



HAL
open science

Étude du gène HACE1 dans les lymphomes B

Abdelilah Bouzelfen

► **To cite this version:**

Abdelilah Bouzelfen. Étude du gène HACE1 dans les lymphomes B. Santé. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR012 . tel-01541449

HAL Id: tel-01541449

<https://theses.hal.science/tel-01541449>

Submitted on 19 Jun 2017

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.

NORMANDIE UNIVERSITÉ ROUEN

THÈSE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE NORMANDIE UNIVERSITE

Spécialité : **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Présentée et soutenue publiquement par

ABDELILAH BOUZELFEN

LE 09/01/2017

Étude du gène *HACE1* dans les lymphomes B

Thèse dirigée par le Pr Fabrice Jardin

JURY

Pr Karen LEROY Rapporteur
Pr Philippe GAULARD Rapporteur
Pr Isabelle DUBUS Examineur (Président du Jury)
Pr Fabrice JARDIN Examineur (Directeur de thèse)
Dr Christian SCHMITT Examineur

Thèse préparée au sein de l'Équipe « Génétique et clinique des proliférations lymphoïdes »

Centre de Recherche INSERM U918

Centre Henri Becquerel

Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je reste convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire et personnel. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail titanesque sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ». L'achèvement d'une thèse est toujours la fin d'une aventure de plusieurs années. Aventure où j'ai pu développer un sens d'analyse critique, un recul sur moi-même à la fois sur le plan intellectuel et sur le plan humain.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse et avec beaucoup de gratitude, le Pr Fabrice Jardin, lui qui a su m'offrir une chance pour participer à cette aventure au sein de son laboratoire INSERM U918, lui qui a su m'accorder sa confiance et qui m'a fait profiter de son expérience pour me faire grandir tous les jours. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je tiens aussi à remercier le Pr Hervé Tilly pour son accueil au sein du centre Henri Becquerel.

Un grand merci à mon cher Ami Philippe Bertrand, un merci pour sa sagesse, un merci pour sa patience, un merci pour tout ce qu'il m'a enseigné en science mais aussi l'enseignement qu'il m'a apporté sur le plan humain.

Je tiens à remercier également Catherine Maingonnat, une technicienne d'un grand talent avec laquelle on apprend énormément, toujours disponible, prête à aider, un énorme plaisir « d'avoir été à ses côtés » durant ces quatre années.

J'adresse mille mercis au Dr Jean-Baptiste Latouche de m'avoir formé aux transfections cellulaires, et de m'avoir ouvert les portes de la collaboration. Je le remercie également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements, notamment lors de ma première communication au congrès de l'ACR à Philadelphie et son soutien pour mes entretiens à New-York.

J'exprime aussi toute ma gratitude au Dr Sahil Adriouch pour m'avoir transmis toutes ces connaissances sur le cycle cellulaire et l'apoptose.

Merci au Dr Louis-Ferdinand Pépin pour son soutien et son admirable philosophie qui m'a permis d'échanger de bons moments en sa compagnie, des moments riches de conseils et plein de bienveillance à mon égard.

Je n'oublierai pas notre très cher Dr Michel Picquenot qui m'a initié à l'IHC toujours dans la joie et la bonne humeur avec des moments de partage sur un de nos points communs : Nietzsche et son ouvrage « Par-delà le Bien et le Mal » sur lequel nous avons si souvent conversé....

Je tiens à remercier le Dr Christian Bastard pour son hospitalité et « sa porte ouverte » toujours prêt à donner son précieux avis sur nos travaux et ses conseils bien avisés. Un grand merci au Dr Dominique Penher pour sa disponibilité et son attention.

Un hommage en particulier au Dr Florian Clatot pour son humanisme et son Amitié qui a su trouver chaque semaine les bons mots pour m'encourager à aller jusqu'au bout de cette aventure.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire U918 pour tous ces bons moments partagés.

Tout cela n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien éternel et indéfectible de ma chère famille qui a su me donner le courage et les valeurs nécessaires pour accomplir ce travail de longue haleine.

Résumé en anglais

Several B-cell lymphomas have characteristic genetic abnormalities that are important in determining their biologic features and can be useful in differential diagnosis. Historically, classical Hodgkin lymphomas have been distinguished from non-Hodgkin lymphomas (NHL). The most common types are follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), which together make up more than 60% of all lymphomas. DLBCL are aggressive but potentially curable with multi-agent chemotherapy. However the putative tumor suppressor genes (TSG) responsible for lymphomagenesis still remain unknown. The rationale of this project was based on unpublished data from the translational project GHEDI (Deciphering the Genetic Heterogeneity of Diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era). Array comparative genomic hybridization (aCGH) (Agilent 180 K) was performed in a series of 202 DLBCL and found 40% of deletions of 6q21 region, whose minimal common deleted region (MCR) contains *HACE1* gene. Furthermore, transcriptomic analysis showed a significant correlation between gene copy number and expression level. *HACE1*, located on chromosome 6q, encodes an E3 ubiquitin ligase and is downregulated in human tumors such as neuroblastomas and natural killer (NK) lymphomas. *HACE1* has been shown to ubiquitylate Rac1, a protein involved in cell proliferation and G2/M cell cycle progression. The function of *HACE1* and the factors involved in its transcriptional regulation are largely unknown in the context of B-cell lymphomas. In this study, we investigated whether *HACE1* is a candidate

gene in the 6q genomic region involved in DLBCL lymphomagenesis. We determined the frequency of *HACE1* inactivation in B-cell lymphoma and analyzed the mechanisms involved in its silencing. We show, by RT-qPCR, that *HACE1* gene is constitutively expressed in normal lymph nodes and in normal B-cells isolated from peripheral blood, contrasting with a strong downregulation of its expression in more than 70% (77/111) of B-cell lymphoma cases and in four tested B-Lymphoma cell lines. *HACE1* gene copy number was assessed by quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) and array for comparative genomic hybridization (aCGH) in 91 DLBCL cases. A *HACE1* heterozygous deletion was observed in 38.1% of cases. These deletions were associated with a significant gene expression decrease. The molecular epigenetic mechanisms underlying *HACE1* downregulation were also investigated. Using pyrosequencing and MSP assays, as compared to normal B-cells, we observed an hypermethylation of *HACE1* promoter CpG177 island in 60% (68/111) of DLBCL cases and in all tested B-Lymphoma cell and an hypomethylation of *HACE1* promoter CpG88 island. However, no significant correlation between promoter methylation status and gene expression level was demonstrated. Furthermore, RT-qPCR assays revealed that the demethylating agent 5'azacytidine (5'AZA-dC) did not induce a *HACE1* gene expression increase in the different cell lines. By contrast, the histone deacetylase inhibitors (HDACi) trichostatin A (TSA) and PRC2 complex inhibitor, DZNep strongly reactivated the expression of *HACE1* in Ramos, Raji cells in which the CpG 177 island was fully methylated whereas CpG88 was poorly methylated. We next performed ChIP experiments to determine whether *HACE1* locus chromatin was in an active or inactive conformation in Ramos and Raji cell lines. We found that the chromatin of *HACE1* gene promoter region was predominantly in the inactive conformation (methylated H3 histones H3K9me2 around CpG 177 and CpG88 and H3K27me3 only around CpG88). TSA and DZNep treatment was able to reverse this pattern, switching the conformation of *HACE1* promoter chromatin to an active one predominantly

associated with acetylated H3 histones. The putative role of *HACE1* in B-cell lymphomagenesis was further investigated using lentiviral transduction (shHACE1). We demonstrated in Ramos and Raji cells that a down-regulation of *HACE1* expression was associated with a significant decrease of apoptosis level and cell cycle arrest in G2/M phase. To conclude, our experiments indicate that *HACE1* can act as a haploinsufficient tumor suppressor gene in most B-cell lymphomas and be downregulated by deacetylation and methylation of its promoter region chromatin constituting a potential target for HDAC and DZNep inhibitors.

Résumé en français

Plusieurs lymphomes à cellules B présentent des anomalies génétiques qui sont importantes pour déterminer leurs caractéristiques biologiques et peuvent être utiles pour le diagnostic. Les types les plus courants sont le lymphome folliculaire et le lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB), qui représentent à eux deux plus de 60 % de tous les lymphomes. Les LDGCB sont agressifs mais peuvent être traités par chimiothérapie à agents multiples. Cependant, les gènes suppresseurs de tumeur (GST) potentiellement responsables de la lymphomagenèse ne sont pas tous connus. Le rationnel de ce projet reposait sur des données non publiées du projet translationnel GHEDI (déchiffrer l'hétérogénéité génétique du lymphome diffus à grandes cellules B à l'ère du rituximab). Une hybridation génomique comparative (CGH) (puce Agilent 180 K) a été réalisée sur une série de 202 LDGCB de la série GHEDI et 40 % des délétions de la région 6q21 ont été identifiées, dont la région minimale commune délétée qui contient le gène *HACE1*. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique a montré une corrélation significative entre le nombre de copies du gène et le niveau d'expression. Le gène *HACE1*, situé sur le chromosome 6q, code pour une

ubiquitine ligase E3 et est régulé négativement chez l'homme dans les tumeurs, y compris les neuroblastomes et les lymphomes à cellules tueuses naturelles (NK). Il a été montré que le gène *HACE1* ubiquityle Rac1, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire et la progression G2/M du cycle cellulaire. La fonction du gène *HACE1* et les facteurs impliqués dans sa régulation transcriptionnelle sont en grande partie inconnus dans le contexte des lymphomes à cellules B. Dans cette étude, nous avons examiné si le gène *HACE1* était un gène candidat dans la région génomique 6q impliqué dans la lymphomagenèse des LDGCB et plus largement dans les lymphomes B. Nous avons déterminé la fréquence de l'inactivation du gène *HACE1* dans le lymphome à cellules B et analysé les mécanismes impliqués dans son extinction. Nous avons montré par RT-qPCR que le gène *HACE1* est exprimé de façon constitutive dans des ganglions lymphatiques normaux et dans des cellules B normales isolées du sang périphérique, ce qui contraste avec une forte régulation négative de son expression chez plus de 70 % (77/111) des cas de lymphome à cellules B et dans quatre des lignées cellulaires de lymphome à cellules B testées. Le nombre de copies du gène *HACE1* a été évalué par PCR quantitative multiplex de fragments fluorescents courts (QMPSF) et par hybridation génomique comparative (CGH) chez 91 cas de LDGCB issus du laboratoire oncogénétique du Centre Henri Becquerel. Une délétion hétérozygote du gène *HACE1* a été observée chez 38,1 % des cas. Ces délétions étaient associées à une diminution importante de l'expression du gène. Les mécanismes moléculaires épigénétiques sous-jacents à la régulation négative du gène *HACE1* ont également été étudiés. À l'aide du pyroséquençage et de la MSP, par rapport aux cellules B normales, nous avons observé une hyperméthylation de l'îlot CpG 177 du promoteur du gène *HACE1* chez 60 % (68/111) des cas de Lymphome B et dans toutes les lignées cellulaires de lymphome B testées. Cependant, aucune corrélation significative entre l'état de méthylation du promoteur et le niveau d'expression du gène n'a été démontrée. De plus, les analyses par RT-qPCR ont révélé que l'agent déméthylant 5'azacytidine (5'AZA-

dC) n'induisait pas d'augmentation de l'expression du gène *HACE1* dans les différentes lignées cellulaires. En revanche, l'inhibiteur de l'histone désacétylase (HDACi), la trichostatine A (TSA) et l'inhibiteur du complexe PRC2, la DZNep, réactivaient fortement l'expression du gène *HACE1* dans les lignées cellulaires Ramos et Raji. Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour déterminer si la chromatine du locus du gène *HACE1* se trouvait dans une conformation active ou inactive dans les lignées cellulaires Ramos et Raji. Nous avons observé que la chromatine de la région du promoteur du gène *HACE1* se trouvait principalement dans la conformation inactive (histones H3 méthylées : H3K9me2 au niveau des îlots CpG88 et CpG177 et H3K27me3 seulement au niveau de l'îlot CpG88). Le traitement par la TSA et le DZNep permettait d'inverser cette tendance, en faisant passer la conformation de la chromatine du promoteur du gène *HACE1* à une conformation active principalement associée aux histones H3 acétylées. Le rôle putatif du gène *HACE1* dans la lymphomagenèse des cellules B a également été étudié par transduction lentivirale (sh*HACE1*). Nous avons démontré dans les cellules Ramos et Raji qu'une régulation négative de l'expression du gène *HACE1* était associée à une diminution significative du niveau d'apoptose et à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. En conclusion, nos expériences indiquent que le gène *HACE1* peut agir comme un gène suppresseur de tumeur haploinsuffisant dans la plupart des lymphomes à cellules B et son expression peut être régulée négativement par la désacétylation et la méthylation de la chromatine au niveau de la région de son promoteur ce qui en fait une cible potentielle pour les inhibiteurs d'HDAC et la DZNep.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé en anglais	3
Résumé en français.....	5
Index des figures et des tableaux.....	13
Liste des abréviations	16
Introduction	17
I - Organisation, fonction et régulation du génome et de l'épigénome	17
I-1 La chromatine, support de l'information génétique et épigénétique	17
I-1-a) Structure et compaction de la chromatine	17
Nucléosome : unité de base de la chromatine	17
I-1-b) L'euchromatine et l'hétérochromatine	19
L'hétérochromatine :	20
L'euchromatine :.....	20
I-2 Régulation et fonction de la chromatine	21
I-2-a) Qu'est-ce que l'épigénétique ?	21
I-2-a1) La méthylation de l'ADN	22
α Méthylation de novo de l'ADN.....	25
β Méthylation de maintien de l'ADN.....	25
γ Rôle de la protéine DNMT2 (ou TRDMT1) dans la méthylation de l'ADN .	27
δ Méthylation de l'ADN et contrôle de l'expression génique.....	28
I-2-a2) La déméthylation de l'ADN	28
α Déméthylation passive de l'ADN	28
β Déméthylation active de l'ADN.....	29
1 Déméthylation par hydroxylation et oxydation	29
2 Déméthylation par hydroxylation et déamination	29
3. Déméthylation par déamination.....	30

δ Déméthylation impliquant les protéines DNMT3A et DNMT3B.....	30
Ω À propos des DNA demethylating associated proteins.....	30
I-2-a3) Les modifications post-traductionnelles des histones.....	31
α L'acétylation des histones	33
1° Les histonedéacétylases – HDAC	36
2° Les histoneacétyltransférases – HAT.....	36
β La méthylation des histones	37
1° Les histoneméthyltransférases – HMT	38
2° Les histonedéméthylases – HMD	39
I-2-b) Les protéines liant l'ADN méthylé : les MBD.....	39
I-2-c) Les protéines à chromodomaine.....	40
I-2-c1) La famille SUV39	41
I-2-c2) La famille HP1	42
I-2-c3) La famille Polycomb (EZH2)	43
I-2-d) Collaboration entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.....	48
I-2-d1) Désacétylation des histones, méthylation de H3K9 et de l'ADN.....	48
I-2-d2) Lien entre méthylation de H3K27 et méthylation de l'ADN	49
I-3 Epigénétique et Cancer	50
I-3-a) De l'origine épigénétique des cancers : « epigenetic progenitor of cancer » ? ..	50
I-3-b) <i>Perturbations épigénétiques dans les cancers</i>	52
I-4 Approche de la thérapie épigénétique.....	53
I-4-a) Inhibiteurs de la méthylation.....	55
I-4-a1) Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN	55
I-4-a2) Classification et usage clinique.....	55
I-4-b) Les inhibiteurs des HDACs (HDACi).....	57
I-4-b1) Classification des inhibiteurs des HDACs.....	57
I-4-b2) Effets cellulaires des inhibiteurs des HDACs.....	60

I-4-b3) Inhibiteurs des HDACs en développement clinique.....	61
I-4-b4) Inhibiteurs des HDAC dans les lymphopathies	62
I-4-c) Thérapie épigénétique “nouvelle génération” : mécanismes d'action des inhibiteurs des protéines BET	63
II- HACE1 (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase 1) un gène du chromosome 6q.....	65
II-1 Chromosomes 6q et délétion	65
II-2 HACE1 un gène suppresseur de tumeur codant pour une ubiquitine ligase de type E3.....	67
<i>II-2-a) Ubiquitine et proteasome</i>	69
II-2-a1) L’ubiquitinylation des protéines	71
II-2-a2) Ubiquitinylation et ciblage	73
II-2-a3) Structure et organisation du proteasome	74
α Le proteasome 20S	74
β Le proteasome 26S	75
II-3) Cibles de la protéine HACE1 (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase 1)	76
<i>II-3-a) La rhoGTPase RAC1</i>	76
<i>II-3-b) Protéine OPTN</i>	78
III-Les lymphomes non Hodgkiniens	80
III-1 Définition et classification	80
III-2 Génétique des lymphomes non-Hodgkiniens –LNH	82
<i>III-2-a) Chromosomes et cancers</i>	83
<i>III-2-b) Altérations génétiques dans les lymphomes B</i>	84
<i>III-2-c) Profil épigénétique dans les lymphomes B</i>	86
<i>III-2-d) Anomalies primaires et lymphomagenèse</i>	87
III-2-d1) Analyse chromosomique.....	87
III-2-d2) Conséquences moléculaires des anomalies primaires.....	87

α Lymphome folliculaire et translocation t(14;18)(q32;q21) - BCL2.....	88
β Lymphomes B diffus à grandes cellules B et anomalies génétiques.....	89
Matériels et méthodes.....	92
I. Les échantillons.....	92
1- <i>Conditions de culture</i> :	92
2- <i>Effecteurs pharmacologiques</i>	92
3- <i>ADAM assay</i>	95
II. Les techniques de détection d'anomalies de nombre de copies de gènes.....	95
1 - La QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments).....	95
2- L'hybridation génomique comparative (CGH array).....	96
III. Electrophorèse sur gel d'agarose	97
IV. Etude de méthylation.....	97
1 - La MSP (Methylation Specific PCR).....	97
2 - Le pyroséquençage.....	98
V. Quantification de l'expression du transcrit.....	100
VI. Expression des protéines par Immunohistochimie.....	101
VII. Etude des modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur <i>HACE1</i> par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	102
VIII. Analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose par cytométrie en flux	103
XI. Extraction de lymphocyte B du sang périphérique :	104
OBJECTIF DU TRAVAIL	104
Resultats	106
I-Article 1	107
I-1- Résumé Article 1	107
I-2- Discussion Article 1	108
I-3- Résultats supplémentaires pour l'article 1.....	145
I-3-a Hypométhylation de l'îlot CpG 88 au niveau du promoteur <i>HACE1</i> -.....	145

I-3-b- Effet de la Trichostatine-A sur l'apoptose des cellules de Lymphome-B.....	146
I-3-c Résultats de d'hybridation génomique comparative (aCGH) et de profils d'expression génique (GEP).....	146
I-3-d Résultats cliniques	149
II-Article 2.....	150
II-1- Résumé Article 2.....	150
II-2 Discussion Article 2	151
Discussion et perspectives.....	169
I - Existence d'une coopération étroite entre la méthylation de l'ADN, la méthylation des histones H3K9me2 et la désacétylation des histones au niveau du promoteur du gène <i>HACE1</i>	171
a) Quel rôle pour l'hyperméthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène <i>HACE1</i> dans les lymphomes de type B ?	171
b) L'augmentation de l'expression du gène <i>HACE1</i> subséquente au traitement avec un inhibiteur des HDAC, la TSA.	173
c) Le rôle de la méthylation H3K9me2 des histones dans la sous-expression du gène <i>HACE1</i>	174
d) La méthylation de l'ADN, une conséquence de la méthylation et de la désacétylation des histones ?	176
II - Le code histone peut-il expliquer l'expression basale du gène <i>HACE1</i> malgré une conformation répressive de la chromatine au niveau de son promoteur ?.....	177
III - La Voie Polycomb : la protéine EZH2 régulerait-elle l'expression du gène <i>HACE1</i> ?	178
IV - Le gène <i>HACE1</i> serait-il donc un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la lymphomagenèse ?	179
V - Intérêt et avenir de la thérapie épigénétique.....	180
Bibliographie.....	181

Index des figures et des tableaux

1 - Figures

Figure 1 : Compaction de l'ADN	17
Figure 2 : Empaquetage de l'ADN	18
Figure 3 : Structure cristallographique du nucleosome de drosophile a 2,8 A	19
Figure 4 : La chromatine : hétérochromatine et euchromatine	20
Figure 5 : Voie métabolique de la méthylation de l'ADN.....	23
Figure 6 : Les différentes ADN méthyltransférases.....	25
Figure 7 : Maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires.....	26
Figure 8 : a) Les principales DNMT; b) méthylation de novo et de maintien	27
Figure 9 : Histones de la particule cœur.....	32
Figure 10 : Principales modifications post-traductionnelles décrites aux niveaux des histones H2A, H2B, H3 et H4.	33
Figure 11 : Acétylation et déacétylation des lysines des histones. HAT, histone acétyltransférase ; HDAC, histone déacétylase.....	35
Figure 12 : La méthylation des histones sur les lysines et les arginines.. ..	37
Figure 13 : Organisation des protéines à chromodomaine chez les mammifères.	41
Figure 14 : Structure de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1).	42
Figure 15 : Fonction des protéines Polycomb.....	47
Figure 16 : “The epigenetic progenitor model of cancer”.....	52
Figure 17 : Modifications épigénétiques et réactivation pharmacologique.	54
Figure 18 : Agents déméthylants.....	55
Figure 19 : Mécanismes d'action d'agents hypométhylants	56
Figure 20 : Spécificité des inhibiteurs de HDACs	59
Figure 21 : Chromosome 6.....	66
Figure 22 : HACE1	69
Figure 23 : Fonctionnement de la réaction d'ubiquitylation	70
Figure 24 : Implication de la voie ubiquitine-protéasome dans la cellule. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 25 : Structure hiérarchique du système d'ubiquitylation.	72
Figure 26 : Les familles de protéines E3 ubiquitines ligases et les différents modes d'élongation de la chaîne de poly-ubiquitines sur les protéines.....	73

Figure 27 : Le protéasome 20S	75
Figure 28 : Structure du protéasome 26S	76
Figure 29 : Ubiquitylation de protéine Rho. (A) HACE1 avec le domaine-HECT	78
Figure 30 : L'axe HACE1-OPTN suppresseur de tumeur	79
Figure 31 : Diversité des lymphomes.....	82
Figure 32 : Structure développée de la 5-aza-2'-désoxycytidine	93
Figure 33 : Structure développée de la trichostatine A.	94
Figure 34: Structure développée de la 3-déazaneplanocine A (DZNep).....	95
Figure 35: Design de l'analyse QMPSF en 6q21	96
Figure 36: Schéma représentatif des différentes étapes de la MSP.....	98
Figure 37: Exemple de pictogramme obtenu pour de la methylation du gène <i>HACE1</i>	100
Figure 38: Principe de l'immunohistochimie	102
Figure 39: Représentation schématique de la technique de ChIP.	103
Figure 40: HACE1 promoter methylation at CpG 88 sites by MSP/UMSP PCR in Ramos cell lines and primary DLBCL samples	145
Figure 41: Effet de la TSA sur l'apoptose des cellules Ramos.....	146
Figure 42: Représentation génomique des délétions du gène HACE1 dans la série GHEDI (aCGH)	148
Figure 43: Profil d'expression génique d'HACE1 dans la série GHEDI	148
Figure 44: La survie globale selon le statut génomique du gène HACE1 et son niveau d'expression.	149

2 - Tableaux

Tableau 1 : Signification de la méthylation des histones en fonction du contexte	38
Tableau 2 : Protéines de modification des histones classées selon leur activités enzymatique	45
Tableau 3: Protéines effectrices reconnaissant les modifications des histones.....	45
Tableau 4 : Les différentes protéines reconnaissant les marques de méthylation de l'ADN...	46
Tableau 5 : Principaux gènes hyperméthylés dans les cancers	53
Tableau 6 : Classe pharmacologique d'HDACi	60
Tableau 7 : Combinaison Déméthylants et HDACi	64

Liste des abréviations

LZM	Lymphome de la zone marginale	HDAC	Histone deacetylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	IP	Immuno-précipitation
P	Phosphorylation	ac	Acétylation
Pb	Paires de bases	AC	Anticorps
PcG	Polycomb Group	AND	Acide désoxyribonucléique
R	Arginine	Ag	Antigène
SET Su(var)39	Enhancer of zeste, Trithorax	ARN	Acide ribonucléique
TCR	T-cell Receptor	ARNm	Acid ribonucléique messenger
TSA	Trichostatin A	BCL2	B cell lymphoma-2
SVF	Sérum de veau foetal	BCL6	B cell lymphoma-6
5'AZA	5' Azacytidine	BCR	B cell receptor
HDM	Histone demethylase	BL	Lymphome de Burkitt
LDGCB	Lymphome diffus à grande cellule B	CGH	Hybridation génomique comparative
CA	Co-activateurs transcriptionnels	ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
FT	Facteur de transcription	CMF	Cytométrie de flux
HAT	Histone acetyl-transférase	DNMT	DNA methyltransferase
CR	Corépresseurs transcriptionnels	FL	Lymphome folliculaire
MBD	Methyl-CpG binding domain	GCB	Cellule B du centre germinatif
NF- κB	Nuclear Factor kappa B		
CSC	Cellules souches cancéreuses		
HMT	Histone methyltransferase		

Introduction

I - Organisation, fonction et régulation du génome et de l'épigénome

I-1 La chromatine, support de l'information génétique et épigénétique

I-1-a) Structure et compaction de la chromatine

Nucléosome : unité de base de la chromatine

Composé de trois milliards de paires de bases (pb), le génome humain est constitué par 46 chromosomes, qui une fois déroulés représentent deux mètres de la longueur totale de l'ADN alors que le diamètre de l'ADN n'excède pas une dizaine de micromètres dans le noyau cellulaire. Effectivement, au sein du noyau, l'ADN est compacté avec des histones afin de former la chromatine (Figure 1).

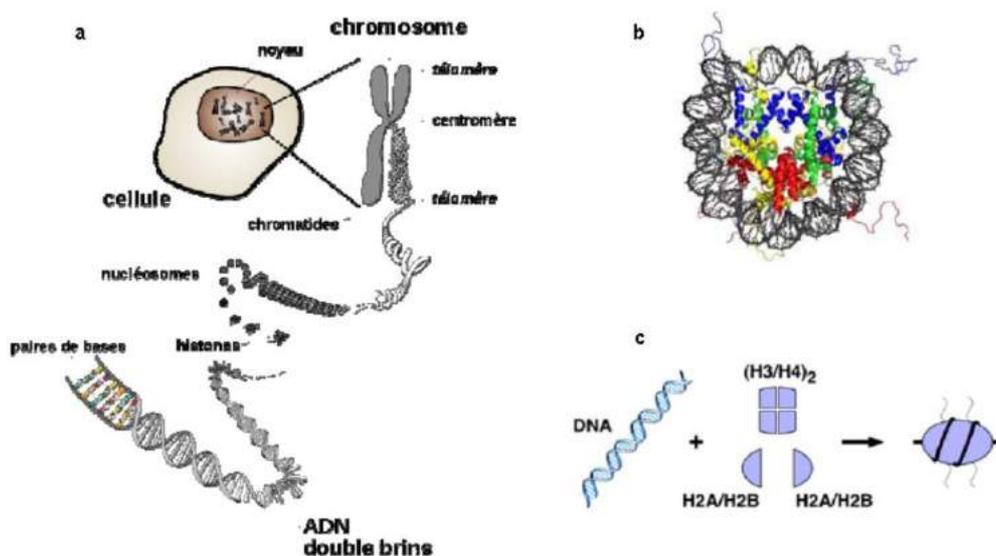


Figure 1 : Compaction de l'ADN

a) Enroulement de l'ADN sous forme de nucléosome et compaction en fibre de chromatine pour former le chromosome métaphasique, contenu dans le noyau de la cellule. b) Structure du nucléosome par diffraction aux rayons X, montrant la double

hélice d'ADN (en noir) enroulée deux fois autour des 4 histones (4 couleurs) présentes chacune en deux exemplaires. *D'après Luger, K. et al., 1997, adapté : <http://www.christopher-vidal.com/thegenome.htm> c) Représentation d'un nucléosome, composé d'un octamère des histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule l'ADN. *D'après Grewal SI, Moazed D, 2003.**

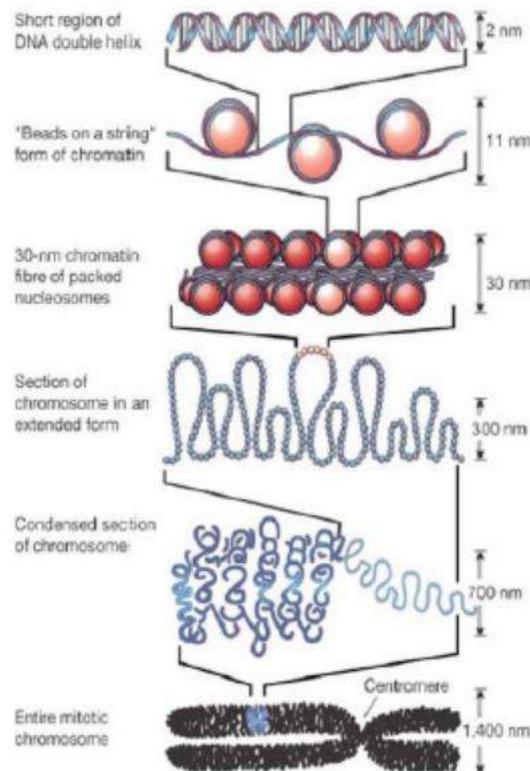


Figure 2 : Empaquetage de l'ADN

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

La chromatine contient l'information génétique et contrôle les fonctions cruciales du génome. C'est une structure dynamique qui peut se réorganiser au cours de différents processus tels que la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. Elle possède trois fonctions essentielles : compacter l'ADN, organiser les territoires et les fonctions chromosomiques (télomères, centromères), et moduler l'accessibilité de l'ADN à divers facteurs régulateurs des fonctions nucléaires. Élément fondamental de la chromatine, le nucléosome est formé par 146 paires de bases d'ADN qui se retrouvent pelotées autour d'un octamère qui est constitué par

deux copies des protéines histones de cœur : histones H2A, H2B, H3 et H4. Les histones sont les protéines liées à l'ADN les plus abondantes dans les cellules eucaryotes et parmi les protéines connues les plus conservées dans l'évolution. Ce sont de petites protéines basiques avec un poids moléculaire compris entre 11 et 20 kDa qui contiennent un fort pourcentage d'acides aminés chargés positivement (20%) tels que les lysines et les arginine (Figure 2).

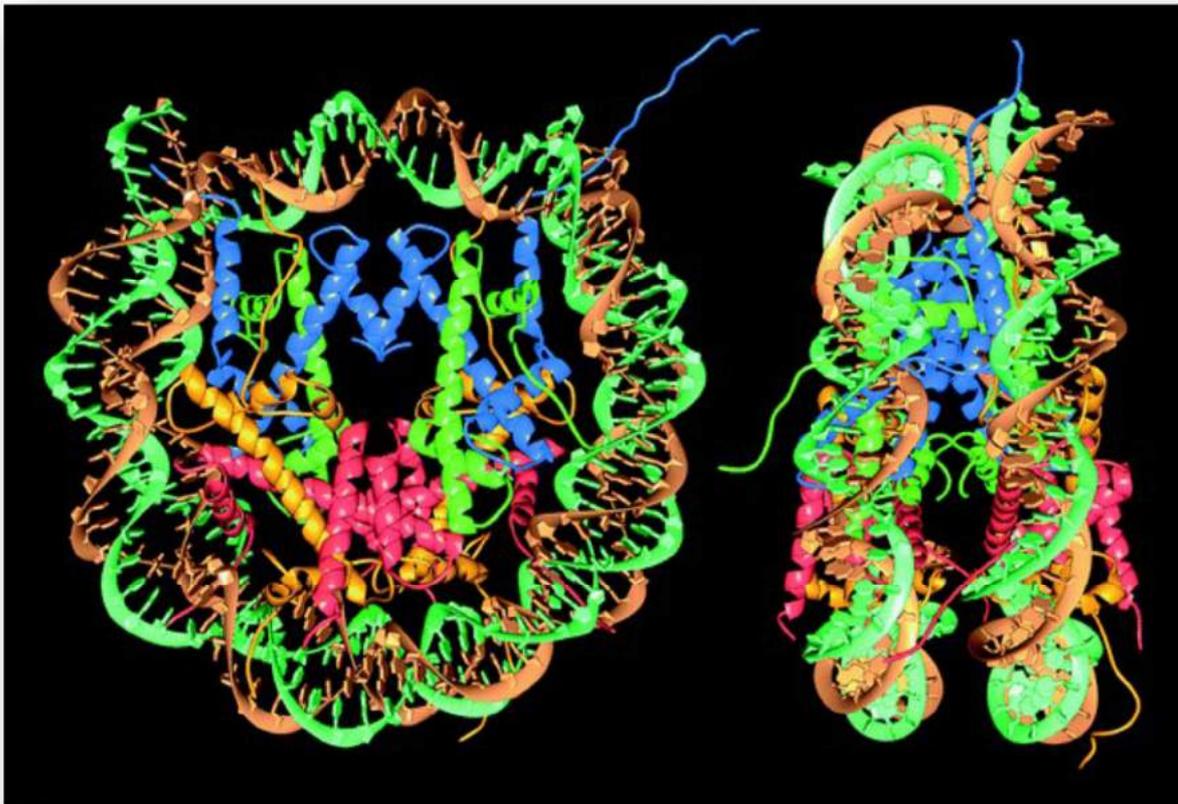


Figure 3 : Structure cristallographique du nucleosome de drosophile a 2,8 A

(Luger, 1997). ADN de 146 paires de bases (brun et vert) et histones H4 (bleu), H3 (vert), H2A (orange) et H2B (rouge)

I-1-b) L'euchromatine et l'hétérochromatine

La chromatine s'organise en deux types de structure dite chromatinienne.

- *L'hétérochromatine :*

Elle est dense et se caractérise par une structure dont l'état de condensation reste inchangé durant le cycle cellulaire. Avec un niveau d'acétylation faible, l'hétérochromatine représente un état répressif par rapport à la transcription. Située à la périphérie du noyau ainsi que du nucléole, l'hétérochromatine dite constitutive est composée essentiellement de répétition de séquences de gènes qui sont majoritairement localisées au voisinage des centromères : hétérochromatine péricentrique, et des télomères, l'hétérochromatine facultative qui renferme les régions codantes.

- *L'euchromatine :*

Elle est claire et décondensée. Elle se localise à l'intérieur du nucléoplasme et renferme les régions actives du génome. Durant l'interphase, la structure de l'euchromatine est décondensée (G1/S/G2) (Figure 3 et 4).

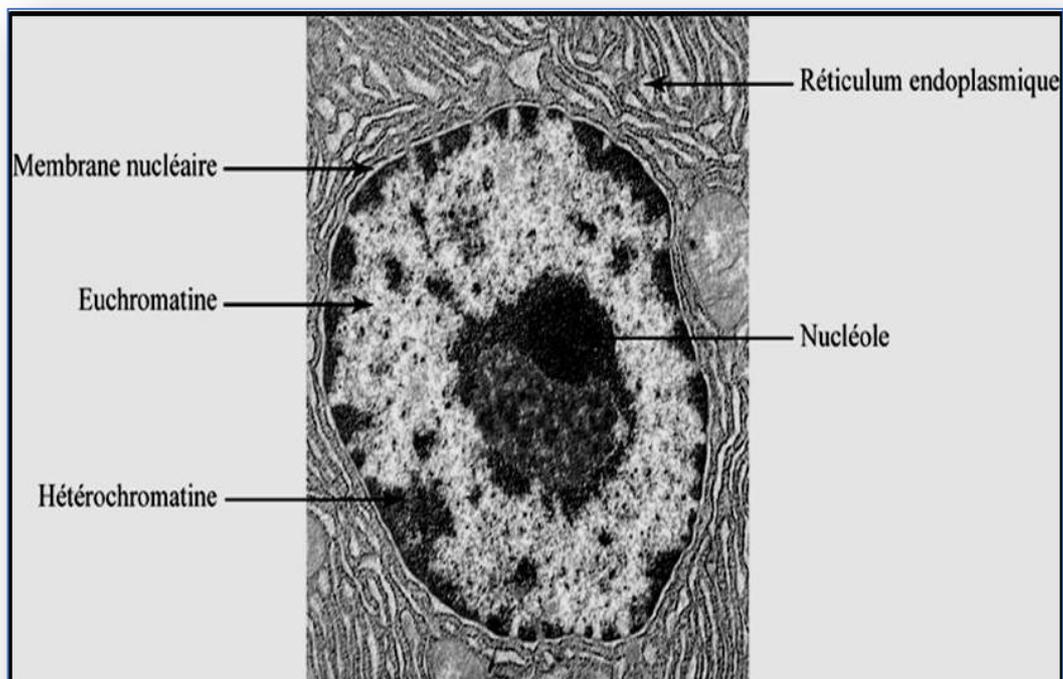


Figure 4 : La chromatine : hétérochromatine et euchromatine

I-2 Régulation et fonction de la chromatine

Chaque cellule qui compose notre organisme possède le même contenu génétique étant donné que l'ADN se réplique et se transmet à chaque division cellulaire à toutes les autres cellules formées bien qu'elles vont acquérir des fonctions et identités distinctes durant le développement embryonnaire ainsi que de la différenciation cellulaire. Comment alors différencier un neurone d'une cellule immunitaire ou encore d'une cellule cardiaque ? C'est là qu'agit l'« épigénétique ». Effectivement, bien que toutes les cellules de l'organisme aient un nombre identique de gènes, seuls certains qui sont responsables de l'activité de la dite cellule sont activés. En fonction donc du type cellulaire, des gènes seront donc inhibés : « verrouillés » pour que leur expression ne puisse se faire. Cette information dite de verrouillage ou de déverrouillage du génome, nécessaire au fonctionnement physiologique de la cellule, est localisée au sein de la chromatine. Il existe ainsi une modulation épigénétique de l'expression des gènes qui permet de contrôler l'organisation de la chromatine ainsi que la propagation de l'identité et de la diversité des types cellulaires durant le développement d'un organisme.

I-2-a) Qu'est-ce que l'épigénétique ?

La régulation des fonctions indispensables à la vie cellulaire est donc assurée par la chromatine. Ce qui traduit l'intérêt du contrôle de sa formation, son maintien ainsi que sa transmission lors des divisions cellulaires ainsi que des processus de différenciation. Ce contrôle est assuré par différents mécanismes responsables qui interviennent en régulant l'information dite épigénétique. Il est à noter que cette information n'est pas codée par la séquence d'ADN. Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur l'épigénome, cette définition s'est étendue au-delà de la stricte information portée par le nucléosome (ADN et histones), et aujourd'hui, différents niveaux d'information qui part depuis l'échelle du nucléosome jusqu'à l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau sont également considérés comme épigénétiques. Le

terme épigénétique renvoie alors aux paramètres transmissibles des gènes, durant les divisions cellulaires, qui concourent à la régulation du fonctionnement physiologique d'une cellule sans que cela ait un impact direct sur la séquence d'ADN¹. A ce jour, les mécanismes intervenants dans la mise en place de l'information épigénétique incluent :

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

L'état de compaction de la chromatine est ainsi conditionné par les paramètres épigénétiques qui vont impacter sur les processus physiologiques vitaux que sont la transcription, la réplication, la réparation ainsi que la recombinaison. La modulation des informations génétiques étant assurée par des enzymes et complexes protéiques dont leur action est spécifique à la réorganisation de la chromatine et par voie de conséquence au contrôle et régulation des types cellulaires, autrement dit des fonctions cellulaires.

I-2-a1) La méthylation de l'ADN

Comme son nom l'indique, la méthylation de l'ADN se caractérise par l'addition d'un groupement méthyl-CH₃ au niveau du carbone 5 des résidus de cytosines de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est sous le contrôle d'enzymes, dont les ADN méthyltransférases ou DNMT, issus de la S-adénosyl-méthionine (SAM) qui est un donneur de méthyl (Figure 5).

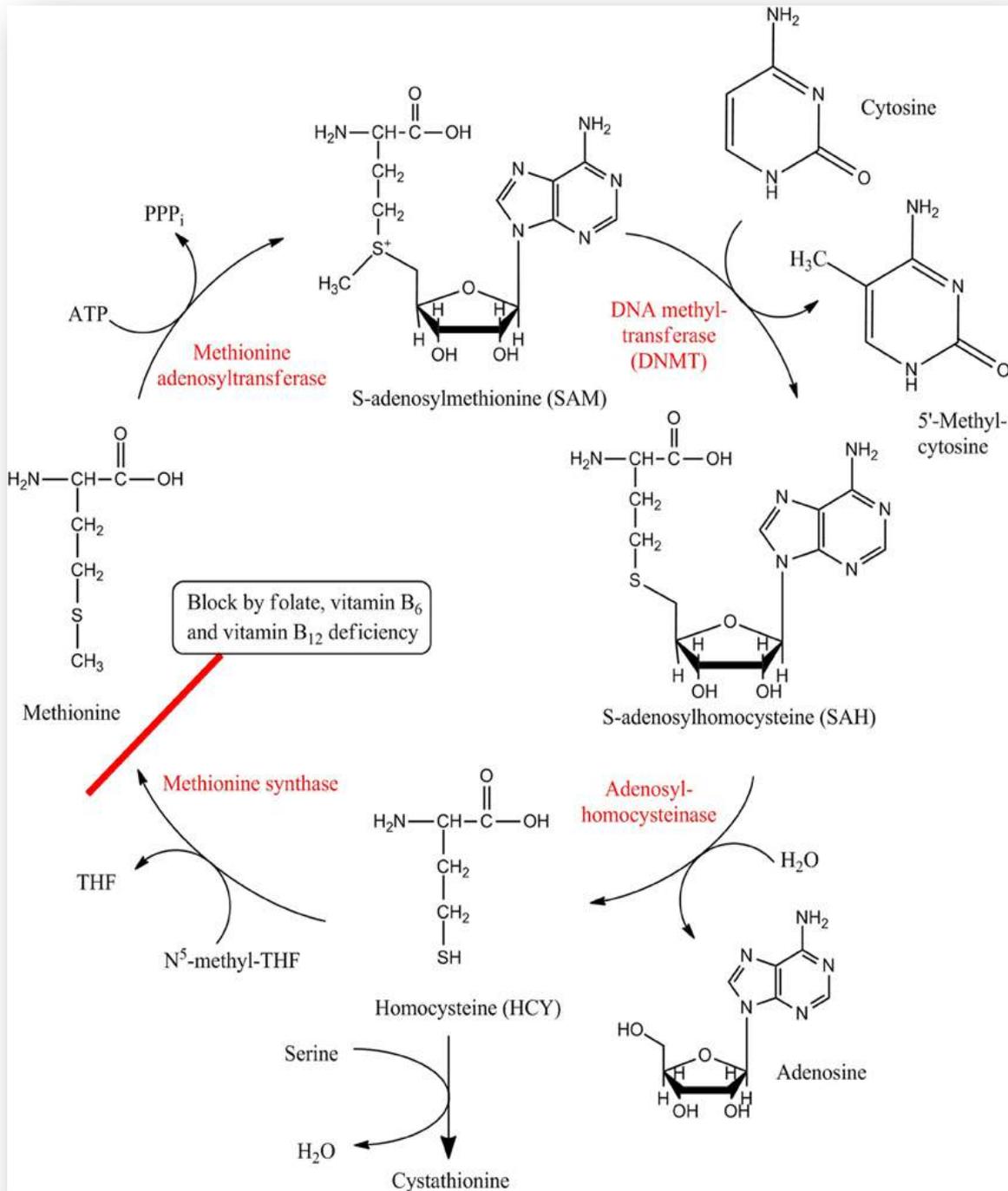


Figure 5 : Voie métabolique de la méthylation de l'ADN²

Il est à noter que la méthylation de l'ADN peut être réversible grâce à une déméthylase qui vient d'être découverte récemment. Cette méthylation de l'ADN octroie l'identité du type cellulaire de par la formation d'un revêtement moléculaire propre et variable d'un gène à l'autre,

d'un type cellulaire à un autre qui confère un caractère unique et transmissible à l'ADN. Ce qui confère à la structure moléculaire de l'ADN une composante génétique propre et semblable dans toutes les cellules ainsi qu'une composante épigénétique qui varie selon le type cellulaire. Le processus de méthylation pour les mammifères se localise généralement au sein des dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine). D'ailleurs, 60% à 90% des dinucléotides CpG qui se situent au niveau de la chromatine compactée ou hétérochromatine, région qui s'avère impénétrable par la transcription, sont méthylés. Un îlot CpG étant selon Gardiner-Garden et Frommer « une région comprise entre 0,2 et 2 kilobases ayant une teneur en GC supérieure à 50 % et un rapport de CpG sur GpC d'au moins 0,6 ». Sur environ 1% à 2% du génome humain, le nombre de ces îlots CpG serait estimé entre 1000 et 45000 complémentairement à une répartition moyenne à chaque 100 kilobases. La majorité de ces îlots sous forme méthylés sont retrouvés dans les régions promotrices de gènes. Les séquences exoniques ou introniques recèlent en très faible quantité des îlots CpG. Il y a une corrélation entre la méthylation ou non des îlots CpG et l'expression de certains gènes mais cela n'est pas toujours vérifié. De plus, la méthylation de l'ADN et la structure de la chromatine seraient intimement reliées et impliquées dans la régulation de cette expression. Trois processus interviennent dans la mise en place de cette diversité des motifs de méthylation :

- la déméthylation globale qui correspond à l'effacement des schémas de méthylation transmis par les parents avec l'établissement d'un nouveau profil chez l'embryon.
- La méthylation de novo qui consiste à la formation de nouveaux schémas de méthylation après la différenciation cellulaire de l'embryon
- La méthylation de maintenance ou de maintien qui porte sur la reproduction fidèle des schémas de méthylation chez les cellules filles lors de la réplication

La méthylation, qu'elle soit *de novo* ou de maintenance, est assurée par une famille d'enzymes, les DNMT (figure 5).

