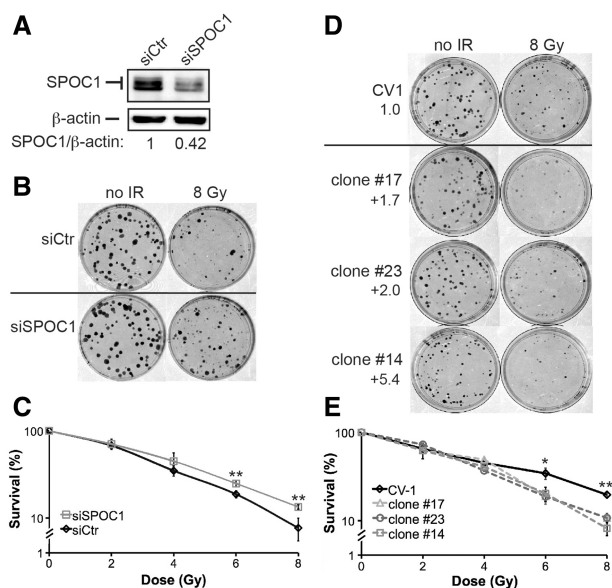


Figure 5. SPOC1 protein expression levels affect cell survival after γ -IR. (A) Immunoblot analysis shows that SPOC1 levels in SPOC1 siRNA transfected CV1 cells are reduced by 58% compared to control siRNA-transfected cells as analyzed by densitometry. These cells were used for clonogenic survival assays (see below). (B) Colony formation assays: SPOC1-siRNA treated cells formed more colonies than control siRNA transfected cells when analyzed after 8 Gy γ -IR and 9 days post-plating, indicating higher radioresistance. (C) Survival curves based on clonogenic growth of CV1 cells transfected with SPOC1-siRNA or control siRNA, analyzed after 0–8 Gy γ -IR and up to 9 days after plating. SPOC1 knockdown results in increased radioresistance. (D) Colony formation assays: different SPOC1 overexpressing (1.7- to 5.4-fold) cell lines formed less colonies than control cells when analyzed after 8 Gy γ -IR and 12 days post-plating, indicating higher radiosensitivity. (E) Survival curves based on clonogenic growth of SPOC1 overexpressing (1.7- to 5.4-fold) or control cells after 0–8 Gy γ -IR and analyzed 12 days after plating. SPOC1 overexpression results in lower radioresistance. Cells were plated in two different densities and in triplicates. Mean values \pm SD are given. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

chromatin-rich fraction (Figure 6A, siCtrl). Furthermore, SPOC1 depletion appeared to increase phosphorylation-dependent activation of ATM (pATM-S1981 (soluble 1.7-fold and chromatin-associated 1.9-fold), Chk2 (pChk2-T68, 3.6-fold) and γ H2AX (1.6-fold) in irradiated cells, whereas total levels of ATM and Chk2 remained unchanged (Figure 6A). Increased pATM-S1891 and pChk2-T68, phosphorylated by activated ATM (50,51), after SPOC1-depletion indicates elevated DDR, and is consistent with more IRIF, enhanced DNA repair kinetics and increased NHEJ activity observed in the previous experiments (Figures 3C, E, G and 4A).

ATM-mediated KAP-1 phosphorylation at serine 824 leads to chromatin decondensation, an important process in DDR. Therefore, we evaluated whether SPOC1 affects KAP-1 expression and phosphorylation, as well as that of its binding partner HP1, which targets H3K9me3. We detected 30% less chromatin-bound KAP-1 protein in SPOC1-deficient cells compared to controls cells (Figure 6A). As expected, phosphorylated KAP-1 (pKAP-1-S824) was only detected after γ -IR, with levels related to those of total KAP-1 protein (Figure 6A). SPOC1 depletion

did not alter expression of any isoforms of HP1, although levels of H3K9me3 were reduced (by 32% and 45% in non-irradiated and irradiated cells, respectively) (Figure 6A).

Several H3K9 methylation enzymes (SETDB1, GLP, G9A and SUV39H1) are present in large multisubunit complexes that promote H3K9 trimethylation (33). The amounts of three out of the four chromatin-associated enzymes decreased upon SPOC1 depletion both pre- and post- γ -IR (Figure 6A) explaining the decrease in H3K9me3. Less H3K9 KMTs, H3K9me3, and chromatin-bound KAP-1 proteins are likely linked to SPOC1 depletion-induced chromatin relaxation (2) and probably enhance accessibility of damaged sites for factors involved in DDR and repair.

Conversely, we tested whether SPOC1 overexpression affects the same proteins. SPOC1 overexpression slightly reduced both chromatin-bound ATM and activated ATM (pATM-S1981) after γ -IR (Figures 6B and Supplementary Figure S5). The ATM-dependent phosphorylation of KAP-1 at S824, as well as that of H2AX, was strongly reduced in SPOC1 overexpressing cells (by 60% and 30%, respectively), whereas total KAP-1 levels increased slightly (1.7-fold, Figures 6B and Supplementary Figure S5A). Reduced ATM activity is also in agreement with the lower number of γ H2AX foci and the globally reduced γ H2AX level observed after SPOC1 overexpression (Figures 3D and 6B). These data argue that SPOC1 overexpression impedes DDR and repair by promoting chromatin compaction.

To identify possible factors involved in SPOC1-induced chromatin compaction that may also affect DDR, we analyzed expression levels of the heterochromatin markers HP1 (all isoforms), H3K9me3 and KAP-1. Independent of γ -IR, levels of HP1 α , H3K9me3, and also KAP-1 increased in the chromatin fraction 1.4-, 1.7- and 1.4-fold, respectively, after SPOC1 overexpression, whereas those of HP1- β and HP1- γ did not (Figure 6B, C and Supplementary Figure S6). Elevated levels of HP1- α , H3K9me3 and KAP-1 are consistent with the reported ability of SPOC1 to induce chromatin compaction (2).

As above, we then evaluated expression levels of the same H3K9 KMTs after SPOC1 overexpression. Now, chromatin-bound levels of SETDB1, GLP and G9A, but not SUV39H1, increased 1.2- to 1.4-fold in irradiated and non-irradiated SPOC1-overexpressing cells (Figure 6B and Supplementary Figure S5A). Thus, SPOC1 overexpression increases chromatin-associated H3K9 KMT and H3K9me3 levels, exactly the opposite of SPOC1 downregulation. Elevated H3K9me3 may promote chromatin compaction by recruiting appropriate epigenetic readers and their binding partners, including HP1- α and KAP-1, whereas lower H3K9me3 levels may have the reverse effect. In summary, the observed SPOC1-dependent changes in phosphorylation of ATM, Chk2 and KAP-1 could all contribute to SPOC1's impact on DDR and DNA repair.

SPOC1 interacts with KAP-1 and H3K9 KMTs

The observed correlation between chromatin-associated KAP-1 and SPOC1 levels (Figure 6A and B) may be due

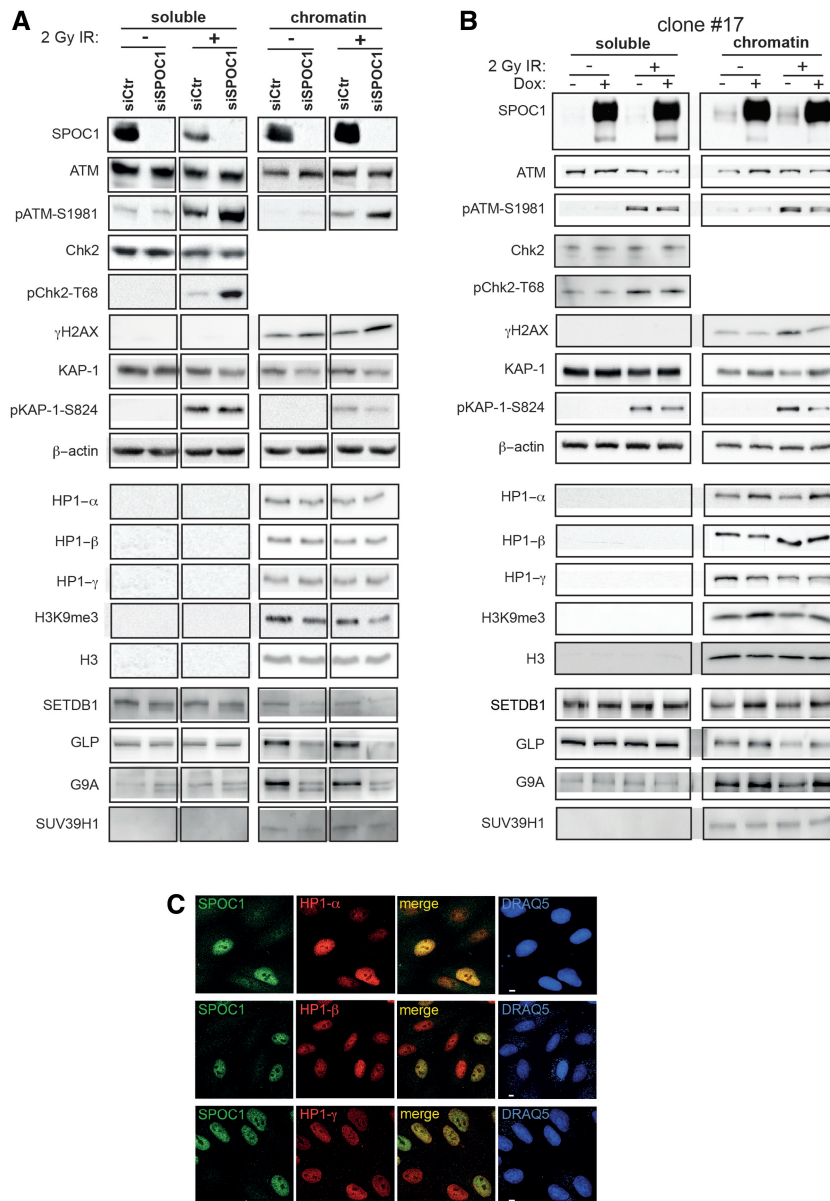


Figure 6. SPOC1 levels modify expression, modification and localization of proteins involved in chromatin (de)compaction and DDR. Immunoblots of soluble and chromatin-rich fractions from untreated (–) and irradiated cells collected 30 min post-2 Gy γ -IR (+) analyzed with Abs against the indicated proteins. (A) SPOC1-siRNA transfected cells show less SPOC1 protein than control CV1 cells. (B) Dox-treatment strongly enhances SPOC1 levels in CV1 cell line clone #17. (A and B) Immunoblot signal intensities for different cellular proteins detected in the corresponding cellular lysates show specific changes in expression of some but not all, depending on the soluble or chromatin fraction, SPOC1-expression levels and/or γ -IR. (C) Confocal immunofluorescence analysis of mixed CV1 cells over and underexpressing SPOC1 immunostained for HP1- α (top), HP1- β (middle) and HP1- γ (lower panels) only showed enhanced HP1- α expression in SPOC1-overexpressing cells. SPOC1 was immunostained with antibody CR56, the HP1 proteins with the antibodies given in ‘Materials and Methods’ section, and DNA was stained by DRAQ5. Scale bars = 5 μ m.

to KAP-1 interacting with SPOC1. To provide direct evidence for a SPOC1/KAP-1 interaction we performed GST pull-down experiments (Figure 7A). Full-length GST-SPOC1 protein precipitated KAP-1, unlike GST alone or the N-terminal 100 amino acids of SPOC1 (GST-SPOC1 1-100; Figure 7A).

To independently verify, and further map the SPOC1/KAP-1 interaction, we used a LUMIER-assay (Figure 7B). Full-length or C-terminal SPOC1 fused to protein A (ProtA-SPOC1; amino acids 1–300, 150–300) pulled down luciferase (Luc) fused to full-length or

N-terminal KAP-1 (Luc-KAP-1; amino acids 1–835, 1–400), but not C-terminal derivatives (Luc-KAP-1; amino acids 401–600, 601–835), while protein A-tagged N-terminal KAP-1 (ProtA-KAP-1; amino acids 1–400) efficiently pulled down C-terminal SPOC1 (Luc-SPOC1; amino acids 150–300) (Figure 7B). These results indicate a specific interaction between the N-terminal 400 amino acids of KAP-1 and the C-terminal 150 amino acids of SPOC1. The interaction with SPOC1 may affect KAP-1 stability, phosphorylation, and/or its recruitment to chromatin before and after γ -IR.

We then investigated whether SPOC1 interacts with components of the H3K9 KMT multiprotein complex (33,52). Endogenous SPOC1 from HeLa nuclear extracts with anti-SPOC1 antibody but not with control antibody coprecipitated both G9A and SETDB1 as revealed by immunoblotting (Figure 7C). In addition, both endogenous SPOC1 and SETDB1 were specifically immunoprecipitated with antibodies against GLP or SUV39H1 (Figure 7D).

Previously described cell lines (52) expressing either FLAG-tagged SETDB1 wt, or an enzymatically inactive SETDB1 (SETDB1 H1224K), were used to further evaluate the SPOC1/H3K9 KMT interaction. With anti-FLAG antibodies wt SETDB1 efficiently coprecipitated endogenous SPOC1 and all three tested H3K9 KMTs (GLP, G9A and SUV39H1), compared to the less efficient coprecipitation by the mutant SETDB1 protein (Figure 7E). These data imply that SPOC1 interaction with H3K9 KMT molecular complexes partly depends on SETDB1 enzymatic activity. The nuclear extracts used for coimmunoprecipitation and protein complex immunoaffinity purification experiments were pretreated with DNase with or without added RNase or EtBr and analyzed for residual DNA by agarose gel electrophoresis (see 'Materials and Methods' section and Supplementary Figure S6). These experiments exclude that coIPs of SPOC1 and H3K9 KMTs are mediated by DNA.

An *in vitro* histone methylation assay was then used to check if SPOC1-bound H3K9 KMTs are enzymatically active. The addition of chicken core histones and radiolabeled Adenosyl-L-Methionine-[methyl-3H] to SPOC1 immunoprecipitated proteins resulted in methylation of histone H3, as also observed with immunoprecipitated G9A or SETDB1 (Figure 7F). This result shows SPOC1-bound H3K9 KMTs are active.

SPOC1 overexpression-induced increase of only chromatin-bound H3K9 KMT (Figure 6B) might depend on SPOC1's binding to chromatin. Therefore, we analyzed H3K9me3 levels in total lysates from HeLa-S3 cell lines expressing either endogenous or ectopically enhanced levels of SETDB1, with or without lentivirally expressed SPOC1 wt or the SPOC1-PHD mutant. Neither expression of SETDB1 nor SPOC1-PHD mutant alone increased H3K9me3 levels (Figure 7G). In contrast, extra SPOC1 wt significantly enhanced H3K9me3 levels (Figure 7G), as was seen in CV1 cells (Figure 6B). H3K9me3 levels were even higher when both SPOC1 and SETDB1 were overexpressed (Figure 7G). However, these coexpression conditions did not detectably increase SETDB1 protein levels, suggesting instead that SPOC1 stimulates SETDB1 activity. In summary, these data demonstrate that SPOC1 overexpression can increase both chromatin-associated levels and activity of H3K9 KMTs, thus enhancing H3K9 trimethylation.

DISCUSSION

Here, we provide the first evidence that SPOC1-expression levels have an impact on DDR, DNA repair kinetics and

pathway choice, as well as on cellular radiosensitivity. We propose a molecular mechanism that is predominantly deduced from the following observations: (i) ATM kinase-dependent recruitment of SPOC1 to DSBs; (ii) SPOC1 accumulation at endogenous and experimentally induced repair foci with slow repair kinetics; (iii) SPOC1-dependent differences in the number of IRIFs formed early after γ -IR; (iv) altered kinetics of γ -IR-inducible DSB repair; (v) altered cellular radiosensitivity; (vi) the ability of SPOC1 to modulate dose-dependently both NHEJ and HR activity and (vii) SPOC1's interaction with, and modulation of proteins that have intertwined functions in regulating chromatin structure as well as DDR and DNA repair.

SPOC1 binding to chromatin and its PHD-dependent ability to alter chromatin compaction (2), as well as its predicted binding to H3K4me2/3 (3) were known; but neither the underlying mechanisms nor the possible impact of SPOC1-expression levels on DDR or DNA repair have been described so far. We now propose an integrative mechanistic model of SPOC1's function in altering chromatin structure, DDR and DNA repair (Figure 8). Accordingly, by SPOC1 binding to chromatin exposing H3K4me2/3, and/or different interaction partners, chromatin can be compacted by SPOC1's ability to increase global or local levels of KAP-1, HP1- α , H3K9 KMTs and H3K9me3. These heterochromatin building factors can act in concert or independently in both gene repression and chromatin condensation (17,53,54).

Loss of SPOC1 results in the release of several factors and marks associated with chromatin condensation (H3K9 KMTs, H3K9me3, KAP-1), and thus promotes chromatin decondensation. SPOC1 dose-dependent chromatin condensation and decondensation, previously shown by micrococcal nuclease digestion experiments (2), is consistent with this interpretation, and with the now demonstrated associated differences in DDR, DNA repair kinetics and cellular radiosensitivity. Moreover, the ATM-dependent recruitment to and accumulation of SPOC1 protein at heterochromatic repair foci and endogenous 53BP1 bodies/OPT domains further argue for SPOC1's involvement in chromatin structural changes required for timely repair and choice of repair pathways. DSBs induced by low dose γ -IR in chromatin condensed locally and/or globally with the help of SPOC1 contribute to impaired activation of ATM and delayed expansion of γ H2AX and 53BP1 at DSBs.

This interpretation is strongly supported by the observed reduced levels of pKAP-1(S824), an essential factor for decondensing and then repairing heterochromatin-associated DSBs (28). In contrast, upon SPOC1 depletion DSBs in decondensed chromatin are associated with increased levels of DDR transducers (pATM, γ H2AX) and mediator 53BP1 involved in DNA repair. Chromatin decondensation as well as increased pATM are also consistent with the increased γ H2AX and 53BP1 accumulation at DSBs and their repair, similar to that documented in human cells with deficits in other heterochromatin building factors (25). The SPOC1-dependent positive and negative modulation of

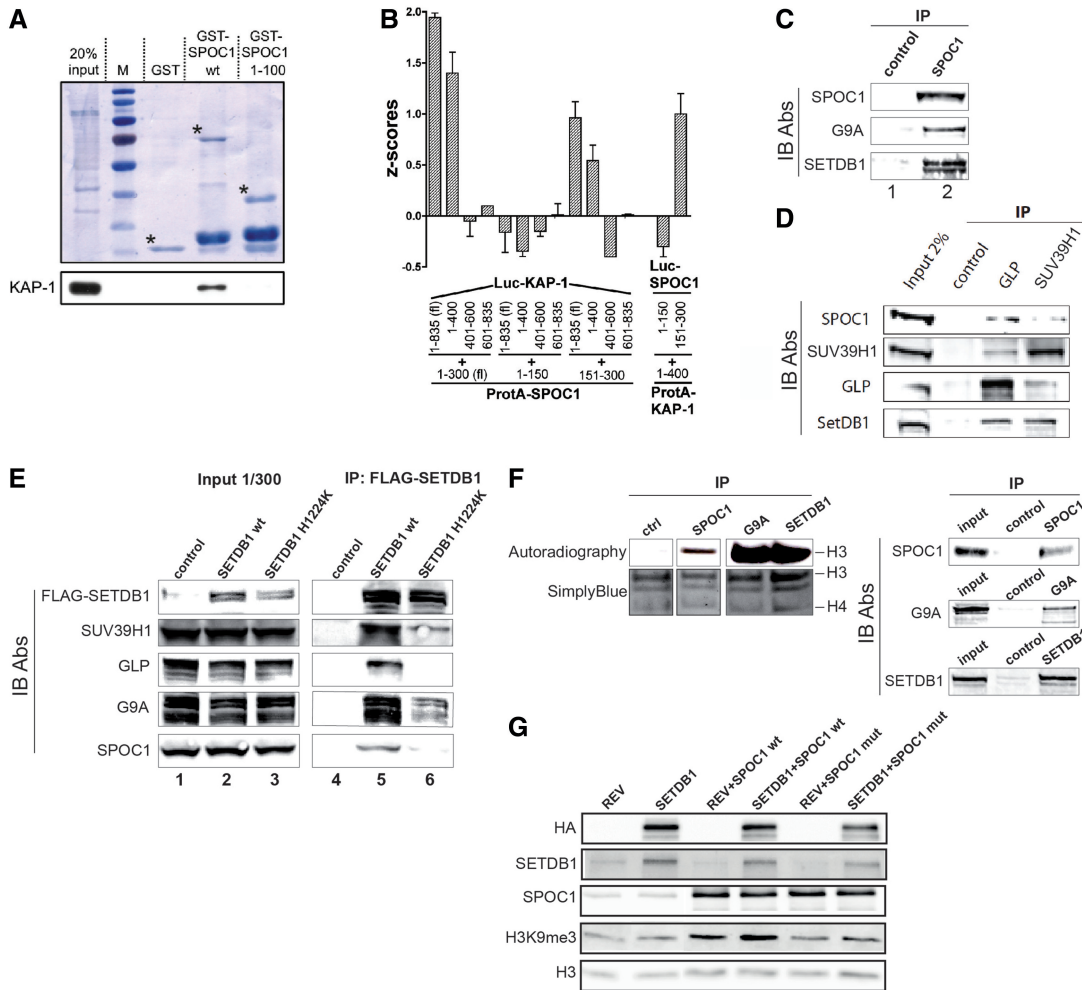


Figure 7. SPOC1 protein interacts with KAP-1 and enzymatically active H3K9 KMTs. **(A)** In GST-pull-down experiments with GST-SPOC1 wt, GST-SPOC1 (amino acids 1–100) or GST alone and chromatin extracts from U2OS cells, only the GST-SPOC1-full-length protein precipitated the KAP-1 protein, as detected on the immunoblot (lower panel). Amounts of GST proteins used were visualized by Amido black staining of the blots (upper panel). Asterisks mark the positions of full-length GST-proteins. **(B)** LUMIER-assay for mapping the KAP-1/SPOC1 interaction. The indicated combinations of SPOC1 and KAP-1, ProteinA (ProtA) and luciferase (Luc) fusion proteins were coexpressed. Luc activity coprecipitated with IgG-beads was measured (Z-scores). Significant KAP-1-interaction is only evident between both full-length proteins, or the C-terminal half of SPOC1 and the N-terminal 400 amino acids of KAP1, as detected by significant Luc activity in the corresponding pellets. Z-score ≥ 0.5 indicates an interaction. Mean values \pm SD of three independent experiments each performed in triplicate are given. **(C)** Immunoprecipitation of SPOC1 from HeLa nuclear extracts with anti-SPOC1 (lane 2) or with control antibodies (lane 1) and analysis of pelleted material by immunoblotting shows specific coprecipitation of G9a and SETDB1 with SPOC1. **(D)** Immunoprecipitation (IP) of endogenous GLP or SUV39H1 from C2C12 cell extracts and immunoblotting with the indicated Abs (IB Abs) against GLP (PP-B0422-00), SUV39H1 (07-550), SETDB1 (ab12317) and SPOC1 (6F6). Unlike the control Ab, GLP and SUV39H1 Abs precipitated all associated KMTs as well as SPOC1. **(E)** Nuclear extracts of control C2C12 cells (lane 1) or cells expressing HA-FLAG-tagged SETDB1 wt (lane 2) or SETDB1 H1224K mutant (lane 3) were analyzed on immunoblots (IB Ab.) with antibodies against FLAG (F1804), G9A (D141-3), GLP (PP-B0422-00), SUV39H1 (07-550) and SPOC1 (6F6). After anti-FLAG-SETDB1 immunoprecipitation (IP) the immunoblot detected specific coprecipitation of SPOC1 by wt SETDB1 (lane 5) but much less by enzymatically inactive SETDB1 H1224K (lane 6). **(F)** *In vitro* analysis of histone H3 methylation by proteins immunoprecipitated by control, SPOC1, G9A, or SETDB1 antibodies. Left panel: autoradiography and SimplyBlue staining of the assay products separated by SDS-PAGE. Right panel: immunoblot which demonstrates that SPOC1, G9A and SETDB1 were immunoprecipitated specifically from the HeLa nuclear extracts. **(G)** In total lysates from HeLa-S3 cell lines constitutively expressing HA-FLAG-SETDB1 (HA-SETDB1), lentiviral-mediated SPOC1wt expression elevates H3K9me3 levels compared to control cells (REV), as detected by immunoblotting with Abs against the indicated proteins (left). The SPOC1 PHD mutant (SPOC1mut) unable to bind to H3K4me3 only marginally increased H3K9me3 levels compared to SPOC1 wt.

DNA repair results in decreased and increased cellular radiosensitivity, which may be a consequence of SPOC1 also affecting the accuracy of DNA repair. The SPOC1 depletion-induced reduction in HR activity detected in the p53 positive, but not p53 negative HR reporter cells could be due in part, or entirely to the different p53 status. This assumption is strongly supported by the recent

demonstration that DSB repair by HR is significantly compromised in the absence of DNA damage-induced phosphorylation of p53 by the concerted action of DNA-PK, ATM and ATR, as well as the well-documented effects of p53 on DNA repair mediated by its functions in regulating the cell cycle and gene transcription (55,56).

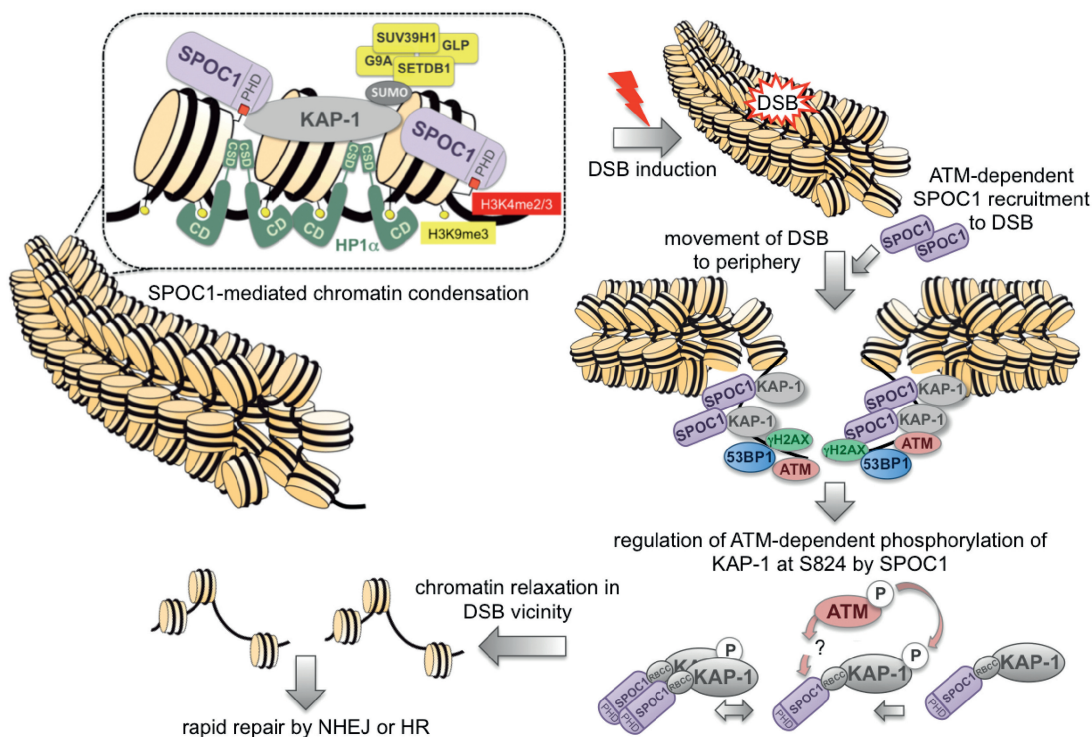


Figure 8. Model: mechanisms of SPOC1-associated chromatin compaction and modulation of DDR at DSBs. The interaction of SPOC1 with heterochromatin building factors KAP-1, HP1 and H3K9 KMTs and its binding to chromatin via H3K4me2/3 and/or other factors can induce chromatin compaction. DNA damage-induced DSBs in heterochromatin activate ATM kinase. This results in pan-nuclear KAP-1S824 phosphorylation and concomitant ATM recruitment to repair foci, and also to increasing accumulation at repair foci. SPOC1 is also ATM-dependently recruited to DSBs and accumulates detectably only at heterochromatic repair foci after γ -H2AX expansion and 53BP1 accumulation. The KAP-1S824 phosphorylation required for chromatin relaxation at DSBs in heterochromatin and for DNA repair is regulated by SPOC1. For more details see text.

A strong argument for SPOC1 playing a role in DDR is the observed increase in chromatin-bound SPOC1 protein 30 min after γ -IR and a simultaneous decrease in the nucleoplasmic fraction. This demonstrates that nucleoplasmic SPOC1 responds to DNA damage early on by its increased recruitment to chromatin. However, unlike 53BP1 the SPOC1 protein did not detectably accumulate at DSB repair foci, nor did the nuclear distribution pattern visibly change 30 min after γ -IR. Therefore, we assume that the pan-nuclear increase of chromatin-bound SPOC1 represents an early response to DNA damage.

In contrast, ATM-dependent accumulation of SPOC1 was clearly observed at DSB-associated DNA repair foci at 8 h post-DSB induction, with gradually increasing SPOC1 and 53BP1 up to the end of the observation period (24 h). By this late time period post- γ -IR, the number of foci had decreased and their size had grown much larger, a feature characteristic of DSB repair occurring in heterochromatic regions (25). These findings are reminiscent of the distribution of pKAP-1(S824) post- γ -IR, which at early times is distributed in an pan-nuclear manner and only detectably accumulates late in foci formed at highly compacted chromatin (9).

Whether the DNA damage-induced changes in the distribution pattern of chromatin-bound SPOC1 are also mediated by ATM and/or Chk2 phosphorylation, as reported for pKAP-1(S824/473), is an open question.

Alternatively, SPOC1 overexpression interfering with KAP-1 at S824 phosphorylation may be caused by KAP-1/SPOC1 protein-protein interaction-induced structural changes masking KAP-1 phosphorylation sites, combined with, or independently of SPOC1-induced alteration in ATM activity. SPOC1 may also affect KAP-1 dephosphorylation, known to be mediated by phosphatase PP4 (57,58). In addition, the SPOC1 overexpression-induced higher level of chromatin-bound HP1 α may also affect KAP-1 phosphorylation, consistent with HP1's known regulatory roles in both KAP-1 phosphorylation and dynamic chromatin structural changes occurring globally and locally at foci (59,60). Evidence for HP1 proteins playing a role in the response to γ -IR-induced IRIFs and DDR (27,31,32,61) supports our speculations. Whether SPOC1's γ -IR-induced chromatin-binding pattern is associated with, or driven by changes in phosphorylation or other post-translational modifications on SPOC1, and/or by corecruited factors involved in DDR is an interesting question that remains to be examined.

The inverse correlation between SPOC1-expression levels and the number of IRIF 30 min post-2 Gy γ -IR raised the question of whether this reflects altered sensitivity of DNA for DSB induction, subsequent DDR, or repair. The Comet assay performed with cells deficient in or overexpressing SPOC1 showed no difference, indicating

that SPOC1 does not alter the radiosensitivity of DNA. This finding is consistent with increasing evidence for similar sensitivity of euchromatin and heterochromatin in forming DSBs (62,63). Therefore, we conclude that SPOC1 modulates the kinetics of DNA repair foci formation and DNA repair, but not the extent of initial damage. Since we failed to detect major changes in cell-cycle phase regulation upon SPOC1 depletion or overexpression (FACS analyses) and saw only minor changes in cell proliferation, we believe that the SPOC1-dependent differences in cellular radiosensitivity are triggered by SPOC1's ability to differentially affect repair pathways, and thus also the accuracy of DNA repair.

The chromatin compaction upon SPOC1 overexpression (2) and the observed changes in IRIF kinetics are consistent with reports that DSBs in heterochromatin become fully accessible for sensors and mediators of DDR and repair only after partial chromatin relaxation and translocation to the periphery of heterochromatin (28,62,63). Proven or proposed key mediators of these processes include ATM-mediated KAP-1 phosphorylation (29), and epigenetic writers, readers and erasers (6,9,19,23,28,60,64). We have shown here that several of these mediators (KAP-1, HP1, ATM) are modulated by SPOC1, possibly explaining at the molecular level the observed SPOC1-mediated changes in the kinetics of IRIF formation, DSB repair and radiosensitivity.

KAP-1 is one of the best studied heterochromatin proteins and is phosphorylated in response to DNA damage (17,29). It accumulates as pKAP-1-S824 and mediates chromatin relaxation at IRIF in concert with chromatin remodeler CHD3 (23), which is essential for repairing DNA damage in heterochromatin. Our study revealed SPOC1-dependent modulation of chromatin-bound KAP1 in both γ -irradiated and non-irradiated cells. This change in KAP-1 levels may be due to SPOC1/KAP-1 protein interaction-triggered (de)stabilization, and presumably contributes to the SPOC1-dependent changes in chromatin (de)condensation (2).

Although sequence analysis revealed no evident KRAB-like domain, SPOC1 may act like KRAB containing proteins and other proteins shown to bind the RBCC domain of KAP-1 (17). If true, some of the many thousands of genes known to be targeted and transcriptionally altered *in vivo* by KAP-1 (65,66) could be cotargeted and regulated by SPOC1 in non-irradiated cells. However, the considerable cell-type-specific differences in both KAP1 and SPOC1 expression, the discrepancies between *in vitro/in vivo* data published for KAP-1-mediated recruitment and gene regulation, as well as open questions concerning the *in vivo* relevance of all KAP-1 protein interactions with KRAB/KRAB-like proteins, except for ZNF 274 (17), certainly make this a very demanding topic to investigate.

All HP1 isoforms, HP1- α , HP1- β and HP1- γ , are recruited to DSBs in human cells independently of H3K9 trimethylation (6,31). Therefore HP1 proteins are apparently important for DNA repair as well as their known function in higher order chromatin structure, and may act to stabilize loose ends and keep together sister chromatin in response to damage. However, HP1 proteins also have

isoform-specific roles in DDR (6) and other biological processes (67). For instance, human cells overexpressing HP1- α and HP1- β , but not HP1- γ , show increased sensitivity to IR (68).

Our study corroborates this observation since SPOC1 overexpression increased levels of HP1- α and radiosensitivity. Whether the selective increase in HP1- α expression is due to protein stabilization enhanced by direct or indirect interaction with SPOC1 remains to be studied. Independently of the regulatory mechanism, increased HP1- α levels probably contribute to chromatin compaction and impaired DDR. HP1- α overexpression was recently reported in tumor tissues and proposed to play a crucial role in cancer prognosis (69). The inverse relationship of SPOC1-expression levels with cancer patient survival time (1) may be related to SPOC1-enhanced HP1- α expression.

The correlation between SPOC1 protein levels and H3K9 trimethylation as well as expression of several H3K9 KMTs implicates SPOC1 functions in both chromatin (de)condensation and DDR. H3K9me3 is not only an epigenetic mark characteristic of heterochromatin, but also the binding platform of HP1 and KAP-1, which collectively promote heterochromatin compaction and spreading (70,71).

Three lines of evidence indicate an important role for H3K9me3 in DDR and DNA repair. First, a sharp increase in H3K9me3 observed at I-SceI-induced DSBs is thought to transiently silence the gene to ensure that DNA repair is complete before transcription resumes, and/or compact the chromatin to mute DNA damage signaling stimulated by the initial chromatin opening (72). Second, binding of the acetyltransferase TIP60 via its CD to H3K9me3 at DSBs is required for its activation (24), and is a prerequisite for efficient ATM activation by acetylation. Third, the level of heterochromatin-associated histone modification H3K9me3 can account for >40% of mutation rate variation in human cancer cells (5).

The increase in HP1- α in SPOC1 overexpressing cells may interfere with TIP60 binding to H3K9me3 and its activation, possibly contributing to the observed reduction in activated ATM and delayed DDR. However, despite reduced H3K9me3 levels in SPOC1-depleted cells, ATM is apparently hyperactivated, perhaps indicating that its activity is independent of H3K9me3. Possible reasons for our observation are that ATM can also be activated in cells with low H3K9me3 levels (24). Furthermore, SPOC1 depletion, which promotes chromatin relaxation, may increase accessibility of H3K9me3 for TIP60, leading to increased ATM activation.

The histone H3K9 KMTs shown here to be modulated by SPOC1 (SETDB1, G9A, GLP) exist in a multisubunit complex that is destabilized by depleting the individual components (33). While indirectly confirming these findings, our data also demonstrate the importance of SPOC1's interaction with this complex for its stability and activity.

Evidence provided here on SPOC1's impact on DDR, DNA repair, and radiosensitivity may also be relevant for the recently reported function of SPOC1 in testicular germ

stem-cell differentiation. In particular, both SPOC1 (4) and KAP-1 knockout (73) as well as a HPI-binding deficient KAP-1 mutant (74) all lead to progressive depletion of spermatogonial stem cells and their differentiated derivatives. The similar phenotypes of KAP-1 and SPOC1 knockout in testis argues for a cooperative physiological relationship *in vivo* in stem-cell maintenance and differentiation.