α Méthylation de novo de l'ADN

La méthylation de novo survient après la déméthylation globale : après la fécondation il y a effacement des profils de méthylation transmis par les parents pour permettre la réalisation d'un nouveau schéma chez l'embryon. La méthylation de novo se déroule sous l'influence des enzymes de la famille des DNMT, notamment les DNMT3a et DNMT3b qui font partie de la famille DNMT3³. La DNMT3a intervient dans la méthylation des séquences de régulation de l'expression des gènes alors que la DNMT3b joue un rôle dans la méthylation des séquences « satellites » au niveau des Centromères (figure 6).

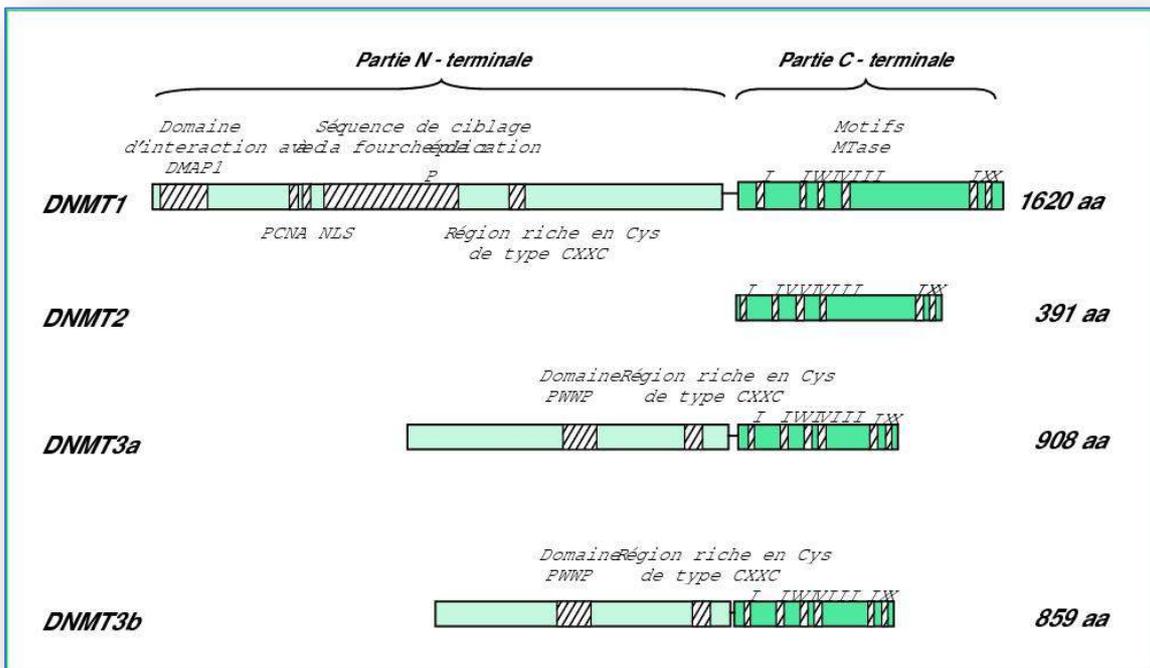


Figure 6 : Les différentes ADN méthyltransférases

β Méthylation de maintien de l'ADN

La méthylation de maintien fait suite à la méthylation de novo et consiste comme son nom l'indique au maintien, la reproduction fidèle des profils de méthylation réalisés durant la

méthylation in novo. La méthylation de maintien de l'ADN se déroule sous l'effet de la DNMT1 qui, au cours des divisions cellulaires, préserve en se basant sur la molécule d'ADN hémiméthylé, les profils de méthylation en concordance avec la réplication de l'ADN⁴ (Figure 7 et 8).

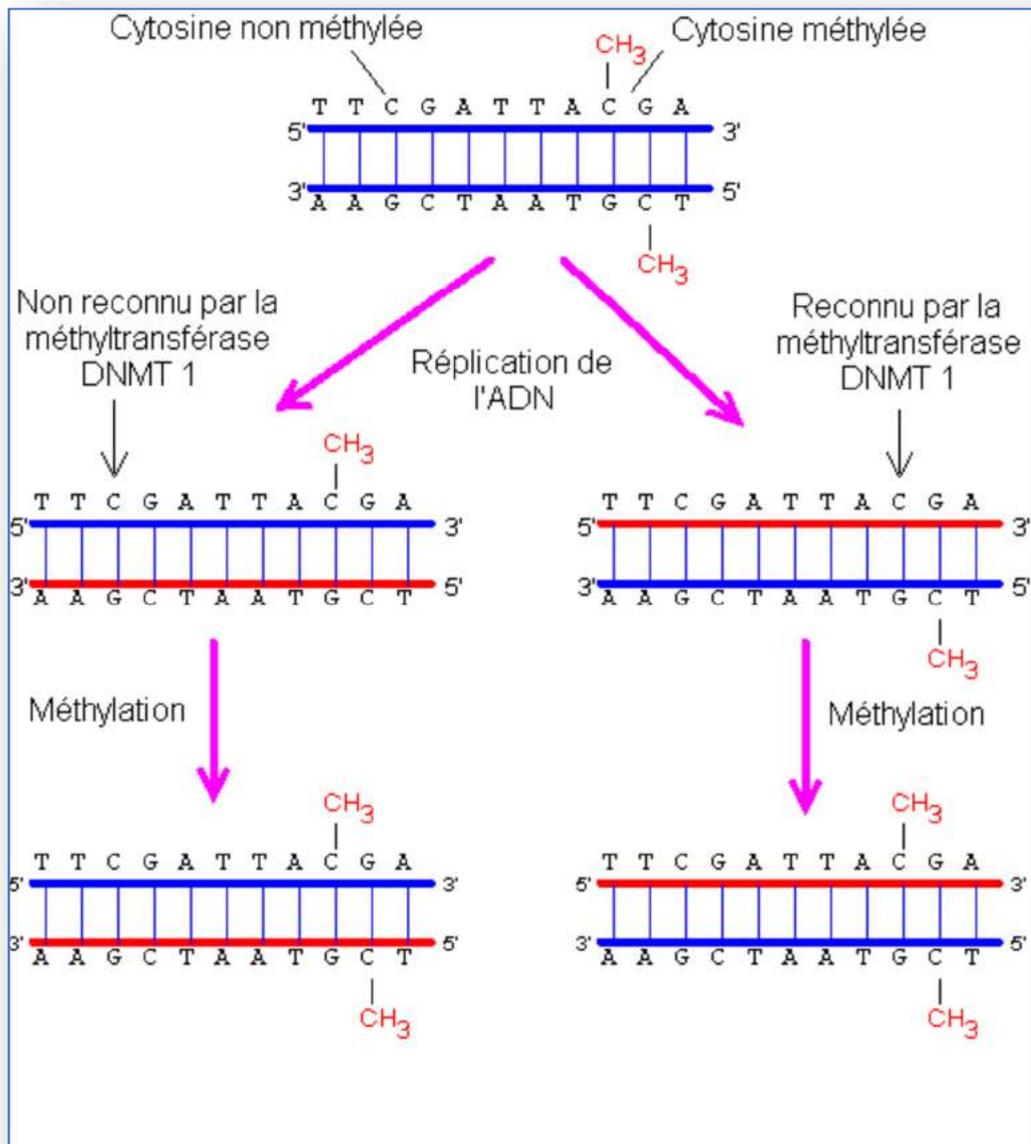


Figure 7 : Maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires

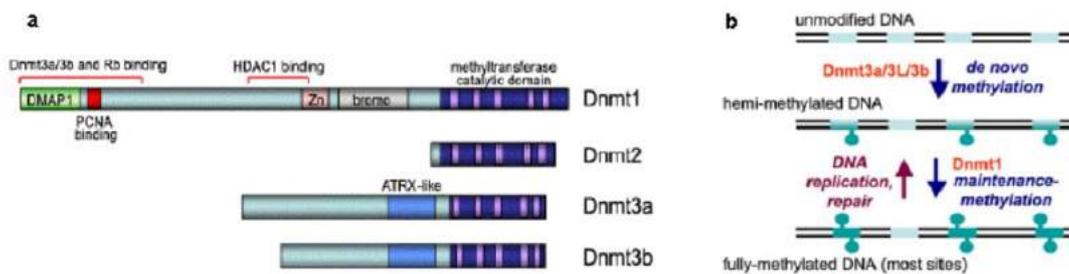


Figure 8 : a) Les principales DNMT, d'après Zlatanova J, 2004 ; b) méthylation de novo et de maintien

d'après Cheng X & Blumenthal RM, 2008

γ Rôle de la protéine DNMT2 (ou TRDMT1) dans la méthylation de l'ADN

La protéine initialement clonée par Yoder et Bestor (1998) fut nommée DNMT2 en raison de sa forte homologie de séquence avec les autres méthyltransférases via notamment la conservation des motifs I, IV, VI, IX et X⁵. Néanmoins, cette protéine n'affiche pas d'activité méthyltransférase⁶. De ce fait, son rôle dans la méthylation de l'ADN demeure très discuté. Ce point est renforcé par le fait que son niveau d'expression est faible dans de nombreux tissus, et que l'inactivation du gène DNMT2 au sein de cellules souches embryonnaires de souris n'affecte pas le niveau global de méthylation de l'ADN⁷.

δ Méthylation de l'ADN et contrôle de l'expression génique

L'expertise de l'expression génique se déroule également sous la direction des DNMT qui interviennent directement ou pas dans la transcription de gènes spécifiques. La méthylation est responsable de l'inhibition de certaine expression génique à travers un mécanisme de blocage de la liaison des facteurs de transcription tels myc, AP-2, c-fos, CRE ou CTCF^{8,9} complémentairement à une non reconnaissance de la séquence méthylée. Le contrôle de l'état de la chromatine, en particulier sa compaction, est un phénomène clef de la régulation de l'expression génique. Incontestablement, l'assemblage de l'ADN avec les histones qui déterminera la compaction condensée ou moins dense de la chromatine est le facteur principal qui permettra l'accessibilité des gènes durant les phénomènes de transcription.

1-2-a2 La déméthylation de l'ADN

Plusieurs mécanismes moléculaires aboutissant à la déméthylation de l'ADN ont été mis en évidence^{10,11}. De manière classique, la littérature distingue deux types de mécanismes de déméthylation de l'ADN : la déméthylation passive et la déméthylation active.

α Déméthylation passive de l'ADN

La déméthylation passive de l'ADN est liée à un manque de maintien de la méthylation de l'ADN suite à la réplication de l'ADN. Ainsi, une perte d'expression ou d'activité de la protéine DNMT1 et/ou l'absence/diminution de formation d'un complexe impliquant la protéine DNMT1 sont des processus conduisant au fil des générations/divisions cellulaires à l'obtention d'un ensemble de cellules dont l'ADN est hypométhylé. Il est également à noter que l'expression des isoformes DNMT1o (dont l'expression est restreinte de l'ovocyte à l'embryon préimplantatoire) et DNMT1p (dont l'expression est restreinte au stade pachytène de la spermatogenèse) sont des phénomènes associés à des phases de déméthylation/hypométhylation de l'ADN^{12,13,14,15}.

β Déméthylation active de l'ADN

La déméthylation active de l'ADN est un processus indépendant du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN, et résulte de plusieurs réactions enzymatiques successives.

1 Déméthylation par hydroxylation et oxydation

Cette voie de déméthylation de l'ADN fait intervenir les enzymes de la famille TET (Ten-eleven-translocation)¹⁶. Ces protéines catalysent la conversion des 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis des oxydations itératives peuvent ensuite aboutir à la formation de 5-formylcytosine (5fC) et de 5-carboxycytosine (5caC). Ces 2 dernières bases peuvent ensuite être éliminées par l'action de l'enzyme TDG et du système BER (base excision repair) qui vont reconnaître un mésappariement. Il pourrait aussi exister des déformylases ou décarboxylase qui convertiraient les 5fC et 5caC en cytosines indépendamment du système TDG/BER¹⁷. Il est également à noter que la présence des bases 5hmC, 5fC et 5CaC pourrait aussi conduire à une déméthylation dite passive puisque la présence de ces bases ne sera pas maintenue suite à la réplication de l'ADN.

2 Déméthylation par hydroxylation et déamination

Cette voie de déméthylation de l'ADN fait intervenir les enzymes de la famille TET qui vont catalyser la conversion des 5mC en 5hmC. Puis, les 5hmC vont ensuite être déaminées par les protéines AID/APOBECs. Cela génère l'apparition de 5-hydroxyméthyluracile (5hmU) et donc de mésappariements U/G qui seront pris en charge par les protéines SMUG1/TDG et le système BER. Cependant, les travaux récents du groupe de Thomas Carell montrent que la présence de 5hmU dans les cellules ES n'est pas liée à un processus de déamination des 5hmC mais résulte d'une oxydation des T par les enzymes TET¹⁸.

3. Déméthylation par déamination

Les 5mC peuvent directement être prises en charge par les protéines AID/APOBEC pour être désaminées ce qui conduit à la mise en place de mésappariement T/G que les protéines TDG ou MBD4 vont reconnaître, induisant ainsi la formation de sites abasiques que le système BER répare en incorporant une cytosine non modifiée.

δ Déméthylation impliquant les protéines DNMT3A et DNMT3B

Plusieurs publications suggèrent que les DNMTs puissent être sous certaines conditions impliquées dans la déméthylation active de l'ADN. Les travaux de Métivier *et al.* (2008) et de Kangaspeska *et al.* (2008) suggèrent que les DNMT3A et DNMT3B possèdent une activité déaminase et proposent que ces deux enzymes seraient impliquées dans une voie cyclique de déméthylation-méthylation dynamique^{19 20}. Les travaux de Chen *et al.* (2013) indiquent par ailleurs que DNMT1, DNMT3A et DNMT3B peuvent aussi agir comme des déméthylases actives de l'ADN dans un contexte Ca²⁺/redox-dépendant²¹. Enfin, la littérature mentionne que DNMT3A interagirait directement avec la protéine TDG, et que cette interaction affecterait l'activité enzymatique des deux protéines : DNMT3A régulant positivement l'activité glycosylase de TDG, et TDG inhibant l'activité de méthylation de DNMT3A *in vitro*. Ces données suggèrent ainsi que DNMT3A participerait à la déméthylation de l'ADN *via* son interaction directe avec la protéine TDG^{22 23}.

Ω À propos des DNA demethylating associated proteins

Plusieurs familles de protéines jouant un rôle dans les différents mécanismes de déméthylation de l'ADN sont actuellement connues. On parlera de « DNA-demethylating associated proteins ». Les travaux de Cartron *et al.* (2013) montrent que TET1 interagit avec les protéines MeCP2 ou encore avec les protéines HDAC. Ces données pourraient donc

suggérer un adressage de la protéine TET1 au niveau de régions du génome fortement enrichies en ces protéines²⁴. Récemment, les travaux de Schafer *et al.* (2013) ont montré que la protéine ING1 joue un rôle au sein d'un processus de déméthylation active et ciblée de l'ADN²⁵. En effet, en interagissant avec Gadd45, ING1 promeut le recrutement de Gadd45 au niveau de séquences d'ADN associées à H3K4 triméthylée, permettant ainsi le maintien d'un état hypométhylé de ces régions. Ainsi, ING1 apparaît comme un des médiateurs d'un processus de « chromatin-directed DNA demethylation ». Enfin, les travaux de Arab *et al.* (2014) montrent que les lncRNAs, peuvent servir de séquences d'adressage sur le génome afin de promouvoir un processus de « RNA-directed DNA demethylation » *via* la protéine Gadd45²⁶.

I-2-a3) Les modifications post-traductionnelles des histones

Elles sont parmi les protéines eucaryotes connues les plus conservées. En effet, elles sont retrouvées chez les animaux, les plantes, les eucaryotes inférieurs, et même récemment chez des archéobactéries, règne distinct des végétaux et des animaux^{27,28}. Cette extrême conservation au cours de l'évolution traduit leur rôle essentiel dans la chromatine. Elles sont classées en deux familles : les histones de coeur (H2A, H2B, H3 et H4) et les histones de liaison (H1)¹⁰. Les histones de coeur sont de petites protéines de poids moléculaires compris entre 11 et 22 kDa (figure 8).

Il s'agit de protéines riches en résidus basiques (lysine et arginine) conférant à ces protéines des charges positives leur permettant de lier fortement l'ADN par des interactions électrostatiques²⁹. Malgré une faible homologie de séquence, les structures secondaires et

Diverses modifications post-traductionnelles peuvent toucher les histones, notamment l'acétylation (sur les lysines), la méthylation (sur les lysines et les arginines), la phosphorylation (sur les sérines et les thréonines), l'ubiquitinylation (sur les lysines), ou encore la sumoylation (sur les lysines), les histones peuvent également être ADP-ribosylées et glycosylées^{32,33} (Figure 9).

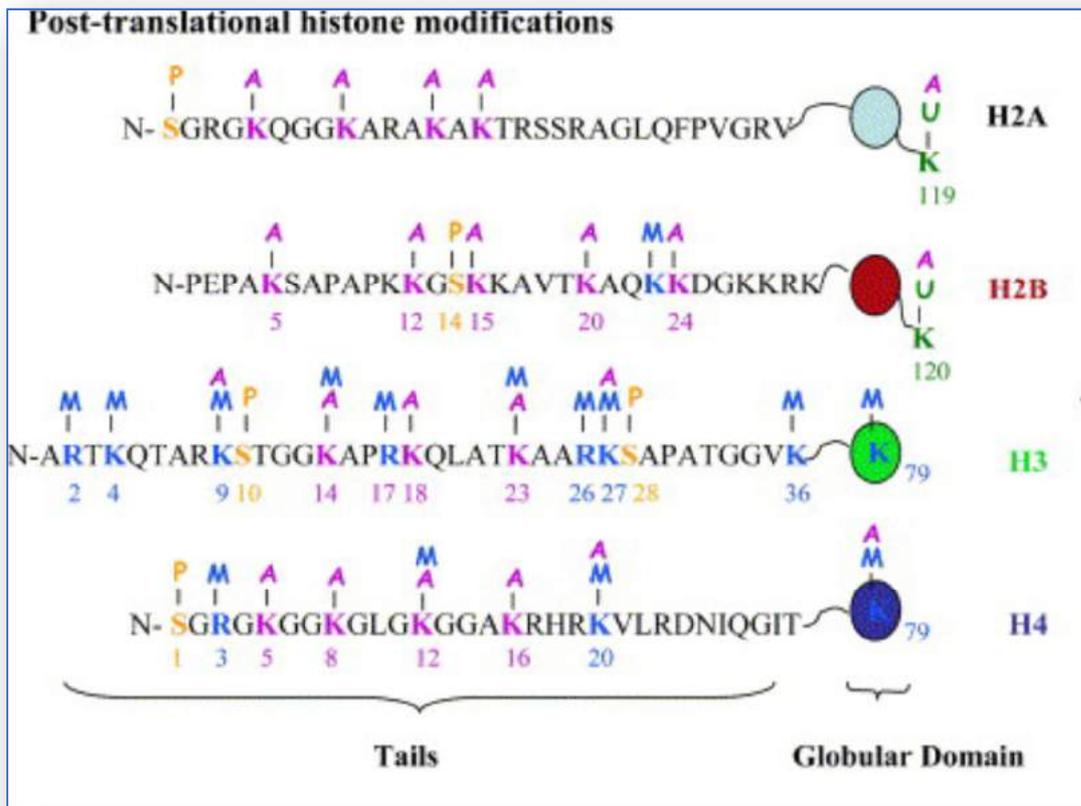


Figure 10 : Principales modifications post-traductionnelles décrites aux niveaux des histones H2A, H2B, H3 et H4.

A, acétylation ; M, méthylation ; P, phosphorylation ; U, ubiquitinylation. *D'après Santos-Rosa H, Caldas C, 2005*

α L'acétylation des histones

L'acétylation des histones est caractérisée par l'ajout d'un groupement acétyl (COCH₃) qui provient de l'acétylCo-enzyme A, au niveau des résidus lysine (K) des histones. Réversible,

l'acétylation est sous la régulation de deux classes d'enzymes antagonistes que sont les histones acétyltransférases (HAT) qui sont responsables de l'ajout du groupement acétyl, et les histones déacétylases (HDAC) qui sont responsables de la déacétylation. Il existe ainsi un équilibre d'activité enzymatique, des HAT et des HDAC, qui contrôle l'état d'acétylation des histones. De plus, des régions typiques sont ciblées par l'acétylation / déacétylation³⁴. Les analyses « genome-wide » ont par ailleurs permis d'affirmer que les HAT et HDAC qui sont localisées au niveau des régions géniques actives seraient mobilisées par l'ARNpolIII sous le contrôle de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3³⁵. Ce qui atteste du rôle clef de l'acétylation / déacétylation dans l'état de la chromatine, notamment en termes de structure et fonction³⁶. Ainsi, l'activation de la machine transcriptionnelle serait corrélée à l'acétylation des histones des régions actives, notamment H3 et H4, alors que les régions moins et peu actives dans la transcription sont hypoacétylées³⁷. L'acétylation en agissant via un mécanisme de neutralisation des charges positives des lysines réduirait les liaisons entre les histones et l'ADN, qui ont une charge négative, une décompaction de la chromatine et par voie de conséquence l'accessibilité de la séquence d'ADN homologue aux facteurs de transcription³⁸ (Figure 10 et 11). L'acétylation activerait également les protéines présentant une affinité avec la chromatine, comme les protéines à bromodomaine qui sont responsables du recrutement de la machine transcriptionnelle¹⁷. En outre, l'acétylation interviendrait également dans la réplication ainsi que dans le phénomène de réparation de l'ADN^{17,39,40,41}.

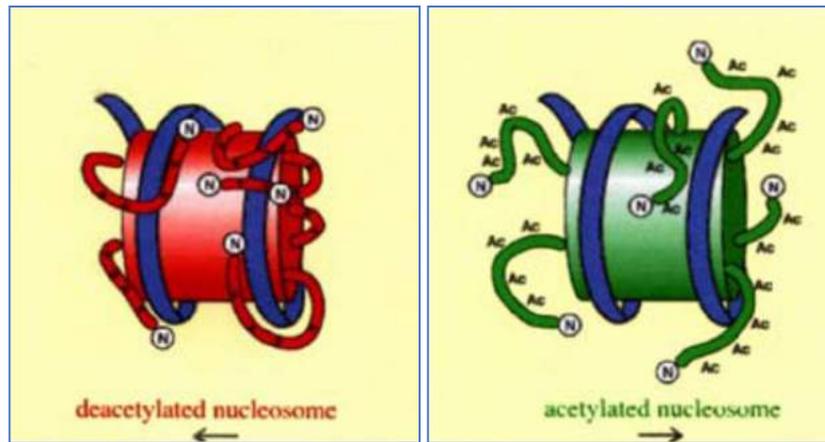


Figure 11 : Acétylation et déacétylation des lysines des histones. HAT, histone acétyltransférase ; HDAC, histone déacétylase⁴².

1° Les histone déacétylases – HDAC

Enzymes qui agissent en catalysant l'hydrolyse du groupement acétyl, les histones déacétylases sont classées en 4 familles d'après la présence d'homologie de leurs séquences avec celles des HDAC de la levure *S. Cerevisiae*. Actuellement, il existe chez les mammifères 18 histones déacétylases identifiées. Les HDAC de classe I avec les HDAC 1, 2, 3 et 8 sont ubiquitaires et se retrouvent dans le noyau cellulaire⁴³. Les HDAC de classe II sont réparties en 2 sous-classes :

- la sous-classe IIa avec les HDAC 4, 5, 7 et 9
- la sous-classe IIb avec les HDAC 6 et 10 dont la particularité est la présence de deux domaines « déacétylase ».

Il est à noter que les HDAC II ont une expression plus restreinte par rapport aux HDAC I, d'où leur spécificité d'action, particulièrement durant le développement et de la différenciation⁴⁴. Les HDAC de classe III ou « famille des Sirtuines » sont constituées par 7 protéines similaires à Sir-2 (Silent Information Regulator 2) : SIRT1-7. L'activité histone déacétylase qui est fonction du NAD (Nicotinamide-Adénine-Dinucleotide) est spécifique des SIRT1, 2, 3 et 5⁴⁵. SIRT2 serait spécifique à la lysine 16 acétylée de l'histone H4⁴⁶. Les HDAC de classe IV contiennent, à ce jour le HDAC11⁴⁷ dont l'expression est limitée à certains tissus : rein, cœur, cerveau, muscle squelettique et testicule. Il est à rappeler que les inhibiteurs de HDAC (HDACi) s'avèrent être intéressants, cliniquement, dans les traitements contre les tumeurs.

2° Les histone acétyltransférases – HAT

Il existe six familles de HAT: GNAT, MYST, P300/CBP, TAFII 250, les sous unités de TFIIC ainsi que la famille des coactivateurs des récepteurs nucléaires. Ces enzymes ne présentent pas de spécificité d'action vis-à-vis de la lysine, et leur activité acétyltransférase n'est pas limitée aux histones. Effectivement, les histone acétyltransférases peuvent acétyler des protéines non

histones comme les facteurs de transcription (le suppresseur de tumeur p53) ou encore les protéines dites chaperonnes (HSP)⁴⁸.

β La méthylation des histones

Comme son nom l'indique, la méthylation des histones correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) au niveau des résidus lysine et arginine (histones H3 et H4)⁴⁹. Cette méthylation est réalisée sous l'action des histoneméthyltransférases (HMT) qui proviennent du S-adenosyl-méthionine. Après la méthylation, les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés alors que les résidus arginine ne sont que mono- ou di-méthylés (Figure 12).

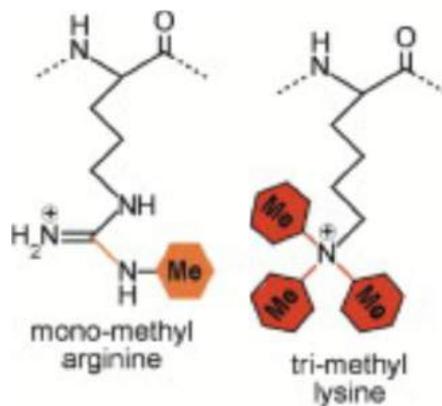


Figure 12 : La méthylation des histones sur les lysines et les arginines. Une arginine mono-méthylée et une lysine triméthylée sont représentées⁵⁰.

La charge du nucléosome n'est pas modifiée au niveau des parties N-terminale des histones par la méthylation, contrairement à ce qui est constaté durant l'acétylation. Toutefois, elles interviennent dans la mobilisation des facteurs qui régulent l'accessibilité de la chromatine.

Selon le résidu méthylé, la méthylation est spécifique et a une signification particulière :

- l'activation de la transcription correspond à la méthylation des lysines 4⁵¹, 36⁵² et 79 de l'histone H3¹⁶.

- la tri-di-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3³⁵ et de la lysine 20 de l'histone H4^{53,54} est adjointe à l'hétérochromatine et ne permet pas la transcription^{55,56,57,58}.
- la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 se localise au sein du chromosome X qui est inactif, ou encore au niveau des gènes qui dépendent de l'héritage parental^{59,60,61} et met en jeu les régulateurs transcriptionnels de la famille Polycomb (Tableau 1).

Tableau 1 : Signification de la méthylation des histones en fonction du contexte⁶².

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

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

1° Les histoneméthyltransférases – HMT

Il existe deux groupes d'histones méthyltransférases:

- les méthyltransférases de type I ou PRMT (Protein R (arginine) Methyltransferase), qui interviennent dans la catalyse de la méthylation des résidus arginines
- les méthyltransférases de type II ou HKMT (Histone K (lysine) Transferase) pour la catalyse des résidus lysine.

Par rapport aux histoneacétyltransférases, les histoneméthyltransférases montrent une spécificité certaine aux résidus. Les histones méthyltransférases sont caractérisées par la

présence, fortement conservée, d'un domaine SET (Su(var)3-0, Enhancer-of-zeste, Trithorax) qui assure l'activité méthyltransférase⁶³.

Il existe 5 grandes familles de HMT : SET1, SET2, SUV39, RIZ, et SUV4-20, dont la classification se base sur la présence de séquence homologue aux HMT ainsi qu'avec celle de la levure et la similarité des domaines SET. Les protéines appartenant à la famille Polycomb ainsi que Trithorax font partie de la famille SET1. Quatre membres constituent la famille SUV39 : SUV39H1, SUV39H2, G9a et ESET et sont caractérisés par la présence d'un domaine SET formé par 130 aminoacides en position C-terminale qui assure l'activité histone méthyltransférase, et d'un chromodomaine en position N-terminale, un motif chromodomaine qui assure la liaison avec les lysines méthylées⁶⁴. Cette famille SUV39 a une affinité spécifique avec la lysine 9 de l'histone H3.

2° Les histone-déméthylases – HMD

Le concept d'irréversibilité de la méthylation des histones a été remis en cause par la découverte des histones déméthylases⁶⁵. En effet, la LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) a la capacité de déméthyle la lysine 4 de l'histone H3, complémentairement à sa participation dans l'inhibition de la transcription⁴⁸. Depuis, la présence d'un domaine LSD1 ou encore d'un domaine JmjC (Jumonji C) semble être le facteur d'identification des histones déméthylases grâce à la présence d'un domaine LSD1 ou d'un domaine JmjC (Jumonji C)⁶⁶. Les HMD sont également douées d'activité spécifique comme la capacité à déméthyle la lysine 4 de l'histone H3 lorsque cette dernière est mono- ou di-méthylée.

I-2-b) Les protéines liant l'ADN méthylé : les MBD

Une reconnaissance des îlots CpG méthylés est possible chez les animaux par l'intermédiaire d'un motif composé de 70 acides aminés appelé MBD (methyl-CpG binding domain). Il existe cinq membres de protéines MBD chez les vertébrés : MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et

MBD4. La MeCP2 étant le premier membre de cette famille de protéines, le reste n'ayant été identifié qu'en 1998⁶⁷. Des complexes dits répresseurs de la transcription sont intimement liés aux MeCP2, MBD1, MBD2 et MBD3 et interviennent dans les modifications de l'état local de la chromatine⁶⁸. La particularité de la MBD3 est son incapacité à se lier de façon intrinsèque avec les CpG méthylés, toutefois elle agit spécifiquement sur la régulation des gènes. Il est à noter que la probabilité de mutation est élevée lorsqu'il y a méthylation des cytosines. Effectivement, la cytosine méthylée est susceptible de subir une désamination spontanée la transformant en thymine. Cette transformation étant à l'origine d'un mésappariement au niveau T/G de l'ADN. Il est à noter que ce mésappariement est reconnu par la protéine MBD4 qui a la capacité d'exciser la thymine en agissant par l'intermédiaire d'une activité glycosylase, conjointement à une reconnaissance, bien que faible par rapport aux mésappariements T/G, des CpG méthylés. Nouvellement, grâce à l'analyse de séquence, six nouveaux membres de la famille MBD ont été recensés⁶⁹ sans que leur capacité à lier les CpG méthylés ait encore été démontrée.

I-2-c) Les protéines à chromodomaine

Bien qu'elles aient déjà été déterminées chez la drosophile au sein des protéines HP1 et Polycomb^{70,71}, les protéines à chromodomaine (CHRomatin Organisation MOdifierdomain) ont été récemment découvertes, et possèdent des motifs de protéines qui peuvent reconnaître les résidus lysines méthylés^{72,73,74}. Formé par une cinquantaine d'acides aminés, le chromodomaine est adjoint à des protéines qui ont une affinité pour les régions dites hétérochromatiques, en d'autres termes un état silencieux de la chromatine. Il existe alors une interaction entre ces protéines et les répresseurs de la transcription^{75,76}. Selon l'analyse fonctionnelle, les protéines à chromodomaine sont réparties en cinq familles que sont : HP1, Polycomb, SUV39, CHD et RBP1⁷⁷ (Figure 13).

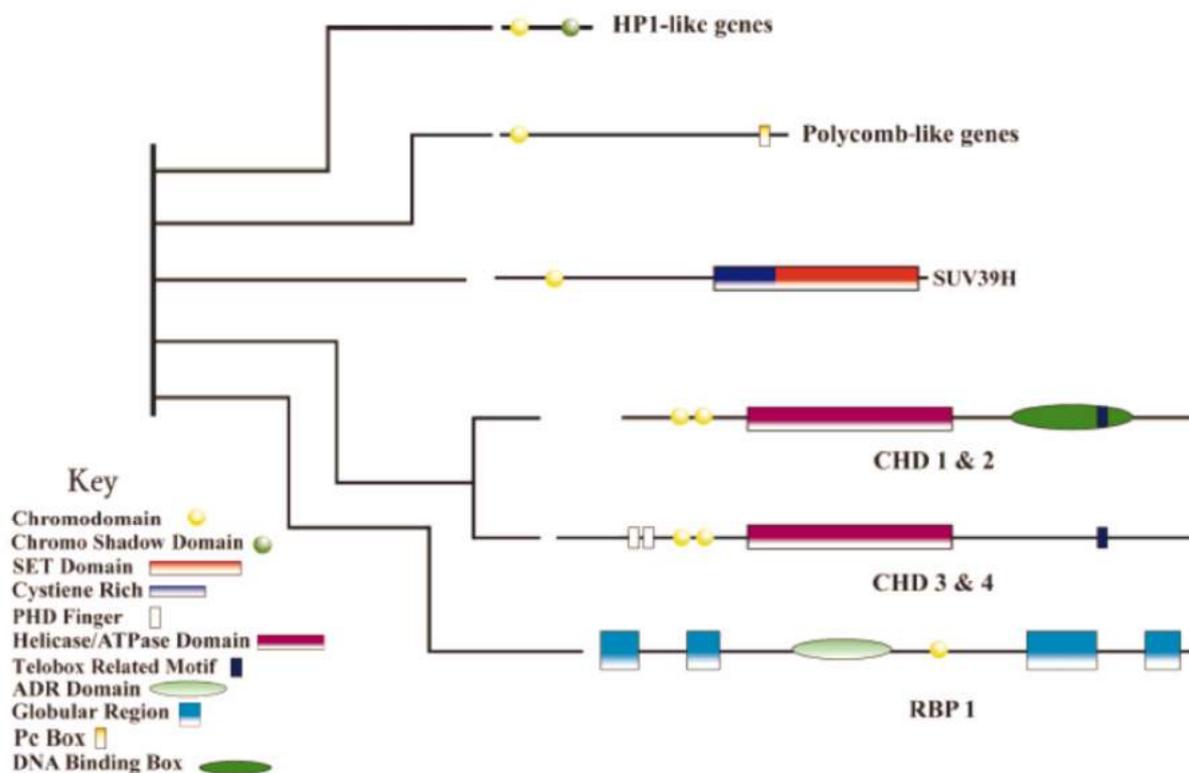


Figure 13 : Organisation des protéines à chromodomaine chez les mammifères.

I-2-c1) La famille SUV39

La présence en position C-terminale d'un domaine SET d'une part, est caractéristique de cette famille SUV39. D'ailleurs, c'est ce domaine qui est responsable de l'activité histone méthyltransférase. De plus, la présence d'un motif chromodomaine localisé en position N-terminale permet également d'effectuer une liaison avec les lysines méthylées⁴⁷. Cette famille a également une spécificité pour la lysine 9 de l'histone H3. En effet, le chromodomaine permettrait de localiser la protéine au sein des régions hétérochromatiques, notamment par la mise en exergue de la protéine SUV39H1 qui a été retrouvée, chez les mammifères, dans les régions centromériques et péri-centromériques⁴⁷.

I-2-c2) La famille HP1

Les protéines HP1 sont caractérisées par une structure commune qui est constituée par trois domaines différents⁷⁸:

- le chromodomaine qui se situe dans la partie N-terminale de la protéine est impliqué dans la liaison de HP1 à l'histone H3 di- ou tri-méthylée sur la lysine 9

- le domaine chromoshadow, rencontré dans la partie C-terminale de la protéine est impliqué dans l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de la protéine ainsi que dans l'interaction avec les autres protéines

- la région « hinge » (charnière), située entre le chromodomaine et le domaine chromoshadow assure la signalisation de localisation nucléaire et est sujette à des modifications post-traductionnelles, cette région peut également établir la liaison avec l'ARN.

En 2001, il a été mis en exergue que le chromodomaine de HP1 pouvait reconnaître de manière spécifique la lysine 9 de l'histone H3 sous sa forme di- et tri-méthylée^{79,80} alors qu'il ne semble pas pouvoir se lier avec l'histone H3 méthylée sur la lysine 4⁶² (Figure 14).

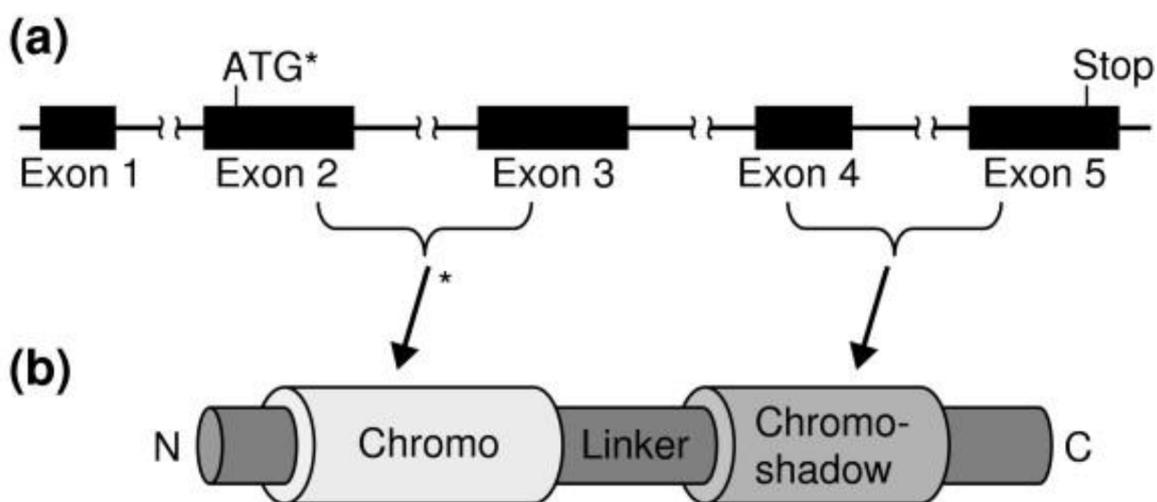


Figure 14 : Structure de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1)⁶¹.

Complémentairement au chromodomaine, les domaines « hinge » et chromoshadow interviennent également dans la localisation de la protéine. D'ailleurs, une délétion au niveau de la protéine HP1 induit une incapacité du domaine chromoshadow à se localiser au sein des régions hétérochromatiques⁸¹, de même que des mutations au niveau du domaine « hinge » sont à l'origine d'altération des interactions et de la distribution chromosomique de la protéine HP1⁸². HP1 α , HP1 β et HP1 γ sont trois isoformes de la protéine HP1, dont les gènes codants respectifs sont *CBX5*, *CBX1* et *CBX3* (ChromoBoXgenes). HP1 α et HP1 β sont retrouvées au niveau hétérochromatique, en particulier dans les régions péri-centromériques^{58,59,83}, HP1 γ est localisée au niveau des deux compartiments de chromatine : euchromatine et hétérochromatine⁸⁴. Il est à noter qu'une activation de la transcription peut être corrélée à la présence d'HP1 au niveau des régions euchromatiques. Cette différence de localisation de ces protéines serait sous le contrôle des modifications post-traductionnelles ainsi que des interactions avec d'autres protéines⁸⁵. Les protéines à chromodomaine comme SUV39 ainsi que HP1 interviennent ainsi et dans l'état de la chromatine, notamment la formation d'hétérochromatine, de même que dans l'expression et la répression génétique.

I-2-c3) La famille Polycomb (EZH2)

Appartenant aux complexes multi-protéiques PRC1 et PRC2 (PolycombRepressiveComplex 1/2), les protéines de la famille Polycomb sont composées de plus de 300 acides aminés et détiennent un motif Pc-box au niveau du côté C-terminal qui est essentiel à leur fonction⁶⁰. D'ailleurs, il a été mis en évidence chez la drosophile en 2002 que le chromodomaine de la protéine Polycomb pouvait se lier de manière spécifique avec l'histone H3 méthylée sur la lysine 27^{86,87}. Outre la présence du chromodomaine, les protéines EZH1 et EZH2 présentent un

domaine SET qui intervient dans la régulation de l'activité histone méthyltransferase du complexe PRC2⁸⁸. Le maintien ainsi que la régulation de la chromatine à l'état répressif durant le développement est assuré par les protéines du groupe Polycomb (PcG). En effet, les protéines Polycomb agissent par répression de gènes codants notamment des régulateurs de développements qui sont essentiels aux organismes, que ce soit chez la plante ou chez l'Homme (Figure 15).

Un exemple des enzymes responsables de la modification des histones et de l'ADN ainsi que des facteurs reconnaissant ces modifications sont reportés dans les tableaux ci-dessous (adaptés de Kim et al Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 66: 596–612. doi:10.1007/s00018-008-8432-4.).

Enzymes de modification des histones	
Acétyltransférases	Deacétylases
HAT1	HDAC 1 à 11
GCN5, PCAF	Sirtuins
CBP, P300	Lysine déméthylases
TIP60/PLIP	LSD1/BHC110
HBO1	JHDM1a-b
Lysine méthyltransférases	JHDM2a-b
SUV39H1-C2	JMJD2A/JHDM3A, JMJD2BC
G9a	JMJD2D
EuHMTase/GLP	JARID1A-D
ESET/SETDB1	UTX
CLL8	JMJD3
MLL1-C5	Serine/thréonine kinases
SET1A-B	Haspin
ASH1	MSK1-C2
SET2	CKII
NSD1	Mst1
SYMD2	Rsk2
DOT1	Ubiquine ligases
Pr-SET7/8	Bmi/Ring1a
SUV4 20H1-C2	RNF20/RNF40
EZH2	Arginine méthyltransférases
SET7/9	CARM1
RIZ1	PRMT4
	PRMT5

Tableau 2 : Protéines de modification des histones classées selon leur activités enzymatique

Modification	Domaine d'interaction	Protéines effectrices
Méthylation	Chromodomaine	HP1, PC, CHD1
	Tudor	JMJD2A
	MBT	L3MBTL1
	PHD	BPTF, ING2
	SRA	UHRF1
Acétylation	Bromodomaine	Rsc4, bdf1, taf1
Phosphorylation	14-3-3	14-3-3 protein

Tableau 3: Protéines effectrices reconnaissant les modifications des histones.