The presumed function of SPOC1 in oncogenesis (1) is consistent with its DDR modulating function shown here. Moreover, since SPOC1 is able to alter cellular radiosensitivity, it may be a relevant target for novel anti-cancer drugs that focus on manipulating differences in lysine methylation (75).

AUTHOR CONTRIBUTION

A.M and H.W conceived and designed the experiments. A.M., H.S., K.R., L.F., V.B., S.A., M.K. and T.S. performed the experiments. A.M., E.S., S.A., S.K. and H.W. analyzed the data. A.H., A.M., E.S., M.K. and S.A. contributed reagents/materials/analysis tools. A.M. and H.W. wrote the paper.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Figures 1–6 and Supplementary References [33,39,40].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to M. Warmer and R. Reimer (HPI, Hamburg, Germany) for their support in microscopical imaging to K. Weber and B. Fehse (UKE, Hamburg, Germany) for providing lentiviral vectors and helping us with lentivirus production, and to E. Kremmer (GSF, Neuherberg, Germany) for SPOC1 rat mABs. U2OS DR-GFP HR reporter cells were kindly provided by M. Jasin, Sloan-Kettering Institute, New York, USA. The authors thank the imaging center of IGBMC and particularly Marc Koch (IGBMC, Illkirch CEDEX, France) for the help with the confocal microscopes. We greatly appreciate helpful discussions of G. Almouzni, Institut Curie, Paris, France) and SP. Jackson, University of Cambridge, Cambridge, UK.

FUNDING

The Deutsche Krebshilfe and Muggenburg Foundation; HPI is supported by the Federal Ministry of Health and the Freie und Hansestadt Hamburg, Germany; Ait-Si-Ali group is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, French gvt); Association Française contre les Myopathies (AFM); Fondation Bettencourt-Schueller. Funding for open access charge: Heinrich-Pette-Institute, Leibniz-Institute for Experimental Virology.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Mohrmann,G., Hengstler,J.G., Hofmann,T.G., Endeles,S.U., Lee,B., Stelzer,C., Zabel,B., Brieger,J., Hasenclever,D., Tanner,B. *et al.* (2005) SPOC1, a novel PHD-finger protein: association with residual disease and survival in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, **116**, 547–554.
- Kinkley,S., Staeger,H., Mohrmann,G., Rohaly,G., Schaub,T., Kremmer,E., Winterpacht,A. and Will,H. (2009) SPOC1: a novel PHD-containing protein modulating chromatin structure and mitotic chromosome condensation. *J. Cell Sci.*, **122**, 2946–2956.
- Chi,P., Allis,C.D. and Wang,G.G. (2010) Covalent histone modifications—miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 457–469.
- Bordlein,A., Scherthan,H., Nelkenbrecher,C., Molter,T., Bosl,M.R., Dippold,C., Birke,K., Kinkley,S., Staeger,H., Will,H. *et al.* (2011) SPOC1 (PHF13) is required for spermatogonial stem cell differentiation and sustained spermatogenesis. *J. Cell Sci.*, **124**, 3137–3148.
- Schuster-Bockler,B. and Lehner,B. (2012) Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *Nature*, **488**, 504–507.
- Luijsterburg,M.S. and van Attikum,H. (2011) Chromatin and the DNA damage response: The cancer connection. *Mol. Oncol.*, **5**, 349–367.
- Bekker-Jensen,S. and Mailand,N. (2010) Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair*, **9**, 1219–1228.
- Dimitrova,N., Chen,Y.C., Spector,D.L. and de Lange,T. (2008) 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, **456**, 524–528.
- Noon,A.T., Shibata,A., Rief,N., Loblrich,M., Stewart,G.S., Jeggo,P.A. and Goodarzi,A.A. (2010) 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 177–184.
- Hartlerode,A.J. and Scully,R. (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J.*, **423**, 157–168.
- Pardo,B., Gomez-Gonzalez,B. and Aguilera,A. (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 1039–1056.
- Polo,S.E. and Jackson,S.P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.*, **25**, 409–433.
- Symington,L.S. and Gautier,J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 247–271.
- Karanam,K., Kafri,R., Loewer,A. and Lahav,G. (2012) Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell*, **47**, 320–329.
- Grewal,S.I. and Jia,S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 35–46.
- Lienert,F., Mohn,F., Tiwari,V.K., Baubec,T., Roloff,T.C., Gaidatzis,D., Stadler,M.B. and Schubeler,D. (2011) Genomic prevalence of heterochromatic H3K9me2 and transcription do not discriminate pluripotent from terminally differentiated cells. *PLoS Genet.*, **7**, e1002090.
- Iyengar,S. and Farnham,P.J. (2011) KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J. Biol. Chem.*, **286**, 26267–26276.
- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, **21**, 381–395.
- Falk,M., Lukasova,E. and Kozubek,S. (2010) Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat. Res.*, **704**, 88–100.
- Goodarzi,A.A., Noon,A.T. and Jeggo,P.A. (2009) The impact of heterochromatin on DSB repair. *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, 569–576.
- 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.
- van Attikum,H. and Gasser,S.M. (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.*, **19**, 207–217.

23. Goodarzi, A.A., Kurka, T. and Jeggo, P.A. (2011) KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 831–839.
24. Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstone, J.R. and Price, B.D. (2009) Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1376–1382.
25. Brunton, H., Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Shrikhande, A., Hansen, R.S., Jeggo, P.A. and Shibata, A. (2011) Analysis of human syndromes with disordered chromatin reveals the impact of heterochromatin on the efficacy of ATM-dependent G2/M checkpoint arrest. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 4022–4035.
26. Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A. and Venkitaraman, A.R. (2008) HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*, **453**, 682–686.
27. Dinant, C. and Luijsterburg, M.S. (2009) The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 6335–6340.
28. Goodarzi, A.A., Jeggo, P. and Lobrich, M. (2010) The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair*, **9**, 1273–1282.
29. Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. and Shiloh, Y. (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 870–876.
30. Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell*, **31**, 167–177.
31. Baldeyron, C., Soria, G., Roche, D., Cook, A.J. and Almouzni, G. (2011) HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J. Cell Biol.*, **193**, 81–95.
32. White, D., Rafalska-Metcalf, I.U., Ivanov, A.V., Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S.C., Trono, D., Janicki, S.M. and Rauscher, F.J., 3rd (2011) The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and Serine 473/824 phosphorylation. *Mol. Cancer Res.*, **10**, 401–414.
33. Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J.R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M. and Ait-Si-Ali, S. (2010) A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol. Cell*, **37**, 46–56.
34. Lemaitre, C., Fischer, B., Kalousi, A., Hoffbeck, A.S., Guirouilh-Barbat, J., Shahar, O.D., Genet, D., Goldberg, M., Bertrand, P., Lopez, B. *et al.* (2012) The nucleoporin 153, a novel factor in double-strand break repair and DNA damage response. *Oncogene*, **31**, 4803–4809.
35. Weinstock, D.M., Nakanishi, K., Helgadottir, H.R. and Jasin, M. (2006) Assaying double-strand break repair pathway choice in mammalian cells using a targeted endonuclease or the RAG recombinase. *Methods Enzymol.*, **409**, 524–540.
36. Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. and Fehse, B. (2008) A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.*, **16**, 698–706.
37. Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J. and Smith, G.C. (2004) Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.*, **64**, 9152–9159.
38. Giunta, S., Belotserkovskaya, R. and Jackson, S.P. (2010) DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.*, **190**, 197–207.
39. Kriegs, M., Kasten-Pisula, U., Rieckmann, T., Holst, K., Saker, J., Dahm-Daphi, J. and Dikomey, E. (2010) The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair*, **9**, 889–897.
40. Mansour, W.Y., Schumacher, S., Roskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H. and Dahm-Daphi, J. (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4088–4098.
41. Myllynen, L., Rieckmann, T., Dahm-Daphi, J., Kasten-Pisula, U., Petersen, C., Dikomey, E. and Kriegs, M. (2011) In tumor cells regulation of DNA double strand break repair through EGF receptor involves both NHEJ and HR and is independent of p53 and K-Ras status. *Thera Radio and Oncol.*, **101**, 147–151.
42. Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven, J., Deppert, W. and Dornreiter, I. (2005) A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell*, **122**, 21–32.
43. Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W. *et al.* (2005) High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*, **307**, 1621–1625.
44. Braun, P., Tasan, M., Dreze, M., Barrios-Rodiles, M., Lemmens, I., Yu, H., Sahalie, J.M., Murray, R.R., Roncari, L., de Smet, A.S. *et al.* (2009) An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat. Methods*, **6**, 91–97.
45. 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.
46. Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P. and Jackson, S.P. (2011) Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.*, **193**, 97–108.
47. Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grofte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J. *et al.* (2011) 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 243–253.
48. Pombo, A., Cuello, P., Schul, W., Yoon, J.B., Roeder, R.G., Cook, P.R. and Murphy, S. (1998) Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle. *EMBO J.*, **17**, 1768–1778.
49. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, **450**, 509–514.
50. Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 155–168.
51. Smith, J., Tho, L.M., Xu, N. and Gillespie, D.A. (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.*, **108**, 73–112.
52. Ceol, C.J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W.M., Hollmann, T.J., Ferre, F. *et al.* (2011) The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature*, **471**, 513–517.
53. Maison, C., Bailly, D., Roche, D., Montes de Oca, R., Probst, A.V., Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J.P. *et al.* (2011) SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat. Genet.*, **43**, 220–227.
54. Li, G. and Reinberg, D. (2011) Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 175–186.
55. Serrano, M.A., Li, Z., Dangeti, M., Musich, P.R., Patrick, S., Roginskaya, M., Cartwright, B. and Zou, Y. (2012) DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. *Oncogene*, 16 July (doi:10.1038/onc.2012.257; epub ahead of print).
56. Rieckmann, T., Kriegs, M., Nitsch, L., Hoffer, K., Rohaly, G., Kocher, S., Petersen, C., Dikomey, E., Dornreiter, I. and Dahm-Daphi, J. (2012) p53 modulates homologous recombination at I-SceI-induced double-strand breaks through cell-cycle regulation. *Oncogene*, April 9 (doi:10.1038/onc.2012.123; epub ahead of print).
57. Liu, J., Xu, L., Zhong, J., Liao, J., Li, J. and Xu, X. (2012) Protein phosphatase PP4 is involved in NHEJ-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, **11**, 2643–2649.
58. Lee, D.H., Goodarzi, A.A., Adelmant, G.O., Pan, Y., Jeggo, P.A., Marto, J.A. and Chowdhury, D. (2012) Phosphoproteomic analysis

- reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *EMBO J.*, **31**, 2403–2415.
59. Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J. and Lukas, J. (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.*, **173**, 195–206.
 60. Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z. and Lou, Z. (2011) MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, **470**, 124–128.
 61. Bolderson, E., Savage, K.I., Mahen, R., Pisupati, V., Graham, M.E., Richard, D.J., Robinson, P.J., Venkitaraman, A.R. and Khanna, K.K. (2012) KRAB-associated co-repressor (KAP-1) Ser-473 phosphorylation regulates heterochromatin protein 1beta (HP1-beta) mobilization and DNA repair in heterochromatin. *J. Biol. Chem.*, **287**, 28122–28131.
 62. Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S.U., Polyzos, A., Costes, S.V. and Karpen, G.H. (2011) Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell*, **144**, 732–744.
 63. Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.O., Zink, D., Durante, M., Lobrich, M. and Taucher-Scholz, G. (2011) DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6489–6499.
 64. Smeenk, G., Wiegant, W.W., Vrolijk, H., Solari, A.P., Pastink, A. and van Attikum, H. (2010) The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J. Cell Biol.*, **190**, 741–749.
 65. Iyengar, S., Ivanov, A.V., Jin, V.X., Rauscher, F.J., 3rd. and Farnham, P.J. (2011) Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 1833–1847.
 66. Blahnik, K.R., Dou, L., Echipare, L., Iyengar, S., O'Geen, H., Sanchez, E., Zhao, Y., Marra, M.A., Hirst, M., Costello, J.F. *et al.* (2011) Characterization of the contradictory chromatin signatures at the 3' exons of zinc finger genes. *PLoS One*, **6**, e17121.
 67. Kwon, S.H. and Workman, J.L. (2011) The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays*, **33**, 280–289.
 68. Sharma, G.G., Hwang, K.K., Pandita, R.K., Gupta, A., Dhar, S., Parenteau, J., Agarwal, M., Worman, H.J., Wellinger, R.J. and Pandita, T.K. (2003) Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1(Hsalpha) and HP1(Hsbeta) interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8363–8376.
 69. De Koning, L., Savignoni, A., Boumendil, C., Rehman, H., Asselain, B., Sastre-Garau, X. and Almouzni, G. (2009) Heterochromatin protein 1alpha: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO Mol. Med.*, **1**, 178–191.
 70. Maison, C. and Almouzni, G. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 296–304.
 71. Groner, A.C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., Ambrosini, G., Denervaud, N., Bucher, P. and Trono, D. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.*, **6**, e1000869.
 72. O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P. and Baylin, S.B. (2008) Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.*, **4**, e1000155.
 73. Weber, P., Cammas, F., Gerard, C., Metzger, D., Chambon, P., Losson, R. and Mark, M. (2002) Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development*, **129**, 2329–2337.
 74. Herzog, M., Wendling, O., Guillou, F., Chambon, P., Mark, M., Losson, R. and Cammas, F. (2011) TIF1beta association with HP1 is essential for post-gastrulation development, but not for Sertoli cell functions during spermatogenesis. *Dev. Biol.*, **350**, 548–558.
 75. He, Y., Korboukh, I., Jin, J. and Huang, J. (2012) Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **44**, 70–79.

Published in final edited form as:

Nature. 2011 March 24; 471(7339): 513–517. doi:10.1038/nature09806.

The SETDB1 histone methyltransferase is recurrently amplified in and accelerates melanoma

Craig J. Ceol^{1,†,*}, Yariv Houvras^{1,2,*}, Judit Jane-Valbuena³, Steve Bilodeau⁴, David A. Orlando⁴, Valentine Battisti⁵, Lauriane Fritsch⁵, William M. Lin³, Travis J. Hollmann⁶, Fabrizio Ferré⁷, Caitlin Bourque¹, Christopher J. Burke¹, Laura Turner¹, Audrey Uong¹, Laura A. Johnson³, Rameen Beroukhim³, Craig H. Mermel³, Massimo Loda⁶, Slimane Ait-Si-Ali⁵, Levi A. Garraway³, Richard A. Young⁴, and Leonard I. Zon¹

¹Stem Cell Program and Hematology/Oncology, Children's Hospital Boston, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Stem Cell Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

² Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA

³ Departments of Medical Oncology, Cancer Biology, and Center for Cancer Genome Discovery, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, and The Broad Institute, Cambridge MA 02142, USA

⁴ Whitehead Institute for Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA

⁵ UMR7216 Epigénétique et Destin Cellulaire, CNRS, Université Paris-Diderot, 35 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France

⁶ Center for Molecular Oncologic Pathology, Brigham and Women's Hospital, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁷ A. Rossi Fanelli Biochemical Sciences Department, Sapienza University of Rome, Rome 00185, Italy

Abstract

The most common mutation in melanoma, *BRAF(V600E)*, activates the BRAF serine/threonine kinase and causes excessive MAPK pathway activity^{1,2}. *BRAF(V600E)* mutations are also present in benign melanocytic nevi³, highlighting the importance of additional genetic alterations in the genesis of malignant tumors. Such changes include recurrent copy number variations that result in

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.I.Z. (zon@enders.tch.harvard.edu)..

[†]Present address: Program in Molecular Medicine, Program in Cell Dynamics, and Department of Cancer Biology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

*These authors contributed equally to this work and are listed alphabetically.

Author contributions C.J.C., Y.H. and L.I.Z. conceived the project, designed and analyzed experiments, and wrote the manuscript. C.J.C. and Y.H. performed the zebrafish and contributed to the other experiments. J.J.-V. performed tissue culture experiments. S.B. performed and analyzed ChIP-Seq experiments. V.B., L.F., S.A.-S.A. performed SETDB1 biochemistry studies. L.A.J. performed fluorescence in situ hybridization studies. T.H. performed immunohistochemistry. W.M.L., R.B. and C.H.M. analyzed copy number data. D.A.O. analyzed WM451Lu SETDB1-overexpression microarray data. F.F. designed a database to manage and analyze tumor incidence data. C.B., C.B., L.T., and A.U., provided technical assistance. M.L., L.A.G., and R.A.Y. provided input in the preparation of the manuscript.

Author information The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series GSE26372

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26372>). Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. L.I.Z. is a founder and stockholder of Fate, Inc. and a scientific advisor for Stemgent. Readers are welcome to comment on the online version of this article at www.nature.com/nature.

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

the amplification of oncogenes^{4,5}. For certain amplifications, the large number of genes in the interval has precluded an understanding of cooperating oncogenic events. Here, we have used a zebrafish melanoma model to test genes in a recurrently amplified region on chromosome 1 for the ability to cooperate with *BRAF(V600E)* and accelerate melanoma. *SETDB1*, an enzyme that methylates histone H3 on lysine 9 (H3K9), was found to significantly accelerate melanoma formation in the zebrafish. Chromatin immunoprecipitation coupled with massively parallel DNA sequencing (ChIP-Seq) and gene expression analyses revealed target genes, including Hox genes, that are transcriptionally dysregulated in response to elevated *SETDB1*. Our studies establish *SETDB1* as an oncogene in melanoma and underscore the role of chromatin factors in regulating tumorigenesis.

To identify genes that promote melanoma we focused on genomic regions subject to copy number amplification in human tumor samples. In a study of 101 melanoma short-term cultures and cell lines, chromosome 1q21 (chr1: 147.2-149.2 Mb) was identified as a recurrently amplified interval (Fig. 1a)⁶. The same region was implicated in another comprehensive analysis of copy number variation in melanoma⁴. To functionally test candidate genes from this interval for the ability to accelerate melanoma we developed an assay in transgenic zebrafish in which *BRAF(V600E)* is overexpressed on a *p53* mutant background (Supplementary Fig. 1). Melanomas and melanocytes that develop in *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf)* zebrafish⁷ are suppressed by a *mitfa(lf)* mutation. We engineered a transposon-based vector, miniCoopR, that rescues melanocytes and melanomas in a *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf); mitfa(lf)* strain and drives expression of a candidate gene in these rescued tissues. We identified genes that were present in the 1q21 region and overexpressed as mRNAs based on Affymetrix microarrays. Candidate genes were cloned into the miniCoopR vector and injected into one-cell stage *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf); mitfa(lf)* embryos. Tumor incidence curves of the resulting adults revealed that one gene in this interval, *SETDB1*, significantly accelerated melanoma onset ($p = 9.4 \times 10^{-7}$, logrank χ^2 ; Fig 1b,c and Supplementary Fig. 2). In addition to melanoma, *SETDB1* is focally amplified in non-small cell (NSCLC) and small cell lung cancer, ovarian cancer, hepatocellular cancer, and breast cancer (Supplementary Fig. 3). The anti-apoptotic gene *MCL1* resides near *SETDB1* in the 1q21 interval, and knockdown of *MCL1* was shown to diminish NSCLC proliferation and xenograft outgrowth⁸. However, *MCL1* is not overexpressed in the melanoma samples that were used to identify amplified genomic intervals, so it was not tested. No other gene accelerated melanomas, suggesting *SETDB1* is a critical gene amplified in the chromosome 1q21 interval. Using fluorescence in situ hybridization we observed *SETDB1* amplification in human melanoma short-term cultures (Supplementary Fig. 4), directly confirming the array-based copy number data from which our study originated.