Famille	Membre	Caractéristique/Interaction
MBD	SETDB1	MCAF1, KAP1, AKT et DNMT3a
	SETDB2	Non décrit
	BAZ2A	HDAC1 CpG
	BAZ2B	Non décrit
	MeCP2	Sin3A, NCoR, c-Ski et CREB-1
	MBD 1	Suv31h1-HP1 ou SETDP1 (directement), HDAC 1 et HDAC2 (indirectement)
	MBD 2	Mi2/NuRD
	MBD 3	Incapable de lier l'ADN, s'associe à Mi2/NuRD et à des gènes transcriptionnellement actifs
	MBD 4	Sin3a et HDAC1
	MBD 5	Incapable de lier l'ADN méthylé
	MBD 6	Incapable de lier l'ADN méthylé
SRA	UHRF1	HDAC1 DNMT1
	NIRF/UHRF2	cyclines (A2, B1, D1 et E1), CDK2 4 et 6), pRB, p53, PCNA, DNMT1, -3a et -3b), HDAC1, l'histone H3
Protéines à doigts de zinc	Kaiso	N-cor
	ZBTB4	Non décrit
	ZBTB38	Non décrit

Tableau 4 : Les différentes protéines reconnaissant les marques de méthylation de l'ADN

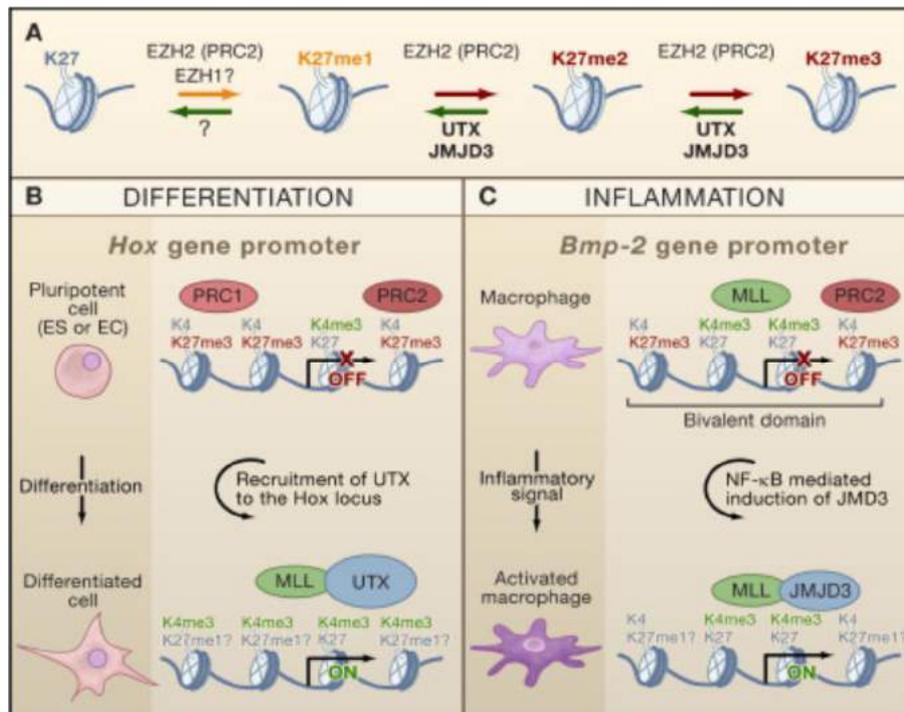


Figure 15 : Fonction des protéines Polycomb.

- A) Méthylation et déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. B) et C) Exemples de régulation transcriptionnelle médiée par les complexes PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressive Complex).

I-2-d) Collaboration entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones

I-2-d1) Désacétylation des histones, méthylation de H3K9 et de l'ADN

Il existe une « conversation » épigénétique entre les histones et l'ADN qui concerne la méthylation des cytosines, la désacétylation des histones et la méthylation de H3K9 dont l'objectif porte sur la répression transcriptionnelle. Toutefois, la chronologie des processus est encore assez floue⁸⁹. De prime abord, il est affirmé que le schéma des modifications post-traductionnelles des histones est dépendant de la méthylation de l'ADN. Il s'avèrerait alors que la méthylation de l'ADN puisse être le facteur clef du maintien de la répression de la transcription des gènes hyperméthylés qui est constatée au niveau des tumeurs malignes^{72,90}. Une autre théorie explique qu'une modification des histones en particulier la méthylation des histones H3 serait une condition requise à la méthylation de l'ADN. D'ailleurs, la présence de méthylation au niveau de la lysine 9 de l'histone H3 se veut être une alerte à la méthylation de l'ADN chez les champignons, les plantes ainsi que les mammifères. Incontestablement, la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9 est requise dans la méthylation subséquente de l'ADN^{91,92} complémentirement à un mécanisme de couplage de la protéine HP1 qui va venir se fixer au niveau du H3K9 méthylée pour se lier à une DNMT et entraîner le processus de la méthylation des cytosines. Ainsi, la méthylation de l'ADN interviendrait de manière complémentaire dans l'extinction génique en méthylant au niveau des sites CpG les gènes qui sont uniquement réprimés par des mécanismes autres⁷². Cela se rencontre par exemple dans les cas de leucémie aigüe promyélocytaire dont la répression des gènes cibles de RAR α est effectuée par la protéine de fusion PML-RAR par fixation des HDACs suivi d'une mobilisation d'enzymes DNMT et H3K9 méthyltransférases, entraînant ainsi l'inhibition permanente des gènes⁹³.

Ce fut également le cas dans l'inhibition de gènes qui code les ARN ribosomiaux. La méthylation de l'ADN serait fonction de la désacétylation antérieure des histones⁹⁴. Malgré le fait que la méthylation de l'ADN semble être précéder par celle de la lysine 9 de l'histone H3, il existerait un rétrocontrôle positif effectué par la méthylation de l'ADN elle-même sur la méthylation de H3K9, ce qui confirme l'extinction épigénétique ainsi que l'auto-reproduction de ce cycle et par conséquent une répression permanente⁵¹. Incontestablement, la liaison des protéines MBD, comme MeCP2 (*methyl- CpG-binding protein 2*), sur l'ADN serait favorisée par la méthylation de l'ADN par les DNMTs. Les protéines MBD vont ensuite mobilisées des H3K9 méthyltransférases pour permettre la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3^{51,72}. En conclusion, il existe donc un modèle de régulation et de contrôle qui fait interagir la méthylation de l'ADN au sein d'un processus de répression épigénétique impliquant :

- la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par une H3K9 méthyltransférase
- la création d'un lieu de liaison pour une protéine adaptatrice (probablement HP1)
- la mobilisation d'une ADN méthyltransférase qui va catalyser la méthylation des CpG, pour permettre la fixation des protéines MBD à l'ADN.

Ces protéines MBD mobiliseraient des complexes possédant des HDACs afin de pouvoir désacétyler la lysine 9 des histones H3 dans le but de les préparer subséquentement à une méthylation. De surcroît, ce schéma suggérerait une association des protéines MBD à des H3K9 méthyltransférases^{51,72}.

I-2-d2) Lien entre méthylation de H3K27 et méthylation de l'ADN

Outre la méthylation de H3K9, il existe d'autres mécanismes de modifications d'histones qui peuvent concourir avec l'ADN méthylé. Comme la catalyse de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 via les complexes répresseurs PRC2 et PRC3 (*Polycomb repressive complex*) qui assurent des activités histones méthyltransférases, en particulier la sous-unité catalytique

représentée par la protéine E(Z) (*enhancer of zeste*) à domaine SET (ou son homologue humain EZH2). Une protéine Polycomb à chromodomaine qui fait partie du complexe répresseur PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) est donc capable de reconnaître H3K27 méthylée. D'ailleurs, sa liaison engendre une répression de la transcription suivant des mécanismes encore indéterminés^{51,95}.

1-3 Epigénétique et Cancer

Fréquemment mentionnées dans les cancers, les perturbations épigénétiques interviendraient dans la dérégulation de l'expression de gènes ainsi que dans l'instabilité génomique. Cependant, il est nécessaire de déterminer si réellement ces perturbations épigénétiques sont la cause ou encore la conséquence de ces processus de dérégulation qui sont des phénomènes clés dans les cancers. Dans cette partie de l'introduction seront exposés des concepts quant à l'origine des cancers avant de poursuivre sur les perturbations épigénétiques majeures dont les hémopathies malignes et de continuer sur les perspectives d'innovation thérapeutique.

1-3-a) De l'origine épigénétique des cancers : « epigenetic progenitor of cancer » ?

Les altérations épigénétiques, en particulier celles impactant sur les modifications post-traductionnelles des histones sont majoritairement constatées dans les cellules cancéreuses et semblent impacter dans le pronostic du patient. Or, récemment, une étude a mis en exergue que les altérations des modifications des histones pouvaient être utilisées comme facteur de prédiction à la survie d'un patient atteint de cancer de la prostate⁹⁶. En effet, une analyse immunohistochimique a permis de démontrer la capacité de deux modifications post-traductionnelles des histones à savoir : H3K4me2 et H3K18ac, à prédire ce pronostic. Le taux d'acétylation de H3K9 semble également être un facteur prédictif à la survie des patients atteints d'un adénocarcinome du poumon de stade I⁹⁷.

Une autre étude a par ailleurs démontré une corrélation entre la perte de la méthylation de l'ADN ainsi que l'hypoacétylation de H3K9 et une exacerbation de la progression tumorale dans les cas de cancers de la prostate⁹⁸. Indiquant un rôle essentiel des dérégulations épigénétiques des histones dans l'apparition et l'évolution du cancer, rôle en tant qu'outil de diagnostic et de pronostic. Le cancer se conçoit comme une perturbation des propriétés biologiques subséquentes à des changements épigénétiques qui vont faire intervenir des gènes tant suppresseurs de tumeurs qu'oncogènes. Toutefois, l'origine de l'apparition du cancer et du développement du cancer serait l'altération épigénétique polyclonale de cellules souches / progénitrices. Effectivement, c'est sur ce modèle que s'appuie et propose Feinberg et *al.* : le modèle d'« epigenetic progenitor of cancer »⁹⁹ (Figure 16). Il est intéressant de noter que l'apparition précoce des changements épigénétiques dans la tumorigenèse amène à s'interroger sur le probable rôle en amont de ces cellules progénitrices. Ce qui fait de la cellule souche une cible potentielle à l'apparition de processus inducteurs de cancer^{100, 82}. Les propriétés hétérogènes qui sont intimement liées à la prolifération tumorale, aux métastases et même la résistance à la thérapie, pourraient alors s'expliquer par ces différents changements épigénétiques précoces. Feinberg et *al* ont ainsi proposé une modélisation de l'apparition de cancers selon trois étapes:

- en premier lieu surviendrait une perturbation épigénétique des cellules progénitrices
- en second lieu une mutation initiatrice
- en dernier lieu une plasticité génétique et épigénétique⁸²

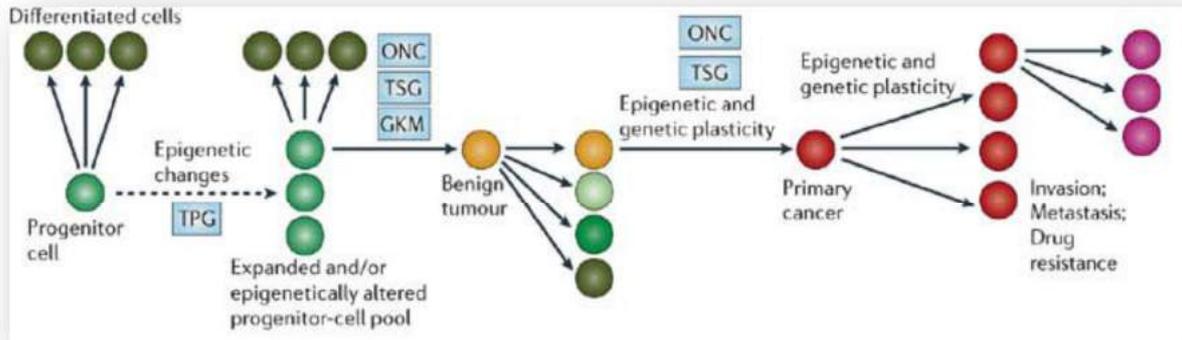


Figure 16 : “The epigenetic progenitor model of cancer”.

TPG, TumourProgenitorGenes ; GKM, GateKeeper Mutation ; TSG, Tumour-Suppressor Gene ; ONC, oncogene⁸².

D’ailleurs, l’existence de « cellules souches cancéreuses » (CSC) a été supposée dès 1994, cellules identifiées par leur faible fraction dans les tumeurs et qui peuvent induire la formation de nouvelles colonies *in vitro* ou d’initier la formation d’une nouvelle tumeur lorsqu’elles sont injectées dans un hôte *in vivo*^{101,102,103,104,105,106,107}. Pareillement aux cellules souches normales, les cellules souches cancéreuses seraient également douées de la propriété d’auto-renouvellement conjointement à leur forte capacité proliférante et leur capacité à se différencier. Il apparaît qu’une régulation génétique, distincte des cellules souches normales, contrôle ces cellules souches cancéreuses¹⁰⁸. Afin de mieux axer la thérapie, il est alors essentiel de tenir compte du phénomène de silencing épigénétique qui interviendrait dans le mécanisme de régulation entre les cellules souches normales et cancéreuses¹⁰⁹.

I-3-b) Perturbations épigénétiques dans les cancers

L’hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs est la principale caractéristique des cellules cancéreuses. En effet, cette hyperméthylation va agir en inhibant l’expression des gènes de même que par une hypométhylation générale du génome suivi d’un déséquilibre génomique évident^{110,111,112,113}.

Tableau 5 : Principaux gènes hyperméthylés dans les cancers¹¹⁴.

Gene or gene product	Function	Tumor type
Rb	Cell cycle regulation	Retinoblastoma
APC	Wnt signal transduction	Colorectal and other cancers
p14/ARF	Cell-cycle regulation	Colorectal cancer
p15/CDKN2B	Cell-cycle regulation	Leukemias
p16/CDKN2A	Cell-cycle regulation	Various cancers
BRCA1	DNA repair	Breast, ovarian cancer
VHL	Tumor suppressor*	Renal cell cancers
hMLH1	DNA mismatch repair	Colorectal, gastric, endometrial cancers
ER-a	Estrogen receptor-a	Breast, colorectal, other cancers
*Loss of control for oxygen-regulated angiogenesis. APC, adenomatous polyposis coli; ARF, alternative reading frame; BRCA1, breast cancer 1, early onset; CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16, inhibits CDK4); CDKN2B, cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4); ER-a, estrogen receptor-a; hMLH1, human mutl. homolog 1; Rb, retinoblastoma; VHL, vonHippel-Lindau tumor suppressor.		

Par ailleurs, il a été démontré une corrélation entre un schéma de modifications d’histones qui est spécifique à des régions de cassures chromosomiques, notamment des régions riches en H3K4me3¹¹⁵. Il est à rappeler que les cassures double brin de l’ADN durant le mécanisme de recombinaison sont issues de la tri-méthylation de la lysine 4 de l’histone H3 complémentairement à l’action de la recombinaise RAG. Les protéines de la famille Polycomb sont également impliquées dans l’apparition de cancers¹¹⁶.

I-4 Approche de la thérapie épigénétique

L’approche de la thérapie épigénétique par des drogues « épigénétiques » est étroitement associée à la découverte de la répression des gènes suppresseurs de tumeurs par les mécanismes épigénétiques et à la réversibilité de ces modifications. Trois phénomènes sont ainsi modulés par ces drogues « épigénétiques » :

- la méthylation de l’ADN, en particulier au niveau des cytosines
- les modifications des histones
- le remodelage des nucléosomes

Deux grands groupes sont ainsi rencontrés, à savoir les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et les inhibiteurs de HDACs, avec des effets très prometteurs, et qui sont en cours de développement et d'essais cliniques⁹⁶. De surcroît, la mise en exergue du lien entre la méthylation des histones et celle de l'ADN^{117,118} au vu des résultats obtenus sur diverses lignées cellulaires¹¹⁹ a permis d'axer les protocoles thérapeutiques vers la combinaison de ces deux types d'inhibiteurs¹²⁰ (figure 17).

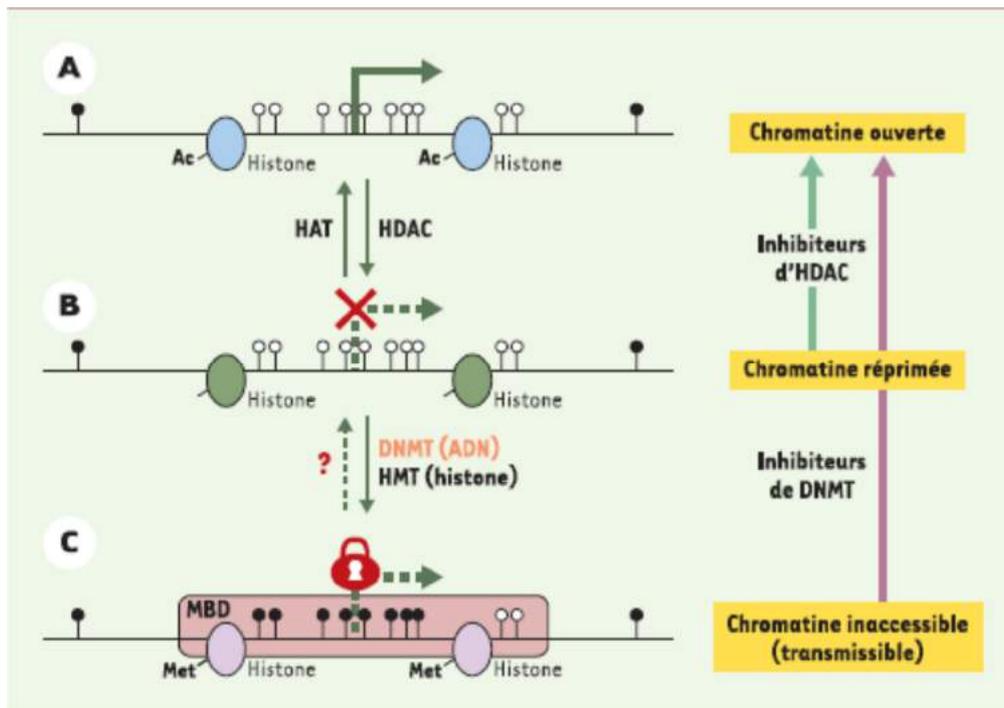


Figure 17 : Modifications épigénétiques et réactivation pharmacologique.

La désacétylation des résidus lysine des histones par les HDAC (histone-désacétylases) permet de passer d'une chromatine « ouverte » (A), accessible pour la transcription, à une chromatine « réprimée » (B), dans laquelle la transcription est inhibée. Néanmoins, une extinction génique transmissible lors de la mitose et/ou de la méiose est le résultat d'un « verrouillage » (C) encore plus important de la chromatine, caractérisé par : (1) la présence de modifications des histones, avec une désacétylation (par des HDAC) accompagnée d'une hyperméthylation par des HMT (histoneméthyltransférases) des résidus lysines ; (2) une méthylation des îlots CpG par des DNMT (méthyltransférases de l'ADN); et (3) la fixation de protéines à MBD (methyl CpG binding domain) sur les CpG méthylés. Alors que plusieurs histone-acétyltransférases (HAT), telles que CBP (creb binding protein) et P300, ont été décrites, la première histone déméthylase vient juste d'être découverte et l'existence d'une déméthylase de l'ADN reste un sujet de controverse. Dans le cadre d'une thérapie épigénétique antitumorale, la réactivation de la transcription des gènes inactivés est possible par l'utilisation combinée d'agents modulant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Ainsi, les inhibiteurs d'HDAC réactivent la transcription de gènes dont les promoteurs sont déméthylés, mais pas celle des gènes dont les promoteurs sont hyperméthylés. En revanche, les inhibiteurs de DNMT permettent de déverrouiller la transcription en déméthylant l'ADN au niveau des îlots CpG de la région promotrice, et de modifier la structure de la chromatine, d'où une réexpression des gènes.

I-4-a) Inhibiteurs de la méthylation

I-4-a1) Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN

Principalement, il s'agit de la 5-azacytidine, la 5-aza-2'-désoxycytidine et de leurs analogues. Elles agissent en inhibant les DNMT par phénomène de piégeage lorsque celles-ci viennent s'intégrer dans l'ADN à la place des résidus cytosine. Il y a ainsi réexpression de gènes suppresseurs de tumeur qui a été inhibée par l'hyperméthylation mais pas toujours ! En outre, des dérivés de ces composés permettraient de réduire leur cytotoxicité tout en augmentant leur stabilité. Des résultats significatifs ont par ailleurs été observés dans le traitement de différents types de leucémie¹²¹ (Figure 18).

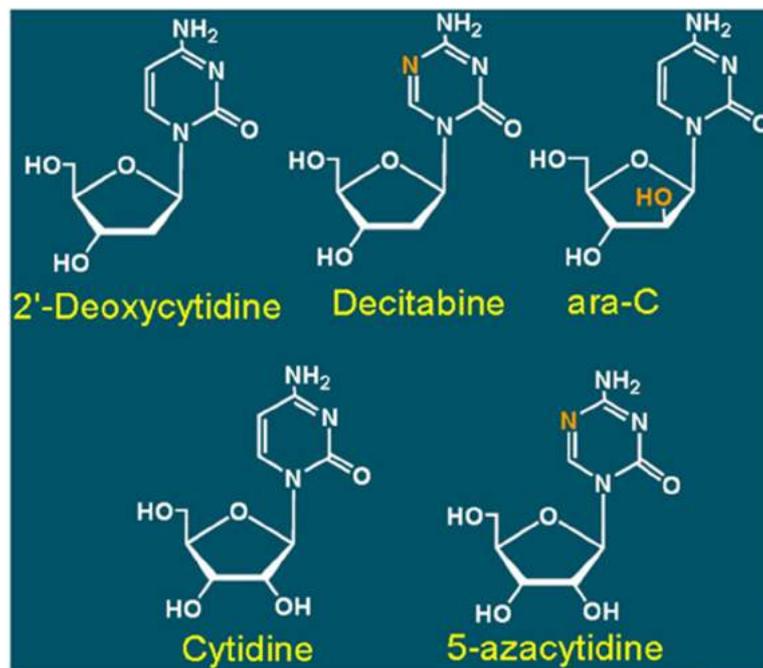


Figure 18 : Agents déméthylants

I-4-a2) Classification et usage clinique

Les inhibiteurs de DNMT peuvent être classés en deux groupes : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques¹²².

Les inhibiteurs nucléosidiques : regroupe les molécules comme la 5-azacytidine (5-aza-CR), la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-aza-CdR ou décitabine) ainsi que la zébularine. Ils agissent en mimant par analogie les nucléosides ce qui leur confère la capacité à s'insérer au niveau de la molécule d'ADN et de prendre la place de la cytosine qui ne pourra pas être méthylée. Ainsi, il y aura donc inhibition de toute méthylation de l'ADN néosynthétisé après division cellulaire^{123,124} (Figure 19).

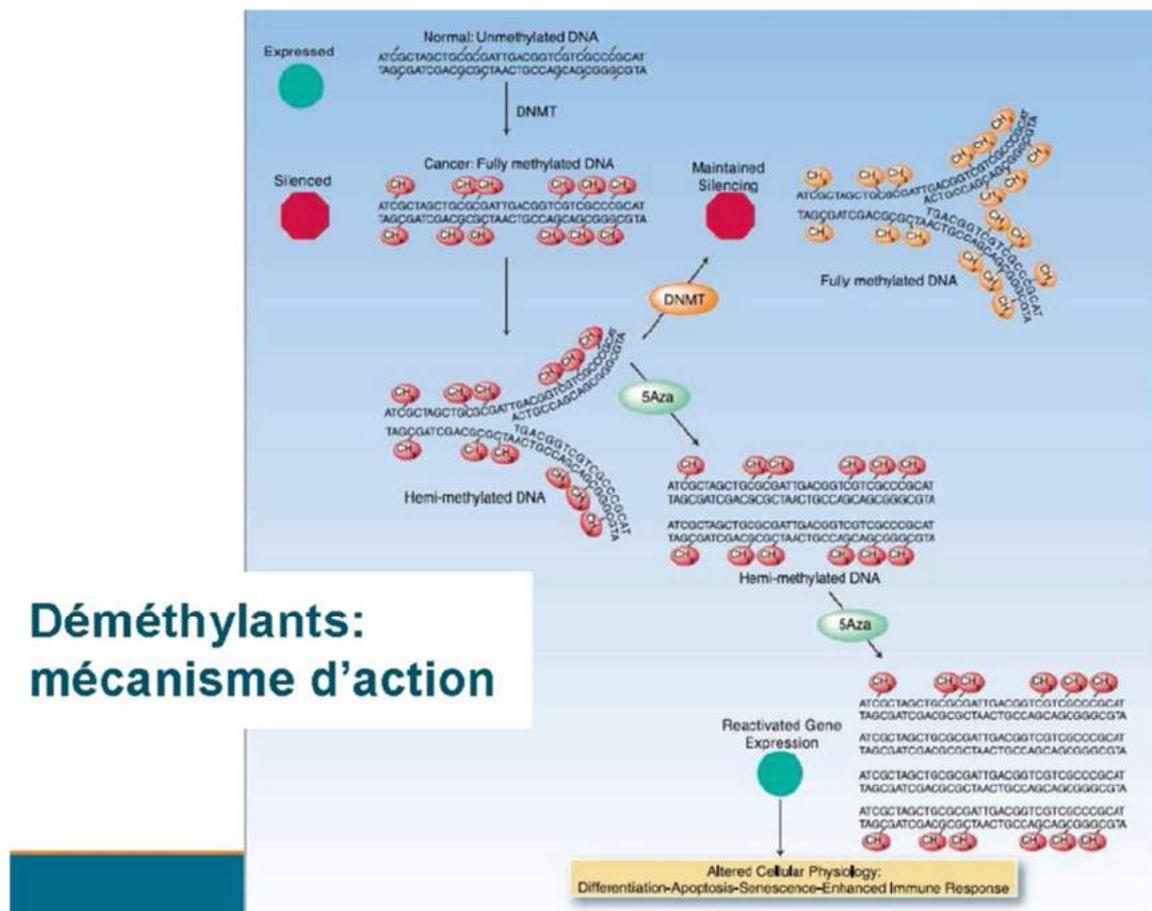


Figure 19 : Mécanismes d'action d'agents hypométhylants

Les inhibiteurs nucléosidiques fréquemment utilisés étant la 5-aza-CR et la 5-aza-CdR. Il est à noter que la 5-aza-CR provoque l'apoptose au niveau des cellules cancéreuses¹²⁵. De plus, son efficacité a été démontrée, seule ou en association avec le valproate, dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe^{126,127,128}. Toutefois, il est essentiel de tenir compte de leur faible

stabilité associée à leur forte toxicité. La zébularine plus stable^{129,130} et avec une faible toxicité¹³¹, en association avec le SAHA, un inhibiteur des HDACs, le Vorinostat, induirait l'apoptose conjointement à l'arrêt du cycle cellulaire chez les lignées cellulaires rencontrées dans le cancer du pancréas¹³².

Les inhibiteurs non-nucléosidiques : regroupe la procaïne, l'(-)-*epigallocatechin-3-O-gallate* (EGCG) et le RG108 qui vont agir par inhibition des DNMT soit par blocage du site actif de l'enzyme (EGCG et RG108) soit par fixation au niveau des régions CpG de l'ADN afin d'inhiber la liaison des DNMT à l'ADN (procaïne). L'EGCG qui est un polyphénol du thé vert agit par inhibition de l'activité méthyltransférase de cellules cancéreuses humaines¹³³. Le RG108 agit par blocage de l'activité méthyltransférase *in vitro*, et permet ainsi la déméthylation de l'ADN du génome, permettant ainsi la réactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs¹³⁴ qui ont été réprimés. La procaïne, en tant qu'inhibiteur de DNA méthyltransférase, a donné des résultats efficaces en particulier chez les cellules cancéreuses des lignées du cancer du sein¹⁰⁴.

I-4-b) Les inhibiteurs des HDACs (HDACi)

I-4-b1) Classification des inhibiteurs des HDACs

Le recours à des molécules qui vont agir par inhibition des HDACs s'avère être une approche thérapeutique pertinente¹³⁵. Principalement, les inhibiteurs des HDACs de classes I, II, III et VI qui ont fait l'objet de nombreux essais cliniques ces dernières années. Les inhibiteurs des HDACs sont répartis en quatre principales classes chimiques^{136,137,138}:

- **Les acides gras à courte chaîne :** butyrate de sodium, phénylbutyrate de sodium, valproate de sodium et AN-9.

- **Les dérivés de l'acide hydroxamique** : trichostatine A, SAHA (*suberoylanilide hydroxamicacid*), CBHA (*m-carboxycinnamicacidbishydroxamicacid*) et ses dérivés (LAQ-824 et PXD-101), panobinostat, et oxamflatine.

- **Les benzamides** : MS-275 et CI-994.

- **Les peptides cycliques** : depsipeptide (FR901228 ou FK-228), apicidine A, trapoxine A et CHAP (*cyclhydroxamicacid-containing peptide*).

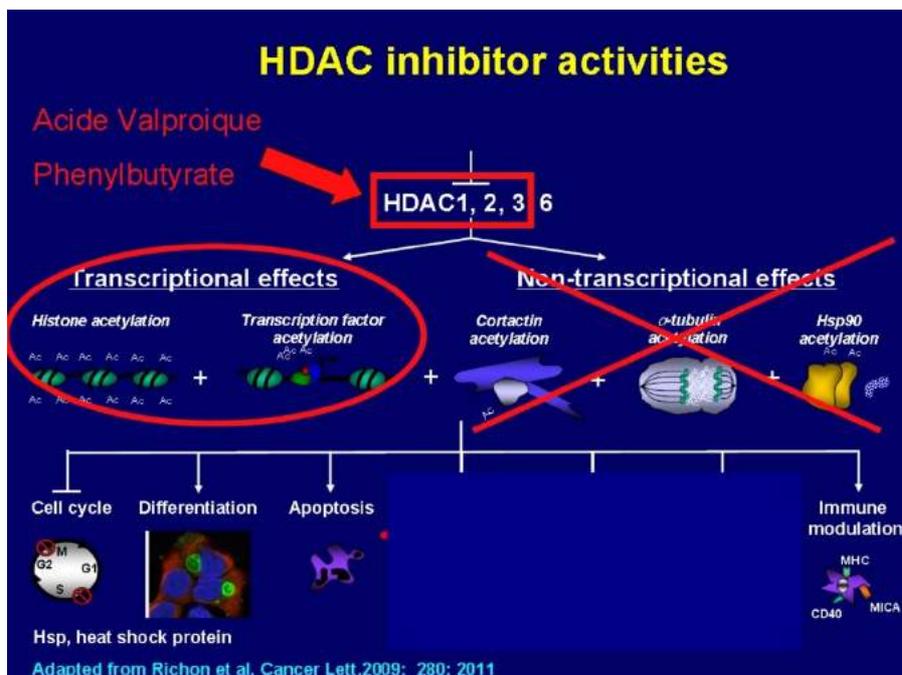
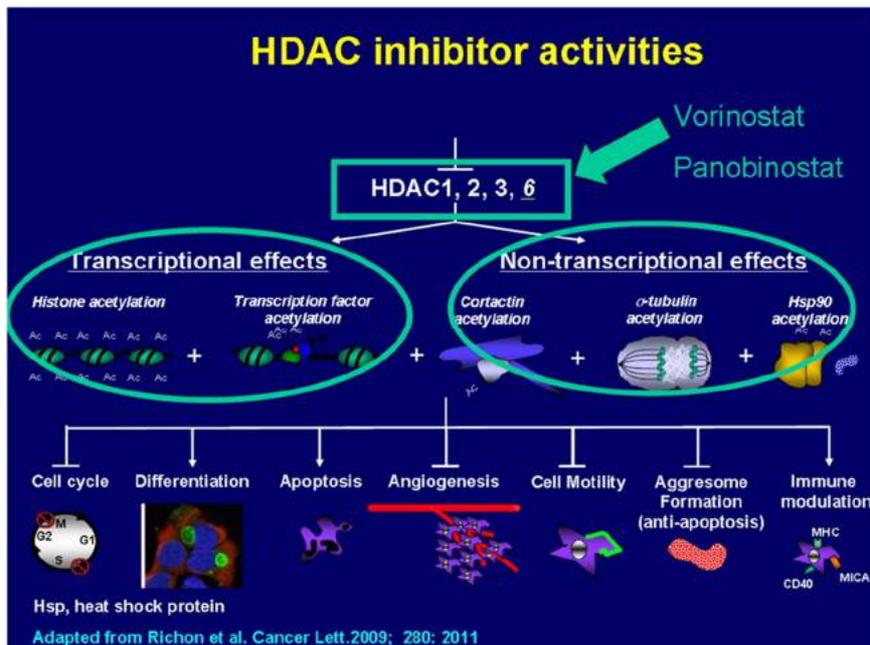


Figure 20 : Spécificité des inhibiteurs de HDACs

Cependant, il est à noter que certains inhibiteurs des HDACs ne coïncident pas à cette classification structurale comme le cas d'un époxyde représenté par la dépudécine. En outre, des

molécules agiraient en inhibant spécifiquement les HDACs de classe I alors que d'autres sont spécifiques à une HDAC comme la tubacine qui est caractéristique de l'HDAC6 ⁷⁶ (Figure 20 et Tableau 6).

Tableau 6 : Classe pharmacologique d'HDAC¹

Chemical class	Agent	Targeted HDAC	Clinical development stage
Aliphatic Acids	Sodium Valproate	Class 1	1 and 2
	Phenylbutyrate	Class 1	1
Cyclic Peptide	Romidepsine (FK 228)	Class 1 and Class 2	1 and 2
Hydroxamate derivatives	Vorinostat (SAHA)	Class 1 and Class 2	1 to 4
	Panobinostat (LBH 589)	Class 1 and Class 2	1 to 4
	Belinostat (PXD 101)	Class 1 and Class 2	1 and 2
	Dasinostat (LAQ824)	Class 1 and Class 2	1
Benzamide derivatives	Entinostat	Class 1 and Class 4	1 to 3
	MGCD-0103	Class 1 and Class 4	1 and 2

I-4-b2) Effets cellulaires des inhibiteurs des HDACs

Les inhibiteurs des HDACs agissent soit par :

- Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par activation de p21
- La différenciation et/ou l'apoptose *in vitro* et *in vivo*

¹ Prébet et al, COH 2008

Effectivement, l'inhibition des HDACs impacte la transcription de gènes assez restreints (20% maximum) qui deviendront sous ou sur-exprimés⁷⁶. Outre l'affectation de la transcription, les inhibiteurs des HDACs interviennent également dans les phénomènes nucléaires. Incontestablement, ils vont agir par inhibition de la réparation de l'ADN qui est endommagé par accroissement de la sensibilité des cellules tumorales face à la chimiothérapie et/ou la radiothérapie¹³⁹. De plus, il existe une corrélation entre l'activité de ces inhibiteurs et de l'incapacité des cellules cancéreuses tumorales à activer les deux mécanismes de contrôle des cellules normales que sont :

- Le point de contrôle en phase G2 qui est la phase checkpoint intervenant dans la transition G2-M pour bloquer la mitose incohérente après la réplication de l'ADN.
- Le point de contrôle du fuseau mitotique (*mitotic-spindle checkpoint*) qui permet la détection d'un alignement incorrect des chromosomes au niveau du fuseau mitotique ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire en phase de métaphase en attendant la séparation appropriée des chromosomes.

En effet, un dérèglement au sein de ces deux mécanismes entraîne l'apparition d'une mitose abortive ainsi que l'apoptose des cellules normales⁷⁶.

Les inhibiteurs des HDACs n'affectent pas seulement l'acétylation des histones mais interviennent également dans les effets pléiotropiques au niveau des substrats non-histones qui lorsqu'ils sont eux-mêmes des facteurs de transcription peuvent impacter sur la transcription⁷⁶. Il est à noter la forte résistance des cellules normales de l'ordre de 10fois plus, à l'apoptose engendrée par ces inhibiteurs par rapport aux cellules tumorales^{119,76}.

I-4-b3) Inhibiteurs des HDACs en développement clinique

A courte chaîne, les inhibiteurs d'HDACs de la classe des acides gras sont faibles et n'agissent qu'à des concentrations de l'ordre du μM . Testés en essais cliniques, leur courte demi-vie

complémentairement à la nécessité de doses élevées pour avoir un effet thérapeutique n'en font pas d'intéressantes molécules thérapeutiques^{119,121}. A titre d'informations, l'AN-9 a été utilisé en essai de phase II ; phénylbutyrate de sodium en essai de phase I ; et l'acide valproïque en essai de phase I/II. Contrairement à cette classe des acides gras, les dérivés de l'acide hydroxamique possèdent une demi-vie plus longue avec des concentrations efficaces relevant du nM. Toxique malgré son origine naturelle, la trichostatine A (TSA) n'a pas été développée en clinique¹²¹. A contrario, certains dérivés synthétiques du groupe hydroxymate sont retrouvés en phases II et III d'essais cliniques, comme le cas du SAHA ou Vorinostat qui a obtenu une AMM dans l'indication des lymphomes T cutanés réfractaire avec sa forme d'administration orale ayant permis d'obtenir des résultats concluants par rapport à la forme intraveineuse. Le SAHA semble avoir une efficacité large compte tenu de son efficacité dans les différentes tumeurs hématologiques, il est également mieux toléré^{119,76}. Le MS-275 est la molécule la plus active du groupe des dérivés benzamides. D'ailleurs, des résultats concluants sont retrouvés in vitro malgré la forte toxicité observée lors de schéma d'administration journalière assez inadéquate compte tenu de sa demie-vie longue (80 heures)^{76,119}. Le depsipeptide évalué en phase II en association avec des autres molécules anticancéreuses ou utilisé seul, offre une perspective d'efficacité sur les types de tumeurs solides et hématologiques¹¹⁹. Les HDACs s'avèrent ainsi être des cibles thérapeutiques non dénouées d'intérêt bien que requérant un approfondissement et développement additionnel.

I-4-b4) Inhibiteurs des HDAC dans les lymphopathies

Le Zolinza® (Vorinostat) à la dose de 400mg/j a permis d'avoir des résultats généraux dans le traitement du lymphome T cutané¹⁴⁰. Le Zolinza® est indiqué pour le traitement des manifestations cutanées du lymphome cutané à cellules T (LCCT) à un stade avancé chez les patients qui présentent une maladie évolutive, persistante ou récurrente après l'essai de traitements systémiques antérieurs. Ainsi, sur une durée de traitement de 30 semaines de

patients ayant déjà suivis au moins deux types de traitements, le Zolinza® a permis l'obtention d'un taux de réponse de 24% contre 36% dans le syndrome de Sézary. Pour le même cas de patients, le depsipeptide (FK-228) et le panobinostat (LBH-589) ont permis d'avoir un même taux de réponse similaire à celui obtenu par le vorinostat lors d'essais en phase II¹⁴¹. Des études en combinaison HDACi (vorinostat) et DNMT inhibiteur (Azacitidine ou décitabine) dans les lymphomes non hodgkiniens en rechute ou réfractaire ont montré en phase 1b une efficacité prometteuse sans augmentation de la toxicité obtenue en monothérapie¹⁴². D'autres études (Phase II) en combinaison comme le panobinostat avec le rituximab dans les lymphomes diffus à grandes cellules B ont montré une efficacité importante de la part du panobinostat qui induit des réponses très durables chez certains patients ayant rechuté avec un lymphome diffus à grande cellule B¹⁴³.

I-4-c) Thérapie épigénétique “nouvelle génération” : mécanismes d'action des inhibiteurs des protéines BET

Les facteurs de régulation épigénétique ont émergé récemment comme de nouvelles cibles des traitements anticancéreux . Parmi ceux-ci, les protéines BET (protéines à *Bromodomain and ExtraTerminal domain*) , qui reconnaissent les histones acétylées pour réguler l'activité génique, soulèvent un vif intérêt. Les protéines BET sont au nombre de 4 : BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT. Ces protéines ont en commun la présence d'un double bromodomaine N-terminal (B) et d'un domaine C-terminal dit “extraterminal”. Les protéines BET sont impliquées dans la régulation génique via des interactions avec la chromatine acétylée, soit au niveau des promoteurs de gènes, soit au niveau d'éléments enhancers responsables de la régulation transcriptionnelle tissu spécifique à distance. Les protéines BET ont une expression et/ou une activité dérégulée dans les cancers dans lesquels elles sont

des acteurs majeurs dans le maintien du phénotype transformé et la résistance thérapeutique. L'introduction récente de petites molécules inhibitrices des protéines BET offre la possibilité d'abroger leurs fonctions oncogéniques. Cet article présente les principaux mécanismes responsables de l'activité antitumorale de cette nouvelle classe de thérapie épigénétique. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs BET, qui commencent à être décrits, seront également évoqués¹⁴⁴.

Tableau 7 : Combinaison Déméthylants et HDACi

Pathology	HDACi	Demethylating agent	Phase	N	ORR	CR+ CRI	AEs
Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome ¹⁴⁵	VPA (50mg/kg/d) d1-7	5-aza (75 d1-7)	1-2	53	40%	27%	Neuro
Myelodysplastic syndrome ¹⁴⁶	VPA (50mg/kg/d) d1-7	Decitabine (20 mg/m ³ d1-5)	3	84	56%	41%	Fatigue
Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome ¹⁴⁷	VPA (35-50mg/kg/d) d1-7, ATRA (45mg/kg/d) d8-28	5-aza (75 d1-7)	2	65	44%	22%	Fatigue, neuro
Myelodysplastic syndrome ¹⁴⁸	Vorinostat 400 or 600mg/d d3-14	5-aza 55 or 75mg/m ³ d1-7	1	28	82%	55%	Fatigue
Diffuse large B cell lymphoma ¹⁴⁹	Vorinostat (400mg/d d1 vs d6, 7-10-14 days)	Decitabine (20mg/m ³ d1-5)	1	72	30%	UNK	QTc
Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome ¹⁵⁰	Phenylbutyrate (200mg/kg d1-5)	5-aza (75 d1-7)	1	36	38%	0	Neuro
Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome ¹⁵¹	Erinostat (d3 and d10)	5-aza (50 d1-10)	2 RAND	68	44%	14%	Fatigue
Advanced leukemia ¹⁵²	MGCD103 (30-135 MWF d5)	5-aza (75 d1-7)	1	12	30%	25%	GI

II- *HACE1* (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase 1) un gène du chromosome 6q

II-1 Chromosomes 6q et délétion

La délétion du bras long du chromosome 6 est fréquemment constatée dans des cas de leucémies et de lymphomes, toutefois, aucun gène cible commun ni de spécificité de régions n'ont été identifiés dans les divers diagnostics établis pour ces maladies¹⁵³. Une délétion chromosomique en 6q traduit la perte d'une paire de ce chromosome qui fait partie des 46 chromosomes (figure 21).

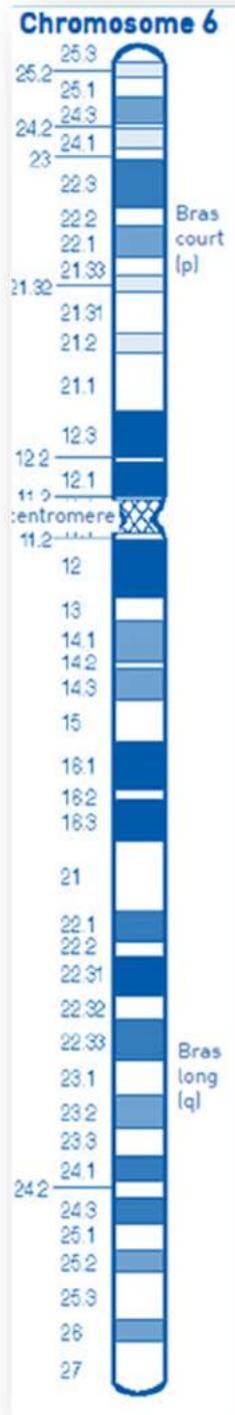


Figure 21 : Chromosome 6

Chaque chromosome est constitué d'un bras court dénommé (p) et d'un bras long (q). La délétion 6q affecte ainsi la perte de matériel chromosomique au niveau du bras long du chromosome 6² :

- Par délétion interstitielle à la suite de cassure au niveau de 2 régions du bras long
- Par délétion terminale subséquentement à une cassure localisée à un seul endroit

De plus, la délétion 6q s'accompagne fréquemment d'une modification chromosomique supposant ainsi que la délétion 6q joue un rôle essentiel dans la progression tumorale. Trois principales régions ont été proposées et corrélées aux étapes intervenant dans le lymphome non hodgkinien^{154,155} :

- RMD1 au niveau du 6q25 - 27
- RMD2 au niveau du 6q21
- RMD3 au niveau du 6q23 sans translocation t (14; 18).

Les délétions au niveau du 6q21 étant les plus fréquemment associées aux LDGCB (lymphomes diffus à grandes cellules B) et sont hautement pathogènes^{129,130}. Le gène *HACE1* est en position 6q21.

II-2 *HACE1* un gène suppresseur de tumeur codant pour une ubiquitine ligase de type E3

Le gène codant la protéine *HACE1* chez l'homme se trouve dans la région chromosomique 6q21 qui possède une activité avérée de suppresseur de tumeur. Le gène *HACE1* est inactivé par un mécanisme épigénétique dans de nombreuses tumeurs de Wilms ; il est également sous exprimé dans environ 50 % des tumeurs humaines et a été impliqué dans de multiples types de cancer chez l'homme. Chez la souris, l'inactivation de *HACE1* induit une susceptibilité

²rarechromo.org. Délétions 6q de 6q26 à 6q27.

accrue au développement de cancers de tous types au cours du vieillissement et coopère avec p53 dans la tumorigenèse¹⁵⁶. Il semble que cet effet passe par une dérégulation de l'activité de la cycline D1, bien que celle-ci ne soit pas une cible directe de la protéine HACE1. HACE1 contrôlerait le niveau de la cycline D1 via l'ubiquitinylation de la rho-GTPase RAC1. En effet, dans un travail publié en novembre 2011 dans *Developmental Cell*¹⁵⁷, il a été établi un crible, basé sur l'activité de CNF1, pour déterminer le rôle potentiel des E3 ligases de type HECT dans l'ubiquitinylation et la dégradation de l'oncoprotéine Rac1. Un crible fondé sur la déplétion systématique de chacune des 27 ligases connues et décrites à domaine HECT par la technique d'ARN interférence (ARNi) a permis d'identifier HACE1 comme étant essentielle à la dégradation protéasomique de Rac1 induite par CNF1. Par des études d'interaction in vitro et de co-immunoprécipitation in vivo, il a été établi que HACE1 s'associe préférentiellement à la forme active (liée au GTP) de Rac1. La réalisation de réactions d'ubiquitinylation in vitro utilisant des protéines recombinantes purifiées ont permis de montrer que HACE1 catalyse cette réaction, avec une forte spécificité pour la forme active de Rac1. L'expression d'un mutant K48R de l'ubiquitine dans les cellules réduit fortement la formation de chaînes de polyubiquitines. Au total, ces données établissent l'activité E3 ubiquitine-ligase de HACE1 sur Rac1, et permettent l'identification d'une première cible cellulaire de HACE1. Dans les tumeurs de Wilms, l'absence de Hace1 permet l'activation de Rac1 qui entraîne une augmentation des ROS. Le métabolisme de la glutamine régule la balance REDOX (Cf. Chapitre I.9) car il y a production de NADPH ce qui permet de réguler la production de ROS. Ils ont montré que les MEFs Hace1^{-/-} sont plus sensibles à la privation en glutamine que les MEFs contrôles. A final, les MEFs Hace1^{-/-} vont adapter les voies métaboliques afin de contrebalancer l'augmentation des ROS (due à la perte de Hace1) en devenant dépendantes à la glutamine¹⁵⁸. Une autre étude du même groupe montre que la privation de glutamine sur des glioblastomes (lignée cellulaire et xénogreffe) entraînent un modelage métabolique passant

par une augmentation de la pyruvate carboxylase ¹⁵⁹. La protéine HACE1 possède un domaine HECT et un domaine ankyrine répété contenant la protéine ligase ubiquitine E3 (figure 22).

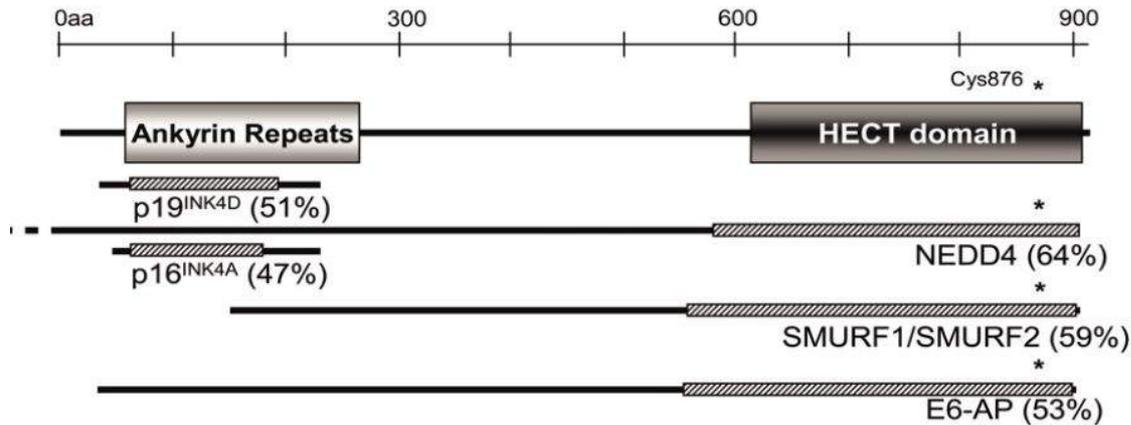


Figure 22 : HACE1 (numéro d'accension GenBank [AAH34982](#)) est constitué de 6 répétitions d'ankyrine terminal-N et d'un domaine HECT terminal-C, comme prévu par les outils de bases de données Pfam et SMART. Un invariant du résidu Cys dans le domaine HECT est indiqué par un astérisque. L'alignement à un certain nombre de protéines contenant des ankyrines répétées ou des domaines HECT est affiché en dessous ; la région rayée correspond à la région de grande similarité. Le pourcentage de similarité fut calculé avec des outils BLAST.
D'après Anglesio et *al* 2004

II-2-a) Ubiquitine et proteasome

L'association ubiquitine et protéasome est essentielle dans le phénomène de protéolyse intracellulaire. Effectivement, ce système dont la structure à la fois modulaire et multienzymatique regroupe des complexes protéiques qui autorisent une intégration fonctionnelle d'activités enzymatiques au niveau du protéasome ou encore le partage d'un module fonctionnel via les enzymes d'ubiquinylation. D'ailleurs, un système multienzymatique s'avère être le pilier de ce système ubiquitine/protéasome. Il est à noter que la protéolyse intracellulaire outre ses fonctions comme l'éradication des protéines excédentaires ou anormales, la maturation protéique des précurseurs actifs biologiquement ... est aussi douée

de la capacité à la régulation de protéines impliquées dans des phénomènes biologiques essentiels comme la différenciation, l'apoptose ou encore la prolifération. Le déroulement du système ubiquitine/protéasome s'effectue suivant deux grandes étapes : le marquage du substrat par l'intermédiaire de conjugaison covalente d'UB (chaînes d'ubiquitine) et d'une protéine ubiquitaire formée par 76 aminoacides sous l'influence d'une cascade spécifique d'enzymes. Les chaînes ainsi formées permettront la reconnaissance ainsi que la dégradation par le complexe protéolytique ; le protéasome 26S, des molécules polyubiquitylées. La précision et la spécificité de reconnaissance des substrats étant assurées par le système multi-enzymatique d'ubiquitylation (figure 23 et 24).

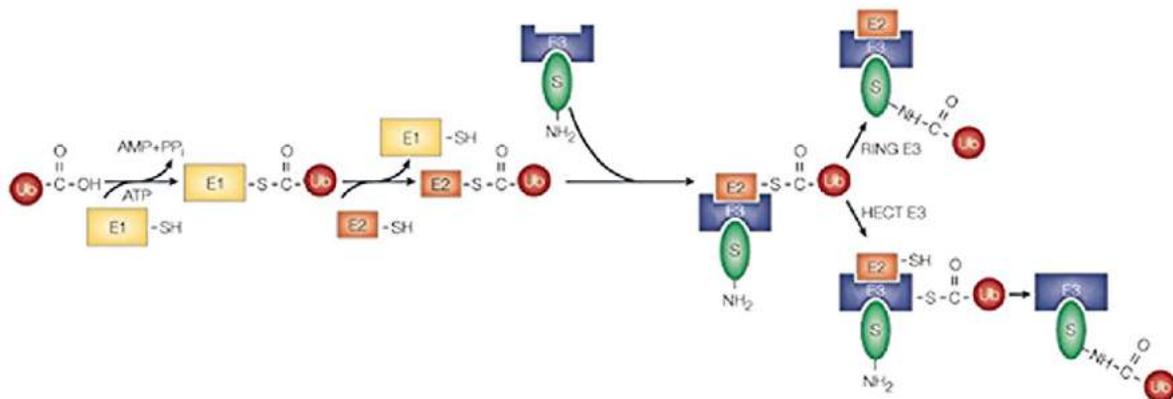


Figure 23 : Fonctionnement de la réaction d'ubiquitylation

E1 : *Ubiquitin Activating Enzyme*

E2 : *Ubiquitin Conjugating Enzyme (UBC)* ou *Ubiquitin Carrier protein*

Ub : Ubiquitine S : Substrat

D'après Weissman 2001.

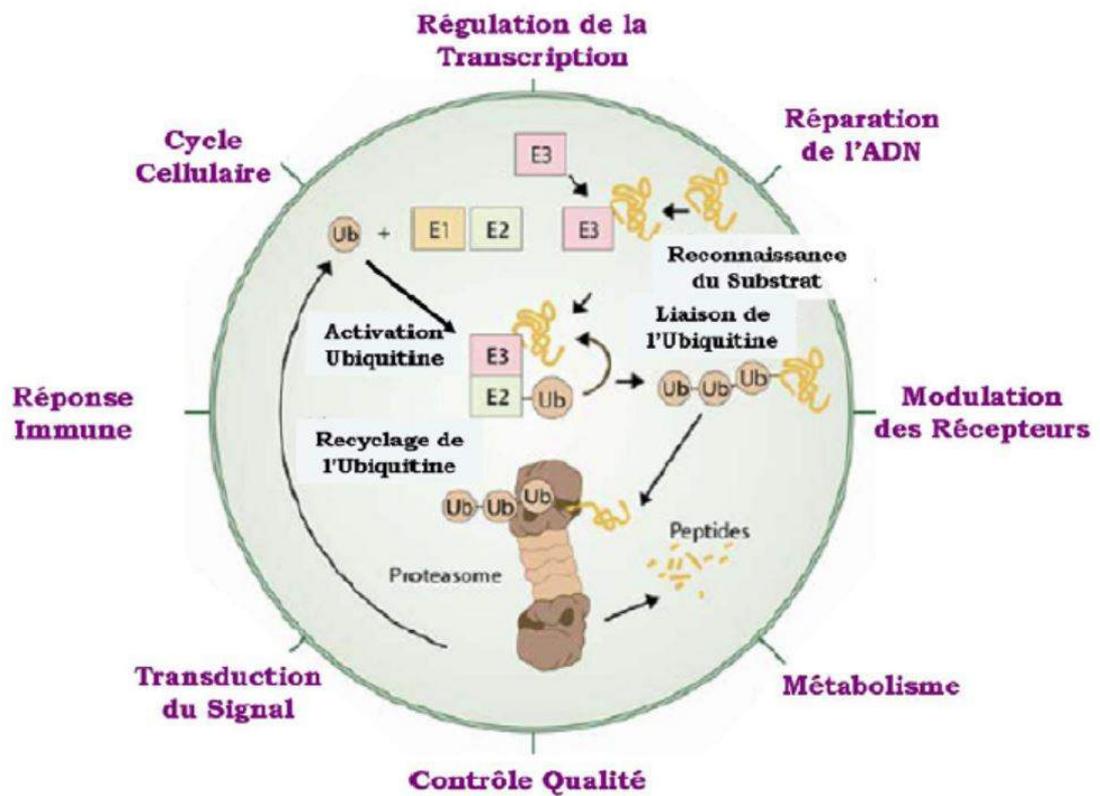


Figure 24 : Implication de la voie ubiquitine-protéasome dans la cellule.

II-2-a1) L'ubiquitylation des protéines

Une activation par séquence de cascade d'enzymes est constatée lors de l'ubiquitylation des protéines. Une enzyme d'activation va activée l'ubiquitine avec formation d'une liaison thioester pour aboutir à l'ubiquitin-activating enzyme ou E1 qui sera ensuite transférée au sein d'un complexe d'enzymes de conjugaison : ubiquitin-conjugating enzymes ou Ubc/ E2, suite à la formation d'une liaison thioester supplémentaire. Ce sont les E2 qui sont responsables, premièrement, de la reconnaissance spécifique des substrats. D'ailleurs, certaines enzymes de E2 peuvent transporter l'ubiquitine au niveau des protéines cibles. Toutefois, la présence de l'ubiquitine ligase ou E3 est requise et intervient principalement au niveau de la reconnaissance des substrats, c'est le cas de la protéine HACE1. Finalement, tout récemment identifié, l'enzyme E4 semblerait intervenir dans l'élongation de chaînes d'ubiquitine. Il existe ainsi un contrôle dans la reconnaissance constitutive des substrats par les enzymes d'ubiquitylation.

Un contrôle s'appliquant soit au sein des enzymes d'ubiquitylation, soit au niveau des substrats. Ce contrôle pouvant s'effectuer après des modifications post-traductionnelles. Localisé dans la partie carboxy-terminale, le domaine HECT de HACE1 représente le domaine catalytique alors que la partie amino-terminale pourvoit à la reconnaissance des substrat (figure 25 et 26).

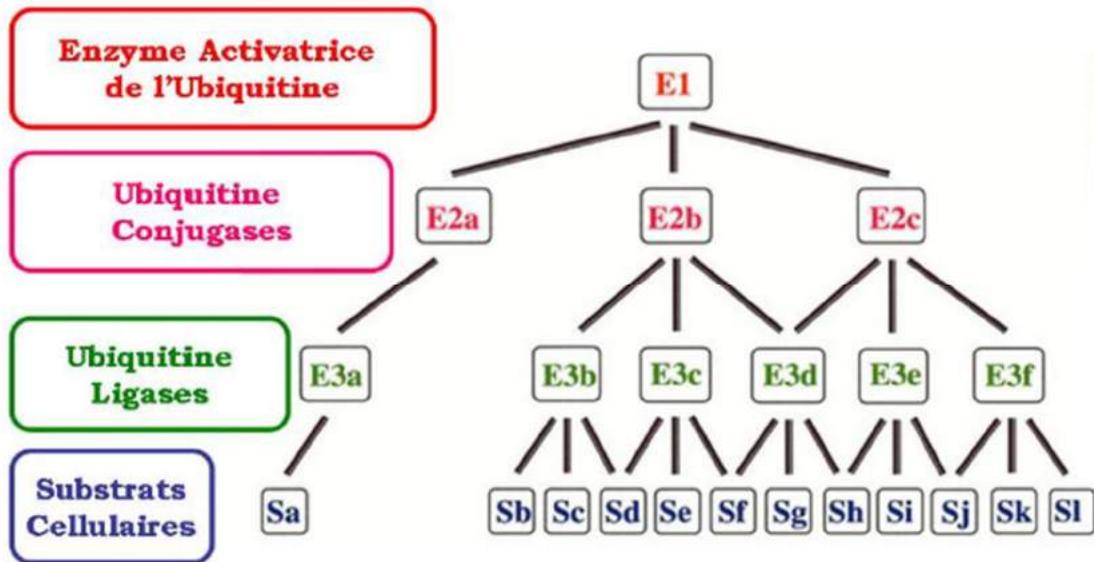


Figure 25 : Structure hiérarchique du système d'ubiquitylation.
D'après Ciechanover et al 1998

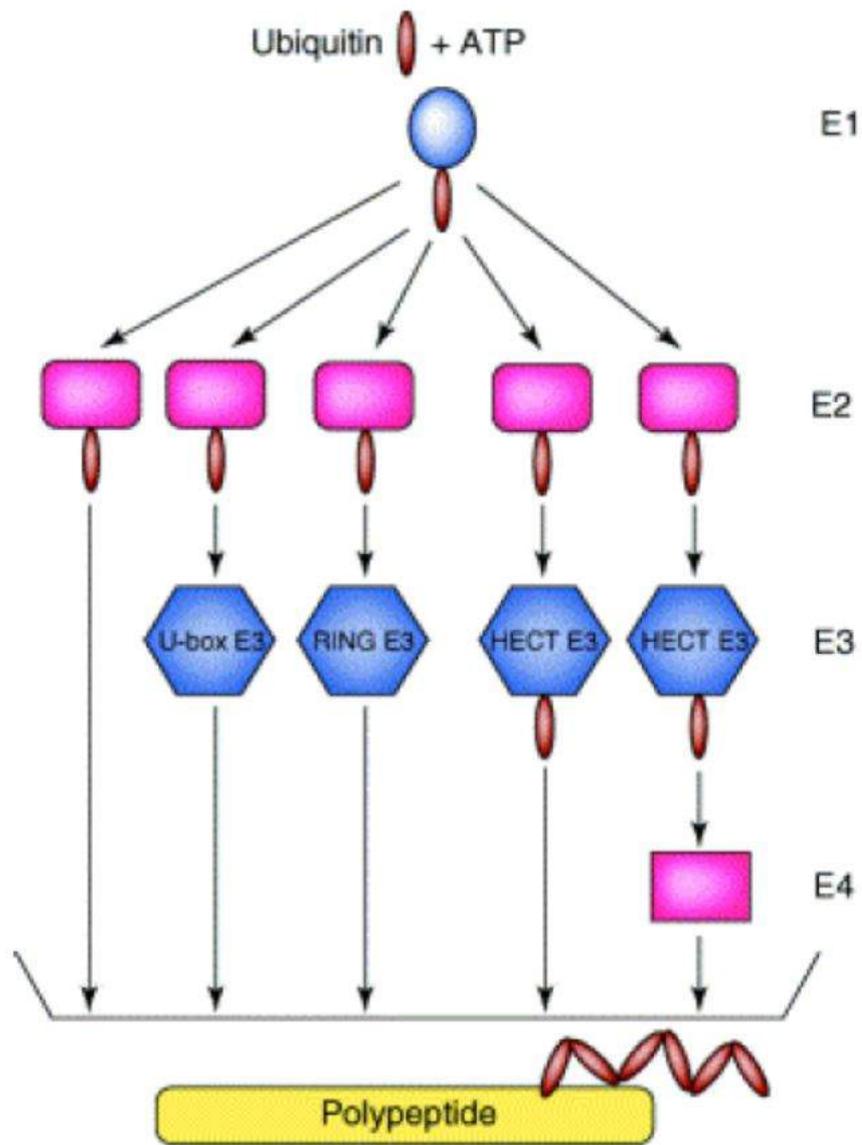


Figure 26 : Les familles de protéines E3 ubiquitines ligases et les différents modes d'élongation de la chaîne de poly-ubiquitines sur les protéines.

D'après Cyr et al, 2002.

II-2-a2) Ubiquitylation et ciblage

La mono-ubiquitylation consiste en la modification des protéines par l'intermédiaire d'une seule ubiquitine, alors que la poly-ubiquitylation est assurée par des chaînes de poly-ubiquitine et s'effectue sur un ou plusieurs résidus du substrat, généralement sur une lysine.

Lors de la poly-ubiquitylation, il existe une conjugaison de la lysine du substrat avec la molécule d'ubiquitine. L'élongation de la chaîne dite chaîne de poly-ubiquitine s'effectue ensuite par l'intermédiaire de liaison isopeptidique qui s'établit entre la lysine conjuguée antérieurement et une glycine C-terminale provenant d'une nouvelle ubiquitine. Différentes chaînes peuvent ensuite se former compte tenu de l'accessibilité et de la disponibilité, à la surface, des lysines de l'ubiquitine. D'où l'implication de la poly-ubiquitylation dans des voies distinctes à la protéolyse cellulaire telles l'endocytose ou encore la réponse inflammatoire¹⁶⁰.

II-2-a3) Structure et organisation du protéasome

α Le protéasome 20S

De structure stable et en forme de cylindre creux, le protéasome 20S est formé par 28 sous unités similaires qui se répartissent en 4 anneaux heptamériques. Les 2 anneaux centraux constitués chacun par sept sous-unités de type β distinctes constituent les sites catalytiques. Parmi ces sous-unités de type β , seules trois ont été identifiées : X, Y et Z, par l'utilisation du groupement hydroxyle des résidus de thréonine amino-terminal en tant que nucléophile afin de rompre les liaisons peptidiques de manière atypique. Les deux anneaux extérieurs également formés chacun par sept sous-unités de type α assurent l'association du protéasome 20S avec les complexes régulateurs complémentaires au contrôle de l'arrivée des substrats au sein des sites catalytiques. Pourvu d'au moins cinq activités peptidasiques, le protéasome 20S se caractérise par des inhibiteurs et substrats spécifiques. Les produits des sites catalytiques du protéasome qui agissent de manière récurrente et allostérique sont des peptides formés de trois à vingt acides aminés dont la majorité est ensuite hydrolysée en acides aminés sous l'influence des peptidases cellulaires.

Chez les eucaryotes supérieurs, les peptides formés sont mobilisés par le système immunitaire en association aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et intervient dans la réponse immunitaire par le biais de l'interféron- γ (IFN- γ). Le complexe formant ainsi une immunoprotéasome. La rapide et efficace dégradation des substrats est assurée par la compartimentalisation des sites catalytiques du protéasome 20S (figure 27).

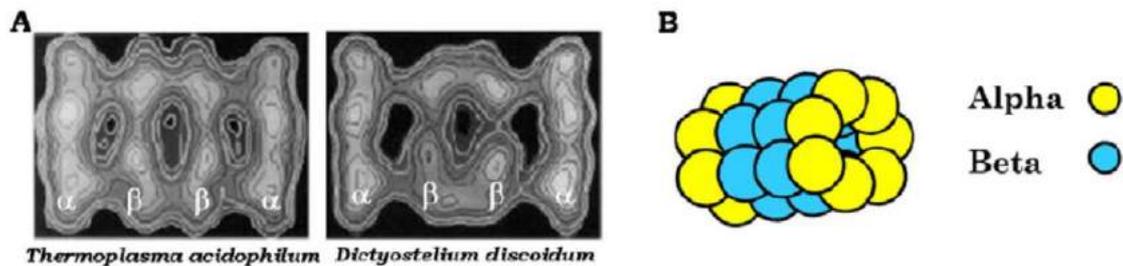


Figure 27 : Le protéasome 20S

A : Structure du protéasome 20S déterminée par analyse d'images de microscope électronique. D'après Koster et al 1995

B : Organisation générale du protéasome 20S

β Le proteasome 26S

Le protéasome 26S est constitué par deux sous-complexes : le protéasome 20S qui forme le cœur protéolytique et le complexe 19S qui est un complexe régulateur.

La dégradation des protéines ubiquitinylées par le protéasome 26S se localise soit au niveau du cytoplasme soit dans le noyau cellulaire et est fonction de l'ATP (4).

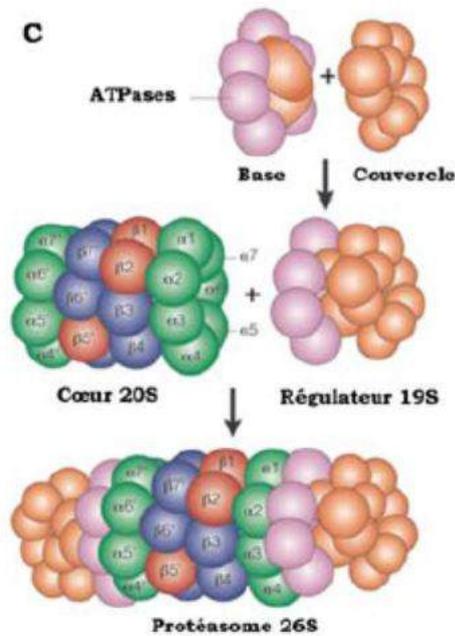


Figure 28 : Structure du protéasome 26S

II-3) Cibles de la protéine HACE1 (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase 1)

II-3-a) La rhoGTPase RAC1

La GTPase Rac1 appartient à la famille RhoGTPase. Ce sont des protéines qui oscillent entre un état inactif et un état activé en réponse aux signaux transmis par des récepteurs situés à la membrane plasmique. Ces protéines lient la guanosine-5'-triphosphate (GTP) et catalysent son hydrolyse en GDP (Figure 21). Durant la transition GTP/GDP, deux domaines dits switch changent de conformation, offrant à ces GTPases, sous leur forme GTP, la propriété de fixer et d'activer des protéines effectrices. Les transitions GTP/GDP sont finement régulées par les facteurs d'échange (GEF) qui catalysent l'échange du GDP en GTP, et par les protéines GAP qui stimulent l'hydrolyse, spontanément faible, du GTP. Ce cycle de régulation temporelle est complété par une régulation spatiale. Sous forme GTP, Rac1 est localisée à la membrane, où

s'exerce son activité de signalisation, alors qu'elle est séquestrée, sous forme inactive liée au GDP, dans le cytosol, en interaction avec le facteur GDI¹⁶¹. Lorsque fixée au GTP, elle interagit avec diverses molécules qui provoquent des réactions en aval. En effet, la petite GTPase Rac1 est une protéine régulatrice principale de la motilité cellulaire. GTPase Rac1 contrôle des processus cellulaires essentiels, au nombre desquels la migration, la phagocytose, le cycle et l'apoptose¹⁶². La dérégulation de l'activité de Rac1 est impliquée dans des pathologies humaines graves comme certains déficits immunitaires, cancers et maladies mentales. Rac1 est aussi la cible de nombreux facteurs de virulence bactériens¹⁶³. Plusieurs mécanismes régulent l'activité de Rac1, y compris son ubiquitinylation et sa dégradation subséquente. Le suppresseur de tumeur HACE1 comme ligase ubiquitine E3 est responsable de la dégradation de Rac1 suivant son activation. L'interaction de HACE1 et de Rac1 est renforcée par la signalisation du facteur de croissance hépatocyte (HGF), un activateur de Rac1 et un puissant stimulant de la migration cellulaire. HACE1 catalyse la poly-ubiquitinylation de Rac1 au niveau de la lysine 147 provoquant sa dégradation dans le protéasome. Conformément à cela, la déplétion de HACE1 par SiRNA est accompagnée par des niveaux de Rac1 plus élevés, ainsi qu'une accumulation de Rac1 dans les plis de la membrane cellulaire. D'ailleurs, la diminution du niveau de HACE1 augmenterait la migration cellulaire. Ces constats identifient HACE1 comme un antagoniste de migration cellulaire de par sa capacité à dégrader la forme active de Rac1 (figure 29)¹⁶⁴.

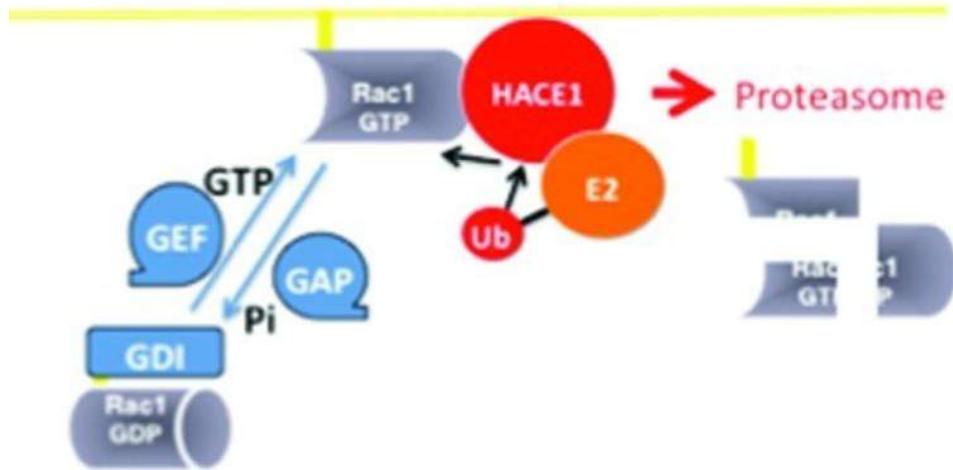


Figure 29 : Ubiquitylation de protéine Rho. (A) HACE1 avec le domaine-HECT et contenant la protéine E3 ubiquitine-ligase s'attache de manière préférentielle à la forme de Rac1 associée au GTP, et à une ubiquitine conjuguée à un enzyme E2. Les molécules d'ubiquitine sont alors transférées à un résidu de cystéine conservé (C876 de HACE1) du domaine-HECT avant la conjugaison à Rac1 pour former une chaîne K48-poly-ubiquitinée, un signal permettant de cibler la machine du protéasome. *D'après Mettouchi et al. 2012.*

II-3-b) Protéine OPTN

Récemment, il a été démontré que l'axe HACE1-OPTN accélère la dégradation de p62 et réduit la production de substance oxydative, les ROS, atténuant ainsi les dommages causés à l'ADN dans les cellules de cancer du poumon humain. En effet, il a été décrit dans plusieurs études qu'un excès de l'oncoprotéine p62 pouvait être associé à de multiples cancers humains, et l'élimination de celle-ci via le mécanisme de l'autophagie supprime la tumorigénèse^{165 166}. L'axe HACE1-OPTN pourrait ainsi supprimer la production de ROS et atténuer les dommages à l'ADN, probablement en favorisant l'élimination autophagique de p62 et les autres protéines endommagées par oxydation. La protéine HACE1 a été identifiée comme ayant un rôle d'ubiquitylation de la protéine OPTN, et promeut ainsi son interaction avec p62/SQSTM1 pour former un complexe autophagique, accélérant ainsi le flux d'autophagie. En effet, les chaînes de polyubiquitine liant la lysine 48 (K-48) au niveau de la protéine OPTN conjugués par HACE1 pourraient principalement cibler l'OPTN pour dégradation autophagique. Il a été

démonstré que l'axe HACE1-OPTN empêche de manière synergique la croissance et la tumorigenèse de cellules cancéreuses du poumon. Cela pourrait ouvrir la voie au développement d'interventions thérapeutiques ciblant l'autophagie dans le cancer (figure 30)¹⁶⁷.

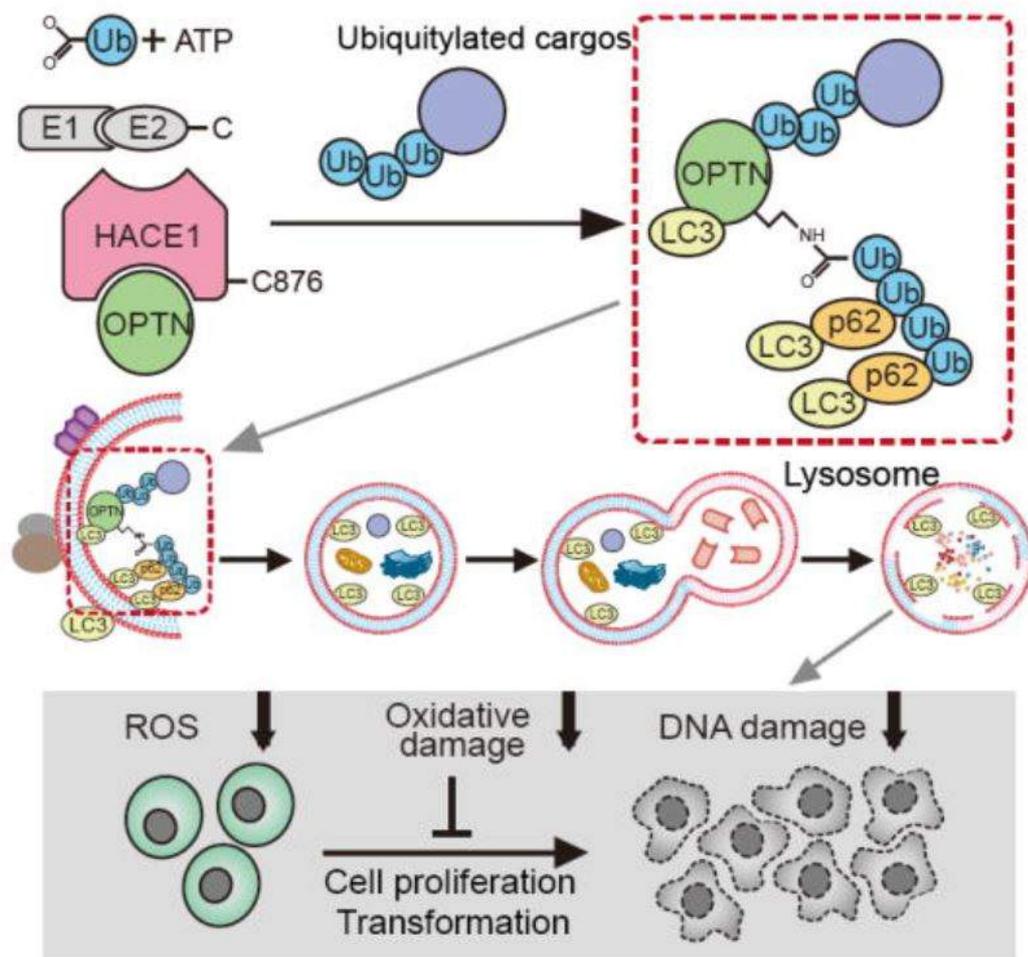


Figure 30 : L'axe HACE1-OPTN suppresseur de tumeur en promouvant la formation d'un complexe de récepteurs d'autophagie. Le modèle démontre comment l'axe HACE1-OPTN pourrait jouer le rôle de suppresseur de tumeur en promouvant l'autophagie *in vivo*. D'après Liu et al., *Cancer Cell* 2015.

III-Les lymphomes non Hodgkiniens

III-1 Définition et classification

Les lymphomes regroupent l'ensemble des proliférations lymphoïdes clonales malignes. Leur incidence est chiffrée à 20 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux¹⁶⁸. Les Lymphomes malins non-Hodgkiniens (LMNH) constituent un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde. Il s'agit d'entités clinico-biologiques complexes qui proviennent de l'entassement de cellules dont les stades de maturation sont différentes. Cette différence de stades de maturation traduisant la diversité de la physiologie fonctionnelle de la cellule lymphocytaire normale ainsi que de la complexité des processus lors de la phase de maturation. D'ailleurs, chaque lymphome est doué des caractéristiques qui sont spécifiques au stade de maturation dans lequel il se développe (Figure 31). C'est notamment sur ces critères que repose la classification actuelle des lymphomes (OMS 2008). Chaque entité est définie selon une association de critères cliniques, morphologiques, phénotypiques, génétiques et moléculaires. Le principe de cette classification est basé sur une approche diagnostique cohérente et reproductible, et intègre la notion selon laquelle chaque entité constituerait la contrepartie tumorale d'un lymphocyte normal bloqué à un stade de différenciation donné. Cette classification offre une nomenclature standardisée et de ce fait un langage commun, utilisable par les biologistes et cliniciens. La validité de cette classification est confirmée par de nombreuses études cliniques. L'identification précise d'une entité constitue l'étape clé pour la prise en charge thérapeutique ultérieure du patient. On observe un intérêt croissant pour une classification moléculaire des lymphomes, que ce soit transcriptomique ou épigénétique. Ainsi des sous-types moléculaires distincts de lymphomes B diffus à grandes cellules (LDGCB) ont été identifiés grâce aux profilings d'expression génique. Il s'agit notamment des « Germinal

Center B-celllike- » (GCB-) et des « Activated B-celllike- » (ABC-) DLBCL, qui sont issus des divers stades de différenciation / maturation lymphocytaire B. Ces cellules ont recours à des mécanismes oncogéniques différents et ont une réponse spécifique aux chimiothérapies^{169,170,171,172,173,174}.

Avec les signatures moléculaires nouvellement disponibles, il est maintenant possible d'évaluer le rôle des voies de signalisation spécifiques au sein de sous-groupes de lymphomes, en particulier pour les LDGCB^{175,176}. Ainsi plusieurs des gènes exprimés de manière spécifique dans les LDGCB sont des gènes connus de la voie NF- κ B^{177,144}. Le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) contrôle un programme d'expression génique impliqué dans la réponse immunitaire lymphocytaire, et est requis pour l'activation et la prolifération des lymphocytes^{178,179,180}.

La voie de signalisation NF- κ B est également impliquée dans la survie de cellules B malignes : NF- κ B est activé de manière constitutive dans la majorité des cas de ABC-LDGCB, qui présente une survie moins bonne – comparé au sous-type GCB-LDGCB – après traitement par des chimiothérapies standards^{147,145}. NF- κ B pourrait contribuer au mauvais pronostic de ces patients en contrant l'action de la chimiothérapie via son contrôle de l'expression de gènes régulateurs de la mort cellulaire (gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques). Il pourrait ainsi jouer un rôle crucial dans la transformation maligne et la progression tumorale dans ces tumeurs, et constitue donc une cible thérapeutique prometteuse^{147,145,181}. A ce propos, plusieurs molécules inhibitrices, dont l'inhibiteur du protéasome bortezomib, ont la capacité d'inhiber la voie NF- κ B et d'améliorer le traitement des patients atteints d'un ABC-LDGCB^{140,182}. D'autre part, la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans les cancers en réprimant potentiellement un large spectre de gènes pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs. Les régions aberrantes de méthylation ne sont pas aléatoires, mais tumeur-spécifiques, et peuvent influencer le profil d'expression génique. Par exemple, la méthylation aberrante des

gènes *p57 (KIP2)*, *p15 (INK4B)*, *DAPK*, *SHP1* et *p73* est un évènement fréquent dans les hémopathies malignes lymphoïdes. La classification tumorale pourrait alors prendre en compte le profile de méthylation de l'ADN. Des études prometteuses de profiling de méthylation de l'ADN ont ainsi comme objectif de déterminer des signatures épigénétiques¹⁸³.

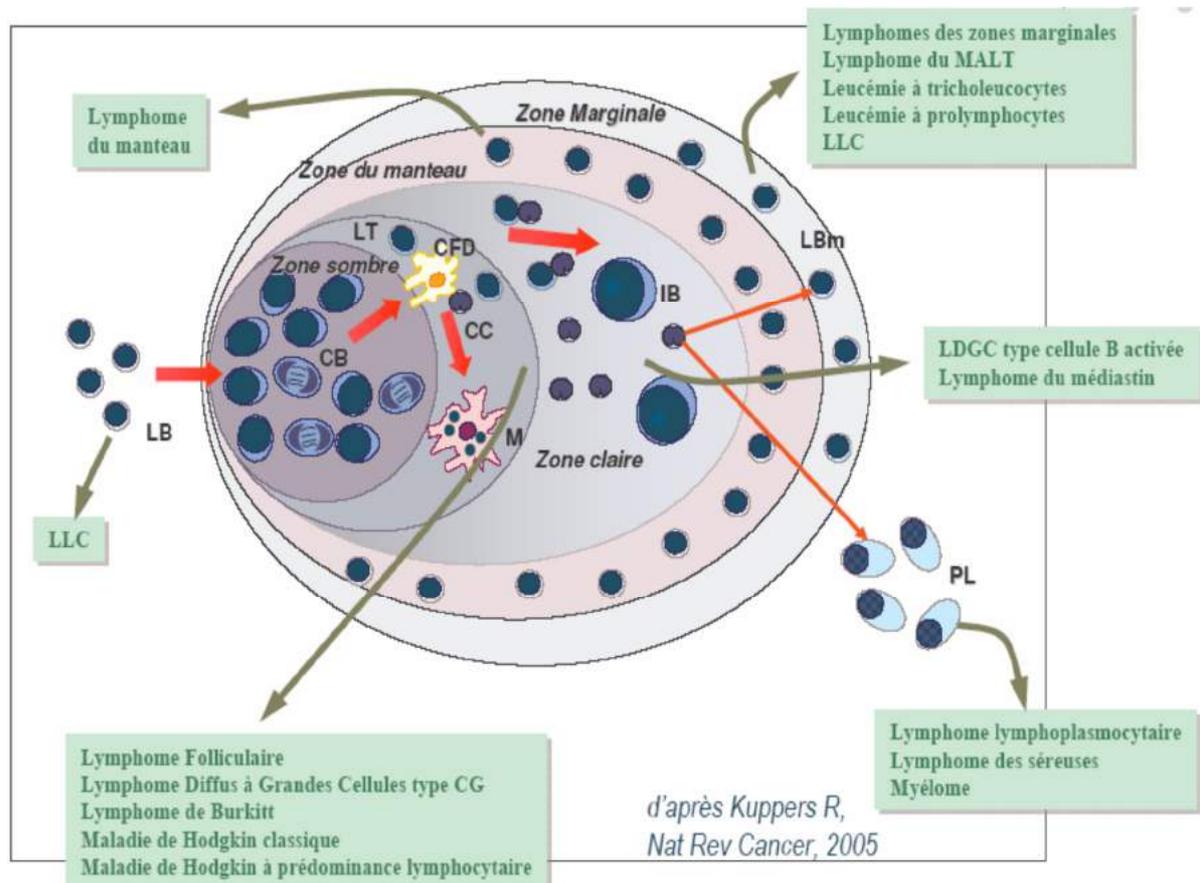


Figure 31 : Diversité des lymphomes. D'après Kupperts, Nat Rev Cancer, 2005

III-2 Génétique des lymphomes non-Hodgkiniens –LNH

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

III-2-a) Chromosomes et cancers

Dès 1914, Boveri suggère un lien entre anomalie chromosomique et cancer : il postule que le caractère héritable des cellules cancéreuses peut provenir des perturbations de la distribution des chromosomes¹⁸⁴. La découverte du chromosome Philadelphie (Ph) en 1960 chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique constitue le premier exemple d'anomalie chromosomique acquise, spécifique d'une tumeur donnée¹⁸⁵. Dans les années 1970 se développe une nouvelle discipline, la génétique chromosomique. Ainsi, le chromosome Ph s'est avéré résulter d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22, la $t(9;22)(q34;q11)$ ¹⁸⁶. Dans les années 1980, l'analyse des caryotypes sur de grandes séries de patients met en évidence la grande diversité des réarrangements chromosomiques dans les tumeurs : ces réarrangements sont soit des anomalies de nombre (gains, pertes de chromosomes entiers) soit des anomalies de structure, équilibrées ou déséquilibrées (translocations, inversions, insertions, délétions, duplications...). La signification clinique de ces réarrangements est importante dans les hémopathies malignes. Les anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes sont classées en 2 catégories, primaires et secondaires. Les anomalies primaires regroupent les anomalies présentes dès le diagnostic et tout au long de la maladie. Ces anomalies parfois uniques sont pour la plupart équilibrées. Certaines anomalies primaires sont spécifiques d'un type de pathologie donné, et possèdent donc une grande valeur diagnostique. Elles joueraient ainsi un rôle critique dans le déclenchement de la maladie¹⁸⁷. Les anomalies secondaires concernent pour la plupart des anomalies de nombre et de structure, souvent complexes et déséquilibrées, et pouvant apparaître au cours de l'évolution de la maladie. Elles ne sont pas présentes comme anomalies uniques, mais sont surajoutées aux anomalies primaires. Les anomalies secondaires ne sont pas spécifiques d'un type de pathologie, mais ne sont cependant pas aléatoires. Elles confèreraient à une cellule tumorale, à un instant donné, un avantage en terme de prolifération / survie / résistance (sélection de type

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

III-2-b) Altérations génétiques dans les lymphomes B

Le lymphome diffus à grande cellule B (LDGCB) est une maladie maligne agressive et hétérogène qui présentent environ 30-40% des cas de lymphome non-Hodgkinien¹⁸⁸. Le profil d'expression génique (PEG) a défini deux sous-groupes majeurs issus de différents stades de la différenciation normale des lymphocytes B : les cellules B du centre germinatif (GCB) et les lymphocytes B activés (ABC), qui utilisent des voies oncogéniques distinctes^{189,190}. Ces deux catégories sont caractérisées par des survies globales différentes, avec un pronostic plus favorable pour le sous-type GCB¹⁹¹. Comme dans d'autres cancers, les progrès dans les technologies de séquençage ont souligné l'hétérogénéité génétique de ces tumeurs. La majorité des variants génétiques dans les LDGB semble être acquis stochastiquement^{192,193,194}. Les études fonctionnelles ont permis d'identifier des anomalies particulières dans les familles de gènes ou des voies de signalisation qui pourraient contribuer à la pathogenèse des deux sous-groupes de LDGCB et être de nouvelles cibles thérapeutiques. Les lymphomes du sous-type GCB expriment généralement des centaines de gènes qui caractérisent les cellules B du centre germinatif avec des altérations génétiques spécifiques, telles que la dérégulation de l'expression de BCL2 à travers la translocation t (14; 18) (q32; q21), la dérégulation de l'expression MYC principalement par t (8; 14) (q24; q32), la régulation de PTEN un gène suppresseur de tumeur, l'amplification de REL et les mutations de TP53^{195,196,197,198}. Certaines mutations ont été identifiées dans un certain nombre de gènes modifiant la chromatine dans le

sous-type GCB. L'une d'entre elles est une mutation somatique récurrente dans l'oncogène EZH2, qui code pour une sous-unité du complexe 2 répressif polycomb (PRC2) et est responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Morin et al., 2010). Cette altération affecte une tyrosine clé dans le site catalytique du domaine SET et améliore l'activité de triméthylation d'EZH2, en partie en augmentant son affinité pour le substrat^{199,200}. La valeur pronostique des mutations EZH2 dans le sous-type GCB n'a pas été rapportée, mais la surexpression de ce gène est en corrélation avec un mauvais pronostic chez plusieurs types de tumeurs^{201,202,203,204,205}. Les LDGCB du sous-type ABC ont une signature d'expression caractéristique des cellules B normales activées par réticulation du récepteur des cellules B, significativement enrichies par les gènes cibles du facteur nucléaire K-ka (NF-κB) et une délétion du locus suppresseur de tumeur INK4A / ARF^{206 207}. L'activation constitutive de la voie NF-κB (antiapoptotique) est une caractéristique des lignées cellulaires ABC, et l'interférence avec cette voie élimine sélectivement les cellules de LDGCB du sous-type ABC^{208,209}. Récemment les chercheurs ont mis en évidence un certain nombre de modifications génétiques qui contribuent à cette activation de la voie NF-κB. Parmi ces altérations figurent des mutations somatiques dans le gène CARD11, qui code pour une protéine d'échafaudage qui fait partie du complexe multiprotéines CBM (CARD11 / BCL10 / MALT1). Ce complexe active la kinase IκB afin d'initier la signalisation NF-κB^{210,211}. Les lymphomes LDGCB du sous-type ABC présentent une signalisation de la voie BCR constitutive provoquée par des mutations dans le domaine intracellulaire fonctionnel (ITAM) des sous-unités BCR CD79A ou CD79B, augmentant ainsi l'expression BCR et réduisant l'activation de LYN, un régulateur négatif de la signalisation BCR^{212,213,214}. Les altérations les plus fréquentes trouvées dans le sous-type ABC sont des mutations somatiques dans MYD88, qui code pour une protéine adaptatrice qui active les voies de signalisation NF-κB et JAK / STAT3²¹⁵. Toutes ces

altérations sont susceptibles d'être des mutations activatrices car elles sont des mutations de gain de fonction qui favorisent la survie cellulaire en empêchant l'apoptose.