Melanomas overexpressing *SETDB1* were more aggressive than control tumors when analyzed at an equivalent stage. The melanomas expressing *SETDB1* were more locally invasive than *EGFP* control tumors (Fig. 2a); 94% (*SETDB1*; n=18) vs. 53% (*EGFP*; n=17) of melanomas invaded into the muscle ($p=1.6 \times 10^{-3}$, Fisher's exact) and 89% (*SETDB1*) vs. 35% (*EGFP*) invaded into the spinal column ($p=7.2 \times 10^{-3}$, Fisher's exact). MiniCoopR-*SETDB1* melanomas had more extensive nuclear pleomorphism and larger nuclei as compared to control tumors (Supplementary Fig. 5). MiniCoopR-*SETDB1* tumors showed similar levels of BRAF protein as compared to control tumors, indicating that *SETDB1* did not accelerate melanoma formation by altering expression of the *BRAF(V600E)* transgene (Supplementary Fig. 6).

Melanocytes overexpressing *SETDB1* grew in confluent patches in zebrafish, unlike melanocytes in control zebrafish, which grew in a wild-type stripe pattern. We analyzed the

genetic interactions that are responsible for these pigmentation differences. *SETDB1*-expressing melanocytes in the *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); mitfa(lf)* strain formed confluent patches, but *SETDB1*-expressing melanocytes in the *p53(lf); mitfa(lf)* strain grew in a striped pattern (Fig. 2b). Although *SETDB1* and *BRAF(V600E)* cooperated to override normal pigment patterning, no tumors arose in miniCoopR-*SETDB1* injected *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); mitfa(lf)* zebrafish, indicating *SETDB1* and *BRAF(V600E)* require loss of *p53* to form tumors.

Oncogenic *BRAF(V600E)* induces senescence in human nevi and in cultured mammalian melanocytes⁹, and we suspected that the pigmentation differences might result from a failure of senescence and excess melanocyte proliferation caused by *SETDB1*. Using senescence-associated β -Galactosidase (SA- β Gal) staining^{10,11}, we confirmed that *BRAF(V600E)* induces senescence of zebrafish melanocytes in vivo (Supplementary Fig. 7a,b,c). We stained miniCoopR-rescued melanocytes and found *SETDB1*-expressing melanocytes to be less senescent than those expressing *EGFP* (Fig. 2C). *SETDB1*-expressing melanocytes also lacked the flattened morphology of senescent cells (Supplementary Fig. 7d). These results suggest that *SETDB1* overexpression may contribute to melanoma formation by abrogating oncogene-induced senescence.

To understand the gene expression changes that occur when *SETDB1* is overexpressed, we performed microarray analyses of zebrafish melanomas. We defined a gene signature comprised of 69 human orthologs of genes downregulated in *SETDB1* overexpressing melanomas (Fig. 3a) and tested the relationship of this signature to *SETDB1* expression in human melanoma. Using gene set enrichment analysis (GSEA)^{12,13} we found that the gene signature was inversely correlated with *SETDB1* expression across a panel of 93 melanoma short-term cultures and cell lines (Fig. 3b). *SETDB1* overexpression leads to a broad pattern of transcriptional changes, including conserved downregulation of a group of genes enriched for Hox genes and transcriptional regulators.

To identify the direct targets of *SETDB1* genome-wide in melanoma, we performed chromatin immunoprecipitation followed by massively parallel sequencing (ChIP-Seq). We identified *SETDB1* targets from WM262, a melanoma short-term culture with high *SETDB1* expression, and WM451Lu, a melanoma short-term culture with low levels of *SETDB1* (Supplementary Fig. 8). These short-term cultures harbor the *BRAF(V600E)* mutation (Supplementary Fig. 9), and their proliferation is sensitive to changes in *SETDB1* levels (Supplementary Fig. 10, Supplementary Fig. 11). In murine embryonic stem cells (mESCs), *SETDB1* binds to the promoters of developmental regulators, including HOX genes¹⁴. We observed differential binding of *SETDB1* to genes in the HOXA cluster in melanoma cell lines with high vs. low *SETDB1* expression; *SETDB1* is bound to HOXA genes in WM262 cells, whereas there is minimal binding in WM451Lu cells (Fig. 3c, Supplementary Tables 1,2). *SETDB1* catalyzes trimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9me3), thereby promoting repression of target genes. ChIP-Seq for the H3K9me3 mark showed that H3K9me3 is present at the HOXA locus in WM262 cells but absent in WM451Lu cells (Fig. 3c). HOX gene expression is inversely correlated with *SETDB1* levels in melanoma short-term cultures (Fig. 3b), suggesting that enhanced target gene binding and repression may play a role in *SETDB1*-mediated melanoma acceleration. Additional ChIP-Seq, using WM262 cells, of the *SETDB1* methyltransferase-stimulatory cofactor MCAF1/hAM¹⁵ suggests that the effects of *SETDB1* overexpression are mediated in part by MCAF1/hAM (Supplementary Fig. 12).

We assayed effects of *SETDB1* overexpression on target genes by infecting WM451Lu cells with *SETDB1* lentivirus. Using *SETDB1* ChIP-Seq data from WM451Lu, we determined that *SETDB1*-bound targets are significantly enriched in downregulated but not upregulated

genes (Supplementary Fig. 13, Supplementary Table 3), suggesting that a major consequence of *SETDB1* amplification is repression of SETDB1-bound target genes. However, many SETDB1 target genes in both WM451Lu and WM262 lines are not methylated, and additional analyses show a relationship between higher *SETDB1* levels and elevated expression of many SETDB1 targets (Supplementary Fig. 14).

To obtain mechanistic insight into the role of SETDB1 in regulating gene expression, we undertook genetic and biochemical studies that evaluate methyltransferase activity. Recently, a complex containing SETDB1 and the H3K9 methyltransferases SUV39H1, G9a and GLP was discovered¹⁶. To examine the possibility that other methyltransferases act with *SETDB1* to modulate melanoma onset, we tested whether *SUV39H1* could accelerate melanoma formation in zebrafish. As with *SETDB1*, overexpression of *SUV39H1* led to the formation of confluent melanocyte patches and accelerated melanoma onset (Fig. 3d). We next examined the consequences of mutations that render SETDB1 enzymatically inactive. Enzymatically-deficient SETDB1 was capable of incorporating into the methyltransferase complex in vitro (Fig. 3e) and in vivo (Supplementary Fig. 15). Furthermore, in the context of enzymatically-deficient SETDB1, the complex retained methyltransferase activity (Fig. 3f, Supplementary Fig. 16) and binding site localization (Supplementary Fig. 17). Lastly, melanoma incidence curves from two methyltransferase-deficient SETDB1 mutants were similar to each other and to wild-type SETDB1 (Fig. 3d). Our studies suggest a model in which activity of the methyltransferase complex containing SETDB1 and SUV39H1 causes alterations of gene expression that lead to melanoma acceleration.

To determine the extent of SETDB1 overexpression in human melanomas, and to examine potential clinical implications, we performed immunohistochemistry (IHC) on melanoma tissue microarrays. After confirming antibody specificity (Supplementary Fig. 18), we observed high levels of SETDB1 expression in 5% of normal melanocytes (n=20), 15% of benign nevi (n=20), and 70% of malignant melanoma (n=91; Fig. 4). Based on our observations of premalignant melanocytic lesions in zebrafish, we speculate that human nevi harboring SETDB1 overexpression may have a higher likelihood of oncogenic progression as compared with nevi that show basal levels of expression. These data indicate that the majority of malignant melanomas demonstrate overexpression of SETDB1 protein.

In this study we adapted the zebrafish as a platform for cancer gene discovery. Through the creation and analysis of over 3000 transgenic animals, *SETDB1* was identified as a gene capable of accelerating melanoma formation in cooperation with *BRAF(V600E)*. Amplification of 1q21 in melanoma does not preferentially co-occur with the *BRAF(V600E)* mutation (p=0.28, 2 sample t-test). Therefore, it is likely that the tumor-promoting activity of *SETDB1* is not exclusively dependent on *BRAF(V600E)*, which is common in melanomas but found less frequently in other tumor types with 1q21 amplification. SETDB1 forms a multimeric complex with SUV39H1 and other H3K9 methyltransferases. Based on our findings we speculate that *SETDB1* overexpression can increase activity of the H3K9 methyltransferase complex, leading to alterations in target specificity. Inactivating mutations in both histone methyltransferases and demethylases were recently described in renal cell carcinoma^{17,18}. Our study lends functional support to the notion that perturbation of histone methylation promotes cancer. *SETDB1* is focally amplified in a broad range of malignancies, suggesting that alterations in histone methyltransferase activity could define a biologically related subset of cancers.

Methods Summary

miniCoopR Assay

miniCoopR was constructed by inserting a zebrafish *mitfa* minigene (promoter + open reading frame + 3' UTR) into the BglII site of pDestTol2pA2¹⁹. Individual MiniCoopR clones were created by Gateway multisite recombination using human, full-length open reading frames (Invitrogen). 25pg of each MiniCoopR-Candidate clone and 25pg of *tol2* transposase mRNA were microinjected into one-cell embryos generated from an incross of *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf); mitfa(lf)* zebrafish. Rescued animals were scored weekly for the presence of visible tumor.

Senescence Assay

SA-βGal staining was performed as described¹⁰, except that scales plucked from the dorsum of melanocyte-rescued zebrafish were stained instead of tissue sections. This assay was performed in an *albino(b4)* mutant background so melanin pigment would not obscure βGal staining. Experimental animals were injected with 20pg miniCoopR-*SETDB1* + 10pg miniCoopR-*EGFP* and controls with 30pg miniCoopR-*EGFP*. Rescued melanocytes were recognized as EGFP-positive cells.

Gene Expression

From zebrafish, total RNA was extracted from four miniCoopR-*SETDB1* melanomas and four miniCoopR-*EGFP* melanomas. Total RNA from each was used for synthesis of cDNA, which was hybridized to a Nimblegen 385K array (catalog 071105_Zv7_EXPR). Zebrafish genes downregulated by *SETDB1* were selected by fold change (*EGFP/SETDB1*) > 5 and filtered by a 'SETDB1 specificity score', which was defined as a fold change of >3 when comparing *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf)* melanomas to miniCoopR-*SETDB1* melanomas.

Immunohistochemistry

Human melanoma tissue microarrays (TMAs) were analyzed by immunohistochemistry for SETDB1 using rabbit polyclonal Ab (Sigma HPA018142, 1:200) and a mouse monoclonal Ab 4A3 (Sigma, WH0009869M7, 1:400) with a purple substrate for the secondary antibody (Vector Labs, VIP Substrate). A methyl green counterstain was used.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

We thank David Harrington, Richard White and Yi Zhou for helpful discussions, Christian Lawrence, Isaac Adatto and Li-Kun Zhang for expert fish care, Garrett Frampton for bioinformatics assistance, and Kristen Kwan, Chi-Bin Chien, and Jesse Boehm for reagents. This work was supported by grants from the Damon Runyon Cancer Research Foundation (C.J.C – DRG-1855-05), Charles A. King Trust Foundation (C.J.C.), a Young Investigator Award from the American Society of Clinical Oncology (Y.H.), Canadian Institutes of Health Research (S.B.) and National Institutes of Health (C.J.C. – K99AR056899-02; Y.H. – K08DK075432-04; R.A.Y. – CA146455, HG002668; L.I.Z. – DK53298-08).

References

1. Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949–954. [PubMed: 12068308]
2. Wan PT, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116(6):855–867. [PubMed: 15035987]

3. Pollock PM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003; 33(1):19–20. [PubMed: 12447372]
4. Curtin JA, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005; 353(20): 2135–2147. [PubMed: 16291983]
5. Garraway LA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005; 436(7047):117–122. [PubMed: 16001072]
6. Lin WM, et al. Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2008; 68(3):664–673. [PubMed: 18245465]
7. Patton EE, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol.* 2005; 15(3):249–254. [PubMed: 15694309]
8. Beroukhi R, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010; 463(7283):899–905. [PubMed: 20164920]
9. Michaloglou C, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005; 436(7051):720–724. [PubMed: 16079850]
10. Dimri GP, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(20):9363–9367. [PubMed: 7568133]
11. Santoriello C, et al. Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. *Dis Model Mech.* 2009; 2(1-2):56–67. [PubMed: 19132118]
12. Subramanian A, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(43):15545–15550. [PubMed: 16199517]
13. Mootha VK, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003; 34(3):267–273. [PubMed: 12808457]
14. Bilodeau S, Kagey MH, Frampton GM, Rahl PB, Young RA. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev.* 2009; 23(21):2484–2489. [PubMed: 19884255]
15. Wang H, et al. mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell.* 2003; 12(2):475–487. [PubMed: 14536086]
16. Fritsch L, et al. A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol Cell.* 2010; 37(1):46–56. [PubMed: 20129054]
17. Dalglish GL, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature.* 2010; 463(7279):360–363. [PubMed: 20054297]
18. van Haaften G, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet.* 2009; 41(5):521–523. [PubMed: 19330029]
19. Kwan KM, et al. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn.* 2007; 236(11):3088–3099. [PubMed: 17937395]
20. Beroukhi R, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(50):20007–20012. [PubMed: 18077431]
21. Nisolle M, et al. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod.* 1999; 14(11): 2844–2850. [PubMed: 10548634]

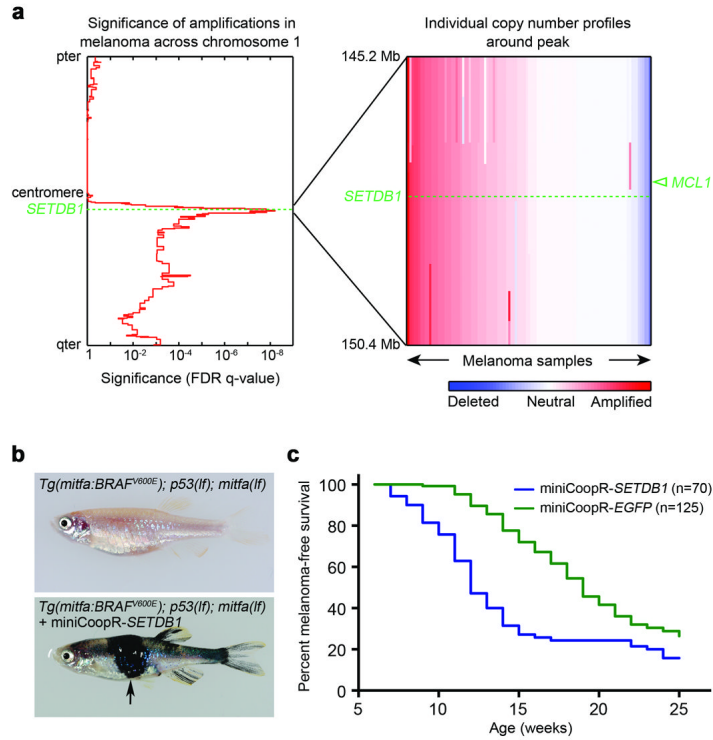


Figure 1. SETDB1 accelerates melanoma formation in zebrafish

a, Left, significance of copy number amplification in human melanoma samples determined using genomic identification of significant targets in cancer (GISTIC)^{8,20}. q-values (x-axis) are plotted across chromosome 1. Right, copy number profiles of the 1q21 interval in melanoma samples. The positions of *SETDB1* (dotted line) and *MCL1* (arrowhead) are indicated. **b**, The *Tg(mitfa:BRAF^{V600E}); p53(lf); mitfa(lf)* strain (top) injected with miniCoopR-cloned candidate oncogenes. Animals injected with miniCoopR-*SETDB1* (bottom) have rescued melanocytes and rapidly develop melanomas (arrow). **c**, Melanoma-free survival curve of miniCoopR-*SETDB1* (weighted average of 2 independent experiments, n=70) and miniCoopR-*EGFP* (weighted average of 3 independent experiments, n=125) injected zebrafish.

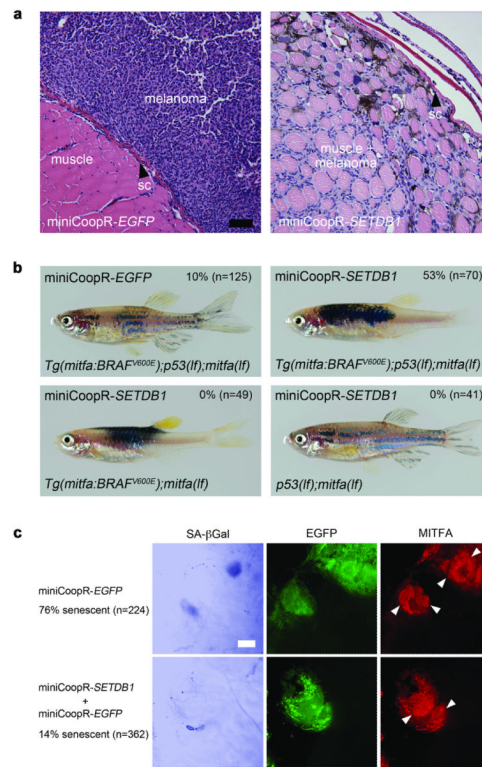


Figure 2. *SETDB1* effects on melanoma cells and melanocytes

a, Hematoxylin and eosin-stained transverse sections of zebrafish melanomas at two weeks post onset. At this time point dorsal miniCoopR-*EGFP* melanomas (left) display exophytic growth, whereas miniCoopR-*SETDB1* melanomas (right) have invaded from the skin, through the collagen-rich stratum compactum of the dermis (sc), into the underlying musculature. Scale bar = 70 μm. **b**, *SETDB1* interacts with *BRAF(V600E)* to affect pigmentation pattern, but a *p53(lf)* mutation is required to form melanomas. MiniCoopR-*EGFP* or MiniCoopR-*SETDB1* was injected into the indicated transgenic strains. Percentages indicate melanoma incidence at 12 weeks of age. **c**, *SETDB1* abrogates *BRAF(V600E)*-induced senescence. Left, brightfield pseudocolored photomicrographs of SA-βGal staining performed on scale-associated melanocytes. Middle and right, fluorescent photomicrographs of the same melanocytes. miniCoopR-rescued melanocytes in this experiment express *mitfa* promoter-driven EGFP (middle) and the MITFA protein (right). Multiple nuclei (arrowheads) are present in *BRAF(V600E)*-expressing melanocytes. Percentage of senescent melanocytes is indicated at left ($p = 7.3 \times 10^{-51}$, χ^2). Scale bar = 10 μm.

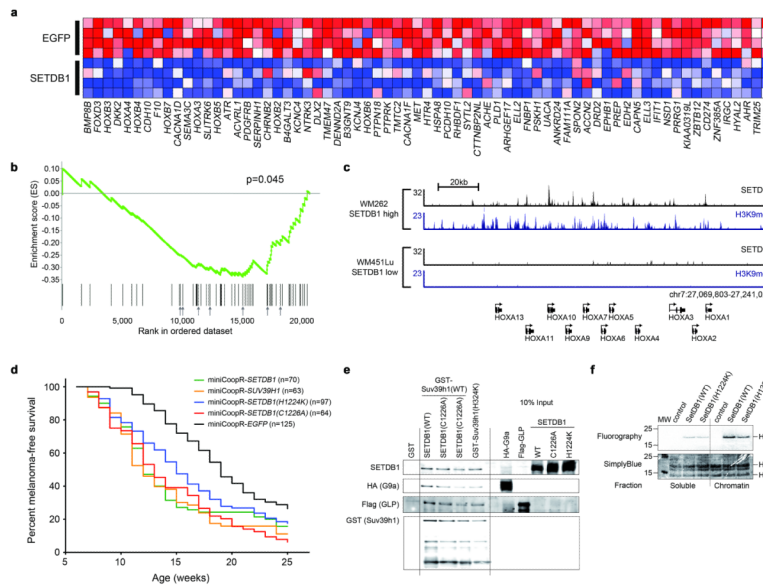


Figure 3. SETDB1 target gene regulation and HMTase complex formation

a, Heat map of genes downregulated in zebrafish melanomas that overexpress *SETDB1* compared with control (*EGFP*) melanomas. **b**, Graphical representation of the rank-ordered gene list derived from a panel of human melanoma short-term cultures stratified based on *SETDB1* expression level. GSEA shows that homologs of zebrafish *SETDB1*-downregulated genes are similarly downregulated in human melanomas as levels of *SETDB1* increase (ES = -0.35, NES = -1.43, FDR q -val = 0.045, p = 0.045). Arrows indicate positions of HOX genes. **c**, *SETDB1* and H3K9me3 ChIP-Seq profiles at the HOXA locus in human melanoma cells. The number of sequence reads is shown on the y axis. **d**, Melanoma-free survival curves of zebrafish expressing *SUV39H1* (p = 6.74×10^{-8} vs. *miniCoopR-EGFP*, logrank χ^2) and the methyltransferase-deficient *SETDB1(H1224K)* (p = 0.24 vs. *miniCoopR-SETDB1*, p = 8.4×10^{-5} vs. *miniCoopR-EGFP* and *SETDB1(C1226A)* (p = 0.20 vs. *miniCoopR-SETDB1*, p = 1.3×10^{-11} vs. *miniCoopR-EGFP*) variants. **e**, In vitro reconstitution of methyltransferase complexes. Sequential purification of GST-tagged SUV39H1, Flag-tagged GLP and HA-tagged G9a proteins was followed by western blotting using antibodies shown on left. **f**, Histone methylation assays on complexes purified from C2C12 cells.

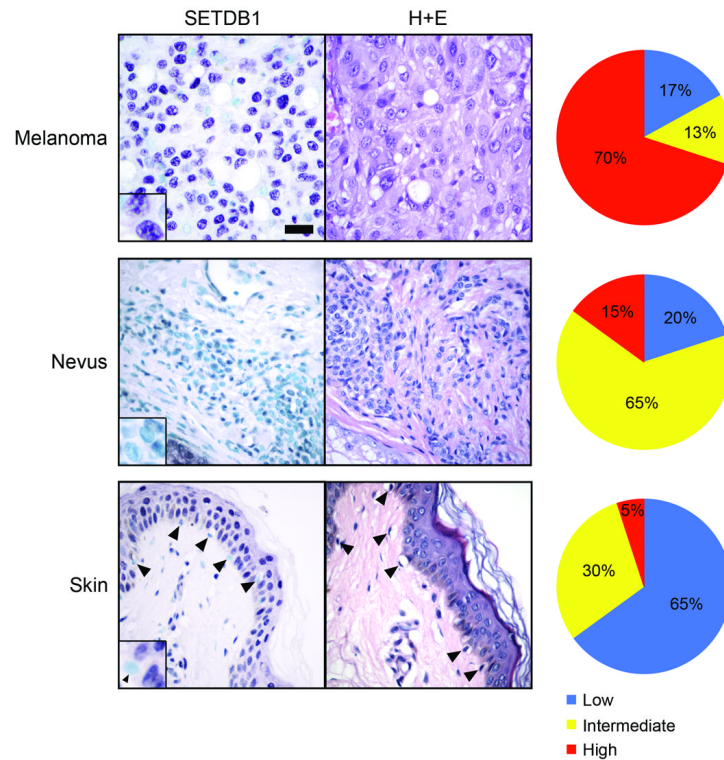


Figure 4. High expression of SETDB1 protein is common in human melanomas but not nevi or normal melanocytes

Immunohistochemical staining of SETDB1 (left) and hematoxylin and eosin (H+E) staining (center). SETDB1 expression (right) was scored on malignant melanoma (top; n=91), nevi (middle; n=20) and normal skin (bottom; n=20). SETDB1 expression was measured as described in Methods. Summarized and raw data from two independent antibodies are described in Supplementary Tables 4 and 5, respectively. Scale bar = 30 μ m, insets are 2.5x magnified.

Acetonic Extract of *Buxus sempervirens* Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells

Ouardia Ait-Mohamed^{1*}, Valentine Battisti², Véronique Joliot², Lauriane Fritsch², Julien Pontis², Souhila Medjkane², Catherine Redeuilh³, Aazdine Lamouri³, Christine Fahy³, Mohamed Rholam³, Djebbar Atmani¹, Slimane Ait-Si-Ali^{2*}

1 Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Béjaia, Béjaia, Algeria, **2** Laboratoire Epigénétique et Destin Cellulaire, UMR7216, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **3** Laboratoire ITODYS, UMR7086 CNRS, Université Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Abstract

Plants are an invaluable source of potential new anti-cancer drugs. Here, we investigated the cytotoxic activity of the acetonic extract of *Buxus sempervirens* on five breast cancer cell lines, MCF7, MCF10CA1a and T47D, three aggressive triple positive breast cancer cell lines, and BT-20 and MDA-MB-435, which are triple negative breast cancer cell lines. As a control, MCF10A, a spontaneously immortalized but non-tumoral cell line has been used. The acetonic extract of *Buxus sempervirens* showed cytotoxic activity towards all the five studied breast cancer cell lines with an IC₅₀ ranging from 7.74 µg/ml to 12.5 µg/ml. Most importantly, the plant extract was less toxic towards MCF10A with an IC₅₀ of 19.24 µg/ml. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis showed that the plant extract induced cell death and cell cycle arrest in G₀/G₁ phase in MCF7, T47D, MCF10CA1a and BT-20 cell lines, concomitant to cyclin D1 downregulation. Application of MCF7 and MCF10CA1a respective IC₅₀ did not show such effects on the control cell line MCF10A. Propidium iodide/Annexin V double staining revealed a pre-apoptotic cell population with extract-treated MCF10CA1a, T47D and BT-20 cells. Transmission electron microscopy analyses indicated the occurrence of autophagy in MCF7 and MCF10CA1a cell lines. Immunofluorescence and Western blot assays confirmed the processing of microtubule-associated protein LC3 in the treated cancer cells. Moreover, we have demonstrated the upregulation of Beclin-1 in these cell lines and downregulation of Survivin and p21. Also, Caspase-3 detection in treated BT-20 and T47D confirmed the occurrence of apoptosis in these cells. Our findings indicate that *Buxus sempervirens* extract exhibit promising anti-cancer activity by triggering both autophagic cell death and apoptosis, suggesting that this plant may contain potential anti-cancer agents for single or combinatory cancer therapy against breast cancer.

Citation: Ait-Mohamed O, Battisti V, Joliot V, Fritsch L, Pontis J, et al. (2011) Acetonic Extract of *Buxus sempervirens* Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells. PLoS ONE 6(9): e24537. doi:10.1371/journal.pone.0024537

Editor: Panela Rameshwar, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: May 31, 2011; **Accepted:** August 12, 2011; **Published:** September 15, 2011

Copyright: © 2011 Ait-Mohamed et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR); the Association Française contre les Myopathies (AFM); the Fondation Bettencourt-Schueller; the Programme franco-algérien de formation supérieure en France (PROFAS) via the Centre des Oeuvres Universitaires et Scolaires (CROUS); the Centre national de la recherche scientifique (CNRS); and Université Paris Diderot. Dr. Ait-Mohamed was the recipient of a fellowship from the Programme franco-algérien de formation supérieure en France PROFAS managed by the CROUS. Dr. Battisti and Dr. Pontis are recipients of fellowships from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ouardia.ait-mohamed@univ-paris-diderot.fr (OA); slimane.ait-siali@univ-paris-diderot.fr (SA)

Introduction

Breast cancer, a major worldwide health issue, is considered as the most common malignancy and the most common cause of cancer-related death in Western countries [1]. Standard cancer therapy generally combines surgery, multi-therapeutic agents and ionizing radiation [2]. These anticancer agents induce cell cycle arrest and/or cell death by apoptotic or non-apoptotic mechanisms including necrosis, senescence, autophagy and mitotic catastrophe [3,4].

Major issues concerning conventional anticancer chemotherapy are the occurrence of side effects induced by the non-specific targeting of both normal and cancer cells [5,6], and the emergence of drug-resistant cancer cells [7]. Based on this, there has been

growing interest in the use of naturally occurring molecules with chemo-preventive and chemotherapeutic properties in cancer treatment [8–12]. Natural products will thus continue to play major role as active substances, model molecules for the discovery and validation of drug targets [13,14]. Among natural sources, plants have played an important role as a source of effective anticancer agents [15–17]. Four examples are well known: Taxol[®] from *Taxus brevifolia* L., vinca alkaloids from *Catharanthus roseus* G. Don, camptothecin from *Camptotheca acuminata*, Decne and podophyllotoxin from *Podophyllum peltatum* L. [18,19].

In folk medicine, *Buxus sempervirens* L. is used to treat rheumatism, arthritis, bile duct infections, diarrhea, fever and skin ulceration. Studies highlighted the unique feature of the genus *Buxus* regarding the presence of steroidal alkaloids (more than 200)

[20–23]. The latter are known for exhibiting promising biological activities including anti-acetylcholine esterase [24–27], cytotoxic [28] and immunosuppressive activities [29]. Nevertheless, to our knowledge, no anticancer activity of *Buxus sempervirens* L. extracts has been yet described.

Based on folk medicine, we investigated here the cytotoxic effect of the acetonetic extract of *Buxus sempervirens* L. against five breast cancer cell lines: MCF7, MCF10CA1a, T47D, BT-20 and MDA-MB-435 or the spontaneously immortalized cell line MCF10A as a control. Our results showed that the *Buxus* extract has specific cytotoxic effects toward cancer cell lines by mainly inducing a decrease in cyclin D1. Interestingly, the extract induced autophagic cell death and apoptosis in breast cancer cells tested and a caspase 3-independent apoptosis cell death in the aggressive MCF10CA1a cells.

Results

Buxus acetonetic extracts exhibit cytotoxic properties and induce phenotype modifications in breast cancer cells

In order to evaluate the cytotoxicity of the acetonetic extract of *Buxus*, an MTT assay was monitored on five breast cancer cell lines. The MCF7, MCF10CA1a and T47D, which are aggressive triple positive breast cancer cells, and BT-20 and MDA-MB-435 that are triple negative breast cancer cells. The extract exhibited cytotoxic activity toward all cancer cell lines tested, displaying reduced IC_{50} ($<20 \mu\text{g/ml}$) (Figure 1A). Moreover, the IC_{50} obtained against the control cell line MCF10A was higher ($IC_{50} = 19.24 \mu\text{g/ml}$, Figure 1A). These results suggest a specific cytotoxic effect mainly against breast cancer cell lines.

In order to give a better understanding of the mechanisms of cytotoxicity in cancer cells, we decided to carry on experiments on aggressive triple positive cancer cells: MCF7, MCF10CA1a, T47D and the triple negative breast cancer cell line BT-20.

First, major phenotypic changes were noticed when cancer cell lines were incubated in the presence of *Buxus* extract. Hence, interestingly, the cancer cell lines treated with the same extract (corresponding IC_{50} during 72 h) displayed different apoptotic cell shapes regarding the apoptotic volume decrease (AVD) (Figure 1B and 1C). To further test this, cytoskeleton staining (anti- α -tubulin) was applied. Treated MCF7, T47D and BT-20 cells exhibited a reduced round-shape cellular form before complete detachment from cell culture dish (Figure 1B, 1D and 1E), while MCF10CA1a cells showed a distinct and severe shrinkage (Figure 1C). These specific shapes are well known as the AVD due to massive efflux of K^+ and Cl^- through their specific channels, leading to water escape from the cytoplasm, the latter being considered as a major hallmark of apoptotic cells [30,31].

Finally, while DMSO-treated cells showed large nuclei with distinguishable nucleoli, we have noticed the transformation of nuclei into a unique pyknotic mass in dramatically-injured cells (Figure 1 B–E). On the other hand, normal MCF10A cells did not exhibit such dramatic phenotype changes. Together, our results suggest a cytotoxic activity of the *Buxus* extract regarding cancerous cells *via* apoptotic cell death.

Acetonetic extract of *Buxus* induces cell cycle arrest

We studied the effect of the *Buxus* acetonetic extract on the cell cycle of the studied breast cell lines. After 24 h incubation with the extract, stability is generally noticed in all cell cycle sub-populations of the control cell line MCF10A cells, with a slight increase in sub-G1 population observed with both concentrations applied (Figure 2C). We have also noticed a little decrease in the S-phase sub-population (Figure 2C). Interestingly, the IC_{50} were

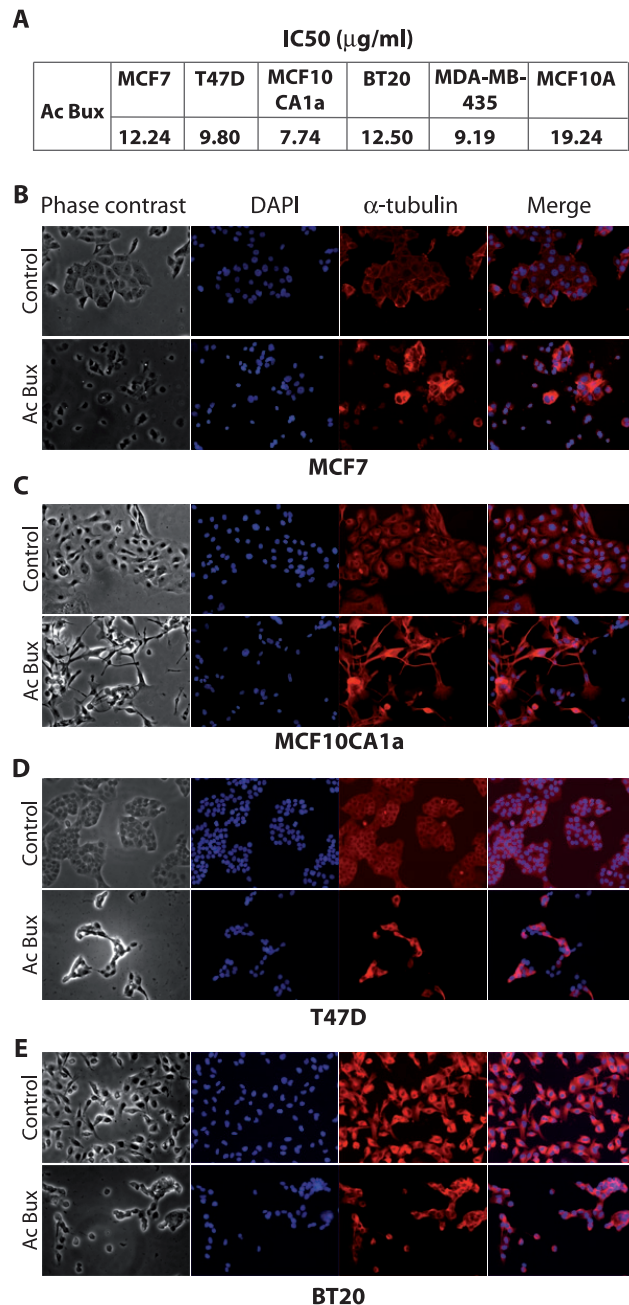


Figure 1. Cytotoxic effects of the acetonetic extract of *Buxus sempervirens* L. towards breast cancer MCF7 and MCF10CA1a cells. **A.** IC_{50} determined by the dose-response curves obtained by the MTT assay. **B. C. D. and E.** Different cell shapes exhibited by MCF7, MCF10CA1a, T47D, MDA-MB-435 and BT-20, respectively, treated with *Buxus* extract at their respective IC_{50} during 72 h. Left panel: phase contrast images; Right panel: anti- α -tubulin fluorescence staining. Control cells are treated with vehicle DMSO (magnification $\times 200$). Ac Bux: acetonetic *Buxus* extract. doi:10.1371/journal.pone.0024537.g001

capable of triggering cell death of both cancerous cell lines. Thus, after 24 h of treatment, the sub-G1 sub-population sharply increased from 2.82% to 30.30% and from 7.31% to 20.64% for MCF10CA1a and MCF7, respectively (Figure 2A, Figure S1, S2). Concomitantly, there is a decrease in G0/G1 and S-phase sub-populations, mainly for MCF10CA1a cells from 69.59% to