III-2-c) Profil épigénétique dans les lymphomes B

Concernant le profil de méthylation des hémopathies malignes, il diffère de celui des tumeurs solides. Grâce aux analyses de profils de méthylation, les cancers peuvent être classés selon leur degré de méthylation. Dans les LAL de la lignée B ou T ainsi que les hémopathies B matures de type centre germinatif (DLBCL, FL, BL), on observe une hyperméthylation de nombreux gènes, ce qui n'est pas le cas dans d'autres hémopathies (MCL, CLL, MALT, MM, PLL-T, LCL anaplasique)²¹⁶. Dans les hémopathies malignes, les études ont porté principalement sur la répression par méthylation des inhibiteurs du cycle cellulaire p16INK4a et p15INKb. L'hyperméthylation de p15INK4b est habituelle dans les LAM, les LAL, les SMD, surtout de haut risque et en progression²¹⁷, et les LAP, mais rare dans les LNH de bas et haut grade²¹⁸. À l'inverse, l'hyperméthylation de p16INK4a est fréquemment observée dans les lymphomes de haut grade mais rarement dans les leucémies aiguës. L'hyperméthylation de p16 est fréquente dans les LNH de haut grade²¹⁹ et les LH²²⁰, ainsi que dans les myélomes multiples (MM), mais absente dans la macroglobulinémie de Waldenström (MW)²²¹ ou les lymphomes à cellules T²²². De nombreux gènes ont été trouvés hyperméthylés dans les hémopathies lymphoïdes B et pourraient servir de biomarqueurs. La méthylation de TGFbetaR2, de DCC ou de DAPK dans le MM a, par exemple, un impact pronostique négatif^{223 224 225}, mais ces données doivent être prises avec prudence, compte tenu des faibles effectifs étudiés. Dans la LLC, l'hyperméthylation de la région intron 1-exon 2 de ZAP-70 s'accompagne d'une répression transcriptionnelle, et elle est corrélée au statut mutationnel IghV et à la survie^{226 227}. D'autres gènes, dont l'expression est régulée par la méthylation dans la LLC, ont une importance pronostique sur la survie, tels CD38, BTG4, HOXA4, LINE et

APP. Dans les lymphomes, la méthylation de p16INK4a est un marqueur de progression des lymphomes de MALT ou folliculaire en lymphomes diffus B²²⁸. De même, DAPK est fréquemment méthylé dans des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de lymphomes folliculaires (n = 52), et est un facteur pronostique indépendant de survie²²⁹. Dans les lymphomes diffus à grandes cellules B, plusieurs études suggèrent un lien entre le pronostic de l'hémopathie et l'hyperméthylation de certains gènes, tels VHL, SHP1, DAPK²³⁰, MGMT²³¹, p16 et Glutathione-S-transferase P1 (GSTP1)²³².

III-2-d) Anomalies primaires et lymphomagenèse

III-2-d1) Analyse chromosomique

Un grand nombre d'anomalies chromosomiques (translocation, mutations, délétions) non aléatoires et qui se limitent aux cellules lymphoïdes B ont été décrites. La majorité de ces anomalies font intervenir des gènes d'immunoglobulines (*IGH* en 14q32, *IGK* en 2p12 et *IGL* en 22q11) à travers une juxtaposition avec un oncogène : *BCL2* en 18q21, *CCND1* en 11q13, ou *MYC* en 8q24. Lors de la différenciation lymphoïde, des erreurs ou aberrations durant les mécanismes de processus de recombinaison génétique seraient à l'origine d'anomalies chromosomiques et par voie de conséquence l'apparition précoce de formation de tumeurs. La plupart de ces translocations ont été clonées, le site de cassure dans les gènes Ig localisé et les proto-oncogènes associés identifiés.

III-2-d2) Conséquences moléculaires des anomalies primaires

La caractérisation moléculaire des translocations chromosomiques primaires a permis d'identifier de nombreux gènes cibles. Les anomalies primaires affectent les gènes qui vont

coder des protéines nécessaires et essentielles aux principales voies de signalisation comme l'homéostasie ou encore le contrôle de l'apoptose ainsi que la prolifération cellulaire ou la lymphopoïèse B. La dérégulation des fonctions de ces gènes impacte ainsi de façon conséquente l'induction de la formation de tumeur.

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

Le lymphome folliculaire (LF) représente 20% des cas de lymphomes B. Une juxtaposition du gène *BCL2* (B-cell lymphoma 2) en 18q21.3 avec les gènes *IGH* est constatée chez 85% environ des lymphomes folliculaires. Cette juxtaposition étant subséquente à la présence d'une $t(14;18)(q32;q21)^{233}$. La dérégulation de l'expression génique de *BCL2* étant initiée par la translocation. De plus, *BCL2* intervient dans la régulation et le contrôle de l'apoptose^{234,235} en agissant par inhibition du phénomène de relargage des activateurs apoptotiques tel le cytochrome c via le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale²³⁶. Il a également été démontré le rôle de *BCL2* dans la régulation de l'évolution des cellules durant le cycle cellulaire par appui du passage en G0²³⁷. D'ailleurs, sa surexpression au niveau des LT ou des LB constituerait l'origine de sa propriété oncogénique dans des cas de modèles murins transgéniques. Le développement suivi de l'évolution rapide des lymphomes B à grandes cellules a été observée chez les souris où il y avait surexpression de *BCL2* conjointement à une hyperplasie des follicules spléniques. Il est intéressant de constater que la dérégulation de *BCL2* de par son hyperexpression qui sera à l'origine de l'état réfractaire des tumeurs à de nombreuses molécules *in vitro* et *in vivo* peut lui conférer une certaine chimiorésistance^{238,239}.

Suite à l'analyse des profils d'expression génique, une « signature transcriptomique » propre aux différents types de lymphomes a pu être mise en exergue. Ainsi les Lymphomes folliculaires (LF) ont un profil différent des lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB)

mais présentent un profil semblable aux lymphocytes B normaux au repos, pour les gènes dont l'expression est modifiée au cours du cycle cellulaire. Cette similitude peut être mise en relation avec le caractère peu proliférant de ce type de lymphome.

D'autre part, les lymphomes folliculaires présentent une signature caractéristique des cellules du centre germinatif (pour les gènes BCL6, A-myb, CD10, CD138)¹³⁹, confirmant l'origine de ces cellules tumorales. L'équipe de Freedman met cependant en évidence des différences d'expression entre les cellules de Lymphomes folliculaires et les cellules normales des centres germinatifs²⁴⁰. En effet, une surexpression de gènes qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que le contrôle de la lymphopoïèse B a été constatée. De façon intéressante, la plupart de ces gènes sont localisés dans des régions chromosomiques fréquemment réarrangées dans les lymphomes folliculaires. Ces études mettent donc en évidence des profils transcriptionnels spécifiques des différents sous-types de lymphomes. Ce type d'approche permettra par la suite de définir et de mieux comprendre la physiopathologie de ces tumeurs (progression tumorale, gènes impliqués).

β Lymphomes B diffus à grandes cellules B et anomalies génétiques

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB) représentent 30 à 40% des cas de lymphomes diagnostiqués dans les pays occidentaux. Il constitue une entité hétérogène sur le plan clinique et biologique. BCL6 intervient directement dans le développement des lymphocytes B^{241, 242} à travers un mécanisme de répression au niveau de la machine transcriptionnelle de l'expression du gène *BLIMP* dépendant de STAT3, en particulier via un blocage de la différenciation des lymphocytes B des centres germinatifs²⁴³. Les réarrangements de *BCL6* ont été initialement décrits dans les LDGCB et constituent l'anomalie cytogénétique la plus fréquente de ces tumeurs (35 à 40% des cas)²⁴⁴. La combinaison répétitive de

translocations qui touchent la bande 3q27, notamment le gène *BCL6/LAZ3* (*lymphoma-associated zinc finger on chromosome 3*) est aussi constatée chez environ 15% des lymphomes folliculaires¹⁶⁹. Le gène *BCL6* peut être juxtaposé soit à côté d'éléments enhancers des gènes d'immunoglobuline soit sous le contrôle de promoteurs d'autres gènes. *BCL6* code pour une protéine nucléaire de 706 acides aminés contenant 6 doigts de zinc et un domaine de répression de la transcription, le domaine POZ (Poxviruses and zinc finger)^{245,246}. La répression de *BCL6* permet la différenciation terminale des lymphocytes en plasmocytes ou lymphocytes B mémoires. *BCL6* peut interagir avec HDAC1, suggérant une répression des gènes cibles de *BCL6* par modification du statut chromatinien de ces gènes²⁴⁷. Ainsi la dérégulation de *BCL6* lors de la lymphomagenèse pourrait participer à l'altération du code histone contrôlant l'expression des gènes de la différenciation B. Une des hypothèses du rôle oncogénique d'une anomalie chromosomique mettant en jeu *BCL6* serait que, suite à la translocation chromosomique, la protéine agisse comme

un répresseur constitutif de la transcription, notamment en recrutant une activité histone déacétylase sur un promoteur cible, promoteur du gène *BLIMP* par exemple, empêchant ainsi la différenciation plasmocytaire des lymphocytes B matures¹⁷¹. L'analyse cytogénétique et moléculaire des anomalies chromosomiques primaires montre leur rôle important dans l'initiation de la lymphomagenèse. Caractéristiques des sous-types tumoraux, elles dérégulent l'expression d'oncogènes engendrant ainsi des perturbations cellulaires. Nombre d'entre elles, pour la plupart équilibrées, ont été clonées et les voies moléculaires mises en jeu caractérisées. Cependant, ces anomalies ne suffisent pas au développement tumoral^{248,249}, comme démontré par la présence d'une t(14;18) chez des personnes saines. Ceci suggère donc la nécessité d'anomalies chromosomiques additionnelles pour le développement d'un phénotype tumoral. De ce fait, les caryotypes des lymphomes malins sont dans 90% des cas très complexes (plus de trois anomalies) avec la présence d'anomalies chromosomiques secondaires non aléatoires,

récurrentes et pertinentes pour la progression tumorale. Parmi ces anomalies secondaires, celles touchant le chromosome 1 surviennent particulièrement fréquemment.

Matériels et méthodes

I. Les échantillons

Les ADN, ARN et tissus utilisés dans cette étude sont issus de prélèvements tumoraux ganglionnaires et extra-ganglionnaires provenant des laboratoires de génétique oncologique et d'anatomopathologie du Centre Henri Becquerel. De plus l'ADN et l'ARN extraits d'adénopathie réactionnelle et ceux extraits de cellules B du sang périphérique ont été utilisés comme témoins. Un ADN commercial (Roche) caractérisé comme ne portant pas d'anomalie génétique connue a également été utilisé comme témoin. Au total 112 patients diagnostiqués pour un LDGCB ont été étudiés.

1- Conditions de culture :

Les cellules sont cultivées en milieu liquide RPMI 1640/glutamax (Invitrogen, France) supplémenté à 1% (v/v) en antibiotiques à partir d'une solution constituée de 10000 UI/mL de pénicilline G et de 10000 µg/mL de streptomycine (Invitrogen, France), et à 10% en sérum de veau foetal (SVF) (Invitrogen, France) préalablement décomplémenté (30 min à 56°C). Leur viabilité est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4% (Invitrogen, France) : celui-ci est exclu des cellules viables qui demeurent ainsi incolores, contrairement aux cellules mortes qui se chargent de bleu (Boyse et al., 1964). Elles sont remises en culture pendant la phase exponentielle de leur croissance (2-3 jours) et sont maintenues à 37°C dans une étuve saturée en humidité contenant 5% de CO₂. Toutes les manipulations sont faites stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical.

2- Effecteurs pharmacologiques :

a- 5-Aza-2'-désoxycytidine (5azadC) (C₈H₁₂N₄O₄ ; MM :228,2)

La 5-aza-2'-désoxycytidine est un agent déméthylant de l'ADN (figure 32). Son incorporation dans l'ADN à la place d'une 2'-désoxycytidine inhibe l'activité de l'ADN méthyltransférase par sa liaison irréversible à l'enzyme (Christman, 2002 ; Juttermann et al., 1994). La solution mère de 5azadC (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 100 mM dans une solution d'acide acétique (Sigma-Aldrich, France) à 5%, aliquotée et conservée à -20°C pour une durée maximale de trois mois.

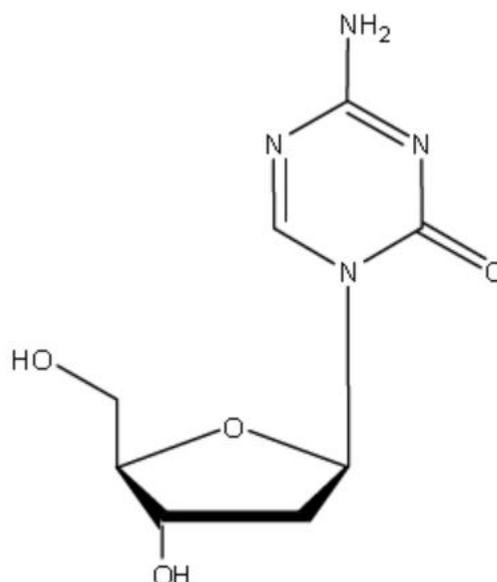


Figure 32 : Structure développée de la 5-aza-2'-désoxycytidine

b- Trichostatine A (TSA) (C₁₇H₂₂N₂O₃ ; MM : 302,4)

Isolée à partir de *Streptomyces hygroscopicus*, la trichostatine A a été d'abord caractérisée comme antifongique dirigé contre *Trichophyton* spp. Environ dix ans plus tard, ses activités différentielles et antiprolifératives ont été démontrées (Yoshida et al., 2001). La TSA est un puissant inhibiteur réversible des HDACs de classes I et II. C'est le premier hydroxamate identifié avec un fort pouvoir acétylant (à des concentrations de l'ordre du nM). Elle est formée

de 3 motifs distincts : le groupement fonctionnel (acide hydroxamique) chélateur de Zn^{2+} , une chaîne de liaison aliphatique et une coiffe diméthylaminophényle nécessaires au bon positionnement du groupe fonctionnel de la molécule au sein de l'HDAC (figure 33). La solution mère de TSA (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 1 mg/mL dans le DMSO, aliquotée et conservée à $-20^{\circ}C$.

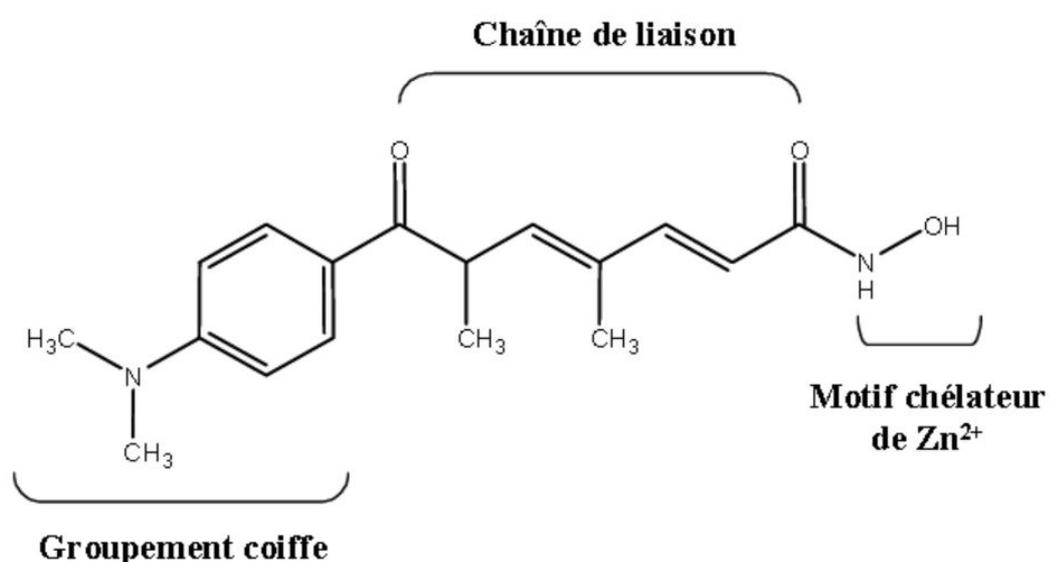


Figure 33 : Structure développée de la trichostatine A.

c- 3-déazaneplanocine A (DZNep)

La 3-déazaneplanocine A (DZNep) est un inhibiteur de l'adénosylhomocystéinase, une enzyme qui synthétise la S-adénosylhomocystéine.

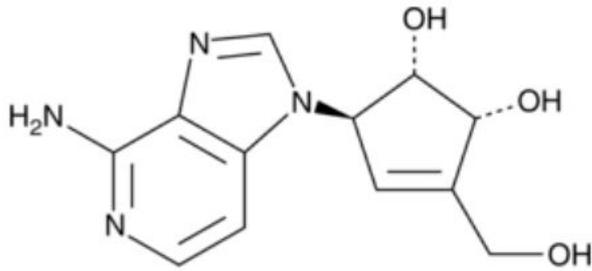


Figure 34: Structure développée de la 3-déazaneplanocine A (DZNep)

3- ADAM assay

Avant et après traitement avec du Dznep, la viabilité des lignées cellulaire Ramos et Raji est déterminée en utilisant le compteur automatique de cellules ADAM. Un kit de comptage contenant, une solution d'iodure de propidium (solution T) et une solution N est utilisé. La solution T permet de marquer l'ensemble des cellules et la solution N l'ensemble des cellules non viables. La différence entre ces deux paramètres permet de déterminer le nombre de cellules viables.

II. Les techniques de détection d'anomalies de nombre de copies de gènes

1 - La QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments)

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé les gains et pertes de 8 exons (exon 1 à 8) composant le gène *HACE1* ainsi qu'un fragment des autres gènes composant la région 6q21 (*GRIK2*, *A20*, *FNGR1*, *LINK28B*, *PERP*). La QMPSF est une méthode semi-quantitative basée sur une PCR multiplexe de courts fragments fluorescents. Son principe repose sur l'amplification de fragment de petites tailles (<300 pb) marqués par un fluorochrome. La PCR mutiplexe, semi-quantitative, est réalisée avec un nombre limité de cycles (en général inférieur ou égal à vingt et un) afin que l'amplification reste dans sa phase exponentielle. Tous les amplicons sont amplifiés simultanément dans le même tube. Après séparation des produits de PCR sur séquenceur automatique (Applied Biosystems ABI PRISM®310), la mise en évidence

des amplifications et des pertes est basée sur la comparaison de hauteur des différents pics entre échantillons par superposition des chromatogrammes.

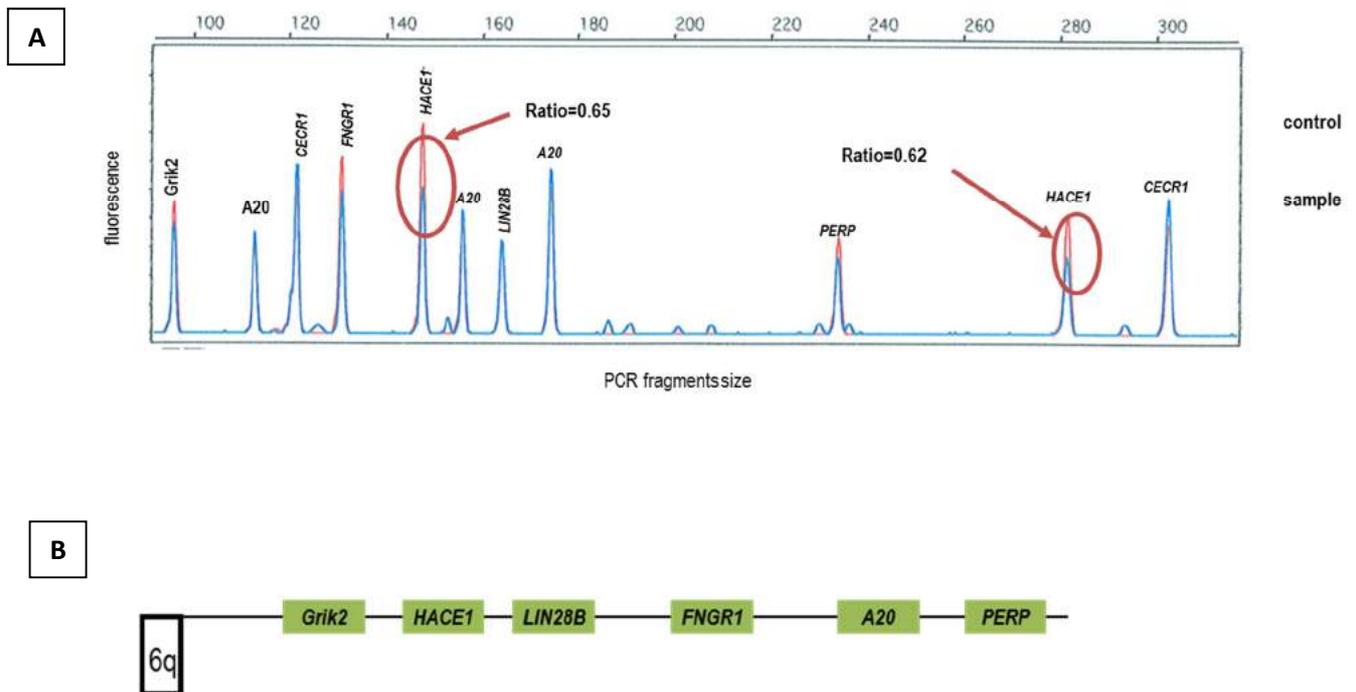


Figure 35: Design de l'analyse QMPSF en 6q21

A : La taille de chaque fragment est indiquée en haut de la figure en paire de base. Chaque pic représente un fragment dont la hauteur est proportionnelle à la fluorescence. Le gène *CECR1* est le gène témoin. Les pictogrammes jaunes et bleus représentent le témoin et le patient. **B** : Gènes ciblés par la QMPSF en amont et en aval du gène cible *HACE1*

2- L'hybridation génomique comparative (CGH array)

La CGH est une technique qui permet de détecter des déséquilibres génomiques de petites tailles sur l'ensemble du génome avec une résolution de 100kb (puce 44K). Cette technique est particulièrement utilisée pour analyser les variations du nombre de copies de gène, de fragments d'ADN ainsi que pour caractériser la taille d'un remaniement ou pour localiser les points de cassures issus d'une translocation déséquilibrée ou d'une délétion. Les ADN de 100

patients ont été analysés sur la plateforme de CGH microarray (Agilent), de l'unité U837 à Lille, qui exploite la technologie de puces à ADN à haute densité, en utilisant des puces Human Genome CGH microarray 44K, 4x44K ou 105K. Le principe repose sur l'hybridation compétitive de l'ADN tumoral et non tumoral d'un même patient sur des oligonucléotides fixés sur lame. Le résultat apparaît sous forme de Log2 ratio et de spot de couleurs.

III. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Pour cette partie de l'étude nous avons utilisé un gel à 0.8% (0.8g d'Agarose (Seakem GTG, Cambrex) et 100 ml de (TBE 1X (Tris base EDTA à pH 8.6). La migration est effectuée en TBE 1X, à 100V, 40 mA, pendant 1 heure puis la révélation se réalise sous UV après exposition au GEL RED à 0.05%.

IV. Etude de méthylation

1 - La MSP (Methylation Specific PCR)

La PCR spécifique de la méthylation (MSP) est une technique rapide et très sensible pour analyser la méthylation des cytosines d'une façon qualitative. Elle est basée sur l'utilisation de deux paires distinctes d'amorces au niveau la région d'intérêt, désignées à amplifier les brins méthylés (amorces M) ou non méthylés (amorces U) après transformation de l'ADN par le bisulfite de sodium (figure 36). La Methylation Specific PCR consiste à déterminer le caractère méthylé ou non méthylé d'une région donnée contenant des CpG. Le principe de cette technique repose sur l'amplification de l'ADN traité au bisulfite par des amorces spécifiques de la méthylation ou de non methylation. En effet le traitement au bisulfite permet de convertir les cytosines des CpG en uracile (U) lorsque l'ADN n'est pas méthylé alors

qu'en cas de méthylation, les cytosines ne sont pas converties. Les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose à 2%. Cette technique reste très sensible ainsi que rapide et peu coûteuse.

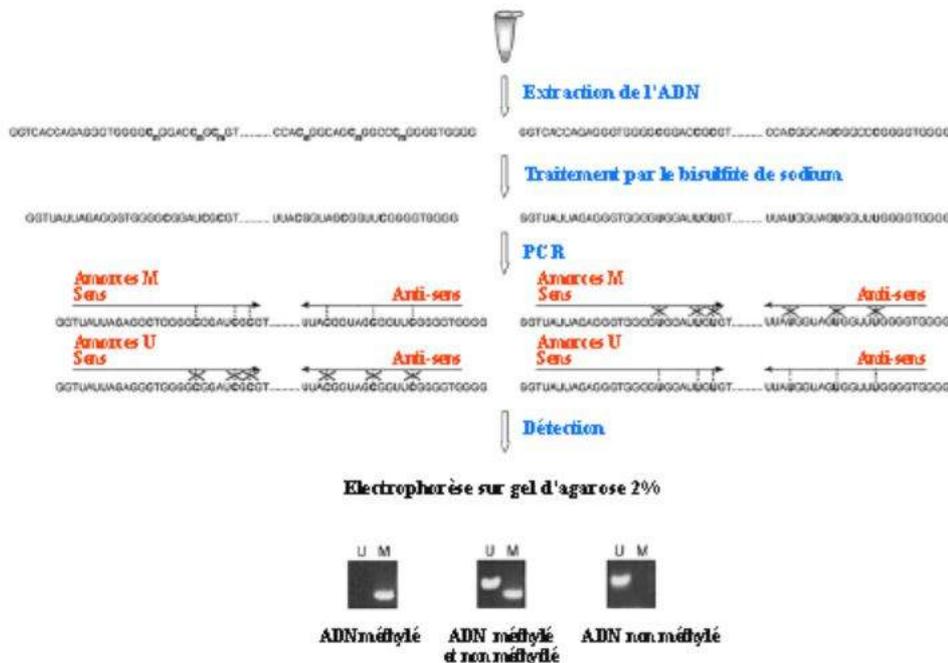


Figure 36: Schéma représentatif des différentes étapes de la MSP (Derks *et al.*, 2004).

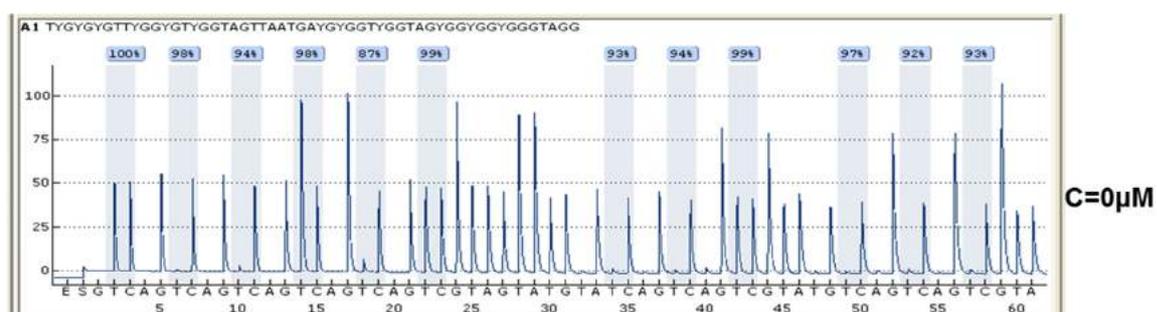
2 - Le pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique qui permet le séquençage rapide et directe. Elle peut-être utilisé pour détecter les mutations mais aussi les profils de méthylation des îlots CpG.

Dans le cas de notre étude cette technique a été employée pour quantifier la méthylation au niveau du promoteur du gène *HACE1*. Après une amplification de la région d'intérêt à partir d'ADN bisulfite, le produit est analysé au pyroséquenceur. Contrairement à la technique de séquençage classique où tous les nucléotides sont ajoutés ensembles, le pyroséquençage ajoute les nucléotides l'un après l'autre. Lorsque le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par la polymérase, il sera incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un PyroPhosphate.

Le PyroPhosphate est transformé en ATP par une ATP Sulfurylase, cet ATP est utilisé par une luciférase pour émettre un signal lumineux. Le signal lumineux est capté par le séquenceur qui le transforme en pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux qui est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps.

Dans cette étude, nous avons conçu et mis au point un protocole pour le gène *HACE1*. Les CpG cibles choisis sont situées dans une région de 50 paires de base au maximum contenant les sites CpG étudiés par la MSP (îlot CpG 177). La mise au point s'est effectuée en deux étapes : tout d'abord chaque protocole a été testé par 5 PCR comme recommandé par le fabricant (Qiagen, Courtabeuf, France) puis des tests de sensibilité ont été effectués à partir de dilution sériées d'ADN méthylé et non méthylé commercial (Qiagen). Au final la faisabilité de nos protocoles a été testée et validée avec la lignée RL pour laquelle le statut de méthylation avait été caractérisé par MSP. Le protocole de réalisation des PCR et d'analyse au pyroséquenceur sont ceux recommandés pour le système Pyromark Q24.



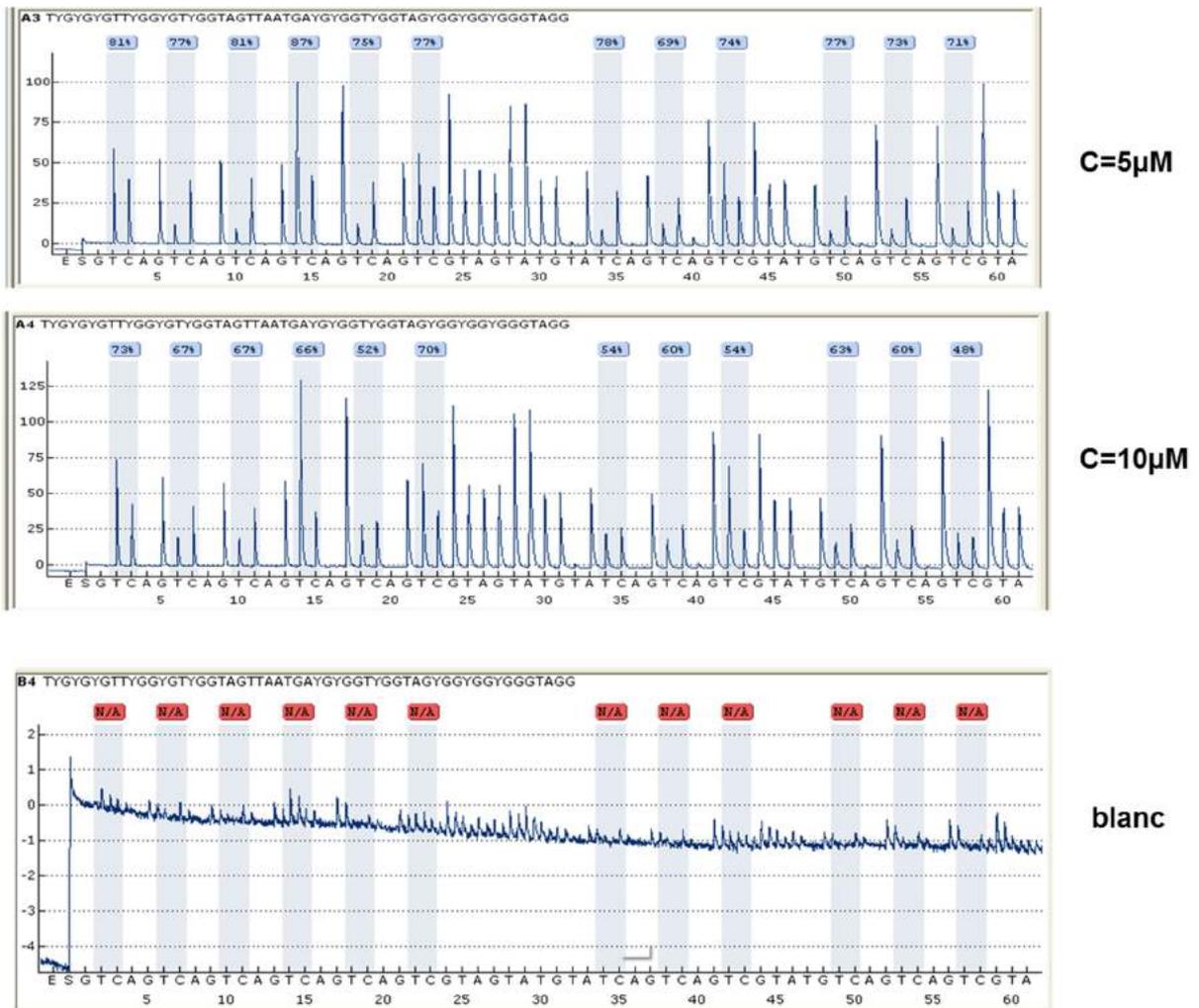


Figure 37: Exemple de pictogramme obtenu pour de la methylation du gène *HACE1*.

Parmi les bases de la séquence située en dessous des pictogrammes, les cytosines des CpG sont marquées en bleu et leurs niveaux de méthylation sont indiqués en pourcentage. Le pictogramme obtenu pour *HACE1* montre des pourcentages situés entre 91 et 100% au pyroséquenceur pour le gène *HACE1* dans des la lignée cellulaire RAMOS non traitée par le 5'AZA. Les pictogrammes obtenus pour *HACE1* dans la lignée RAMOS traitée au 5'AZA montrent un niveau de méthylation de 50 à 80% au pyroséquenceur selon la concentration du 5'AZA.

V. Quantification de l'expression du transcrit

La quantification de l'expression du transcrit est basée sur la PCR en temps réel ou RT PCR Quantitative (Reverse Transcriptase PCR). Cette méthode consiste en l'hybridation de sondes porteuses des deux molécules, un fluorochrome en 5' et un extincteur (quencher) en 3' (sondes "TaqMan"). L'extincteur empêche le fluorochrome d'émettre de la fluorescence lorsqu'il est excité. Au cours de la PCR, la sonde est dégradée par la Taq polymérase conduisant ainsi à la

libération du fluorochrome et de l'extincteur dans le milieu. Le fluorochrome peut alors émettre de la fluorescence. La fluorescence émise est strictement proportionnelle au nombre de copies synthétisées au cours de la PCR. Cette fluorescence est mesurée par le système ABI PRISM 7900. Dans cette études l'expression des transcrits du gène *HACE1* à fait l'objet d'une mise au point particulière.

Les résultats correspondent à l'expression relative du gène d'intérêt par rapport à un gène domestique, le gène *TBP*. Le programme de PCR pour *HACE1* consiste en une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes puis 40 cycles de 30 secondes à 95°C et 90 secondes à 60°C. Les courbes standards ont été réalisées à partir de dilutions sériées de l'ARNm de la lignée RL.

VI. Expression des protéines par Immunohistochimie

Dans le but d'étudier l'expression de la protéine HACE1, nous avons mis au point un protocole d'immunohistochimie (IHC). Cette technique permet le marquage de la protéine recherchée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal (Abcam). L'anticorps reconnaît un épitope de la protéine recherchée. L'utilisation d'un anticorps secondaire biotinylé permet la détection du complexe par l'ajout de streptavidine. La révélation est faite à l'aide d'un chromogène : la DAB (Diaminobenzidine) (Figure 38). Pour les étapes de mise au point les prélèvements utilisés sont des macros-TMA (Tissue Micro Array) issus de prélèvement de LDGCB. Les résultats sont exprimés sous forme de marquage faible, moyen ou fort pour ce marquage cytoplasmique d'HACE1.

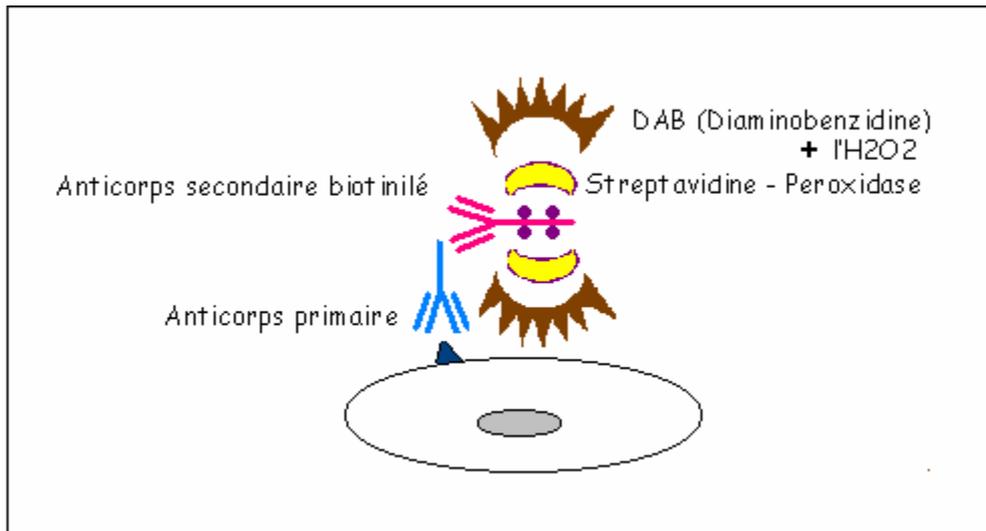


Figure 38: Principe de l'immunohistochimie

VII. Etude des modifications post-traductionnelles des histones au niveau du promoteur *HACE1* par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une technique qui permet de mettre en évidence la fixation d'une protéine donnée sur une séquence spécifique de l'ADN. En bref, les cellules vivantes sont fixées par le formaldéhyde afin de lier les protéines à l'ADN (cross-linking). La chromatine est ensuite clivée et solubilisée par sonication [il s'agit alors du xChIP par opposition au nChIP (native ChIP) où l'on utilise la digestion enzymatique pour fragmenter l'ADN]. Cette étape est suivie par une immunoprécipitation sélective de complexes protéine-ADN à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Les « crosslinks » sont ensuite défaits et l'ADN immunoprécipité est analysé par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de la région à analyser (figure 39).

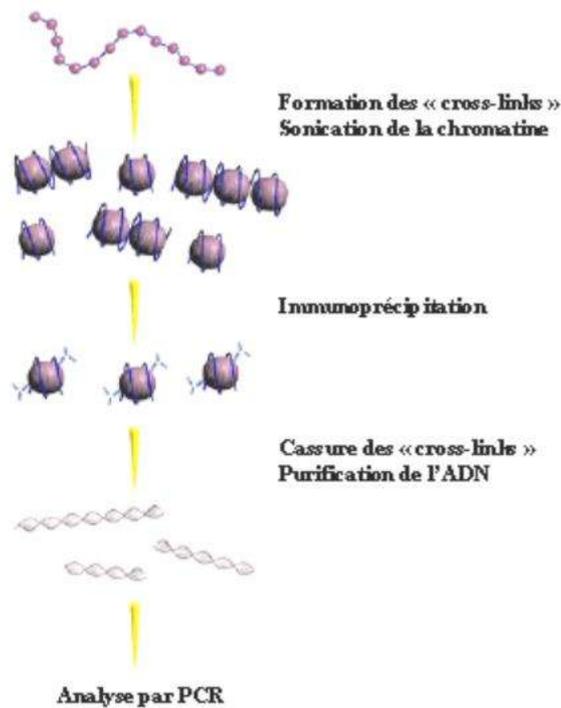


Figure 39: Représentation schématique de la technique de CHIP.

VIII. Analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires. Elle donne des indications sur la taille, la structure interne (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique...) et la fluorescence d'un système cellulaire. Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'histogrammes mono ou biparamétrés, donnant la répartition des cellules en fonction du ou des paramètres étudiés. Cette analyse devant se faire pour chaque objet individuellement, il est nécessaire que l'échantillon se présente sous la forme d'une suspension. Une fois mises en suspension, les cellules ou les particules subcellulaires peuvent être analysées après ou en l'absence de fixation. La mesure de composants particuliers de la cellule nécessite leur marquage préalable, soit à l'aide de fluorochromes spécifiques (intercalants...), soit par immunomarquage fluorescent (anticorps marqués). Les cellules sont ensuite injectées au

centre d'une gaine liquide réalisée par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100 μm de diamètre. Le jet résultant va permettre aux cellules de défiler l'une derrière l'autre, avec suffisamment d'espace entre elles pour être analysées séparément. A la sortie de la buse, les cellules passent dans un faisceau lumineux focalisé sur le centre du jet et généralement fourni par un laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres puis collectés par des photodétecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Enfin, l'analyseur multicanaux va permettre le traitement des signaux électriques afin d'obtenir un histogramme de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés.

XI. Extraction de lymphocyte B du sang périphérique :

Du sang provenant de donneurs sains (HDS) a été recueilli par l'Etablissement Français du Sang. Des cellules mononucléaires isolées du sang périphérique ont été extraites par centrifugation à gradient de Ficoll et les cellules B ont été isolées par sélection négative avec le kit Dynabeads cellules B (DynaLife Technologies).

OBJECTIF DU TRAVAIL

Les Lymphomes B dont les LDGCB sont des tumeurs hétérogènes sur le plan moléculaire, qui portent des mutations, des translocations, et des délétions impliquant de nombreux gènes. L'une des régions les plus fréquemment délétée dans ces tumeurs est située au niveau du bras long du chromosome 6, en 6q21²⁵⁰. Elle comprend le gène *HACE1*, qui a été initialement identifié de part son implication dans la translocation non constitutionnelle t(6;15) (q21;q21) dans les tumeurs de Wilms²⁵¹. Son inactivation chez la souris entraîne le développement spontané de cancers (poumon, lymphome, sein¹⁷⁷ tandis que sa réexpression dans les cellules tumorales humaines (HEK) inhibe directement in vitro et in vivo la croissance tumorale. Ensemble, ces données suggèrent donc qu'*HACE1* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Cette fonction dépendrait notamment de son activité ubiquitine ligase E3¹³¹ qui lui conférerait un rôle dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire, via la dégradation de la cycline D1, mais aussi dans la migration et la prolifération cellulaire via l'ubiquitination de la protéine pro-tumorale, RAC1¹³⁶. En dehors des délétions de la région 6q aucune mutation de *HACE1* n'a été décrite. Une hyperméthylation de son promoteur au niveau de l'îlot Cytosine/Guanine (CpG) 177, situé en amont du site d'initiation de la transcription a cependant été corrélée avec une faible expression du gène dans des échantillons de tumeurs (colorectale, gastrique, lymphome T), suggérant que des mécanismes de régulation épigénétiques pourraient être impliqués dans l'inactivation de ce gène dans les tumeurs^{252,253,254}. Il est également possible que cette perte d'expression d'*HACE1* passe par d'autres mécanismes comme la désacétylation ou la méthylation des histones²⁵⁵.

L'objectif de ce travail consistait donc à déterminer si *HACE1* joue effectivement un rôle dans la lymphomagenèse B. Par quels mécanismes génétiques et épigénétiques son expression peut être altérée dans les lymphomes B et quelles sont les conséquences fonctionnelles de son inactivation ?

Ainsi, la première partie de ce travail a consisté à analyser le statut génétique et l'expression du gène *HACE1* dans une cohorte de 112 échantillons de Lymphome B et des lignées cellulaires de lymphome B. Pour cela nous avons déterminé la variation du nombre de copie de gène ainsi que le profil de méthylation du promoteur au niveau des îlots CpG 177 et 88.

Dans un deuxième temps, pour mieux comprendre les mécanismes de régulations épigénétiques de ce gène, nous avons entrepris d'évaluer les effets sur son expression de molécules inhibant les histones désacétylases, les ADN méthyltransférases ou de molécule telle que le DZNep, un inhibiteur de la méthylation des histones.

Enfin, nous avons étudié les effets de la perte de *HACE1* sur le cycle cellulaire et sur l'apoptose cellulaire dans les cellules B, afin de préciser le rôle de ce gène dans la lymphomagénèse.