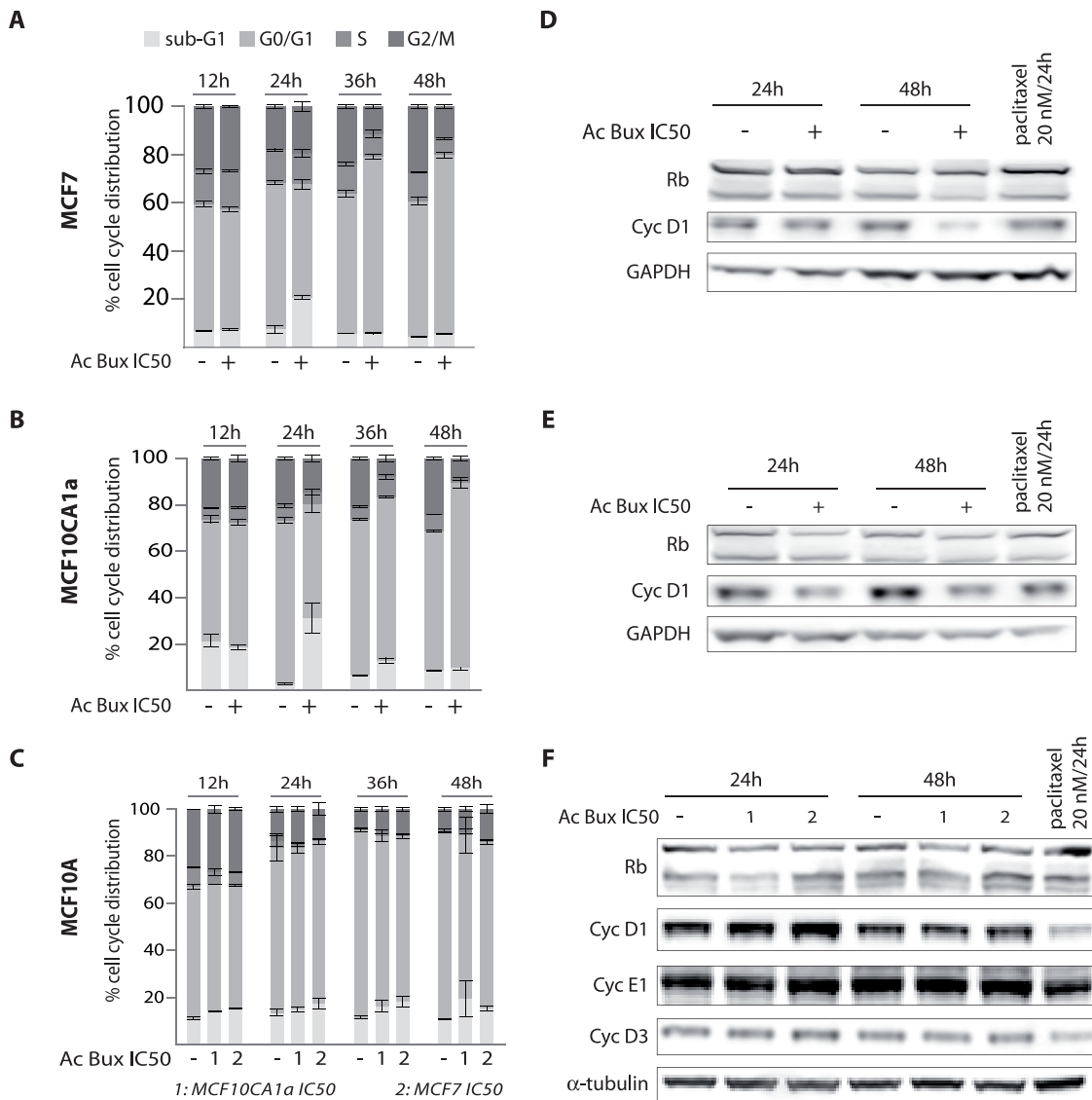


Figure 2. The acetonetic extract of *Buxus* induces cell cycle arrest in MCF7 and MCF10CA1a breast cancer cell lines. **A.** MCF7 cells were incubated for increasing period intervals (12 h, 24 h, 36 h and 48 h) with their IC₅₀ concentrations. The results represent means \pm SEM of three experiments. **B.** MCF10CA1a cells were incubated for increasing period intervals (12 h, 24 h, 36 h and 48 h) with their IC₅₀ concentration. The results represent means \pm SEM of three experiments. **C.** MCF10A cells were incubated for the same period intervals (12 h, 24 h, 36 h and 48 h) with the IC₅₀ of MCF7 and MCF10CA1a, respectively. The results represent means \pm SEM of three independent experiments. **D.** Immunoblots of total cell extracts isolated from MCF7 treated or not with plant extract as indicated and probed with an anti-cyclin D1 antibody. GAPDH was used as a loading control. **E.** Immunoblots of total cell extracts isolated from MCF10CA1a treated or not with plant extract as indicated and probed with an anti-cyclin D1 antibody. GAPDH was used as a loading control. **F.** Immunoblots of total cell extracts isolated from MCF10A treated or not with plant extract (IC₅₀s of MCF7 and MCF10CA1a concentrations) as indicated and probed with an anti-cyclin D1 antibody. α -tubulin was used as a loading control. Ac Bux: acetonetic *Buxus* extract.
doi:10.1371/journal.pone.0024537.g002

48.05% and from 6.30% to 4.80%, respectively (Figure 2B). At 48 h, there is a significant increase in G0/G1 sub-population to the detriment of S and G2/M sub-populations (Figure 2A and 2B).

Finally, we have noticed in all cancer cell lines tested that a maximum of sub-G1 cell population is reached 24 h post-treatment, followed by a reduction (Figure 2A and 2B for MCF7 and MCF10CA1a, respectively). Concerning T47D and BT-20 cells, despite the observation of numerous floating dead cells, no major changes are illustrated in Sub-G1 sub-populations (Figure S3A and S3D). This could be due to the loss of the severely-damaged cells during washing steps. It is indeed established that the content of DNA remaining in apoptotic cells for cytometric

analysis vary markedly depending on the extent of DNA degradation and cell washing steps [32]. Concerning MCF7 and MCF10CA1a, striking results were also noticed regarding the concentrations used: with high concentrations (2 times the IC₅₀), there is an increase in sub-G1 population, while with low concentrations there is a decrease in S and G2/M phases (Figure S1A and S2A).

Concerning cell cycle markers, all cancer cells tested treated with IC₅₀ during 24 h and 48 h showed a noticeable decrease in cyclin D1 expression (Figure 2D and 2E, and Figure S3 B–C and E–F). No major changes in the expression of Rb were noticed in treated cells, we have noticed a slight decrease in

hypo-phosphorylated Rb protein levels 48 h after treatment (Figure 2D and 2E). Nonetheless, the IC₅₀ of MCF7 and MCF10CA1a applied to MCF10A showed neither of the above effects (Figure 2C and 2F). These results indicate that the failure of tested breast cancer cells to enter S phase is due to a decrease in cyclin D1 induced by the *Buxus* acetonetic extract.

***Buxus* acetonetic extract induces autophagy in breast cancer cells**

We have next investigated the role of *Buxus* acetonetic extract in cell death. To this end, cells were collected after 24 h and 48 h treatment with respective IC₅₀, double-stained with PI and Annexin V-FITC and analyzed by FACS (Figure 3 and Figure S4). The kinetic of cell interaction with Annexin V revealed that the extract acts very fast (not shown). Interestingly, there is a discrepancy in the behavior of the breast cancer cell lines. Indeed, while with MCF10CA1a, T47D and BT-20 we revealed a pre-apoptotic sub-population (PI⁻/Annexin V⁺) (13.10% versus 25.57% after 24 h and 48 h of treatment, respectively for MCF10CA1a as an example), that latter shifted to a late apoptotic and/or a necrotic sub-population (PI⁺/Annexin V⁻ quadrant) (Figure 3B, Figure S4 A–B). However, with MCF7 cell line, we noticed that the cell population shifted directly to PI⁺ quadrants (dead cells) without transition by the PI⁻/Annexin V⁺ (Figure 3A), even with reduced time contact kinetics (one hour intervals, data not shown). These findings suggested that the process of death induced by *Buxus* acetonetic extract differs in the cancer cell lines; MCF10CA1a, BT-20 and T47D cells die *via* apoptosis pathway, while MCF7 cell death seemed to rely mainly on autophagy.

As previously seen with PI staining, reduced cell death is observed with MCF10A, even after 48 h of treatment, confirming the specific effect on cancerous cell lines. Paradoxically, a more lethal action is noticed after 24 h of incubation compared to 48 h (Figure 3C).

According to pictures obtained with transmission electronic microscopy, untreated MCF7 cells displayed normal characteristics with, however, the presence of some auto-lysosomes/auto-phagosomes in cell cytoplasm (Figure 4A), suggesting that even in normal growth conditions, MCF7 cells proceed to some controlled autophagy. Nevertheless, treated MCF7 cells with the *Buxus* acetonetic extract (IC₅₀ during 72 h) showed abundant auto-lysosomes/auto-phagosomes dispersed in the cytoplasm (Figure 4A). Hence, in the presence of the plant extract, the phenomenon is dramatically increased, leading to cell death without any damage to mitochondria and cytoplasmic membrane. These observations suggested that MCF7 death is due to autophagy rather than apoptosis. This is in agreement with previous reports showing that MCF7 cells do not undergo apoptosis after treatment with numerous apoptosis stimuli, including Tamoxifen [33], or injection of supra-physiological amounts of cytochrome C [34].

Concerning MCF10CA1a cells, pictures taken after IC₅₀ treatment during 72 h, provided several hallmarks of apoptosis and autophagy (Figure 5A). We noticed the presence of initial autophagic vacuoles and degradative autophagic vacuoles, perinuclear localization of mitochondria, and most importantly, some of them were damaged.

To carry on our investigation concerning autophagy we studied a main autophagy marker, the Microtubule associated Light Chain 3 or LC3 protein. LC3 is the mammalian homolog of the yeast Apg8p protein, essential for amino acid starvation-induced autophagy [35,36]. LC3 is present in two forms in cells: LC3-I is the cytoplasmic form, which is processed into a lipidic LC3-II form, associated with the auto-phagosome membrane [35,36]. Therefore, we compared the LC3 distribution in *Buxus* acetonetic

extract-treated and untreated cells (Figures 4B–C, 5B–5C, Figure S5). In DMSO-treated cells, we noticed a homogeneous cytoplasmic distribution of unprocessed LC3-I, while in plant extract-treated cells (IC₅₀/72 h), many foci are depicted, corresponding to lipidic transformed LC3-II, mainly around nuclei (Figures 4C for MCF7, 5C for MCF10CA1a, Figure S5 A for T47D and C for BT-20). This specific signal corresponds to the auto-phagosome trans-membrane processed version of LC3. These results are in agreement with images taken with transmission electron microscopy (Figures 4A and 4B for MCF7 and MCF10CA1a respectively), where we noticed accumulation of late auto-phagosomes mainly around cell nuclei. In the case of MCF10CA1a cells, the foci pattern of LC3-II was difficult to confirm since there was very little cytoplasm around nuclei (Figure 5C).

Concerning immunoblots, the presence of LC3-II in untreated (24 h) MCF7 cells, demonstrated the occurrence of controlled-autophagy in normal cells, as already seen with transmission electron microscopy (Figure 4A). For MCF10CA1a aggressive cells, we found a decrease in LC3-II in *Buxus* acetonetic extract-treated cells (Figure 5C). This is probably because LC3-II is present both on inner and outer auto-phagosome membranes, with the former being degraded inside auto-lysosomes, whereas LC3 on the outer membrane is deconjugated by Atg4 (Autophagy related gene 4) and returns to the cytosol [35]. Finally, concerning the control cell line MCF10A, a faint LC3-II signal is detected when the cells were treated with the IC₅₀ of MCF7 (Figure S6). Immunoblots of total cell extracts from treated and non-treated T47D and BT-20 confirmed also autophagy processing since we have noticed the processed form of LC3 (LC3 II, 24 h and 48 h after treatment) (Figure S5 B and D for T47D and BT-20, respectively).

Acetonetic *Buxus* extract induces caspase 3-independent apoptosis in MCF10C1a

In order to get more insights on the pattern of cell death, mainly in MCF10CA1a, we studied the activation of several additional markers related to apoptosis by immunoblot (Figure 6A). Procaspase 3 is undetectable in MCF-7 cells due to a 47-bp deletion within exon 3 of the procaspase-3 gene that alters the reading frame of the message, resulting in an unstable truncated polypeptide [34,37]. According to that, activated caspase 3 was assessed in MCF10CA1a (Figure 6A), as well as in the control cell line MCF10A (Figure S6). Surprisingly, active caspase 3 was absent after treatment with the plant extract, even with reduced incubation times (Figure 6A). This result is in contradiction with our previous finding concerning Annexin V staining; the aggressive cell line MCF10CA1a displayed PI⁻/Annexin V⁺ pattern after plant treatment, illustrating an apoptotic cell death concomitant to autophagy. Taken together, these results indicate that MCF10CA1a death can be related only to autophagy, triggered by metabolic stress created by damaged mitochondria that caused an energy-deprivation state, or the autophagy is coupled to an apoptosis cell death independent of caspase 3 activation, since we noticed occurrence of DNA damages related apoptosis (presence of cleaved PARP and γ H2AX, Figure 6A).

As the cells displayed a G1-phase arrest, we were interested in testing levels of p21, a potent cell cycle inhibitor through inactivation of G1-phase cyclin/CDK complexes. Surprisingly, we have found a decrease in p21 levels in cancer cell lines tested (Figures 4B and 5B, Figure S5 B and D). In addition, the cells showed reduced levels of Survivin after plant extract treatment. In the control cell line MCF10A, Survivin was detected at 24 h but no effect on its levels is noticed after plant extract treatment. At

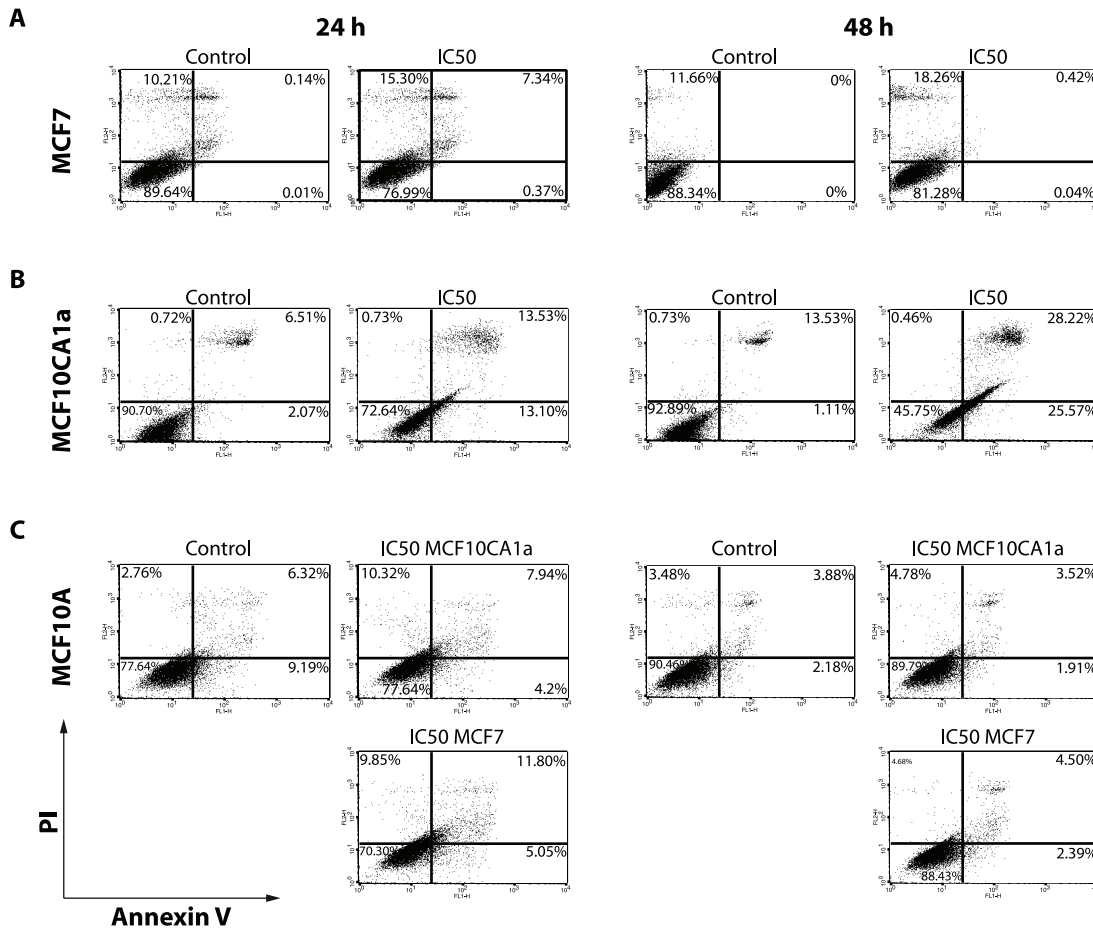


Figure 3. *Buxus* extract induces autophagy in cancer cells as evidenced by PI/Annexin V double staining and FACS analysis. A–B. PI/Annexin V double staining of untreated and treated MCF7 (A) and MCF10CA1a (B) cells with IC₅₀ concentration for 24 h and 48 h. **C.** FACS analysis with PI/Annexin V double staining of MCF10A cell line (control cell line) treated with MCF7 and MCF10CA1a IC₅₀ respective *Buxus* extract concentrations for 24 h and 48 h.

doi:10.1371/journal.pone.0024537.g003

48 h, the level of Survivin is undetectable along with Cyclin A2 (Figure S6), this can be explained by the fact that the cell line did not undergo mitosis and can hence explain the disappearance of Survivin.

It is known that the up-regulation of Survivin expression in cancer cells is independent of the cell cycle, suggesting an increase of its anti-apoptotic role compared to normal cells, in which its mitotic regulation functions may be predominant.

Beclin 1 is a 60-kDa protein that plays a critical role in the formation of auto-phagosomes in mammalian cells [38,39]. 40% of human breast carcinoma cell lines exhibit deletions of one or more alleles of *beclin 1* gene [40]. This decreased expression of Beclin 1 suggests that specific molecular alterations in autophagy pathways may contribute to tumorigenesis [41]. As illustrated in Figure 4, 6B and 6C, an increase in Beclin 1 levels was noticed in treated MCF7, T47D and BT-20, respectively, demonstrating that the plant extract triggers autophagic cell death.

Acetonic *Buxus* extract induces apoptosis in T47D and BT-20

Since we have noticed the presence of pre-apoptotic subpopulations in Annexin V-FITC stained cells, we decided to check the occurrence of apoptosis in these cell lines. As illustrated in Figure 6B and 6C for T47D and BT-20, respectively, after 3 h of

treatment, there is occurrence of apoptosis since there is expression of certain apoptosis markers : caspase 3, γ H2AX. In parallel, autophagy occurs in these cells, since there is a concomitant overexpression of Beclin-1 (Figure 6B and 6C).

Discussion

In this study, we report cytotoxic effects of a plant extract – acetonic extract of *Buxus sempervirens* L. – on several breast cancer cell lines. Cytotoxic activities concerning *Buxus* species are scarce; although an interesting cytotoxic activity is reported for triterpenoid alkaloids isolated from *Buxus microphylla* L. against HepG2 [28]. According to our results, in breast cancer cell lines, the *Buxus* acetonic extract induced cell cycle arrest in G0/G1 phase and triggered cell death by increased sub-G1 cell population. The observed effects could be mediated by two sub-classes of cytotoxic molecules, a first class could act fast and require high concentration to induce cell death, and a second class plays a role in cell cycle arrest by preventing the G1-to-S transition. Alternatively, all these effects could be attributed to a single molecule. This conclusion arises from previous similar results described in the literature with Resveratrol [42]. Indeed, this phytoalexin stilben isolated from grapes, wine and nuts, induces cell cycle arrest at low concentrations and cell death through

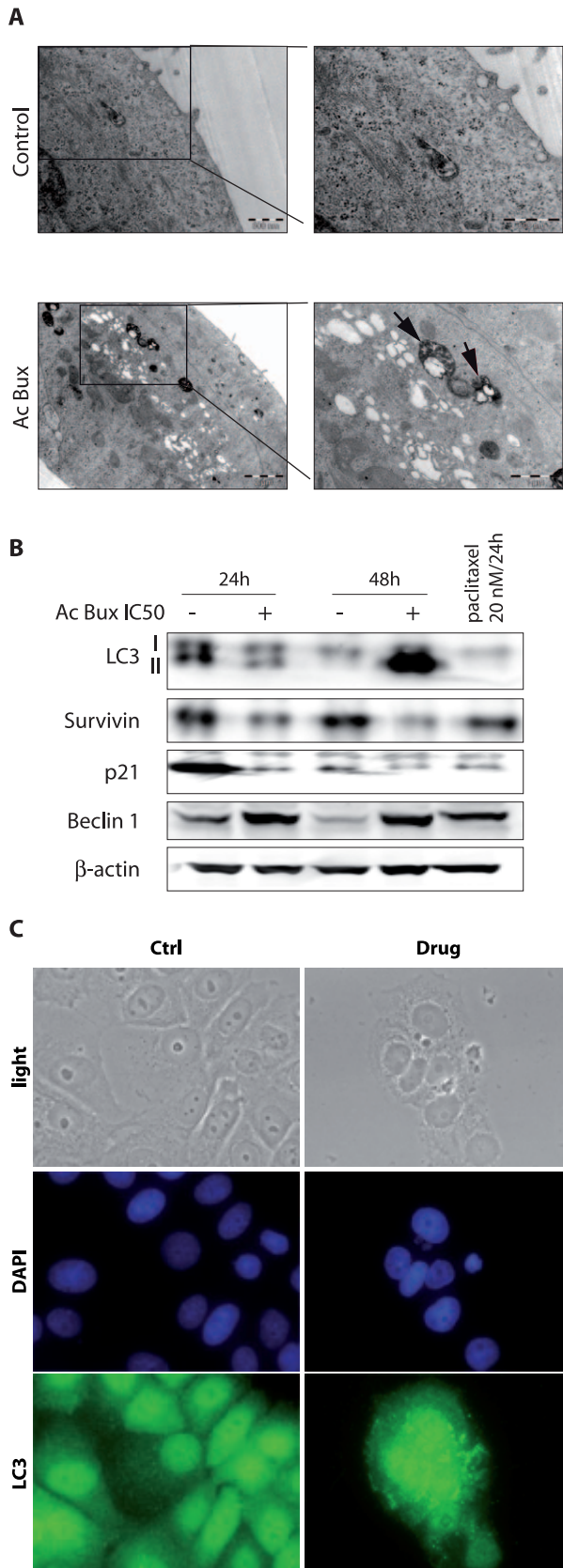


Figure 4. Acetonic extract of *Buxus* induces autophagy in MCF7 cell line. **A.** Transmission electron microscopy pictures of untreated and *Buxus* extract-treated MCF7 cells with IC_{50} concentration for 72 h. Black arrows show degradative autophagic vesicles. White arrows show

lucent electron vesicles. **B.** Immunoblots of total cell extracts isolated from MCF7 (treated and untreated, as indicated) probed with different antibodies demonstrating the occurrence of autophagy. β -actin has been used as a loading control. **C.** Immunofluorescence targeting LC3 obtained with untreated and *Buxus* extract-treated MCF7 cells (IC_{50} , 72 h). Magnification $\times 400$. Ac Bux: acetonic *Buxus* extract. doi:10.1371/journal.pone.0024537.g004

auto-phagocytosis process in ovarian cancer cells at high concentrations [42]. This is a very striking finding, since our preliminary results revealed the absence of Resveratrol in *Buxus* extracts. Also, it is worthy to notice that the plant was collected in an area characterized by unfavorable growth conditions (mountainous and semi-arid region) which are known to trigger the production of phytoalexin substances.

Our investigation concerning cell cycle arrest revealed also a highly sought characteristic. The *Buxus* acetonic extract is able to block cell cycle in G0/G1 through the decrease in cyclin D1. Cyclin D1 belongs to the family of three closely related D-type cyclins, D1, D2 and D3, which are redundant in all proliferating cell types. D-cyclins together drive cell-cycle progression by activating their cyclin-dependent kinase partners, CDK4 and CDK6, which leads to phosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb), and in turn to the advance through the G1 phase of the cell cycle [43,44]. Cyclin D1 is over-expressed in most breast tumor cell lines through over-expression and/or amplification at its genomic locus, 11q13. This feature has been shown to play a key role in tumorigenesis and confers bad prognosis in breast cancer [45–47]. Moreover, the cell cycle arrest observed cannot be the result of CDK inhibitors activation as shown by decreased levels of p21 and p27 (data not shown). Rather, the effect relies on a direct decrease in cyclin D1, strongly suggesting that inhibition of cyclin D1 by *Buxus* extract could be a good tool to improve prognosis in breast cancer.

Another interesting feature concerns the concomitant occurrence of the two programmed cell deaths, apoptosis and autophagy, in several breast cancer cells including triple positive and triple negative ones, since our results have shown markers related to both of them. Transmission electron microscopy analyses showed marked differences in localization and shapes of mitochondria in *Buxus* extract-treated MCF10CA1a cells. The cellular distribution of mitochondria is deeply affected during apoptosis. Mitochondria are normally dispersed throughout the entire cell; however, during apoptosis triggered by tumor necrosis factor (TNF), there is a peri-nuclear clustering of mitochondria caused by an impaired activity of the molecular motor kinesin [48]. Also, the loss of integrity of the mitochondria outer membrane is a very important hallmark of apoptosis. Referred as MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), it leads to the release of proteins normally found in the space between the inner and outer mitochondrial membranes, such as cytochrome C and AIF (Apoptosis Inducing Factor) [49]. It is well established that the release of these molecules initiates apoptosis. Cytochrome C binds to APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1). In the presence of ATP, APAF-1 is allowed to oligomerization and forms the “apoptosome” which, in turn, activates Caspase 9 by dimerization. The active Caspase 9 activates executor caspases (Caspase 3 and 7) and this orchestrates apoptosis through the cleavage of key substrates within the cell [50]. Also, AIF has a direct effect on isolated nuclei, triggering chromatin condensation as well as large-scale chromatin fragmentation [51].

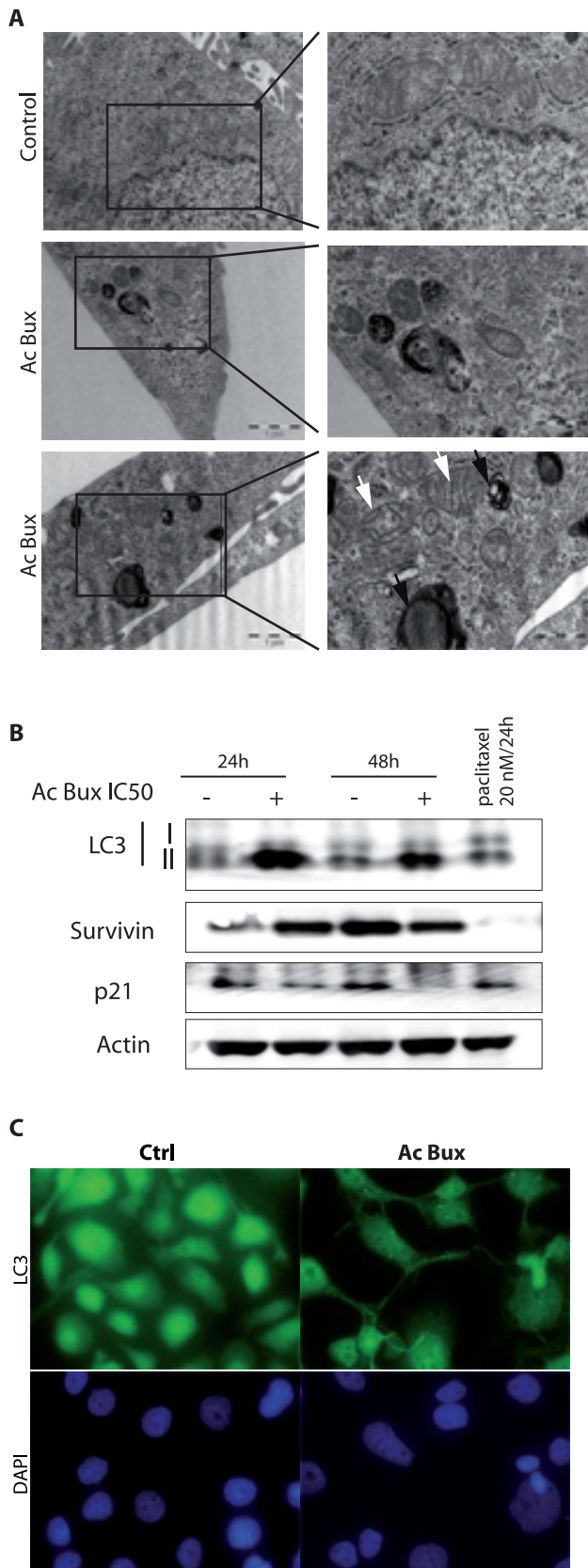


Figure 5. Acetonic extract of *Buxus* induces autophagy in MCF10CA1a cell line. **A.** Transmission electron microscopy pictures of untreated and *Buxus* extract-treated MCF10CA1a cells (IC₅₀, 72 h). Black arrows show degradative autophagic vesicles. White arrows show

damaged mitochondria. **B.** Immunoblots of total cell extracts isolated from MCF10CA1a (treated and untreated, as indicated) probed with different antibodies demonstrating the occurrence of autophagy. β -actin has been used as a loading control. **C.** Immunofluorescence targeting LC3 obtained with untreated and treated MCF10CA1a cells (IC₅₀, 72 h). Magnification $\times 400$. Ac Bux: acetonic *Buxus* extract. doi:10.1371/journal.pone.0024537.g005

There is more and more evidence that autophagy is a mechanism of cell survival following plethora of extra-cellular and intra-cellular stimuli. Numerous studies have demonstrated that proceeding to autophagy allows cancer cells to escape cell death [52–55]. Nevertheless, the autophagy is highly contextual, it can exert both cyto-protective and death-promoting effects. Indeed, the effect of autophagy may vary dependent on the type of cancer, individual characteristics of cancer cells, microenvironments, and therapeutic treatment [52]. Nonetheless, it is clearly assumed that induction of autophagy to high levels leads to autophagic cell death [56,57].

Interestingly, the *Buxus* extract induced a decrease in p21 levels, which can be related to its involvement as an anti-apoptotic protein. This is exemplified by preventing apoptosis by protecting the N-terminal moiety of Caspase 3 preventing its activating proteolysis [58]. Lately, p21 has been reported to play a crucial role in autophagy [59]; although, the entire mechanism is not fully understood. Wild-type MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) undergo apoptosis upon C2-ceramide treatment, and *p21*^{-/-} MEF undergo autophagy rather than apoptosis upon the same death stimulus. p21 triggers apoptosis by inhibiting the autophagic pathway through the suppression of the stability of autophagy-related proteins in MEF [59]. Hence, decreased levels of p21 observed in the cells treated with the plant extract can trigger cell death by autophagy.

By decreasing levels of p21, the *Buxus* extract seems to contain molecules that inhibit cytosolic p21 and trigger cell death. It has been already shown that targeting p21 (with an anti-sense oligodeoxynucleotide) attenuated the growth of Met-1 tumors in nude mice [60]. Finally, our data demonstrated that the *Buxus* extract also decreases levels of Survivin, a 16.5 kDa protein that belongs to the IAP family (Inhibitor of Apoptosis proteins) [61], which plays a key role in mitotic spindle formation [62]. However, two general considerations make Survivin an attractive therapeutic target in cancer: it is selectively expressed in tumor cells and it is required for their viability [63,64]. In cancer cells, Survivin correlates with unfavorable prognosis, resistance to therapy, and accelerated rates of recurrences [65].

In light of our results, we can conclude that *Buxus sempervirens* extract targets many proteins widespread in cancer cells cytoplasm, leading to cell cycle arrest and autophagy. There is however a crosstalk between apoptosis and autophagy, which determines cell fate, but the molecular mechanism is not fully understood. Previous data suggested that the removal or functional inhibition of essential proteins from the apoptotic machinery can switch a cellular stress response from the apoptotic default pathway to a state of massively increased autophagy. However, apoptosis develops only when autophagy is inhibited [66]. In our case, mechanisms of the concomitant occurrence of autophagy and apoptosis are unclear. A possible explanation for the autophagy observed in MCF10CA1a cells can be the presence of Ha-Ras. This aggressive cell line was obtained by transfecting MCF10A with this oncogene. It has been lately shown that the presence of this signature leads to the occurrence of autophagy [67].

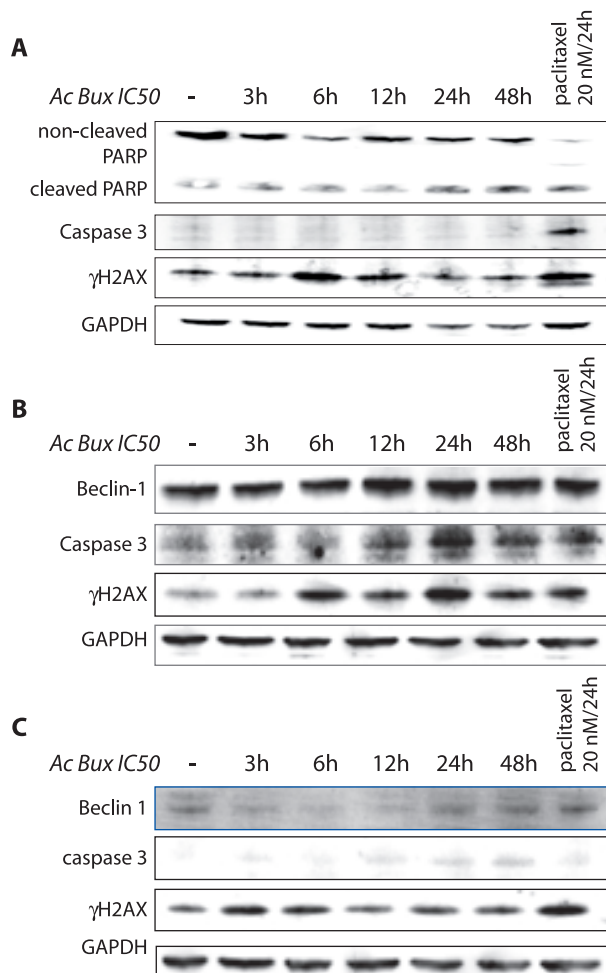


Figure 6. *Buxus* extract induces apoptosis in MCF10CA1a, T47D and BT-20 breast cancer cell lines. **A.** Immunoblots of total extracts from MCF10CA1a, revealing the presence of the cleaved form of PARP and γ H2AX, hall marks of apoptosis, at the same time, the blot reveals the absence of active caspase 3, demonstrating the occurrence of apoptosis without caspase 3 activation. **B.** and **C.** Immunoblots of total extracts from T47D and BT-20, respectively, revealing the presence of the cleaved form of caspase 3 and γ H2AX, hallmarks of apoptosis, demonstrating the occurrence of apoptosis and an up-regulation of Beclin-1, proving the occurrence of autophagy at the same time. GAPDH was used as a loading control. Ac Bux: acetic *Buxus* extract. doi:10.1371/journal.pone.0024537.g006

Conclusion

Nowadays, it is accepted that the major problem with conventional chemotherapy lies in the doses used: low doses have no effect on cancer cells and too high doses induce deleterious side effects. Thus, the presence of a “sensitizer” that can force cells to undergo apoptosis even with mild DNA-damaging agents would greatly enhance the efficacy and limit side effects of conventional chemotherapy drugs [68]. Hence, targeting p21 and Survivin can be a good adjuvant therapy to improve cell death in accompaniment to other conventional drugs [69,70]. *Buxus* extract probably contains molecules that inhibit p21 and Survivin and thus can be used in addition to commonly used drugs to trigger cell death.

Another important feature concerning *Buxus* extract is its capacity to target the cell cycle which is very promising in cancer chemotherapy. Agents that induce cell cycle arrest are increasingly

used in combination with traditional cytotoxic drugs to overcome cell cycle-mediated drug resistance and to improve cytotoxic efficacy. Among them, Flavopiridol has been shown to directly inhibit many CDK proteins [71].

Taken together, our data suggest that *Buxus sempervirens* extract can induce cell death not only via apoptosis, but also by autophagy. This is very promising, since it indicates that the *Buxus* extract may contain molecules that can be potentially used in apoptosis-resistant cells. Also, it exhibited increased toxicity towards cancer cell lines, including triple negative breast cancer cells. Moreover, it induced cell cycle arrest, depletion of cell energy, leading to cell death. Finally, *Buxus* deserves further investigation to understand the potential use of its molecules in therapeutic application for cancer treatment.

Materials and Methods

Plant extract preparation

Buxus sempervirens L. (Buxaceae) was collected from remote places around the province of Béjaia (with the kind permission of the Parc National de Dujurdjura authorities, Northeastern region of Algeria) in March 2008. Plant parts (leaves and flowers) used in this study were chosen on the basis of their use in Algerian ancestral medicine.