Resulats



HACE1 is a putative tumor suppressor gene in B-cell lymphomagenesis and is down-regulated by both deletion and epigenetic alterations

Abdelilah Bouzelfen^a, Marion Alcantara^a, Hafid Kora^b, Jean-Michel Picquenot^a, Philippe Bertrand^a, Marie Cornic^a, Sylvain Mareschal^a, Elodie Bohers^a, Catherine Maingonnat^a, Philippe Ruminy^a, Sahil Adriouch^c, Olivier Boyer^c, Sydney Dubois^a, Christian Bastard^a, Hervé Tilly^a, Jean-Baptiste Latouche^b, Fabrice Jardin^a

[+](#) **Show more**

doi:10.1016/j.leukres.2016.04.007

[Get rights and content](#)

I- Article 1

I-1- Résumé Article 1

Le gène *HACE1* (*HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1*), situé sur le chromosome 6q, code pour une ubiquitine ligase E3 et est régulé négativement dans de nombreuses tumeurs chez l'homme. Dans cette étude, nous présentons le gène *HACE1* comme un gène suppresseur de tumeur candidat régulé négativement par une combinaison de mécanismes de délétions et d'épigénétiques. Des délétions du gène *HACE1* ont été observées dans 40 % des tumeurs de lymphome à cellules B. Une hyperméthylation de l'îlot CpG 177 du promoteur du gène *HACE1* a été observée dans 60 % (68/111) des cas et dans toutes les lignées de lymphome à cellules B testées. À l'aide d'inhibiteurs d'HDAC, nous avons principalement observé la conformation inactive de la chromatine (histones H3

méthylées H3K9me2) au niveau de la région du promoteur du gène *HACE1*. Nous avons démontré dans les cellules Ramos et Raji qu'une régulation négative de l'expression du gène *HACE1* était associée à une réduction significative de l'apoptose et à une accumulation des cellules dans les phases S et G2/M.

Nos expériences indiquent que le gène *HACE1* peut agir comme un gène suppresseur de tumeur haploinsuffisant dans la plupart des lymphomes à cellules B et son expression peut être régulée négativement par la désacétylation de la chromatine au niveau de la région de son promoteur ce qui en fait une cible potentielle pour les inhibiteurs de l'HDAC.

I-2 Discussion Article 1

Dans cette étude, nous avons montré que le gène *HACE1* est régulé négativement dans les lymphomes à cellules B. Il a été montré que le gène *HACE1*, qui est situé dans la région 6q16.3, était altéré dans les tumeurs malignes à cellules T¹² via la délétion et la méthylation de l'ADN, et son altération peut jouer un rôle crucial dans la lymphomagenèse des cellules NK¹². Cependant, l'expression du gène *HACE1* dans le lymphome à cellules B, le type de lymphome le plus fréquent, n'a pas été explorée. Nous avons montré que la régulation négative du gène *HACE1* est due, au moins en partie, à une délétion et une altération de la régulation épigénétique. Des délétions du bras long du chromosome 6 se produisent à une fréquence relativement élevée (50 %) dans la leucémie/le lymphome, et elles sont fréquemment observées dans la région 6q21²⁰. Dans notre étude, l'analyse du nombre de copies de cette région dans les tumeurs de lymphome à cellules B a montré qu'une délétion en 6q se produit chez environ 40 % des patients. Ces délétions entraînent une régulation négative de l'expression du gène *HACE1* et d'autres gènes suppresseurs de tumeur comme le gène *TNFAIP3*²¹. De plus, nous avons identifié des délétions hétérozygotes impliquant

spécifiquement le gène *HACE1* et pas les autres gènes situés dans la région 6q, ce qui étaye fortement notre hypothèse selon laquelle le gène *HACE1* est un gène suppresseur de tumeur haploinsuffisant dans le lymphome à cellules B. Une haploinsuffisance ou des anomalies dans plusieurs gènes suppresseurs de tumeur au niveau de ce locus (les gènes *TNFAIP3*, *PRDM1*, *HACE1*) peut offrir un avantage de croissance additif ou synergique lors de la transformation néoplasique des cellules B^{8,22}. Néanmoins, dans les lignées cellulaires de lymphome à cellules B, l'expression du gène *HACE1* était régulée négativement malgré la présence de deux copies intactes du gène. Par conséquent, l'expression du gène *HACE1* peut être régulée négativement via un autre mécanisme que la délétion, par exemple une régulation épigénétique^{22,23,24}. Nous avons montré que le gène *HACE1* était méthylé au niveau de l'îlot CpG 177 chez 60 % des cas étudiés et dans toutes les lignées cellulaires de lymphome à cellules B testées. Cependant, la méthylation des cytosines ne corrélait pas avec la transcription du gène *HACE1*. De plus, le traitement des lignées cellulaires de lymphome à cellules B par la 5-Aza-dC n'affectait pas l'expression du gène *HACE1*, malgré la déméthylation observée du promoteur du gène *HACE1*. Bien qu'il ait initialement été montré que la méthylation de l'ADN était impliquée dans l'extinction génique^{25,26}, des études récentes ont montré que la méthylation de l'ADN peut également être corrélée positivement avec la transcription ou n'ont montré aucune corrélation²⁷. Pour essayer de comprendre ces résultats nous avons utilisé un traitement par des inhibiteurs de l'HDAC. Ainsi, le traitement des lignées cellulaires de lymphome à cellules B par des inhibiteurs de l'histone désacétylase (TSA) activait l'expression du gène *HACE1*. Cependant, la combinaison de la 5-Aza-dC et de la TsA n'induisait pas de façon plus efficace l'expression du gène *HACE1* que la TsA seule. L'effet des inhibiteurs de l'histone désacétylase sur l'expression du gène *HACE1* suggère que la modulation de la chromatine joue un rôle important dans la régulation de l'expression du gène *HACE1*. En effet, les modifications des histones jouent également un rôle important dans l'extinction génique, et de nombreuses

marques des histones sont associées à une répression de la transcription^{29,30}. En effet, la désacétylation des histones pourrait entraîner une condensation de la chromatine et la répression de la transcription des gènes. Ainsi, l'analyse de l'immunoprécipitation de la chromatine a montré que les marques de méthylation des histones associées à l'extinction génique étaient enrichies au niveau du promoteur du gène *HACE1* dans les lignées cellulaires de lymphome à cellules B (cellules Ramos) par rapport aux lymphocytes B contrôles du sang périphérique de donneurs sains. De plus, l'expression du gène *HACE1* induite par la TsA corrélait avec une forte augmentation de l'acétylation de l'histone H3 et une diminution de l'histone diméthylée H3K9 au niveau du promoteur du gène *HACE1*. Des études récentes ont identifié des interactions importantes entre la méthylation de l'ADN et la méthylation et l'acétylation des histones². En effet, la méthylation de l'ADN peut induire un remodelage de la chromatine, entraînant la formation de domaines de répression en causant une désacétylation massive des histones au niveau des sites méthylés. Par ailleurs, les îlots CpG hyperméthylés attirent les protéines ayant des domaines de liaison aux îlots CpG méthylés (MBDP : MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 iKaiso) dans une boucle auto-entretenu et recrutent les HDAC, ce qui entraîne une répression transcriptionnelle². Cependant, Bachman et al. ont utilisé une approche génétique pour montrer que la modification des histones peut se produire indépendamment de la méthylation de l'ADN et que la méthylation de l'ADN sert à « verrouiller » plutôt qu'à initier la répression génique³¹. Nos résultats ont également fourni un exemple de cette interaction entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (méthylation et acétylation). Une étude plus poussée sera nécessaire pour éclaircir ce point.

Les différentes cibles de la protéine *HACE1* identifiées (*RAC1*, *RAR* et cycline *D1*) suggèrent son implication dans la prolifération cellulaire et la survie, qui jouent un rôle important dans la lymphomagenèse^{6,7}. En effet, il a été montré que *Rac1* inhibait l'apoptose dans les cellules humaines de lymphome en stimulant la phosphorylation de *Bad* sur la Ser-

75³². En ce qui concerne la cycline D1, une protéine dont le potentiel oncogène est connu, elle est régulée négativement dans les lymphocytes B matures normaux. Sa forte expression détectée dans un certain nombre de tumeurs malignes, y compris les lymphomes à cellules B, peut jouer un rôle important dans l'oncogénèse³³. Par ailleurs, Manshouri T et *al* ont suggéré que la présence de RAR α est nécessaire pour que les gènes RAR β et RAR γ répondent de façon adéquate aux changements physiologiques et que la dérégulation de RAR α chez des souris transgéniques, qui entraînait une régulation positive de RAR β et RAR γ , peut être associée à la lymphomagenèse³⁴. Selon une étude récente, une régulation positive de l'expression du gène *HACE1* peut entraîner l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M dans les tumeurs malignes à cellules T¹². Dans notre étude, la régulation négative de l'expression du gène *HACE1* par l'ARNsh induisait une résistance à l'apoptose et à la progression du cycle cellulaire dans les phases S et G2/M dans deux lignées cellulaires de lymphome à cellules B. Nous avons d'abord choisi de réprimer l'expression du gène *HACE1* dans les lignées Ramos et Raji malgré sa faible expression dans ces lignées cellulaires pour observer le rôle du gène *HACE1* en tant que suppresseur de tumeur. Nous devons ré-exprimer le gène *HACE1* dans ces lignées cellulaires pour confirmer ces résultats. Enfin, le gène *HACE1* est un gène suppresseur de tumeur putatif situé dans la région 6q16.3, et nos données fournissent une caractérisation complète des mécanismes épigénétiques entraînant la dérégulation du gène *HACE1* dans les tumeurs de lymphome à cellules B. Ces résultats étayent le concept que le fait de contrôler l'expression du gène *HACE1* dans ces tumeurs est associé à des modifications de la chromatine. Ces observations montrent pourquoi le traitement par des inhibiteurs de l'HDAC peut augmenter l'expression du gène *HACE1*. La ré-expression du gène *HACE1* et les profils de méthylation et d'acétylation justifient la nécessité de tester la thérapie épigénétique chez des patients atteints de lymphome à cellules B.

***HACE1* is a putative tumor suppressor gene in B-cell lymphomagenesis and is down-regulated by both deletion and epigenetic alterations.**

Keywords: Tumor suppressor gene, epigenetic, lymphoma, HDAC inhibitors, deletions

Abdelilah Bouzelfen¹, Marion Alcantara¹, Hafid Kora², Jean-Michel Picquenot¹, Philippe Bertrand¹, Marie Cornic¹, Sylvain Mareschal¹, Elodie Bohers¹, Catherine Maingonnat¹, Philippe Ruminy¹, Sahil Adriouch³, Olivier Boyer³, Sydney Dubois¹, Christian Bastard¹, Hervé Tilly¹, Jean-Baptiste Latouche², Fabrice Jardin¹.

Corresponding author: bouzelfi.a@gmail.com

¹ Henri Becquerel Center, IINSERM U918, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB),

Rouen

² INSERM U1079, Faculty of Medecine of Rouen, iRiB

³ INSERM U905, Faculty of medecine of Rouen, iRiB

Funding information: This work was supported by la ligue régional de la lutte contre le cancer

Abstract

HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1, *HACE1*, located on chromosome 6q, encodes an E3 ubiquitin ligase and is downregulated in many human tumors. Here, we report *HACE1* as a candidate tumor suppressor gene down-regulated by a combination of deletion and epigenetic mechanisms. *HACE1* deletions were observed in 40% of B-cell lymphoma tumors. Hypermethylation of the *HACE1* promoter CpG177 island was found in 60% (68/111) of cases and in all tested B-cell lymphoma lines. Using HDAC inhibitors, we observed predominantly inactive chromatin conformation (methylated H3 histones H3K9me2) in *HACE1* gene promoter region. We demonstrated in Ramos and Raji cells that down-regulation of *HACE1* expression was associated with a significant decrease in apoptosis and an accumulation of cells in the S and G2/M phases.

Our experiments indicate that *HACE1* can act as a haploinsufficient tumor suppressor gene in most B-cell lymphomas and can be downregulated by deacetylation of its promoter region chromatin, which makes *HACE1* a potential target for HDAC inhibitors.

Introduction

Epigenetic alterations can lead to events that are functionally equivalent to mutations/deletions during lymphomagenesis, such as silencing key regulatory tumor suppressor genes¹. The covalent modification of DNA and histones contributes to the establishment of local chromatin structure that influences the permissiveness of gene promoters for the subsequent assembly and/or activation of the transcriptional machinery². A comprehensive study identified *HACE1* (located on chromosome 6q21) as a tumor suppressor gene involved in the spontaneous tumorigenesis of several cancers *in vivo*, including lymphoma³. The protein HACE1 belongs to the HECT family of ubiquitin ligases (HECT E3), which have intrinsic catalytic activity and specificity for substrates involved in the regulation of growth and apoptosis⁴. HACE1 inhibits the tumor suppressor gene RARb⁵, ubiquitylates RAC1, which is a rho-GTPase involved in cell proliferation and G2/M cycle progression⁶ and degrades cyclin D1 through the control of ROS⁷.

A recent study showed that down-regulation of *HACE1* expression is associated with neuroblastoma progression and poor patient Overall Survival (OS)⁸. Furthermore, *HACE1* is down-regulated in Wilm's tumor patients, and this alteration is mediated through hypermethylation of the cytosine phosphate guanine (CpG) island 177 (CpG-177), which is located upstream of the transcription start site (TSS)⁴. Hypermethylation of CpG-177 in the *HACE1* promoter is frequently observed in colorectal and gastric carcinomas, and hypermethylation of *HACE1* is associated with the severity of clinicopathological findings, especially lymph node metastasis, in colorectal carcinomas^{9,10,11}. Thus, *HACE1* was demonstrated to be a tumor suppressor gene in NK cell malignancies and to be down-regulated through a combination of deletion and cytosine phosphate guanine island hypermethylation¹². Mutations in *HACE1* have not been found in the coding or promoter regions of any cancer studied to date. These observations are consistent with the hypothesis that *HACE1* functions as a tumor suppressor gene. However the function of *HACE1* and the factors involved in its

transcriptional regulation are largely unknown in the context of B-cell lymphomas, such as diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), mantle cell lymphoma (MCL) or Burkitt lymphoma. Thus, therapeutic challenges persist, and the development of new targeted strategies is needed to improve the outcomes for these types of pathology¹⁴.

The investigations of these studies consisted on whether *HACE1* was down-regulated in B-cell lymphoma and to understand the central role of various genetic and epigenetic mechanism including deletions and chromatin modifications on *HACE1* down-regulation. We also demonstrated a putative tumor suppressive role for *HACE1* in B cell malignancies using functional assays.

Material and Methods

Patients

A total of 125 patients receiving treatment at our institution and who were diagnosed with *de novo* DLBCL (n = 101), MCL (n = 17) or follicular lymphoma (FL) (n = 7) between 1987 and 2010 were included in our study (Table 1 supplementary materials). Tumors were classified according to the World Health Organization (WHO) classification scheme. Tumor DNA and RNA were extracted at the time of diagnosis from fresh or frozen tissue by conventional protocols. Patients were recruited with the approval of the institutional review board, and informed consent was obtained according to the Declaration of Helsinki. The name of the ethics committee/institutional review board(s) that approved our study is IRB and the approval number is 1501B.

Age	
<65 years	50 (46.3%)
>65 years	48 (44.4%)
Not available	10 (9.3%)
Gender	
Male	55 (51%)
Female	53 (49%)
Subtype	
GCB	26 (24%)
ABC	33 (30.5%)
Undetermined	16 (15%)
Not available	33 (30.5%)
Age-adjusted IPI score	
0-1	36 (33.3%)
2-3	61 (56.5%)
Not available	11 (10.2%)
Stage	
I-II	29 (26.8%)
III-IV	69 (63.9%)
Not available	10 (9.3%)
Rituximab containing regimen	
Yes	61 (56.5%)
No	37 (34.2%)
Not available	10 (9.3%)

Table 1 : Clinical data of patients

Cell lines and culture conditions

The following four B-cell lymphoma cell lines obtained from the ATCC were analyzed: Ramos (Burkitt lymphoma), RL (DLBCL), Raji (Burkitt lymphoma) and REC (MCL). All cell lines were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine. Cells were grown and maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Ramos, Raji and RL cells were treated with 5-Azacytidine-dC (5-Aza-dC, Sigma, final conc. 2, 5 and 7 µM for Ramos, Raji and RL cells, respectively) for 5 days and with Trichostatin A (TsA, Sigma, final conc. 100 nM) for 24 hours. For staurosporine treatment, Ramos and Raji cells were cultured in media containing 10 µM of staurosporine (Sigma) for 3 hours.

Normal B-cell isolation

Fresh blood from healthy donors (HDs) was collected by the Etablissement Français du Sang. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were prepared by Ficoll gradient centrifugation, and B cells were isolated by negative selection with the Dynabeads untouched B-cell kit (DynaLife Technologies) (Figure1 supplementary data).

Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and 1 µg of RNA was converted into cDNA in a random-primer synthesis reaction with the M-MLV reverse transcriptase kit (Life Technologies). All primer/probe sets were designed to span exon boundaries to eliminate contaminating signal from genomic DNA. The *HACE1* gene-specific primer/probe set (forward: AGTTATTCAGTGGTTCT, probe: [6FAM]CGGGCAGTTCAGGGTCCCAC [TAMRA], reverse: ACTTCCACCCATGATATTAGCAAAC) was multiplexed with the VIC-

MGB-labeled TBP endogenous control primer/probe kit (Applied Biosystems). PCR was carried out with a TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) under standard conditions. An ABI 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) was used to run the PCRs and measure fluorescence at each cycle. Each PCR reaction was performed in triplicate and each sample was analyzed independently at least twice. A total of 101 DLBCL, 7 FL, 17 MCL samples and 22 normal lymph nodes were analyzed by QRT-PCR.

Immunohistochemistry for HACE1 expression

For each tumor, four-micrometer thick paraffin sections were deparaffinized, and endogenous activity was quenched by incubation of sections in 3% hydrogen peroxide and absolute methanol. Sections from FFPE tissue samples were used to build Tissue Microarrays (TMAs). The FFPE slides were subjected to heat-induced antigen retrieval pH6 on PTlink (DAKO). For HACE1 antibody (1/100, Abcam), immunohistochemistry was performed with Vectastain ABC Rabbit IgG kit (Vector). The expression of HACE1 was assessed semi-quantitatively as follows: + (low), ++ (intermediate), and +++ (high). Each tumor was represented 3 times on the TMAs. Slides were scored in a blinded fashion by an experienced anatomopathologist (JMP).

Gene copy number abnormalities

A quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments (QMPSF) assay was used to detect *HACE1* deletions. QMPSF is a method used to detect genomic deletions or duplications of short genomic fragments (patent FR02099247)¹⁷ and has been previously used in studies of gene copy number analysis of lymphoma patients^{18, 19}. Short genomic fragments (between 90 and 310 bp) located in *HACE1* and in genes located within 6q region (*GRIK2*, *TNFAIP3*, *IFNGR1*, *LIN28B*, and *PERP*) were simultaneously amplified by

PCR in a single reaction with dye-labeled primers. An additional fragment corresponding to exon 7 of the *CECRI* gene, located on chromosome 22q, was co-amplified as a control. Primer sequences and the location and length of the fragments are shown in Table 2 in supplementary material. A total of 2 μ L of the PCR product was resuspended in a mix containing 19.75 μ L deionized formamide and 0.25 μ L GeneScan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems). PCR products were run on an ABI PRISM sequencer, and data were analyzed with Peak Scanner v.1.0 software (Applied Biosystems). In this analysis, the peak height of each patient sample was compared with the mean peak height of samples from healthy controls. The copy number of each tested fragment was expressed as the following ratio: (peak height of the tested fragment for the patient / peak height of *CECRI* for the patient) / (mean peak height of the tested fragment for controls / mean peak height of *CECRI* for the controls). Ratios < 0.75 were indicative of deletion. Positive results were confirmed in a second independent QMPSF assay. Primers were designed by Prestagen (Bois-Guillaume, France).

QMPSF Primers	
<i>HACE1</i> Exon 1	F 5'-GATAGGGTTAGTCAGTTACATCTCGCCTGGGCCCCGTCC-3' R 5'-CGTTAGATAGTATCATGGCGGCGGGGTGTACTGTAG-3'
<i>HACE1</i> Exon 2	F 5'-GATAGGGTTACCTCTGGTATTCTGCATTATTCTT-3' R 5'-CGTTAGATAGTCAGCCATAACCATTGGCATT-3'
<i>HACE1</i> Exon 3	F 5'-GATAGGGTTAGCAGCTAAAGAGTTGTAACTTGA-3' R 5'-CGTTAGATAGCCGAATGCATAATTGACATCAAATT-3'
<i>HACE1</i> Exon 4	F 5'-GATAGGGTTAAGTTTTCTTAAGTGGCTTAAGTTG-3' R 5'-CGTTAGATAGAGAAAATAAAATATGCACCATTATTTTAGTTTTCC- 3'

<i>HACE1</i> Exon 5	F 5'-GATAGGGTTACGCTGATGTCAACATTTGTAAT-3' R 5'-CGTTAGATAGGAGATTGCAGTGAGCACAGATT-3'
<i>HACE1</i> Exon 6	F 5'-GATAGGGTTAGCCCAGCTGAGAAATAACATTATT-3' R 5'-CGTTAGATAGAAAACAAACACATGCAGCTTA-3'
<i>HACE1</i> Exon 7	F 5'-GATAGGGTTAACTTTGCTTGCAGGTATGATATTT-3' R 5'-CGTTAGATAGTGGGAAAACAAGAGAGCTTTAG-3'
<i>LIN28B</i> Exon 1	F 5'-GATAGGGTTACGGAGTGATCTTCTGCATCAA-3' R 5'-CGTTAGATAGTTGACAAAGTCACGTGTGCTC-3'
<i>GRIK2</i> Exon 16	F 5'-GATAGGGTTAAAAACCTCTTTTAGTAAGTTTCAAAAG-3' R 5'-CGTTAGATAGGAATCTTCTATTTGGTTAGTGCCAC-3'
<i>TNFAIP3</i> Exon 2	F 5'-GATAGGGTTATGGATGTTTCTGTGCGATGAGG-3' R 5'-CGTTAGATAGAGAGAACTCCAGAAGACATTTTTTAA-3'
<i>TNFAIP3</i> Exon 3	F 5'-GATAGGGTTAGCAGATTTGAGAGACTCCAGTTGC-3' R 5'-CGTTAGATAGATGCATGCCACTTCTCAGTACAT-3'
<i>TNFAIP3</i> Exon 4	F 5'-GATAGGGTTAGGATGTTGCAAAGGACAAATAT-3' R 5'-CGTTAGATAGATCAAAATGGCTTCCACAGAC-3'
<i>IFNGR1</i> Exon 1	F 5'-GATAGGGTTAATGCTCACACCCTGCATGACAA-3' R 5'-CGTTAGATAGTTGGAGGGCAGTGCTGGGCTGG-3'
<i>CECRI</i> Exon 7	F 5'-GATAGGGTTAGAGCTCTCCAAGTGCATAAAT-3' R 5'-CGTTAGATAGCCAGCTGATTTTTGCATTTTTAG-3'

Table 2 : QMPSF primers

Methylation analysis

The methylation status of CpG pairs 1–12 in the *HACE1* gene was analyzed by pyrosequencing. Genomic DNA (500 ng) was bisulphite-converted with the EZ DNA Methylation Gold kit (Zymo Research Corporation) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed to amplify the region of interest. Primers were designed with Primer 3. Cycling conditions were as follows: 95°C for 15 minutes; 45 cycles of 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; and 72°C for 5 minutes. Internal and sequencing primers were designed using the PyroMark software (Qiagen). Primer sequences are provided in Supplementary materials Table 3. The PCR control DNA set (Qiagen S.A) containing unmethylated and methylated human bisulphite-converted DNA was used as a control. The level of DNA methylation in the tumors was compared with the median level of methylation in nine normal lymph nodes.

Forward	Reverse	Sequencing
5'-TTTGGGAATGAA TGGAAGGTTTAAT-3'	5'-Biotin-ACACCAAACCATT CCACTAAAACCCTAC-3'	5'-AATGAATGGAAG GTTTAATT-3'

Table 3 : Pyrosequencing primers

Chromatin immunoprecipitation

Ramos cells and B lymphocyte control cells were treated with 100 nM TsA (or left untreated) as described earlier. ChIP was performed with a ChIP assay kit (Upstate) according to the

manufacturer's protocol. Briefly, DNA and protein were cross-linked in culture with 1% formaldehyde. For each reaction, 1×10^6 cells were collected in 200 μ l of SDS lysis buffer and sonicated to shear genomic DNA into fragments of 300–1000 bps. Lysates were diluted 1:10 with ChIP buffer and immunoprecipitated with the appropriate antibody overnight at 4°C with agitation. α -Acetyl-histone H3 (Lys9/Lys14) antibodies (Upstate) were used to immunoprecipitate active chromatin fragments whereas α -dimethyl-histone H3 (Lys9) antibodies (Upstate) were used to immunoprecipitate inactive chromatin. Antibody complexes were recovered with protein A beads, and IgG antibody was used as a negative control. DNA was recovered by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction after washing and cross-link reversal. Equal sample volumes were used throughout all steps of the assay such that the quantity of recovered DNA could be compared between samples. The recovered DNA pellet was air dried and resuspended in 20 μ l of H₂O. The amount of immunoprecipitated *HACE1* DNA was determined by qPCR using the Evagreen kit (Biorad) with primers overlapping the CpG-177 island and primers overlapping CpG-88 island (supplementary materials Table 4).

	CpG177 island (region1)	CpG88 island (region2)
Forward	5'ACACGTCCTCACACCCTCTC- 3'	5'CGGCTCACCCCTCGGGCAACTCC-3'
Reverse	5' TTCTTCCTGCTCCTCAGCAC- 3'	5'CGGCGGCGGGTGTACTGTAGGTGGTC-3'

Table 4 : ChIP primers

RNA interference against *HACE1*

A pool of short hairpin interfering RNA (shRNA) lentiviral particles containing five target-specific constructs was used to knockdown the expression of *HACE1* in Ramos and Raji cells (Santa Cruz Biotechnology). Cells were transduced with lentiviral particles according to the manufacturer's instructions, and *HACE1*-deficient cells were selected with 4 µg/ml puromycin (Santa Cruz Biotechnology).

Annexin V/propidium iodide staining and apoptosis analysis

Annexin V (AV) / propidium iodide (PI) labeling was performed with the Beckman coulter Apoptosis Assay Kit (Beckman) according to the manufacturer's instructions followed by flow cytometry analysis.

Flow cytometric analysis of the cell cycle

Transduced cells were fixed in cold 70% ethanol, washed, rehydrated in PBS, and stained with propidium iodide (PI) binding buffer (10 mg/ml RNase A and 10 µg/ml PI) for 30 min at room temperature. The DNA content of the cells was analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson), and 10,000 events were collected.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using Med-Calc (Medcalc Software) or R software. The nonparametric Mann-Whitney test was performed to statistically examine different expression or methylation and deletion patterns between groups. The limit of significance for all analyses was defined as a P-value of 0.05.

Results

***HACE1* is down-expressed in tumor samples and cell lines derived from B-cell malignancies compared with normal B-cells.**

We determined *HACE1* mRNA levels by real-time PCR. *HACE1* transcripts were amplified with primers specific for the 19th and 20th exons, which amplify all *HACE1* isoforms, and *TBP* was also amplified as an internal control for normalization. The *HACE1* mRNA levels were lower in tumor samples than in normal lymph nodes (Figure 1A). We then performed Q-RT-PCR to examine the expression levels of *HACE1* mRNA in four cell lines from various B lymphoid malignancies. Although the expression of *HACE1* mRNA varied among the cell lines examined, the abundance of *HACE1* mRNA was lower in the four cell lines than in B lymphocyte control cells from peripheral blood (Figure 1B). Differential levels of HACE1 cytoplasmic protein, but not nuclear protein, were found among the DLBCL tumors. Fifty-three percent of cases displayed strong expression (+++), 10% intermediate expression (++) and 37% weak expression (+) (Figure 2). These data, when taken together, confirm that HACE1 can be down-regulated in some B-cell lymphoma tumors.

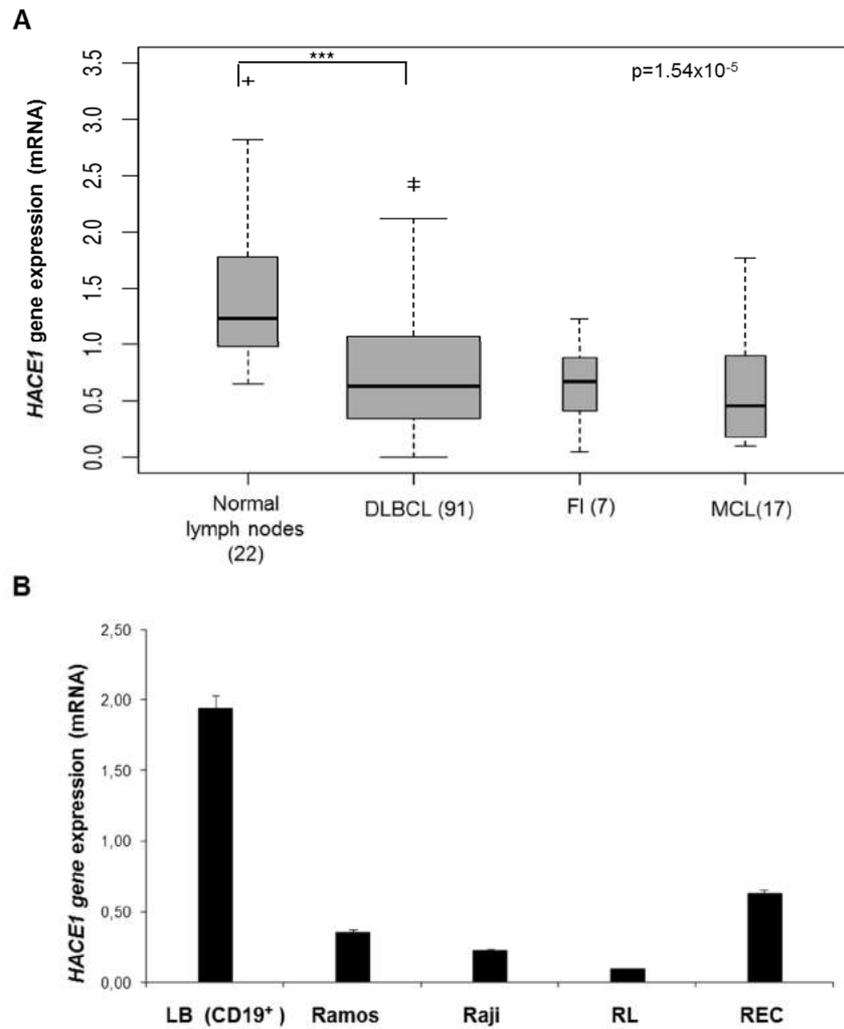


Figure 1: Down-regulation of *HACE1* expression in B-lymphoma tumors and B-lymphoma cell lines.

A: *HACE1* expression by quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) in cryopreserved B-lymphoma tumor cells from 125 patients (101 Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), 17 Follicular lymphoma (FL), 10 Mantle cell lymphoma (MCL) and normal lymph nodes cells from 22 normal patients. Data are means of two experiments $***P < 0.001$. **B:** Quantification of *HACE1* mRNA in B-lymphoma cell lines and lymphocyte control cells from peripheral blood. The *HACE1* mRNA expression in cell lines was determined with qRT-PCR. B cells from normal blood donors isolated from peripheral blood mononuclear cells were used as control. Data are means \pm SDs of three experiments.

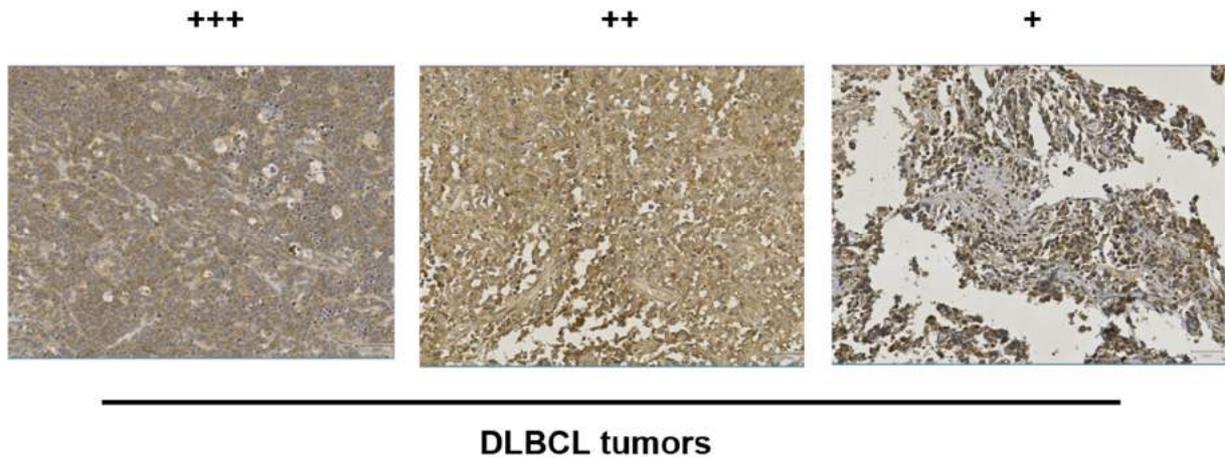
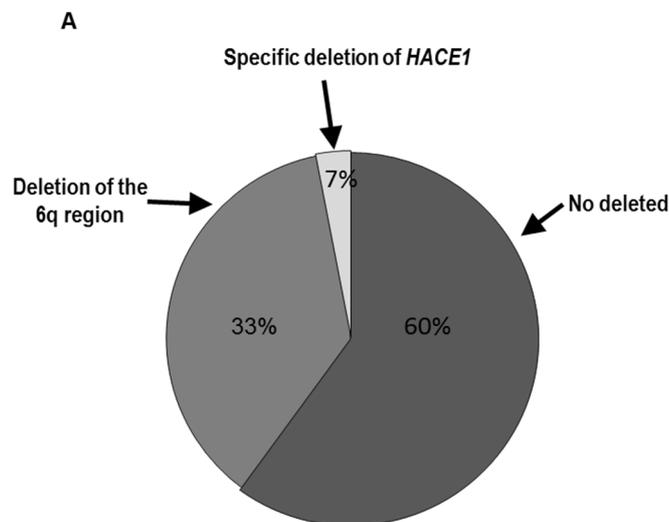


Figure 2: Representative HACE1 staining in paraffin-embedded tissues from DLBCL tumors (magnification x200)
 Samples were scored according to staining intensity as + (low), ++ (intermediate) and +++ (high).

Deletions in *HACE1* are common and lead to gene down-regulation in tumors.

We sought to identify the mechanism resulting in the down-regulation of *HACE1*; therefore, we determined the copy number of *HACE1* in 91 DLBCL samples and the four cell lines. Heterozygous deletions of *HACE1* were observed in 40% of cases (36/91). Moreover, seven of the 36 deletions (20%) were specifically located in the *HACE1* gene (Figure 3A). *HACE1* was not deleted in any of the B-cell lymphoma cell lines and in B lymphocyte control cells from peripheral blood. *HACE1* mRNA levels were significantly lower in patients with deletions than in patients without deletions (Figure 3B).



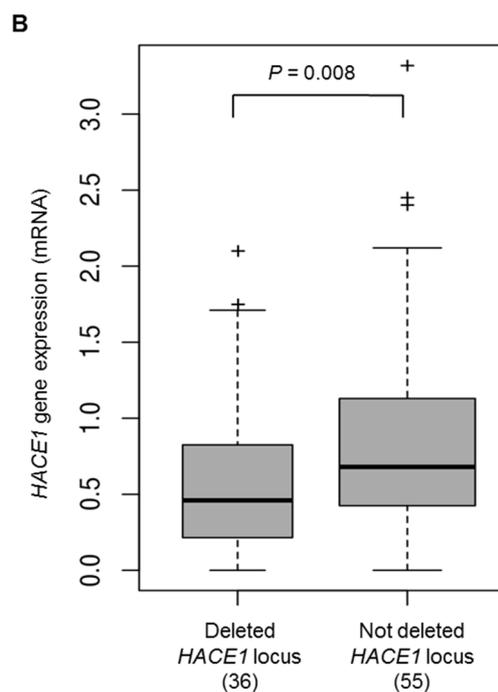


Figure 3: Deletion of *HACE1* locus localized in the 6q16 region in DLBCL.

A: The graphic represents deletion of the 16q16 region in 91 DLBCL samples. Deletion status was determined by QMPSF analysis. **B:** Quantitative analysis of *HACE1* mRNA levels in deleted and intact *HACE1* loci. Differences between groups were determined using the Mann-Whitney test (p value = 0.008). ****P** < 0.01.

The CpG177 island in the *HACE1* promoter is hypermethylated in B-cell lymphoma.

We also sought to determine whether epigenetic mechanisms contribute to the down-regulation of *HACE1* expression. To evaluate the association between DNA methylation status and *HACE1* expression in B-lymphoma cases, we firstly used methylation-sensitive PCR (MS-PCR) to assess the pattern of DNA methylation within two defined CpG islands (CpG88 and CpG 177). We found a better evidence for cytosine methylation at CpG-177 than the CpG island around the *HACE1* TSS called CpG88 (data not shown). Thus, we performed pyrosequencing to quantify methylation at CpG177 sites in the *HACE1* promoter in samples and cell lines. The "methylated" status was assigned to every site / sample pair with a methylation level significantly higher than normal lymph nodes samples in the same site. A

CpG site was considered "methylated" in every sample showing a methylation level significantly higher than normal lymph node samples in the considered site ($p < 0.05$). Probabilities were computed considering the methylation levels observed in lymph node samples as normally distributed, with means ranging from 21.0% to 37.8% and standard deviations from 0.0346% to 0.0740%. Bonferroni corrections for multiple testing were finally applied site by site, resulting in de facto thresholds ranging between 37.3% and 56.7% from a CpG site to another. (Figure 4A). These pyrosequencing results revealed that CpG177 is hypermethylated in a large proportion of patient samples (60%) compared with the normal lymph nodes. All cell lines examined were also hypermethylated whereas B lymphocyte control cells from peripheral blood. Otherwise, we did not find any correlation between methylation levels and HACE1 gene expression (figure 4B).

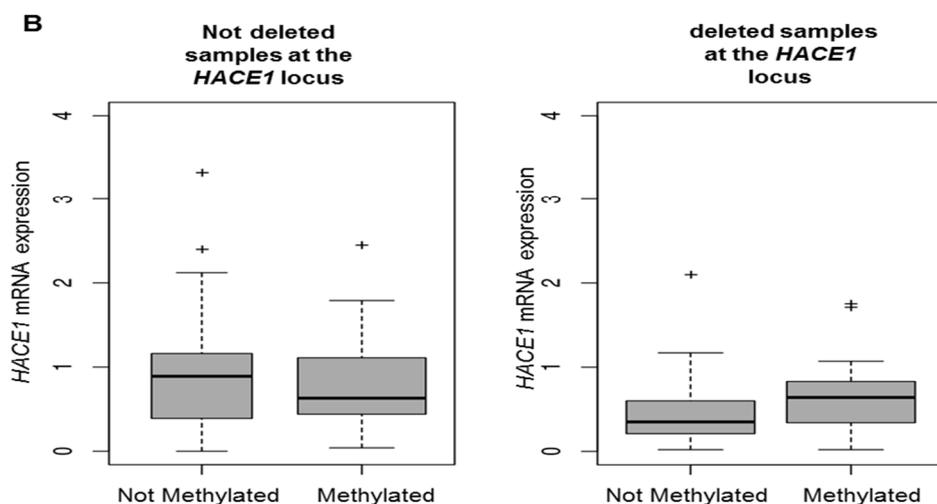
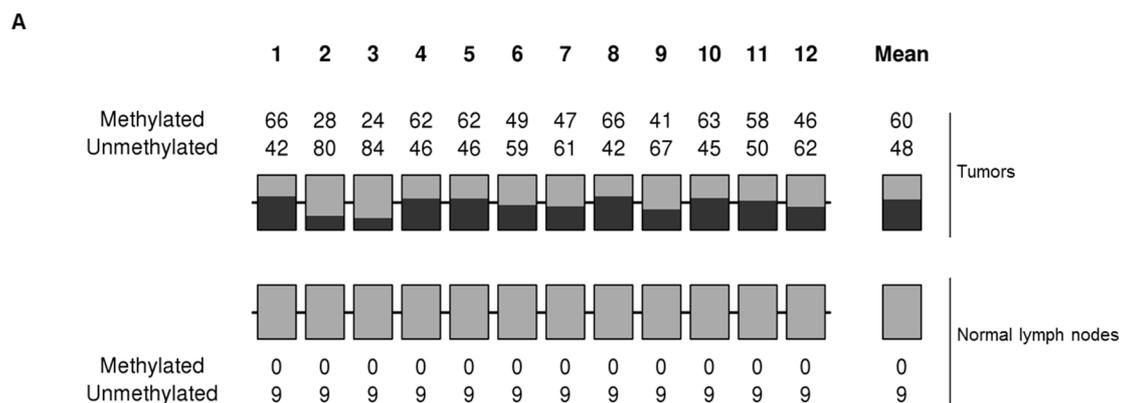


Figure 4: Hypermethylation of *HACE1* promoter at the CpG-177 island in B-cell lymphoma.

A: Each box corresponds to a CG position in the CpG 177 island. Colored bars represent the aggregated methylation status determined by pyrosequencing at each position (black, methylated and grey, unmethylated). Numbers above or below each bar indicate the total number of methylated and unmethylated samples at each CG position. B: Quantification of *HACE1* mRNA expression levels in B-cell lymphoma tumors according to methylation status. The results from the Mann-Whitney test were not significant

The DNA methyltransferase inhibitor 5Aza-dC did not affect *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines despite its demethylation effect.

Then, we tested the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-dC on *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines (Figure 2A in supplementary data). Cell lines (Ramos, RL and Raji cells) were treated with 5-Aza-dC during 5 days (or left untreated), and *HACE1* mRNA were determined by Q-RT-PCR. We found that 5-Aza-dC did not modify the level of *HACE1* mRNA expressed in any of the cell lines despite its demethylation effect (Figure 2B in supplementary data). These results suggest that DNA methylation is not directly involved in the down-regulation of *HACE1* expression in these cell lines.

HDAC inhibitors (TsA) increase *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines.

We inspected the effect of HDAC inhibitors, TsA, on *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines to understand the mechanisms causing altered *HACE1* expression. The cell lines (Ramos, RL and Raji) were treated with TsA for 24 h (or left untreated), and *HACE1* mRNA levels were determined by Q-RT-PCR (Figure 5). For each of the cell lines tested, *HACE1* mRNA levels were higher in cells treated with TSA than in untreated cells. These results suggest that histone hypoacetylation is partly responsible for the down-regulation of *HACE1* expression in B-cell lymphoma cell lines. Thus, it appears that the down-regulation of expression of *HACE1* in cell lines is partly due to epigenetic regulation involving histone acetylation.

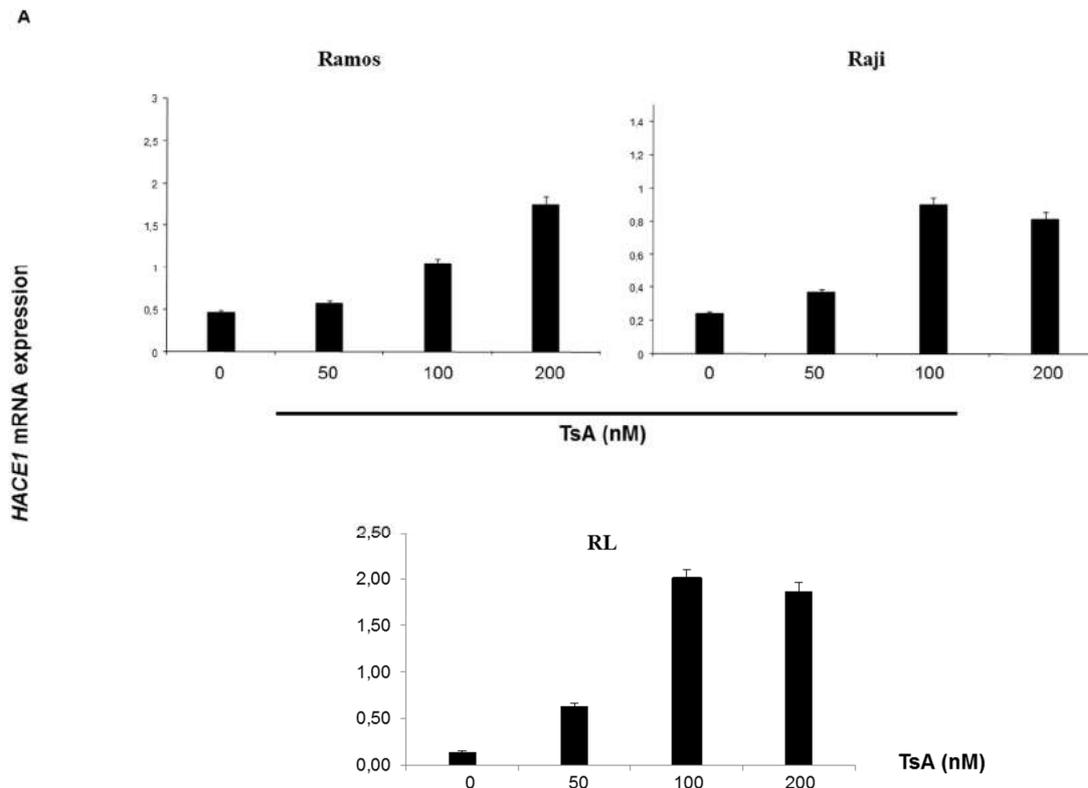


Figure 5: Effect of Trichostatin A (TsA) on *HACE1* re-expression in B-cell lymphoma cell lines.