Powdered material (2 g) was macerated in pure acetone (200 ml) during 24 h, at room temperature with light stirring (50 rpm), and then filtered using 0.22 μ m filters (Millipore). The flow-through material was evaporated to dryness under reduced pressure and the solid extract was reconstituted in DMSO solvent (100 μ g/ μ l stock solution) before storage at -20° C.

Cell culture

MCF7 cells (HTB-22, ATCC) were grown in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), 4.5 g/l of glucose, supplemented with 5% fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin (PAA), and 100 μ g/mL of streptomycin (PAA). MCF10A cells (CRL-10317, ATCC) were cultured in DMEM/F-12 medium (PAA, Carlsbad, CA) supplemented with 10 μ g/mL of human insulin (Sigma, St. Louis, MO), 20 ng/mL of epidermal growth factor (Sigma, St. Louis, MO), 0.5 μ g/mL of hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO), 5% horse serum (Invitrogen), 100 U/mL of penicillin (PAA) and 100 μ g/mL of streptomycin (PAA). T47D (HTB-133, ATCC), a generous gift from Dr Yegor Vassetzky were grown in DMEM, 4.5 g/l of glucose, supplemented with 10% horse serum, 100 U/mL of penicillin (PAA), and 100 μ g/mL of streptomycin (PAA). BT-20 (HTB-20, ATCC) and MDA-MB-435 cells (HTB-129, ATCC) were cultured in DMEM, 4.5 g/l of glucose, supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL of penicillin (PAA), and 100 μ g/mL of streptomycin (PAA). MCF10CA1a cells [72] were cultured in DMEM/F-12 medium supplemented with 5% fetal calf serum (PAA), 100 U/mL of penicillin (PAA) and 100 μ g/mL of streptomycin (PAA). All cited cells were cultured at 37° C in a humidified atmosphere and 5% CO_2 .

Viability assay

Cell proliferation was determined using the Cell Titer Glo assay (Promega). Cells were seeded at a density of 3×10^3 cells per well in 96-well plates and maintained 24 h for attachment and then treated with two-fold serial dilutions of the plant extract. After 72 h incubation, 20 μ L of MTT reagent were added. The plates were incubated during 2 h and absorbance determined at 560 nm in Glomax Multi-detection System (Promega). Percentages of cell survival were calculated as follows: % cell survival = (absorbance of treated cells/ absorbance of cells with vehicle solvent) $\times 100$. The

half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated from the dose–response curve obtained by plotting the percentage of cell survival *versus* the concentration of plant extract used. All assays were performed three times in duplicate. During all experiments, DMSO dilutions of *Buxus* acetonetic extract were adjusted in the culture media at a final concentration of 0.2% (v/v).

FACS analysis, PI and PI/Annexin V staining

In order to determine the effect of plant extract on the cell cycle, FACS analysis was carried out. For propidium iodide (PI) staining, cells were seeded in 6-well plates at a density of 10⁴ cells/ml. After 24 h of attachment, cancer cells were treated with indicated plant extract concentrations for different time intervals. Floating and attached cells were harvested, washed in PBS, fixed in ice-cold ethanol (70% v/v) and stored at –20°C. For analysis, cells were washed in PBS and suspended in PI (25 mg/ml) in PBS with RNase A (200 µg/ml).

For PI/Annexin V double staining, treated cells were harvested and suspended in binding buffer (HEPES pH 7.4, CaCl₂ 2.5 mM, NaCl 140 mM). Aliquots of cells were incubated for 15 min with Annexin V FITC and PI (5 µg/mL) (Invitrogen).

During all FACS analyses, 10⁵ events for each sample were analyzed. Flow cytometry analyses were carried out on a FACScalibur system (BD Biosciences) followed by analysis using CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Ultra-structural study by transmission electronic microscopy

Treated (IC₅₀/72 h) and control cells were fixed in buffered (0.1 M) sodium cacodylate, pH 7.4 and 2.5% glutaraldehyde solution for 2 h. After washing, the cells were post-fixed in 1% OsO₄ solution for 1 h at room temperature, rinsed and dehydrated in an ethanol gradient (70% to 100%, 10 min for each bath). Absolute ethanol was replaced by 2,3 epoxy propylether and further by propylene oxide. Cells were infiltrated by epoxy resin (R1165, Agar scientific) mixed to propylene oxide (50%-50%) overnight, followed by three baths with pure epoxy resin. Samples were polymerized at 60°C during 18 h. Ultra-thin sections (80 nm) cut with an ultra-microtome (Leica UC6) were stained with uranyl acetate (20 min) and Reynolds lead citrate (2 min). Sections were observed at 80 kV, in a TEM Phillips Tecnai equipped with an Olympus Keenview CCD camera.

Immunofluorescence

Cells were grown on Permax slides during 24 h before *Buxus* acetonetic extract treatment (IC₅₀, 72 h). They were fixed with a paraformaldehyde solution (4%) and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, before incubation with appropriate antibodies: α-tubulin (1/5000, Sigma), LC3 (1/200, Sigma) overnight at 4°C. After extensive washing, slides were incubated 1 h at room temperature with red fluorescent Alexa Fluor 568 dye-labeled anti-mouse IgG for α-tubulin and green-fluorescent Alexa Fluor 488 dye-labeled anti-rabbit for LC3. Coverslips were mounted in DAPI (4',6-diamidino-2-phenolindole) (Sigma Aldrich). Finally, cells were observed with a Leica DMI 6000 B microscope and images were treated with MetaMorph software.

Western blot

Cell extracts were prepared in RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA containing protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). After sonication on a Bioruptor (Diagenode) at high frequency during 7.5 min (1 min of pause

versus 15 sec of sonication), the soluble protein fraction was collected after centrifugation at 13 500 g during 10 min. Protein concentration was determined by BCA kit according to manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL). 30 µg of proteins were subjected to SDS-PAGE in 4 to 12% gradient gels and separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen). Incubation with different antibodies was monitored overnight at 4°C. Membranes were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to HRP (Horseradish Peroxidase), revealed using West Dura kit (Pierce, Rockford, USA) and ChemiSmart 5000 system (Vilber Lourmat).

Antibodies

The antibodies against p21 (C-19, sc-397), cyclin A2 (C-19, sc-596), cyclin D1 (DCS-6, sc-20044), cyclin D3 (C-16, sc-182), cyclin E1 (E-4, sc-25303), Rb (C-15, sc-50) were from Santa Cruz Technologies. Anti-cleaved caspase 3 (Asp 175 9661) was purchased from Cell Signaling Technologies. Anti-PARP (33–3100) was from Zymed Inc, anti-LC3 (L8918). Antibodies against Beclin-1 (B6061), β-actin (T9026), α-tubulin (A5441) and GAPDH (G8795), normal mouse and normal rabbit IgG were from Sigma Aldrich. Anti-Survivin (Ab469) was from Abcam.

Statement of Ethics

Experimental research reported in the manuscript must have been performed with the approval of the ethic committee of our Department following the French and European rules. No research on humans has been carried out.

Supporting Information

Figure S1 Dose effect of the acetonetic extract of *Buxus* on MCF7 cells. A. FACS analysis of treated MCF7 with increasing concentrations of *Buxus* extract. The results are the mean ± SEM of three experiments. The results demonstrate a dose effect with increased sub-G1 subpopulation upon plant extract treatment. B. Immunoblot analyses of total extract of treated MCF7 cells treated with increasing concentrations of *Buxus* showing the multiple targets of the extract at high concentrations. GAPDH was used as a loading control. (EPS)

Figure S2 Dose effect of the acetonetic extract of *Buxus* on MCF10CA1a cells. A. FACS analysis of treated MCF10CA1a with increasing concentrations of *Buxus* extract. The results represent means ± SEM of three experiments. The results demonstrate a dose effect with increased Sub-G1 subpopulation upon plant extract treatment. B. Immunoblot of total extract of treated MCF10CA1a cells treated with increasing concentrations of *Buxus* showing the multiple targets of the extract at high concentrations. GAPDH was used as a loading control. (EPS)

Figure S3 Treatment of T47D (an aggressive triple positive breast cancer cell line) and BT-20 (a triple negative breast cancer cell line) cells with *Buxus* acetonetic extracts resulted in the accumulation of cells in G0/G1 phase in a dose- and time-dependent fashion. A. and D. T47D and BT-20, respectively, were treated in increasing concentrations of the plant extract (IC₅₀/2, IC₅₀ and 2 × IC₅₀) during 24 h and 48 h and resulted in an accumulation of cells in G0/G1 phase as demonstrated by FACS analyses. The results represent means ± SEM of three experiments. B and E. Western blots analysis of untreated and treated T47D and BT-20 cells, respectively, showing a decrease of cyclin D1 after their respective

IC₅₀ treatment with the plant extract during 24 h and 48 h. **C and F.** Western blot analysis of total cell extracts from untreated and treated T47D and BT-20 cells, respectively, with increasing concentrations of Ac Bux (IC₅₀/2, IC₅₀ and 2 × IC₅₀) during 48 h, illustrating a dose effect of Ac Bux on the several targeted proteins probed. Ac Bux: acetic Buxus extract. (EPS)

Figure S4 Treatment of T47D and BT-20 cells with the plant extract resulted in the accumulation of apoptotic/necrotic cells. A. T47D cells were treated during 24 h and 48 h with the plant extract (IC₅₀) and resulted in the accumulation of apoptotic/necrotic cells as illustrated with the Annexin V-FITC stained cells analyzed by FACS. **B.** Annexin V-FITC stained BT-20 cells showing that after 24 h of plant extract treatment (IC₅₀), there is an emergence of pre-apoptotic cells that shift to apoptotic/necrotic cell population after 48 h of treatment. (EPS)

Figure S5 Buxus extract treatment in T47D and BT-20 cells resulted in autophagy. A and C. Immunofluorescence targeting LC3 obtained with untreated and treated T47D and BT-20 cells, respectively, (IC₅₀, 72 h), showing the punctuated staining of the processed form LC3 II. Magnification ×400. Ac Bux: acetic *Buxus* extract. **B and D.** Immunoblots of total cell extracts of untreated and treated T47D and BT-20 cells,

respectively, (IC₅₀ during 24 h and 48 h) demonstrating the occurrence of the processed form of LC3 and the decrease of p21 levels. (EPS)

Figure S6 Immunoblot analysis of total cell extracts isolated from MCF10A demonstrating the absence of the processed LC3II and caspase 3 in treated cells. Only a small band related to LC3II is present when cells were treated with MCF7-IC₅₀. α -tubulin was used as a loading control. (EPS)

Acknowledgments

We warmly thank P. Arimondo for technical help. The authors thank E. Heard, G. Velasco, P.A. Defossez, C. Francastel and Yegor Vassetzky for sharing reagents. We thank Alexis Canette from the imaging facility ImagoSeine at the Jacques Monod Institute (Paris, France) for precious help in having transmission electronic microscopy pictures and pieces of advice in interpretation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OA AD SA. Performed the experiments: OA BV FL PJ JV MS. Analyzed the data: AO SA RC LA RM FC MS. Contributed reagents/materials/analysis tools: OA SA LA RM. Wrote the paper: OA SA.

References

- Russo IH, Russo J (1998) Role of Hormones in Mammary Cancer Initiation and Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3: 49–61.
- Morgan G, Ward R, Barton M (2004) The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clinical Oncology* 16: 549–560.
- Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592–603.
- Brown JM, Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5: 231–237.
- Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JFF, Shenoy K, et al. (2010) Thymoquinone Induces Telomere Shortening, DNA Damage and Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* 5: e12124.
- Johnston S New targets for therapy in breast cancer - Farnesyltransferase inhibitors.
- Gibbs JB (2000) Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science* 287: 1969–1973.
- Mann J (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2: 143–148.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768–780.
- Koehn FE, Carter GT (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206–220.
- Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70: 461–477.
- Clardy J, Walsh C (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829–837.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009) Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Reviews* 109: 3012–3043.
- Balunas MJ, Kinghorn AD (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431–441.
- Butler MS (2004) The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products* 67: 2141–2153.
- Li JWH, Vederas JC (2009) Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* 325: 161–165.
- Paterson I, Anderson EA (2005) The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. *Science* 310: 451–453.
- Pezzuto JM (1997) Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53: 121–133.
- Cragg GM, Newman DJ (2009) Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews* 8: 313–331.
- Atta ur R, Naz S, Noor-e-ain F, Ali RA, Choudhary MI, et al. (1992) Alkaloids from *Buxus* species. *Phytochemistry* 31: 2933–2935.
- Fourneau C, Hocquemiller R, Guédon D, Cavé A (1997) Spiroformabuxine, a novel type of *Buxus* alkaloid. *Tetrahedron Letters* 38: 2965–2968.
- Loru F, Duval D, Aumelas A, Akeb F, Guédon D, et al. (2000) Four steroidal alkaloids from the leaves of *Buxus sempervirens*. *Phytochemistry* 54: 951–957.
- Nakano T, Hasegawa M (1964) *Buxus* alkaloids. Part III. The structure of “Alkaloid-L” and its correlation with cyclomicrophylline-A. *Tetrahedron Letters* 5: 3679–3682.
- Khalid A, Azim MK, Parveen S, Atta-ur R, Choudhary MI (2005) Structural basis of acetylcholinesterase inhibition by triterpenoidal alkaloids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 1528–1532.
- Babar ZU, Ata A, Meshkatsadat MH (2006) New bioactive steroidal alkaloids from *Buxus hyrcana*. *Steroids* 71: 1045–1051.
- Ata A, Iverson CD, Kalhari KS, Akhter S, Betteridge J, et al. (2010) Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana* and their enzyme inhibitory, anti-fungal and anti-leishmanial activities. *Phytochemistry* 71: 1780–1786.
- Matochko WL, James A, Lam CW, Kozera DJ, Ata A, et al. (2010) Triterpenoidal alkaloids from *Buxus natalensis* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Nat Prod* 73: 1858–1862.
- Yan YX, Hu XD, Chen JC, Sun Y, Zhang XM, et al. (2009) Cytotoxic Triterpenoid Alkaloids from *Buxus microphylla*. *Journal of Natural Products* 72: 308–311.
- Mesaik MA, Halim SA, Ul-Haq Z, Choudhary MI, Shahnaz S, et al. (2010) Immunosuppressive Activity of Buxidin and Buxenone from *Buxus hyrcana*. *Chemical Biology & Drug Design* 75: 310–317.
- Hernandez-Enriquez B, Arellano RO, Moran J (2010) Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 167: 298–311.
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9487–9492.
- Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M, King MA, Zbigniew Darzynkiewicz MR (2004) Cytometric Methods to Detect Apoptosis. *Cytometry*, 4th Edition: New Developments: Academic Press. pp 307–341.
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, et al. (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17: 1595–1607.
- Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, et al. (1997) Cell-specific Induction of Apoptosis by Microinjection of Cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30299–30305.
- Mizushima N, Yoshimori T (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542–545.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) 445: 77–88.
- Kottke TJ, Blajeski AL, Meng XW, Svingen PA, Ruchaud S, et al. (2002) Lack of Correlation between Caspase Activation and Caspase Activity Assays in Paclitaxel-treated MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277: 804–815.
- Cao Y, Klionsky DJ (2007) Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* 17: 839–849.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, et al. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26: 2527–2539.

40. Aita VM, Liang XH, Murty VVVS, Pincus DL, Yu W, et al. (1999) Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21. *Genomics* 59: 59–65.
41. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672–676.
42. Otipari AW, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, et al. (2004) Resveratrol-induced Autophagocytosis in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* 64: 696–703.
43. Sherr CJ (1996) Cancer Cell Cycles. *Science* 274: 1672–1677.
44. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13: 1501–1512.
45. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, et al. (1995) Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 8: 560–567.
46. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, et al. (1994) Amplification and Overexpression of Cyclin D1 in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining. *Cancer Research* 54: 1812–1817.
47. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, et al. (2000) β -Catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4262–4266.
48. De Vos K, Goossens V, Boone E, Vercammen D, Vancompernelle K, et al. (1998) The 55-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor Induces Clustering of Mitochondria through Its Membrane-proximal Region. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9673–9680.
49. Green DR, Kroemer G (2004) The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 305: 626–629.
50. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, et al. (2005) Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Science* 310: 66–67.
51. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, et al. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441–446.
52. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A (2008) Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy. *Cancer Research* 68: 1485–1494.
53. White E, DiPaola RS (2009) The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research* 15: 5308–5316.
54. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Menendez JA (2009) Autophagy Facilitates the Development of Breast Cancer Resistance to the Anti-HER2 Monoclonal Antibody Trastuzumab. *PLoS ONE* 4: e6251.
55. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, et al. (2009) The Role of ATF4 Stabilization and Autophagy in Resistance of Breast Cancer Cells Treated with Bortezomib. *Cancer Research* 69: 4415–4423.
56. Levine B (2007) Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* 446: 745–747.
57. Chen N, Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Letters* 584: 1427–1435.
58. Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, et al. (2005) The mTOR Inhibitor RAD001 Sensitizes Tumor Cells to DNA-Damaged Induced Apoptosis through Inhibition of p21 Translation. *Cell* 120: 747–759.
59. Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A, Kobayashi R, Yokoyama T, et al. (2008) Pivotal Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 in Apoptosis and Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 283: 388–397.
60. Fan Y, Borowsky AD, Weiss RH (2003) An Antisense Oligodeoxynucleotide to p21Waf1/Cip1 Causes Apoptosis in Human Breast Cancer Cells1. *Molecular Cancer Therapeutics* 2: 773–782.
61. Altieri DC (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3: 46–54.
62. Fengzhi L, Grazia A, Emily YC, Janet P, Simona T, et al. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin Nature Publishing Group.
63. Altieri DC (2001) The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 7: 542–547.
64. Fukuda S, Pelus LM (2006) Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 1087–1098.
65. Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC (2003) Suppression of Survivin Phosphorylation on Thr34 by Flavopiridol Enhances Tumor Cell Apoptosis. *Cancer Research* 63: 230–235.
66. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 741–752.
67. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ (2011) Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival Molecular Cell In Press, Corrected Proof.
68. Weiss RH (2003) p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* 4: 425–429.
69. Tian H, Wittmack EK, Jorgensen TJ (2000) p21WAF1/CIP1 Antisense Therapy Radiosensitizes Human Colon Cancer by Converting Growth Arrest to Apoptosis. *Cancer Research* 60: 679–684.
70. Liu S, Bishop WR, Liu M (2003) Differential effects of cell cycle regulatory protein p21WAF1/Cip1 on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 6: 183–195.
71. Schwartz GK, Shah MA (2005) Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 23: 9408–9421.
72. Strickland LB, Dawson PJ, Santner SJ, Miller FR (2000) Progression of premalignant MCF10AT generates heterogeneous malignant variants with characteristic histologic types and immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat* 64: 235–240.