Ramos, RL and Raji cells were treated with various concentrations (x-axis) of TSA as indicated for 24 h.

The *HACE1* promoter presents inactivating histone marks in Ramos cell line.

We performed ChIP assays with polyclonal antibodies against acetylated histone H3 to examine the acetylation status of H3 histones associated with *HACE1* gene promoter in the B-lymphoma cell line Ramos and B lymphocyte control cells from peripheral blood. In particular, we analyzed those histones associated with *HACE1* promoter around the CpG88 and CpG177 islands (Figure 6A). Levels of histone H3 acetylation in the *HACE1* promoter were lower in Ramos cells compared to B lymphocyte control cells (Figure 6B). Treatment of Ramos cells with TsA resulted in acetylation level increase of histone H3 and increased *HACE1* expression

(Figure 7A and B), suggesting that the low expression of *HACE1* in this B-cell lymphoma cell line is partly due to the hypoacetylation of histone H3.

As well we examined the methylation status of histone H3-lysine (K) 9 by ChIP because methylation at this residue is associated with inactive genes. In Ramos cells we found the *HACE1* promoter region to be enriched with dimethylation of Lysine 9 on histone H3 (H3K9me2) as compared to LB cells (figure 6B). ChIP assay with TsA treatment showed reduced expression of the H3K9me2 histone mark in the treated Ramos cells within the *HACE1* promoter. This suggests that hypermethylation of histone H3-K9 may be involved in the down-regulation of *HACE1* gene expression in Ramos cells. Collectively, these results indicate that epigenetic mechanisms play an important role in the down-regulation of *HACE1* expression in B- lymphoma cells.

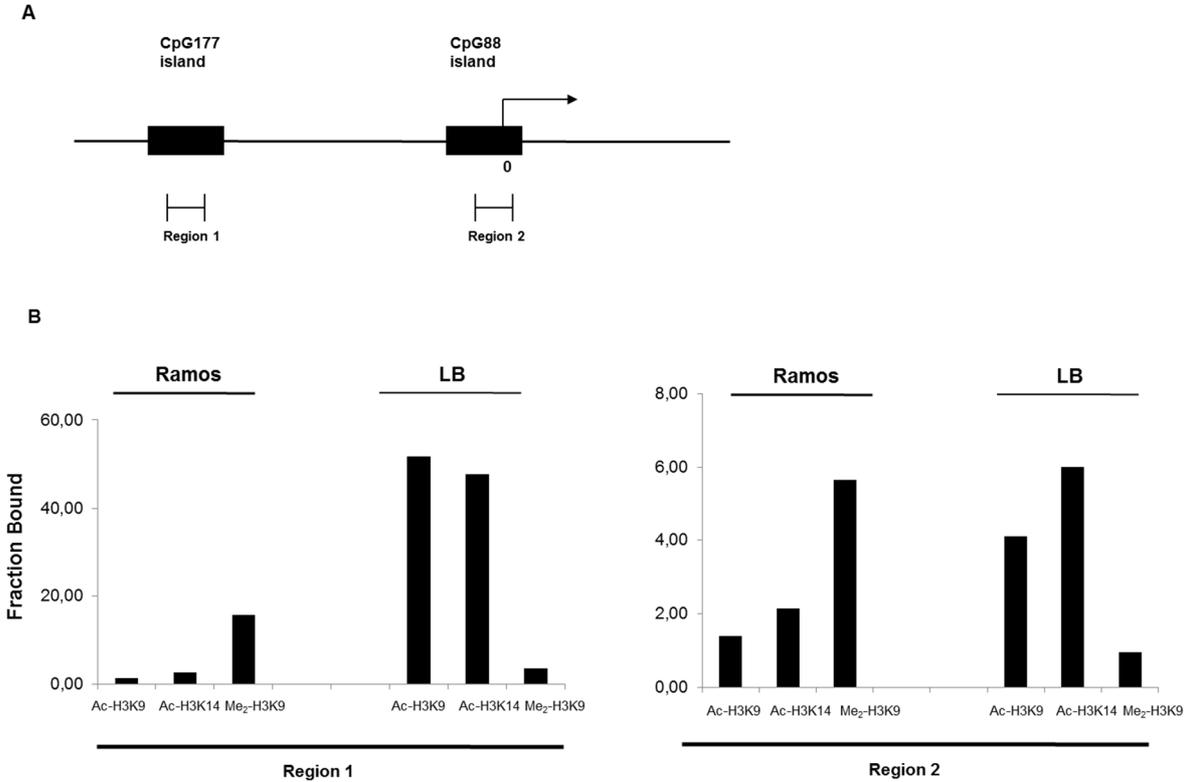


Figure 6: Ramos cells are enriched with histone H3K9me2 and desacetylated compared to LB cells. A: Two regions of the *HACE1* promoter were targeted by ChIP assay. **B:** Quantitative ChIP assay of acetylated and methylated histone around the promoter of *HACE1*.

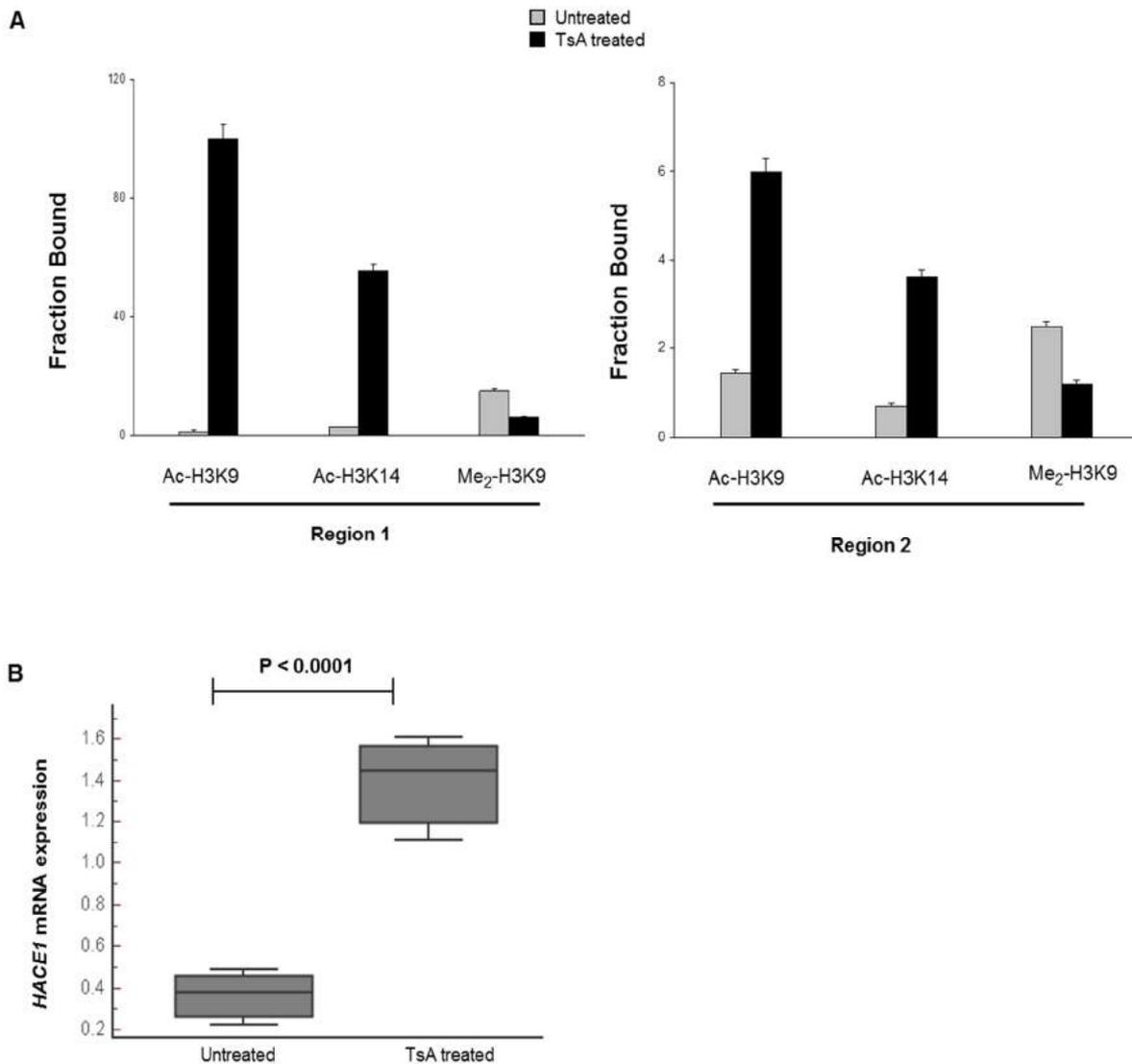


Figure 7: Transcriptional silencing of *HACE1* in Ramos cells is associated with histone modifications.

A: Quantitative ChIP assay of histone modifications around the promoter by TSA treatment. The levels of acetylated (active marker) and methylated (repressive marker) Histone 3 (H3) were determined using antibodies directed against acetylated H3 and methylated H3 in Ramos cells treated with TsA or left untreated. The fraction bound represents the fold increase or decrease in the amount of the *HACE1* promoter in the acetyl-histone or methyl-histone antibody immunoprecipitated (IP) DNA normalized by the level of nonspecific IgG antibody immunoprecipitated DNA. Data are representative of three independent experiments. **B:** Quantitative analysis of *HACE1* mRNA levels in untreated Ramos cells and those treated by TsA. Mann-Whitney test *p*-value < 0.0001

Down-regulation of *HACE1* in lymphoma cell lines leads to cell cycle progression and resistance to staurosporine-induced apoptosis.

HACE1 regulates proteins that control cell survival, such as cyclin D1. We sought to analyze the role of *HACE1* in the control of apoptosis and cell cycle in Ramos and Raji cells; therefore, we inhibited *HACE1* expression by shRNA targeting *HACE1* (figure 3 in supplementary data). We treated transduced Ramos and Raji cells with 10 μ M staurosporine for 3 hours to induce apoptosis and analyzed apoptosis levels by annexin/PI staining. In Ramos and Raji cells transduced with control shRNA, staurosporine treatment resulted in 34% and 27% apoptosis, respectively. However, in cells transduced with *HACE1* shRNA, staurosporine treatment led to apoptosis in approximately 21% of Ramos cells and 16% of Raji cells (figure 7A). In addition, the proportion of viable cells following staurosporine treatment was higher among cells transduced with *HACE1* shRNA than among cells transduced with control shRNA (figure 7B). These results demonstrate that the down-regulation of *HACE1* expression in B-lymphoma cells confers resistance to staurosporine-induced apoptosis, suggesting that *HACE1* is involved in the regulation of apoptosis in these cells. We subsequently used flow cytometry to monitor differences in cell cycle distribution between control cells (transduced with control shRNA) and cells transduced with *HACE1* shRNA. The proportion of cells in the G1 phase was significantly lower in the *HACE1*-deficient cells than in control cells. The same trend was observed among cells in the S and G2/M phases (Figure 8). This suggests that the down-regulation of *HACE1* expression induces cell cycle progression at the S and G2/M checkpoints.

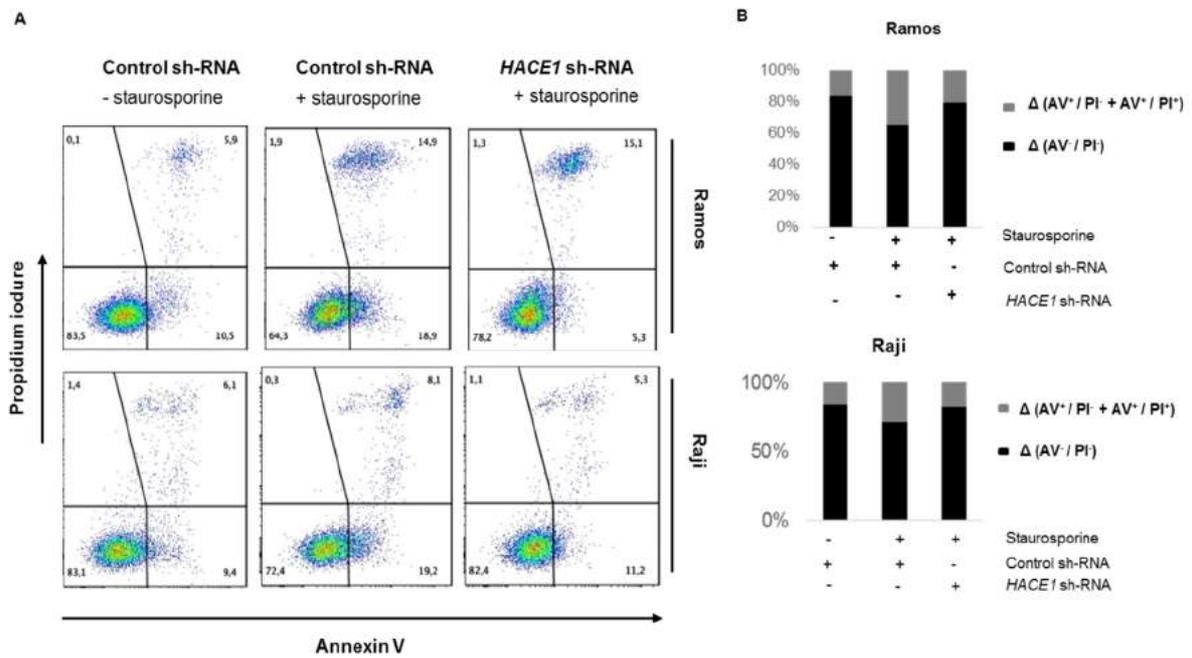


Figure 8: Down-regulation of *HACE1* expression leads to resistance to staurosporine-induced-apoptosis in Ramos and Raji cell lines.

A: Staurosporine-induced cell death assayed by AV/PI double staining and flow cytometry. B-cell lymphoma cell lines Ramos and Raji transduced with control shRNA or anti- *HACE1* shRNA. Cells were stimulated with 10 μ M staurosporine for three hours before apoptosis analysis. **B:** The histograms represent the mean proportions of AV⁺/PI⁻ and (AV⁺/PI⁻ + AV⁺/PI⁺) cells obtained from three independent experiments.

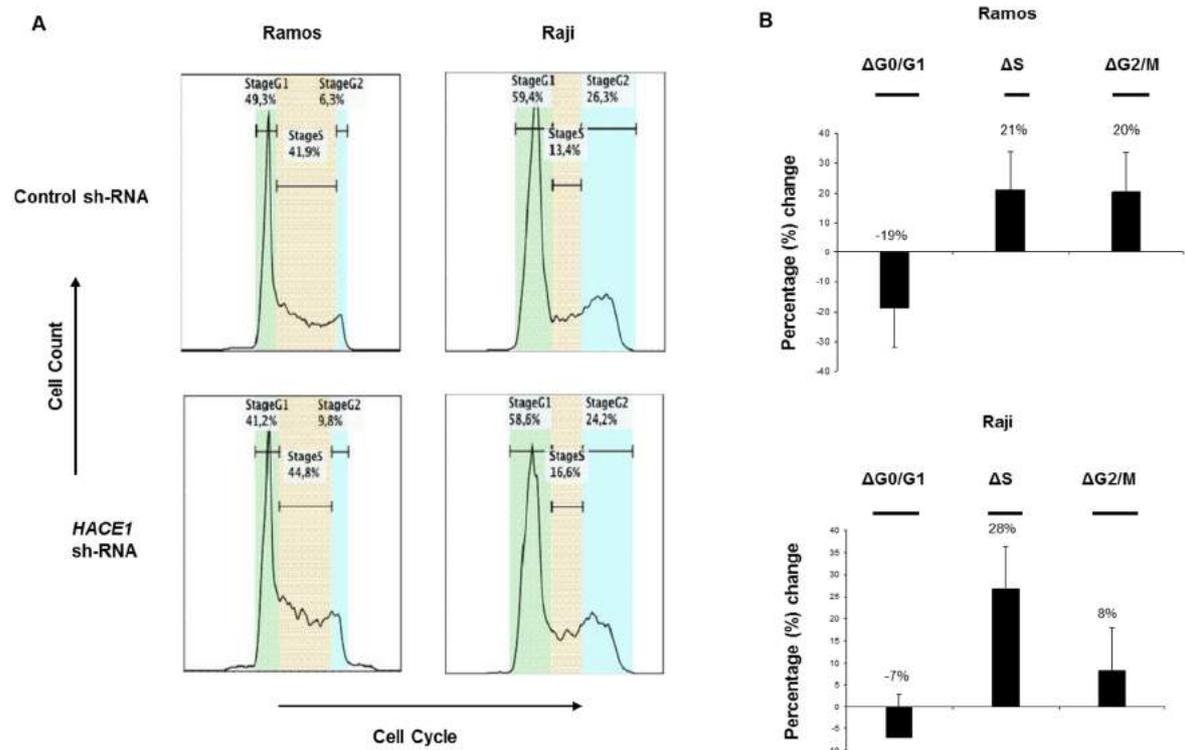


Figure 9: Down-regulation of *HACE1* in Ramos and Raji cell lines increased cell accumulation in the S and G2/M phases.

A: Control shRNA- or *HACE1* shRNA-transduced Ramos or Raji cells were stained with propidium iodide. Cell cycle profiling for each population was determined by flow cytometry. **B:** Graphic representation of variations in the percentage of cells at each stage of the cell cycle. *HACE1* down-regulation leads to S and G2/M phases cell cycle progression in Ramos and Raji cell lines. Data expressed as $[(\%HACE1 \text{ sh-RNA} / \%control \text{ sh-RNA})-1] \times 100$ are means \pm SD from three independent experiments.

Discussion

Here, we found that *HACE1* is down-expressed in B cell lymphoma. The *HACE1* gene, which is located at 6q16.3, has been shown to be altered in T cell malignancies¹² through deletion and DNA methylation, and its alteration may play a crucial role in NK cell lymphomagenesis¹². However, *HACE1* expression in B-cell lymphoma, the most common type of lymphoma, had not been explored. Here, we found that *HACE1* downregulation was due, at least in part, to deletion and altered epigenetic regulation. Deletions of the long arm of chromosome 6 occur at a relatively high frequency (50%) in leukemia/lymphoma, and they are frequently observed in 6q21²⁰. In our study, the copy number analysis of this region in B-cell lymphoma tumors showed that a 6q deletion occurs in approximately 40% of patients. These deletions result in the down-regulation of expression of *HACE1* and other tumor suppressor genes such as *TNFAIP3*²¹. Furthermore, we identified heterozygous deletions specifically involving *HACE1* and not other genes located within 6q region, which strongly supports our hypothesis that *HACE1* is a haploinsufficient tumor suppressor gene in B cell lymphoma. Haploinsufficiency or abnormalities in several tumor suppressor genes at this locus (*TNFAIP3*, *PRDM1*, *HACE1*) may provide an additive or synergistic growth advantage during the neoplastic transformation of LB cells^{8,22}. Nevertheless, in B-cell lymphoma cell lines, the expression of *HACE1* was

down-regulated despite the presence of two intact copies of the gene. Consequently, the expression of *HACE1* may be down-regulated through another mechanism, such as epigenetic regulation^{22,23,24}. We found that *HACE1* was methylated at CpG177 in 60% of cases studied and in all B-cell lymphoma cell lines tested. However, cytosine methylation did not correlate with *HACE1* transcription. In addition, the treatment of B cell lymphoma cell lines with 5-Aza-dC did not affect *HACE1* expression, despite the observed demethylation at the *HACE1* promoter. Although DNA methylation was originally reported to be involved in gene silencing^{25,26}, recent studies have found that DNA methylation can also be positively correlated with transcription or show no correlation at all²⁷. To try understanding these results we used HDAC inhibitor treatment. Thus, treatment of B-cell lymphoma cell lines with histone deacetylase inhibitors (TsA) activated *HACE1* expression. However, the combination of 5-Aza-dC and TsA was not more effective at inducing *HACE1* expression than was TsA alone. The effect of histone deacetylase inhibitors on *HACE1* expression suggests that chromatin modulation plays an important role in regulating *HACE1* expression. Indeed, histone modifications also play an important role in gene silencing, and many histone marks are associated with transcriptional repression^{29,30}. Indeed, histone deacetylation would cause chromatin condensation and repression of gene transcription. Thus, ChIP analysis showed that histone methylation marks associated with gene silencing were enriched at the *HACE1* promoter in B-cell lymphoma cell lines (Ramos) compared to lymphocyte control cells from peripheral blood. Furthermore, TsA-induced expression of *HACE1* correlated with high increase of histone H3 acetylation and a decrease of dimethylated histone H3K9 at the *HACE1* promoter. Recent studies have identified important interplay between DNA methylation and histone methylation and acetylation². Indeed, DNA methylation can induce chromatin remodeling leading to the formation of repressive domains by causing massive histone deacetylation at the methylated sites. Furthermore, hypermethylated CpG islands attract

methyl-CpG binding domain proteins (MBDP: MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 iKaiso) in a self-perpetuating loop and recruit HDACs, leading to transcriptional repression². However, Bachman et al. used a genetic approach to show that histone modification can occur independently of DNA methylation and that DNA methylation serves to 'lock in', rather than initiate gene repression³¹. Our results also provide an example of this interplay between DNA methylation and histone modifications (methylation and acetylation). Further research will be required to clear this question.

The various identified targets of *HACE1* (*RAC1*, *RAR* and cyclin *D1*) suggest its involvement in cell proliferation and survival, which are important for lymphomagenesis^{6,7}. Indeed, it was shown that Rac1 Inhibited apoptosis in Human Lymphoma Cells by Stimulating Bad Phosphorylation on Ser-75³². Regarding Cyclin D1, a protein with known oncogenic potential, is downregulated in normal mature B lymphocytes. Its high expression detected in a number of malignancies, including B-cell lymphomas, may be important for oncogenesis³³. Moreover, Manshouri T et al suggested that *RAR* α is necessary for appropriate response of the *RAR* β and *RAR* γ genes to physiologic changes and deregulation of the *RAR* α in transgenic mice, which resulted in upregulation of *RAR* β and *RAR* γ , can be associated with lymphomagenesis³⁴. A recent study reported that up-regulation of *HACE1* expression can lead to apoptosis and G2/M cell-cycle arrest in T cell malignancies¹². In our study, down-regulation of *HACE1* expression by shRNA promoted resistance to apoptosis and S and G2/M cell cycle progression in two B-cell lymphoma cell lines. We first chose to down-express *HACE1* in ramos and raji despite of its low expression in these cell lines to observe the potent role of tumor suppressor of *HACE1*. We will have to re-express *HACE1* in these cell lines to confirm these results. Finally, *HACE1* is a putative tumor suppressor gene located within the 6q16.3 region, and our data provide a comprehensive characterization of the epigenetic mechanisms leading to *HACE1* deregulation in B-cell lymphoma tumors. These results support the notion that control of

HACE1 expression in these tumors is associated with chromatin modifications. These findings show why treatment with HDAC inhibitors can increase *HACE1* expression. *HACE1* re-expression and patterns of methylation and acetylation provide a rationale to test epigenetic therapy in B-cell lymphoma patients.

Reference list

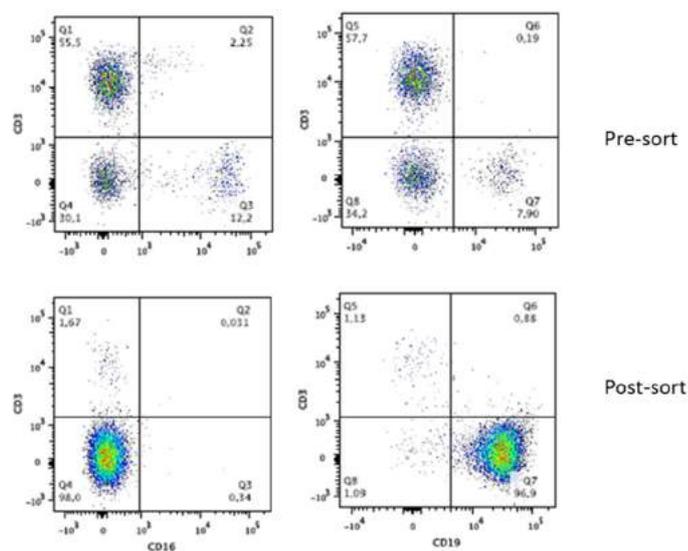
- ¹ Baylin S.B. & Herman J.G. (2000) "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics". *Trends Genet TIG*, 16: 168–174.
- ² Fuks F. (2005) "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes". *Curr Opin Genet Dev*, 15: 490–495.
- ³ Zhang L., Anglesio M.S., O'Sullivan M., Zhang F., *et al.* (2007) "The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers". *Nat Med*, 13: 1060–1069.
- ⁴ Anglesio M.S., Evdokimova V., Melnyk N., Zhang L., *et al.* (2004) "Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney". *Hum Mol Genet*, 13: 2061–2074.
- ⁵ Zhao J., Zhang Z., Vucetic Z., Soprano K.J. & Soprano D.R. (2009) "HACE1: A novel repressor of RAR transcriptional activity". *J Cell Biochem*, 107: 482–493.
- ⁶ Mettouchi A. & Lemichez E. (2012) "Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1". *Small GTPases*, 3: 102–106.
- ⁷ Daugaard M., Nitsch R., Razaghi B., McDonald L., *et al.* (2013) "Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes". *Nat Commun*, 4: 2180.
- ⁸ Diskin S.J., Capasso M., Schnepf R.W., Cole K.A., *et al.* (2012) "Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma". *Nat Genet*, 44: 1126–1130.
- ⁹ Hibi K., Sakata M., Sakuraba K., Shirahata A., *et al.* (2008) "Aberrant methylation of the HACE1 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer". *Anticancer Res*, 28: 1581–1584.
- ¹⁰ Sakata M., Yokomizo K., Kitamura Y., Sakuraba K., *et al.* (2013) "Methylation of the HACE1 gene is frequently detected in hepatocellular carcinoma". *Hepatogastroenterology*, 60: 781–783.

- ¹¹ Sakata M., Kitamura Y-H., Sakuraba K., Goto T., *et al.* (2009) "Methylation of HACE1 in gastric carcinoma". *Anticancer Res*, 29: 2231–2233.
- ¹² Küçük C., Hu X., Iqbal J., Gaulard P., *et al.* (2013) "HACE1 is a tumor suppressor gene candidate in natural killer cell neoplasms". *Am J Pathol*, 182: 49–55.
- ¹³ Coiffier B., Lepage E., Briere J., Herbrecht R., *et al.* (2002) "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma". *N Engl J Med*, 346: 235–242.
- ¹⁴ Witzig T.E., Hu G., Offer S.M., Wellik L.E., *et al.* (2014) "Epigenetic mechanisms of protein tyrosine phosphatase 6 suppression in diffuse large B-cell lymphoma: implications for epigenetic therapy". *Leukemia*, 28: 147–154.
- ¹⁵ Ruminy P., Etancelin P., Couronné L., Parmentier F., *et al.* (2011) "The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma". *Leukemia*, 25: 681–688.
- ¹⁶ Lanic H., Mareschal S., Mechken F., Picquenot J-M., *et al.* (2012) "Interim positron emission tomography scan associated with international prognostic index and germinal center B cell-like signature as prognostic index in diffuse large B-cell lymphoma". *Leuk Lymphoma*, 53: 34–42.
- ¹⁷ Casilli F., Di Rocco Z.C., Gad S., Tournier I., *et al.* "Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments". *Hum Mutat* 20: 218–226.
- ¹⁸ Jardin F., Ruminy P., Kerckaert J-P., Parmentier F., *et al.* (2008) "Detection of somatic quantitative genetic alterations by multiplex polymerase chain reaction for the prediction of outcome in diffuse large B-cell lymphomas". *Haematologica*, 93: 543–550.
- ¹⁹ Jardin F., Jais J-P., Molina T-J., Parmentier F., *et al.* (2010) "Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study". *Blood*, 116: 1092–1104.

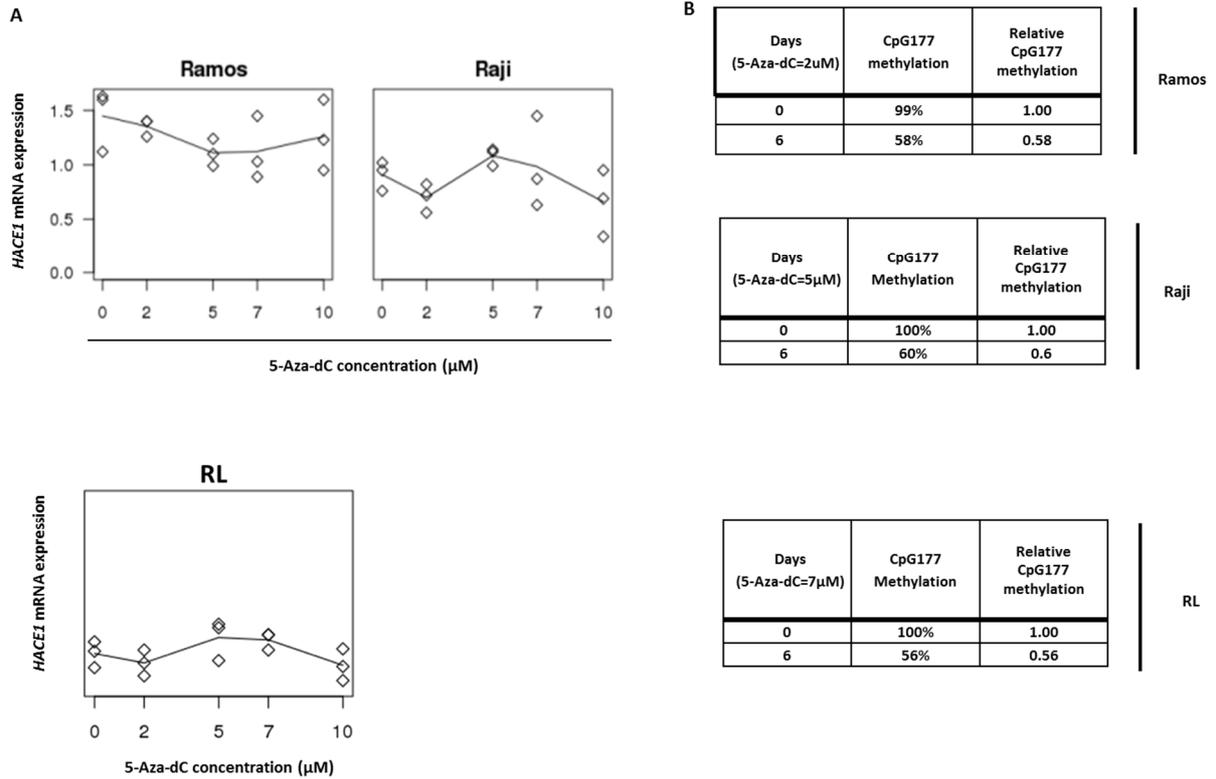
- 20 Thelander E.F., Ichimura K., Corcoran M., Barbany G., *et al.* (2008) "Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia". *Leuk Lymphoma*, 49: 477–487.
- 21 Honma K., Tsuzuki S., Nakagawa M., Tagawa H., *et al.* (2009) "TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas". *Blood*, 114: 2467–2475.
- 22 Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M. & Issa J.P. (1998) "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia". *Adv Cancer Res*, 72: 141–196.
- 23 Baylin S.B., Belinsky S.A. & Herman J.G. (2000) "Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise". *J Natl Cancer Inst*, 92: 1460–1461.
- 24 Jones P.A. & Baylin S.B. (2007) "The epigenomics of cancer". *Cell*, 128: 683–692.
- 25 Herman J.G. & Baylin S.B. (2003) "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation". *N Engl J Med*, 349: 2042–2054.
- 26 Holliday R. & Pugh J.E. (1975) "DNA modification mechanisms and gene activity during development". *Science*, 187: 226–232.
- 27 Lister R. & Ecker J.R. (2009) "Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation". *Genome Res*, 19: 959–966.
- 28 Gutierrez-Arcelus M., Lappalainen T., Montgomery S.B., Buil A., *et al.* (2013) "Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation". *eLife*, 2:e00523.
- 29 Nakayama J., Rice J.C., Strahl B.D., Allis C.D. & Grewal S.I. (2001) "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly". *Science*, 292: 110–113.
- 30 Iizuka M. & Smith M.M. (2003) "Functional consequences of histone modifications". *Curr Opin Genet Dev*, 13: 154–160.

- 31 Bachman K.E., Park B.H., Rhee I., Rajagopalan H., *et al.* (2003) "Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene". *Cancer Cell*, 3: 89–95.
- 32 Zhang B.l., Zhang Y. & Shacter E. (2004) "Rac1 Inhibits Apoptosis in Human Lymphoma Cells by Stimulating Bad Phosphorylation on Ser-75". *Mol Cell Biol*, 14: 6205-6214
- 33 Gladkikh A.l., Potashnikova D., Korneva E., Khudoleeva O. & Vorobjev I. (2010) "Cyclin D1 expression in B-cell lymphomas". *Exp Hematol*, 38: 1047–1057
- 34 Manshouri T., Yang Y., Lin H., Stass S.A., *et al.* (1997) "Downregulation of RAR alpha in mice by antisense transgene leads to a compensatory increase in RAR beta and RAR gamma and development of lymphoma". *Blood*, 89: 2507-2515.

Supplementary data

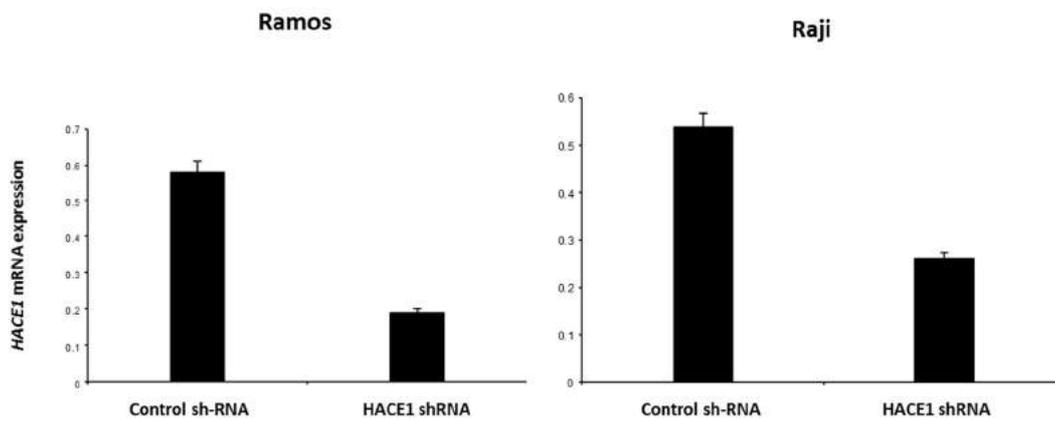


Supplementary figure 1: LB (CD19+) purification



Supplementary figure 2: No effect of 5-Aza-dC on *HACE1* re-expression in B-cell lymphoma.

A: Effect of 5-Aza-dC on CpG177 demethylation detected by pyrosequencing in Ramos, RL and Raji cells. **B:** Effect of 5-Aza-dC on *HACE1* expression in Ramos, RL and Raji cells measured by QRT-PCR.



Supplementary figure 3: Down-regulation of *HACE1* expression by shRNA in Ramos and Raji cell lines.

A pool of short hairpin interfering RNA lentiviral particles containing five target-specific constructs transfected Ramos and Raji cells. *HACE1*-deficient cells were selected with 4Ug/ml puromycin.

I-3- Résultats supplémentaires pour l'article 1

I-3-a Hypométhylation de l'îlot CpG 88 au niveau du promoteur HACE1-

L'îlot CpG 88 contenant 88 dinucléotides CG est situé à 80 kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *HACE1* (Anglesio MS et al Hum. Mol. Genet., 2004). L'expression du gène *HACE1* est régulée négativement dans les tumeurs de Wilms par une hyperméthylation de l'îlot CpG-177 (Zhang L et al Nat. Med. 2007) alors que l'îlot CpG 88 est décrit comme non méthylé et sans impact sur l'expression du gène *HACE1*. Par ailleurs, l'îlot CpG-177 est aussi décrit comme méthylé dans le carcinome gastrique et le cancer colorectal, où une augmentation significative de la taille de la tumeur est associée à une hyperméthylation de *HACE1* au niveau de l'îlot CpG 177 (Sakata M et al Anticancer Res., 2009), (Hibi K et al Anticancer Res . 2008). Pour évaluer la corrélation entre le niveau de méthylation du promoteur *HACE1* et son expression dans le cas des lymphome-B, nous avons effectué une MS-PCR (MSP) afin d'évaluer le niveau de méthylation du promoteur *HACE1* au sein de ces deux îlots CpG 177 et 88. Nous avons observé une hyperméthylation au niveau de l'îlot CpG-177 (quantifié par pyrosequençage voir Article 1) et une hypométhylation au niveau de l'îlot CpG88.

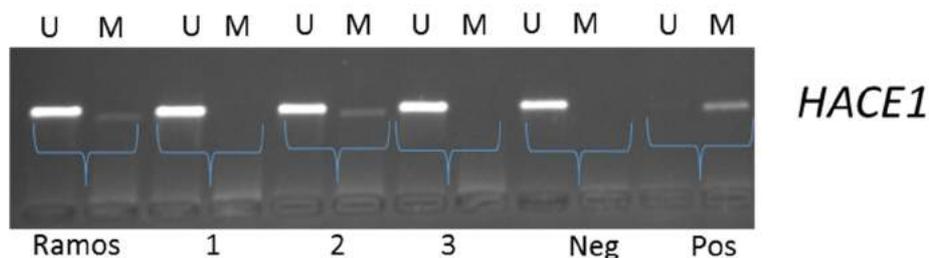


Figure 40: HACE1 promoter methylation at CpG 88 sites by MSP/UMSP PCR in Ramos cell lines and primary DLBCL samples

Left M primer AAGATTTTAAATCGATAGACGTTGC
Right M primer TTACTTTCCAAAACATAAAAAACGAC

Left U primer GATTTTAAATTGATAGATGTTGTGA
 Right U primer TTACTTTCCAAAACATAAAAAACAAC

Primers pour la MSP au niveau de l'ilot CpG 88 du promoteur *HACE1*

I-3-b- Effet de la Trichostatine-A sur l'apoptose des cellules de Lymphome-B

Nous avons montré que le traitement des lignées cellulaires par la TSA (HDACi) pouvait réactiver l'expression du gène *HACE1* dans des lignées cellulaires de lymphome-B (à une concentration de 100nM dans le cas de la lignée cellulaire Ramos). A cette même concentration de TSA, nous observons une augmentation de l'apoptose dans cette lignée cellulaire Ramos.

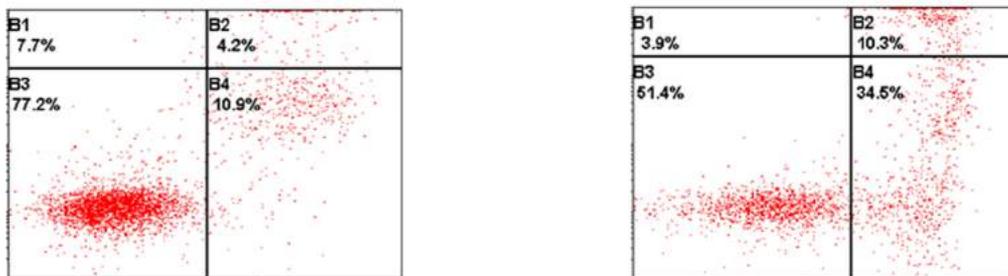


Figure 41: Effet de la TSA sur l'apoptose des cellules Ramos

Ramos avant traitement à la TSA

Ramos après traitement à la TSA (100nM)

I-3-c Résultats de d'hybridation génomique comparative (aCGH) et de profils d'expression génique (GEP)

Nous avons analysé les données de trois puces d'hybridation génomique comparative (aCGH) (44B, 4x44K et 105A). Nous avons observé des délétions du gène *HACE1* dans 35,6% des patients avec un LDGCB (31/87), dont 29,9% de délétions hétérozygotes et 5,7% (5 / 87) de délétions homozygotes.

Ensuite nous avons analysé les données du projet translationnel GHEDI (Deciphering the Genetic Heterogeneity of Diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era) (202 cas de LDGCB) qui ont révélé des délétions récurrentes de la région génomique localisée entre 105.275.259 et 105.337.387 (génomme releaseGRCh37). 46,53% des cas (94/202) ont montré une délétion du gène *HACE1*. En outre, parmi ces 94 patients, 14,9% (14/94) ont montré une délétion spécifique au gène *HACE1* plus exactement de l'exon 1 à 6. Ces résultats nous ont amené à définir *HACE1* comme un nouveau gène suppresseur de tumeur candidat dans les LDGCB.

En outre, les profils d'expression génique (GEP) ont montré une corrélation significative entre le nombre de copie du gène *HACE1* et son niveau d'expression. En effet, *HACE1* est sous-exprimé dans les échantillons présentant une perte de la région minimale commune délétée ($p = 1 \times 10^{-4}$ Figure 46 et Figure 47).

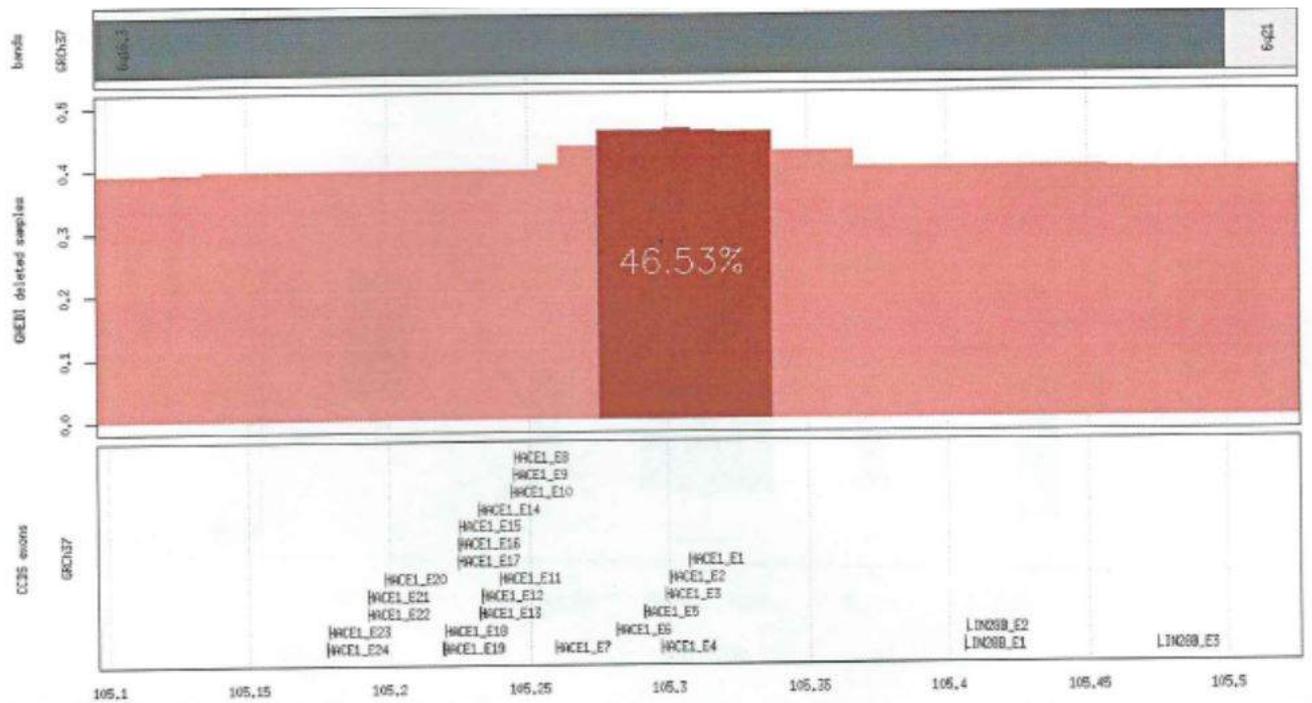


Figure 42: Représentation génomique des délétions du gène HACE1 dans la série GHEDI (aCGH) : les caractéristiques génomiques le long du locus du gène *HACE1* (6q16.3) sont représentées dans les trois bandes parallèles, avec les coordonnées sur le chromosome 6 (en Mo) comme axe X. La bande centrale représente dans chaque emplacement génomique la proportion des 202 échantillons Ghedi qui montre une délétion (rouge clair), tandis que la région commune minimale délétée spécifique à *HACE1* est surlignée en rouge foncé.

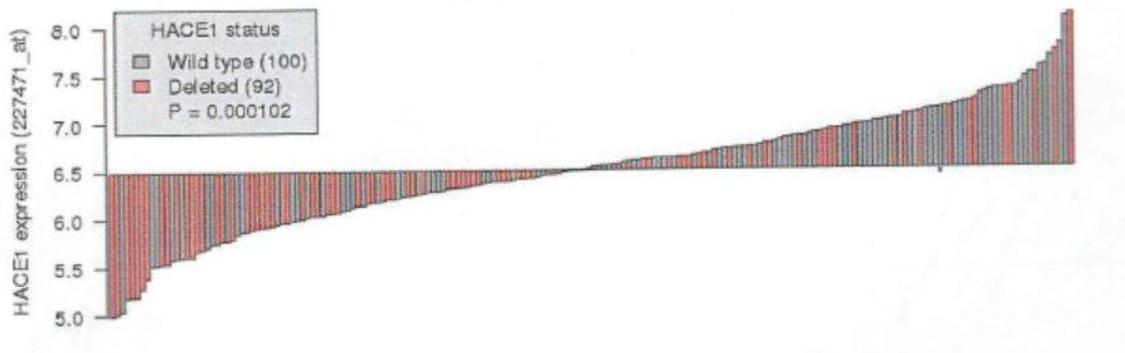


Figure 43: Profil d'expression génique d'HACE1 dans la série GHEDI : Chaque barre représente l'expression du gène *HACE1* chez un patient relativement à l'expression moyenne dans toute la série. Le nombre de copies du gène *HACE1* a été déterminé par aCGH.

I-3-d Résultats cliniques

Nous n'avons observé aucune relation entre les données cliniques et la délétion du gène HACE1 ou avec son niveau d'expression ($p = 0.539$ et 0.435 respectivement). Cependant, nous avons observé une prévalence de délétions du gène HACE1 chez les patients ayant un score élevé en aaIPI (2-3) et en stades avancés (III-IV). En effet, 23/53 (43%) des patients du groupe aaIPI élevé présentaient des délétions HACE1 alors que 10/30 (33%) ont été observés dans le groupe à faible aaIPI. 26/40 (43%) des patients à des stades avancés présentaient des délétions du gène HACE1 alors que 8/24 (33%) présentaient des délétions dans les groupes avec des stades inférieurs. Mais ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs (Fisher's p -value = 0,36).

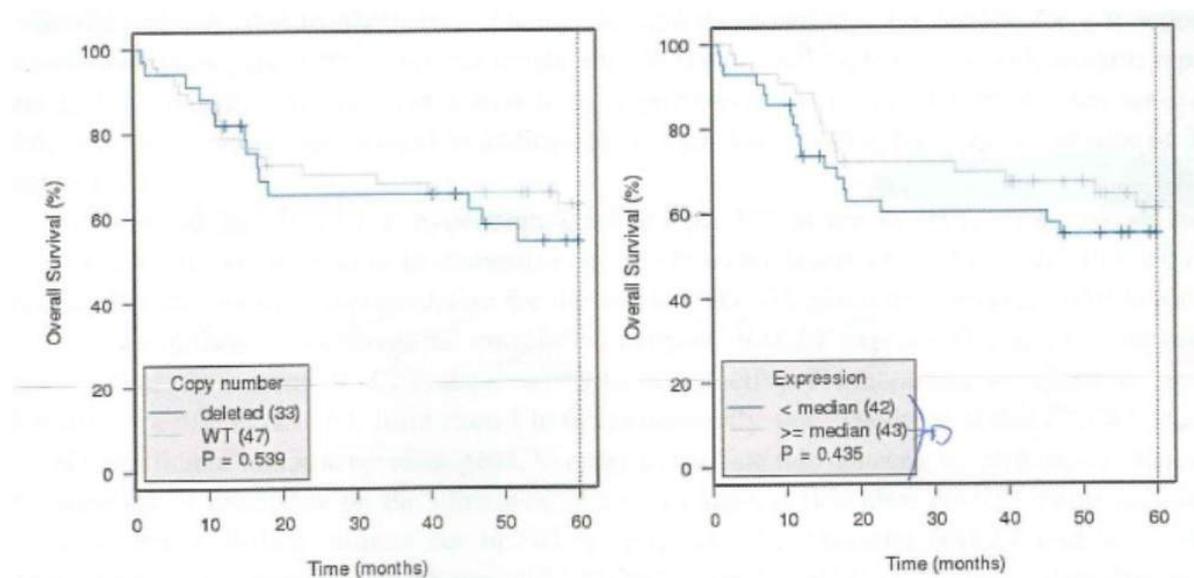


Figure 44: La survie globale selon le statut génomique du gène HACE1 et son niveau d'expression. Méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour analyser les données et les courbes ont été comparées en utilisant le test du log-rank.

II- Article 2

II-1- Résumé Article 2

L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet de la 3-déazaneplanocine A (DZNep) sur l'expression du gène *HACE1* dans le lymphome à cellules B chez l'homme (lignées cellulaires Ramos et Raji) pour explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les lignées cellulaires humaines de lymphome à cellules B, Ramos et Raji, ont été traitées par la DZNep et l'expression du gène *HACE1* a été examinée. L'expression de l'ARNm a été déterminée par RT-PCR. L'effet de la DZNep sur la modification des histones au niveau des lysines 9 et 27 de l'histone 3 associée au promoteur du gène *HACE1* (îlot CpG88 et CpG177) a été examiné par immunoprécipitation de la chromatine et PCR quantitative. Le promoteur du gène *HACE1* autour de l'îlot CpG 88 (peu méthylé) est associé aux marques d'extinction de l'histone H3K27me3 et H3K9me2 dans le lymphome à cellules B mais pas autour de l'îlot CpG 177 (hyperméthylé), qui est seulement enrichi en marques d'extinction de l'histone H3K9me2. L'expression du gène *HACE1* était régulée positivement par le traitement par la DZNep et cet effet était plus marqué lorsque la DZNep était combinée à la trichostatine A (TSA), et les méthylation des histones au niveau de son promoteur étaient significativement réduites (H3K9me2 et H3K27me3). Nos expériences indiquent que le gène *HACE1* peut être régulé négativement par méthylation de la chromatine au niveau de la région de son promoteur (H3K27me3 et H3K9me2), ce qui fait du gène *HACE1* une cible potentielle de la combinaison DZNep / TSA qui est un composé thérapeutique prometteur pour le traitement

du lymphome à cellules B chez l'homme. Ces observations mettent en évidence l'hétérogénéité de la régulation du gène *HACE1* dans le lymphome à cellules B, et indiquent que la réussite de la restauration d'origine médicamenteuse des gènes suppresseurs de tumeur éteints épigénétiquement réside dans la caractérisation précise des mécanismes d'extinction spécifiques à un locus et à un type cellulaire.

II-2 Discussion Article 2

L'inhibition de la prolifération cellulaire par la DZNep a été signalée dans diverses cellules cancéreuses humaines, y compris des cellules de cancer du poumon ou de chondrosarcome et de ^{4,6,7,8}. Nous avons également observé une inhibition de la prolifération des cellules du lymphome B par le DZNep dans notre étude. De plus, notre étude montre que la méthylation des histones H3K9me2 dans la région du promoteur du gène *HACE1* était significativement réduite par la DZNep autour des îlots CpG 88 et CpG 177 alors qu'une diminution de la méthylation H3K27me3 est uniquement observée autour de l'îlot CpG 88. Cette étude est également la première à montrer que la DZNep peut réguler positivement l'expression du gène *HACE1* en modifiant l'état de méthylation des histones. Il a d'abord été signalé que la DZNep modulait la méthylation de l'histone H3K27 en réduisant le complexe PRC2³, et les études ultérieures ont montré qu'elle est un modulateur global de la méthylation des histones^{6,7}. Cette observation étaye les résultats d'une étude récente montrant que la DZNep inhibait l'activité de l'histone méthyltransférase SETDB1 au niveau de l'histone H3K9, ce qui réduit la méthylation de l'histone H3K9⁷. Dans nos précédents travaux, le dosage de la méthylation de l'ADN a révélé un niveau élevé de méthylation de l'ADN dans l'îlot CpG 177, alors que le

niveau était très bas dans l'îlot CpG 88. L'hyperméthylation de l'ADN est un autre mécanisme de régulation épigénétique pour l'inactivation des gènes en aval dans les cellules de mammifères^{12,11,13}. La méthylation élevée de l'îlot CpG 177 observée dans le promoteur du gène *HACE1* indique qu'il était probablement éteint par l'hyperméthylation pendant la leucémogénèse mais dans l'article par Bouzelfen *et al*², aucune corrélation n'a été observée entre le niveau de méthylation de l'ADN et l'expression du gène *HACE1*. De plus, nous avons observé un niveau élevé de H3K27me3 et H3K9Me2 autour de l'îlot CpG 88 alors que l'ADN était peu méthylé. Comme la DZNep avait une action sur l'expression du gène *HACE1* via une diminution du niveau de H3K27me3 et H3K9me2, nous pouvons supposer que l'îlot CpG 88 joue un rôle plus important que l'îlot CpG 177 dans l'expression du gène *HACE1*. Bien que nous n'avons pas évalué le niveau de méthylation des îlots CpG dans le promoteur du gène *HACE1* après traitement par la DZNep, un rapport précédent a démontré que la DZNep avait peu ou pas d'effet sur la méthylation de l'ADN, et ne pouvait donc pas réactiver les gènes éteints par l'hyperméthylation des îlots CpG⁴. Une étude plus approfondie est nécessaire pour surmonter plusieurs limites de cette étude. Un examen plus détaillé de la méthylation des histones après le traitement par la DZNep, comme la méthylation de l'histone H3K27, aiderait à comprendre plus clairement comment la DZNep module l'expression du gène *HACE1*. Seules deux lignées cellulaires humaines de lymphome à cellules B ont été utilisées dans cette étude. Un éventail plus large de lignées cellulaires de lymphome à cellules B, et potentiellement des échantillons primaires des patients, doivent être testés pour confirmer plus clairement l'effet inhibiteur de la DZNep sur le lymphome à cellules B chez l'homme.

Heterogeneous epigenetic regulation of *HACE1* in B-Lymphoma cells

Abdelilah Bouzefen¹, Hafid Kora², Marion Alcantara¹, Jean-Michel Picquenot¹, Philippe Bertrand¹, Sylvain Mareschal¹, Catherine Maingonnat¹, Christian Bastard¹, Hervé Tilly¹, Jean-Baptiste Latouche², Fabrice Jardin¹.

Corresponding author: bouzelfi.a@gmail.com

¹ Henri Becquerel Center, IINSERM U918, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB),

Rouen

² INSERM U1079, Faculty of Medicine of Rouen, iRiB

Funding information: This work was supported by la Ligue Régional de la Lutte Contre le Cancer

Keywords: 3-Deazaneplanocin A, B-cell lymphoma, *HACE1*, histone methylation, DNA methylation, epigenetics

Abstract

We examined the consequences of 3-deazaneplanocin A (DZNep) on *HACE1* expression in human B-cell Lymphoma to investigate fundamental molecular mechanisms that control its expression. We treated the human B-lymphoma cell lines Ramos and Raji with DZNep and examined *HACE1* mRNA expression by RT-PCR. We also studied the effect of DZNep on the

methylation of lysine 9 and 27 of histone 3 (H3K27me3 and H3K9me2) associated with the CpG88 and CpG177 islands of the *HACE1* promoters by chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR. CpG88 (poorly methylated) of the *HACE1* promoter was enriched for histone marks H3K27me3 and H3K9me2 whereas CpG177 (hypermethylated) was only enriched for H3K9me2. DZNep treatment increased *HACE1* gene expression which was further increased by the addition of trichostatine A (TSA), a promising therapeutic compound for the treatment of human B-Lymphoma. Histone methylation (both H3K9me2 and H3K27me3) of the *HACE1* promoter concomitantly decreased. Our experiments suggest that *HACE1* can be downregulated by methylation of its promoter region chromatin (H3K27me3 and H3K9me2), making *HACE1* a potential target for DZNep combined with TSA. These results highlight the heterogeneity of *HACE1* regulation in B-lymphoma and suggest that successful drug-induced restoration of epigenetically silenced tumor suppressor genes will require accurate characterization of cell type- and locus-specific gene silencing mechanisms

Introduction

Epigenetic modification regulates transcription by altering the structure of chromatin without affecting the DNA sequence. Chromatin has a highly ordered structure and consists of DNA and chromosomal proteins, including histones and non-histone proteins. Epigenetic modifications can occur on both DNA and histones. DNA methylation mostly takes place in promoter regions containing repetitive CpG dinucleotides, also known as CpG islands, and usually results in the transcriptional silencing of downstream genes. Histone modification consist mostly of the methylation and acetylation of specific amino acids at the N-terminus of histones. These modifications can either open or close the chromatin structure to affect the

binding of transcriptional factors to the promoters, thus activating or silencing the affected genes¹.

HACE1 is a tumor suppressor gene that encodes a ubiquitin ligase E3 located within the 6q16.3 region. We previously characterized the epigenetic mechanisms leading to transcriptional repression of *HACE1* in B-cell lymphoma tumors and cell lines². The results of this previous study are consistent with the control of *HACE1* expression in these tumors by chromatin modification. The mechanisms involved in the transcriptional repression of *HACE1* are only partially understood, but evidence suggests that promoter hypermethylation (at CpG177) may not be the primary epigenetic alteration in B-cell Lymphoma². We previously showed that *HACE1* expression was lower in B-lymphoma tumors than in control samples and cell lines. However, we found that cytosine hypermethylation (at CpG177) did not correlate with *HACE1* transcription. Moreover, *HACE1* hypermethylation was only observed in the region of CpG177 but not CpG88, and treatment of B-Lymphoma cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) did not restore *HACE1* expression.

We postulated that *HACE1* expression could be upregulated by the inhibitor of histone methylation, 3-Deazaneplanocin A (DZNep), because B-lymphoma cells did not exhibit abnormal *HACE1* methylation in the region of CpG88 in this study. Indeed, the inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) hydrolase, DZNep, inhibited the methylation of histone H3 lysine 27 (H3K27) via the depletion of polycomb-recessive complex 2 (PRC2)³ in genes which are not regulated by DNA methylation⁴. Later studies demonstrated that it is a global inhibitor of histone methylation, including the methylation of H3K9^{5,6,7} and induces apoptotic cell death, and inhibits cell proliferation and migration of cancer cells^{3,5,8}. The effects of DZNep on cancer cells suggest that it may regulate tumor suppressor gene expression, or oncogene expression, by altering their histone methylation status⁴.

The differential DNA methylation of the CpG islands of the *HACE1* gene in the DZNep-induced upregulation of *HACE1* expression suggests that CpG88 plays a more important role in *HACE1* expression than CpG177 which is a hypermethylated island and is not involved in *HACE1* expression. Thus, combining of histone modification agents could restore *HACE1* expression in B-cell lymphoma tumors harboring unusual histone modifications at the *HACE1* promoter.

Materials and methods

Cell lines and culture conditions

The B-cell lymphoma cell lines Ramos (Burkitt lymphoma) and RAJI (Burkitt lymphoma) were obtained from the ATCC. The cell lines were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine. Cells were grown and maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Ramos and RAJI were treated with DZNep (Cayman, final conc. 1.4) for 72 h followed by Trichostatin A (TsA, Sigma, final conc. 100 nM) for 24 h.

ADAM assay

Before and after treatment with DZNep viability of Ramos and Raji Cell lines was measured using an automatic counter cell ADAM (Washington, NanoEntek, MA). Using a kit containing a propidium iodide solution (solution T) and a solution N. The T solution is a fluorescent dye which allowing staining DNA of all cells and N solution allowing detection of all non-viable cells. The difference between these two parameters (T-N) provides the number of viable cells.

Normal B-cell isolation

Fresh blood from healthy donors (HDs) was collected by the Etablissement Français du Sang. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were prepared by Ficoll gradient centrifugation, and B cells were isolated by negative selection using the Dynabeads untouched B-cell kit (DynaLife Technologies) (Figure supplementary data).

Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and 1 µg of RNA was converted into cDNA in a random-primer synthesis reaction using the M-MLV reverse transcriptase kit (Life Technologies). All primer/probe sets were designed to span exon boundaries to eliminate contaminating signal from genomic DNA. The *HACE1* gene-specific primer/probe set (forward: AGTTATTCAGTGGTTCT, probe: [6FAM]CGGGCAGTTCCAGGGTCCCAC [TAMRA], reverse: ACTTCCACCCATGATATTAGCAAAC) was multiplexed using the VIC-MGB-labeled TBP endogenous control primer/probe kit (Applied Biosystems). PCR was carried out using a TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) under standard conditions. An ABI 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) was used to run the PCRs and measure fluorescence at each cycle. Each PCR reaction was performed in triplicate at least twice.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Ramos and RAJI cells were treated with 1.4 (or left untreated) as described earlier. ChIP was performed using a ChIP assay kit (Upstate) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DNA and protein were cross-linked in culture with 1% formaldehyde. For each reaction, 1×10^6 cells were collected in 200 µl SDS lysis buffer and sonicated to shear genomic DNA into

fragments of 300–1000 bps. Lysates were diluted 1:10 with ChIP buffer and immunoprecipitated using the appropriate antibody overnight at 4°C with agitation: α -trimethyl-histone H3 (Lys27) and dimethyl-histone H3 (Lys 9) antibodies (Upstate) were used to precipitate the immunoprecipitation of inactive chromatin. Antibody complexes were recovered using protein A beads, with the IgG antibody as a negative control. DNA was recovered by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction after washing and cross-link reversal. Equal sample volumes were used throughout all steps of the assay such that the quantity of recovered DNA could be compared between samples. The recovered DNA pellet was air dried and resuspended in 20 μ l H₂O. We determined the quantity of immunoprecipitated *HACE1* DNA by qPCR using the Evagreen kit (Biorad), with primers overlapping the CpG177 and CpG88 islands (Table supplementary materials).

	CpG177 island (region1)	CpG88 island (region2)
Forward	5'ACACGTCCTCACACCCTCTC- 3'	5'CGGCTCACCTCGGGCAACTCC-3'
Reverse	5' TTCTTCCTGCTCCTCAGCAC- 3'	5'CGGCGGCCGGGTGTACTGTAGGTGGTC- 3'

Table : ChIP primers

Results

DZNep Inhibits the Growth of B-Lymphoma Cells

We examined the effect of DZNep on the growth of Ramos cells following treatment with DZNep at concentrations between 0.35 μ M and 22.4 μ M. We determined the number of living cells after treatment using the ADAM assay. DZNep significantly inhibited the growth

of Ramos cells in a dose-dependent manner. A concentration of 1.4 μM DZNep inhibited cell growth by approximately 50% (Figure 1) and was used for all subsequent experiments.

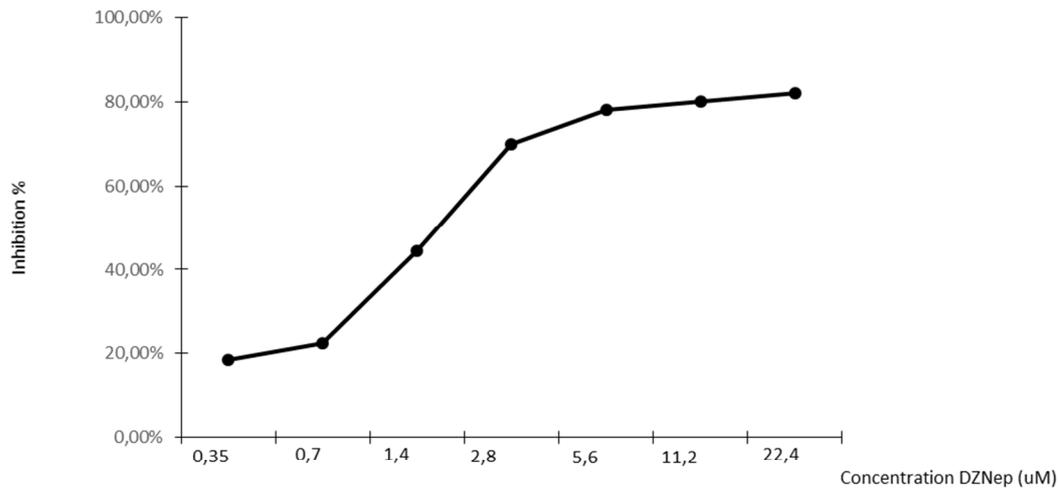


Figure 1: Inhibitory effect of DZNep on the growth of B-lymphoma cells.

Ramos cells were treated with 0.35 to 22.4 μM DZNep for 48 h. The number of living cells was determined by measuring the absorbance at 450 nm after the addition of propidium iodide. Untreated Ramos cells were used as the control. The differences in the number of living cells between the treatment and control groups are expressed as the percentage of inhibition. The data are derived from two separate experiments in triplicate per condition.

Histone methyl inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) promotes the expression of *HACE1* in B-lymphoma cells.

DZNep, a H3K27me3 histone methyl inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) can reactivate tumor suppressor genes that are usually down-regulated in lymphoma cells. We thus studied the effect of DZNep on transcription of the tumor suppressor gene *HACE1* in B-cell lymphoma cells. We treated the Ramos and Raji cell lines with 0 and 1.4 μM of the inhibitor and measured gene expression by determining the level of mRNA using quantitative RT-PCR. The level of *HACE1* mRNA cells was significantly higher in both cell lines than in control B lymphocytes (Figure2). Moreover, combined treatment with DZNep and TrichostatineA (TSA) increased *Hace1* expression in the Ramos and Raji cell lines more than treatment with DZNep alone, suggesting synergy between DZNep and TSA (Figure 3).

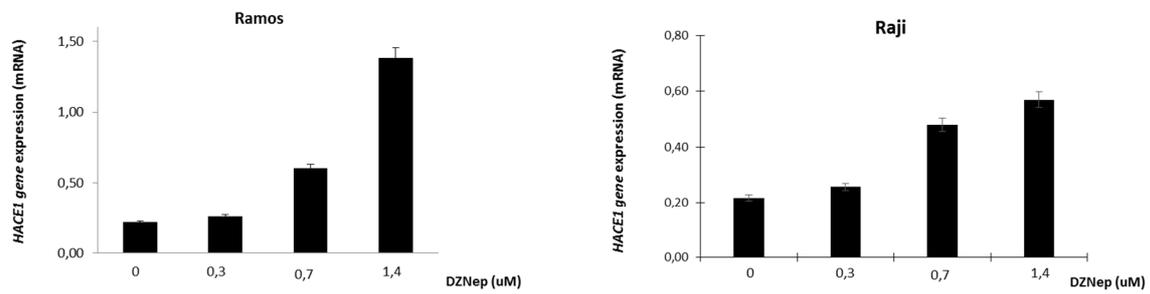


Figure 2. DZNep treatment promotes HACE1 expression in B-cell lymphoma. The expression of HACE1 mRNA was measured by RT-PCR after treatment with DZNep. Cells were treated with the same concentrations of DMSO as controls. The fold changes of mRNA concentrations in the DZNep groups relative to the control groups were determined by the comparative Ct method. Data are reported as the mean \pm the standard deviation derived from three independent experiments.

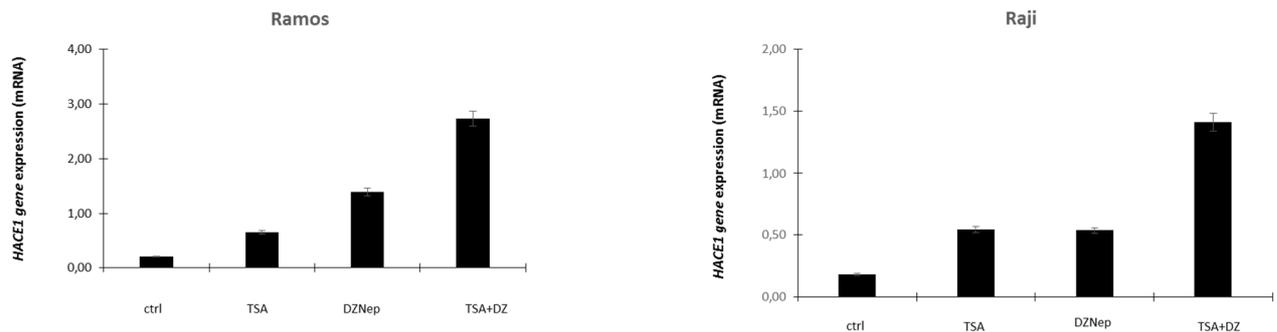


Figure 3. Differential induction of HACE1 expression by epigenetic treatments. Ramos and Raji cells were treated with DMSO (control) or the indicated drug regimens. Differences in HACE1 mRNA levels were measured by RT-PCR. TBP gene expression was used as an internal control. Columns represent the average HACE1 mRNA levels of four independent experiments. Bars represent the SE of the mean.

The HACE1 promoter has high levels of the inactivating histone mark H3K27me3 at the CPG88 island but not the CpG177 island in Ramos and Raji cell lines.

We investigated whether the HACE1 gene is down-regulated in Ramos and Raji cells by trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3). We performed ChIP assays on Ramos and Raji cell lines using antibodies for the repressive histone marks H3K27me3 and H3K9me2.

We used normal human Lymphocyte B cells as a negative control for histone methylation. The CpG88 island of the *HACE1* promoter region in Ramos cells was enriched for both H3K27me3 and H3K9me2 relative to B lymphocytes, whereas the CpG177 island was less highly enriched for H3K27me3 (Figure 4). Raji cells gave a similar profile. Bouzelfen *et al*² previously showed that DNA at CpG88 is poorly methylated whereas DNA at CpG177 is hypermethylated. They proposed an inverse correlation between DNA methylation and H3K27me3 levels in the *HACE1* promoter region.

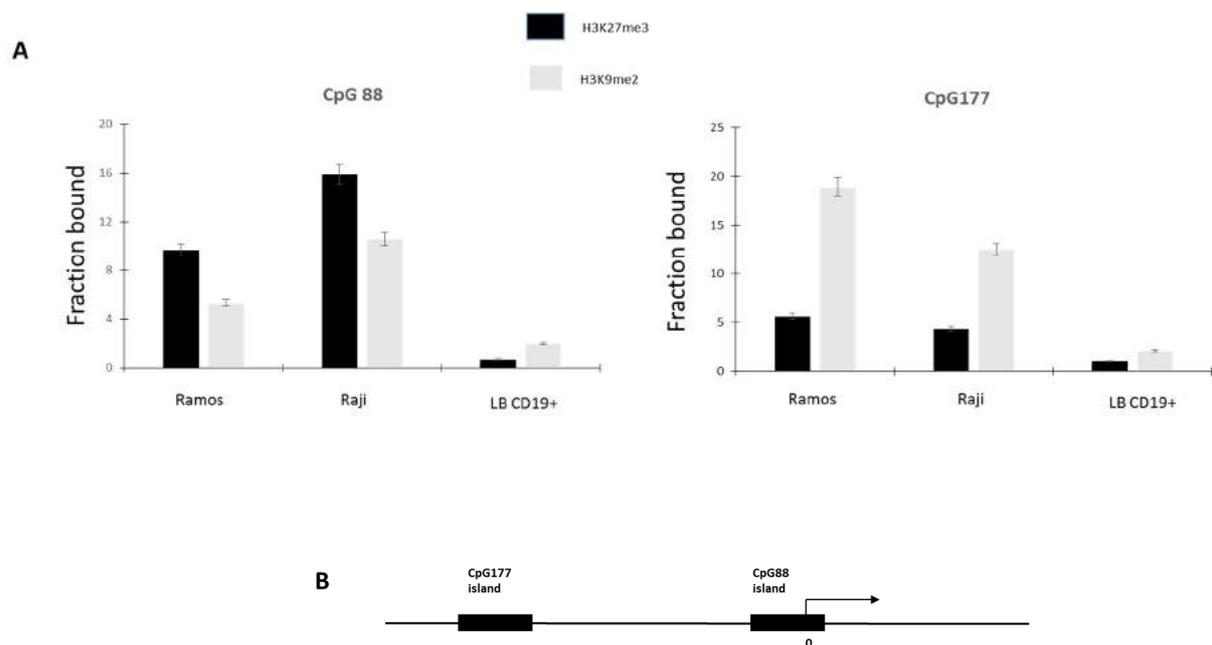


Figure 4. Ramos and Raji cells are enriched for histone H3K27me3 at CpG88 relative to B lymphocytes. A. Quantitative ChIP assay of methylated histone (H3K9me2 and H3K27me3) in the *HACE1* promoter (CpG88 and CpG177). B. Two regions of the *HACE1* promoter were targeted by ChIP assay.

DZNep reduces H3K27me3 levels at CpG88 and H3K9me2 levels at CpG88 and CpG177.

We treated Ramos and Raji cells with DZNep and performed a ChIP assay to confirm that the suppressive histone mark, H3K27me3, regulates *HACE1* expression. DZNep is a global inhibitor of histone methylation, and H3K9 and H3K27 methylation are marks of gene silencing. We thus examined the changes of histone methylation, H3K9me2 and H3K27me3, in the promoter regions of *HACE1* at CpG88 and CpG177. We performed chromatin immunoprecipitation with chromatin from DZNep-treated Ramos and Raji cells using antibodies against H3K27me3 and H3K9me2. We observed lower levels of H3K27me3 in the *HACE1* promoter in the DZNep treated cells only at CpG88 associated with increased *HACE1* expression (Figure 5). The level of H3K9me2 in the promoter region of *HACE1* following DZNep treatment was significantly lower than that observed in B lymphocytes. Both CpGs (CpG177 and CpG88) had significantly lower levels of H3K9me2 following DZNep treatment (Figure 5). It was previously shown that a high level of CpG methylation does not correlate with a high level of H3K27me3 or the action of DZNep⁴. Pyrosequencing of the CpG islands in the promoter of *HACE1* showed that the CpG177 island was very highly methylated, whereas the level of methylation of the CpG88 island was extremely low². The differential DNA methylation of the promoter regions of the *HACE1* gene may account for the CpG island-dependent differences in DZNep-induced decreases of H3K27me3 levels.

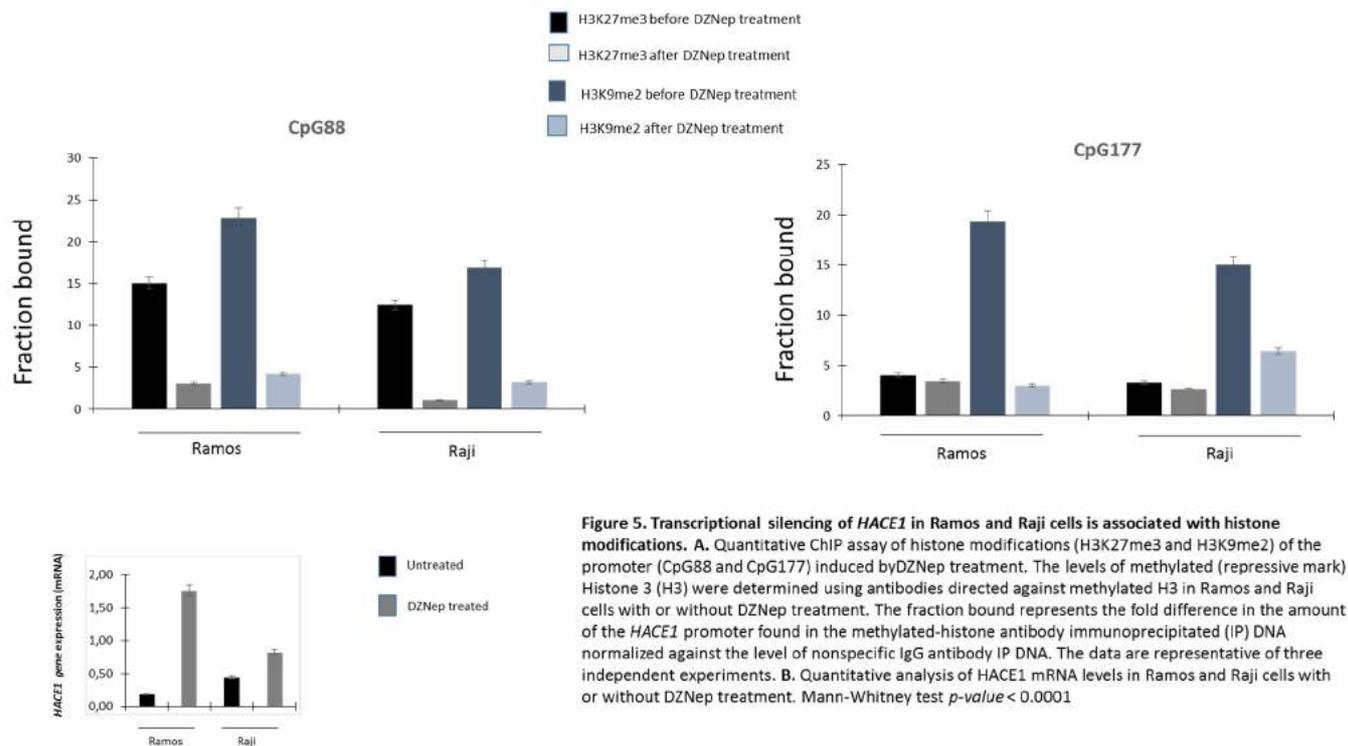


Figure 5. Transcriptional silencing of *HACE1* in Ramos and Raji cells is associated with histone modifications. A. Quantitative ChIP assay of histone modifications (H3K27me3 and H3K9me2) of the promoter (CpG88 and CpG177) induced by DZNep treatment. The levels of methylated (repressive mark) Histone 3 (H3) were determined using antibodies directed against methylated H3 in Ramos and Raji cells with or without DZNep treatment. The fraction bound represents the fold difference in the amount of the *HACE1* promoter found in the methylated-histone antibody immunoprecipitated (IP) DNA normalized against the level of nonspecific IgG antibody IP DNA. The data are representative of three independent experiments. B. Quantitative analysis of *HACE1* mRNA levels in Ramos and Raji cells with or without DZNep treatment. Mann-Whitney test *p*-value < 0.0001.

Overexpression of *EZH2* in B lymphoma cell lines relative to that of normal B cells from peripheral blood.

We performed QRT-PCR to analyze the expression level of the *EZH2* gene in proliferating Ramos and Raji cells relative to that in normal non-proliferating B cells from peripheral blood to investigate whether *EZH2* could be responsible of H3K27me3 overexpression. We observed a significantly higher level of *EZH2* expression in Ramos and Raji cell lines relative to normal B cells from peripheral blood in accordance with previous studies^{9,10} (Figure 6). This increase was more pronounced in the Ramos cell line. These results are also in agreement with previous reports on mantle cell lymphoma (MCL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cases, suggesting that *EZH2* overexpression in B-cell lymphomas may be a sign of clinical aggressiveness¹¹.

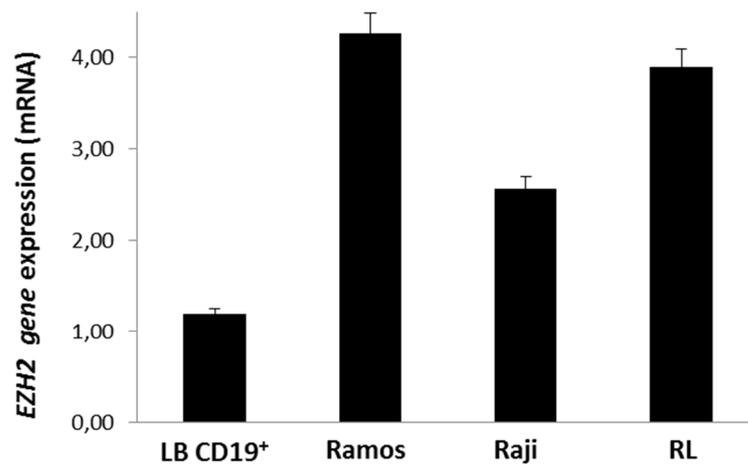


Figure 6. Overexpression of EZH2 in B-lymphoma cell lines.

Quantification of EZH2 mRNA in B-lymphoma cell lines and control lymphocytes from peripheral blood. EZH2 mRNA expression was determined by qRT-PCR. B cells from healthy blood donors isolated from peripheral blood mononuclear cells were used as control. Data are represented by the mean \pm SD of three independent experiments.

Discussion

DZNep inhibits the proliferation of various types of human cancer cells including lung cancer and chondrosarcoma cells^{4,6,7,8}. Here, we showed that the promoter region of the *HACE1* gene in B lymphoma cell lines (Ramos and Raji) is highly enriched for the histone methylation mark, H3K9me2, at the CpG88 and CpG177 islands, whereas H3K27me3 is only highly enriched at CpG88. Treatment with DZNep significantly reduced the level of H3K9me2 at both the CpG88 and CpG177 islands and H3K27me3 at CPG88. This study is also the first to report that DZNep can increase the expression of *HACE1* through modification of the histone methylation status.

DZNep was first reported to modulate H3K27 methylation through the depletion of the PRC2 complex³, with later studies showing that it is a global regulator of histone methylation^{6,7}. The reduction of H3K9me2 levels following DZNep treatment reported in this study is in agreement with the results of a recent study showing that DZNep also inhibits also the activity of SETDB1, an H3K9 HMTase, thus reducing H3K9 methylation³. Bouzelfen et al (Leukemia research 2016) reported a high level of DNA methylation in CpG island 177, whereas the level was very low in CpG88. DNA hypermethylation is a mechanism of epigenetic regulation to inactivate downstream genes of mammalian cells^{12,11,13}. The high level of CpG methylation observed in CpG177 of the *HACE1* promoter indicates that it was probably silenced by DNA hypermethylation during leukemogenesis, but we previously showed that the level of DNA methylation does not correlate with the level of *HACE1* gene expression. Moreover, in this study, we found a high level of H3K27me3 and H3K9me2 at CpG88, whereas the level of DNA methylation was low. CpG88 may play a more important role than CpG177 in the regulation of *HACE1* expression as DZNep treatment led to an increase in *HACE1* expression via decreased levels of H3K27me3 and H3K9me2. We did not assess the level of CpG methylation in the *HACE1* gene promoter after DZNep treatment. However, an earlier finding

showed that DZNep had little or no impact on DNA methylation and could not reactivate the genes that had been silenced by the hypermethylation of CpG islands⁴.

This study has several limitations. It focused only on H3K27 and H3K9 methylation and only two human B-lymphoma cell lines were used in this study. More detailed and extensive examination of histone methylation after DZNep treatment would help to more clearly understand how DZNep modulates the expression of *HACE1*. A broader range of B-lymphoma cell lines, and potentially primary patient samples, also need to be tested to further confirm the inhibitory effect of DZNep on human B cell lymphoma through *HACE1* reexpression.

Reference list

1. Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., Schones D.E. *et al.* (2008) “Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome”. *Nat Genet*, 40: 897-903.
2. Bouzelfen A., Alcantra M., Kora H., Picquenot J.M., *et al.* (2016) “*HACE1* is a putative tumor suppressor gene in B-cell lymphomagenesis and is down-regulated by both deletion and epigenetic alterations”. *Leuk Res*, 45: 90-100.
3. Tan J., Yang X., Zhuang L., Jiang X. *et al.* (2007) “Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells”. *Gene Dev*, 21: 1050-1063.

4. Miranda T.B., Cortez C.C., Yoo C.B., Liang G., *et al.* (2009) “DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation”. *Mol Cancer Ther*, 8: 1579-1588.
5. Fiskus W., Wang Y., Sreekumar A., Buckley K.M. *et al.* (2009) “Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells”. *Blood*, 114: 2733-2743.
6. Zhou Y., Bi C., Cheong L.L., Mahara S. *et al.* (2011) “The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML”. *Blood*, 118: 2830-2839.
7. Lee J.K. & Kim K.C. (2013) “DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells”. *Biochem Biophys Res Commun*, 438: 647-652.
8. Girard N., Bazille C., Lhuissier E., Benateau H *et al.* (2014) “3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells”. *Plos One*, 9:e98176.
9. Baylin S.B., Belinsky S.A. & Herman J.G. (2000) “Aberrant methylation of gene promoters in cancer – concepts, misconcepts, and promise”. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1460-1461.
10. Jones P.A. & Baylin S.B. (2007) “The epigenomics of cancer”. *Cell*, 128: 683-692.
11. Herman J.G. & Baylin I. (2003) “Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation”. *N Engl J Med*, 349: 2042-2054.

12. Baylin S.B. & Herman J.G. (2000) "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics". *Trends Genet*, 16: 168-174.
13. Zhu W.G., Srinivasan K., Dai Z., Duan W. *et al.* (2003) "Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cip1) promoter". *Mol Cell Biol*, 23: 4056-4065.

Discussion et perspectives

Résultant de pertes d'hétérozygotie ou de mutations, un gène peut en effet perdre son expression au moment de la cancérisation. Néanmoins, il a été récemment démontré que des modifications chimiques (ou modifications épigénétiques) de la chromatine engendrent des dérégulations d'expression génique. Dans les cas des gènes *p53* et *PTEN*, ce n'est seulement que ces dernières années où l'hyperméthylation fut décrite comme cause d'inactivation d'expression de ces gènes. Pour ce qui est des gènes *HACE1*, *OVCA1* et *RASSF1*, aucune mutation génétique n'est jusqu'à maintenant décrite, et leur perte d'expression résulterait plutôt de modifications épigénétiques. L'épigénétique est définie comme suit : « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN²⁵⁶ ». La mise en place du programme épigénétique et sa stabilité sont cruciales au cours du développement embryonnaire et pour le maintien des fonctions cellulaires au cours de la vie d'un organisme²⁵⁷. Au niveau de la région promotrice dans une cellule normale, l'acétylation des histones maintient la chromatine dans un état dit « relâchée », permettant le libre accès aux complexes de transcription, parmi lesquels les facteurs de transcription (FT), les Histones Acetyl-transférases (HAT) et les co-activateurs transcriptionnels (CA). Dans une cellule tumorale, les régions promotrices sont plutôt hyperméthylée au niveau des histones sous-jacentes (densité plus importante des histones H3K9me2/3 et H3K27me3). Les profils de méthylation d'ADN sont aussi inversés: une hypométhylation globale des îlots CpG et dans les régions codantes et une hyperméthylation des zones promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette méthylation des îlots CpG est reconnue par les protéines à domaine MBD (methyl-CpG binding domain) en partie responsables d'enzymes modifiant les histones de manière post-traductionnelle (désacétylation [HDAC] et méthylation [HMT]), des DNMT et

des corépresseurs transcriptionnels (CR). La région en question est alors imperméable aux complexes de transcription empêchant ainsi toute expression génique. Quant à l'hypométhylation, elle est surtout particulièrement importante au niveau de séquences satellites péricentromériques, ce qui pourrait prédisposer l'ADN à des cassures ou des remaniements chromosomiques. De tels événements sont fréquemment observés au cours de plusieurs cancers, notamment dans le cas des tumeurs de Wilm's, qui présentent des translocations chromosomiques non équilibrées au niveau de l'ADN péricentromérique. C'est d'ailleurs via ces translocations dans les tumeurs de Wilm's qu'a été découvert le gène *HACE1* (Zhang et al nature medecine 2007). Par ailleurs, il est connu aujourd'hui que l'hypométhylation génomique globale est corrélée à l'âge, ce qui pourrait en partie expliquer l'incidence accrue des cancers chez les personnes âgées. Tous ces résultats montrent bien l'importance de cette modification épigénétique par modifications chimiques de la chromatine dans l'apparition des cancers. De plus, contrairement aux modifications génétiques, les modifications épigénétiques sont dynamiques et réversibles. En conséquence, la découverte de certains inhibiteurs particuliers d'effecteurs épigénétiques nous ouvre un avenir thérapeutique très prometteur, la thérapie épigénétique. Néanmoins, le point à souligner sur ces thérapies épigénétiques actuelles est que ces inhibiteurs ont un champ d'action général et global or il serait plus intéressant d'avoir des drogues plus spécifiques pour réactiver l'expression de certains gènes ou régions génomiques spécifiques (ou les désactiver). Il est donc important de bien comprendre comment les protéines responsables de ces modifications épigénétiques arrivent à moduler d'une façon aussi spécifique le génome. En effet, les enzymes Dnmt ont peu ou pas de spécificité de séquence alors que la méthylation de l'ADN est distribuée de façon non-aléatoire dans le génome.

I - Existence d'une coopération étroite entre la méthylation de l'ADN, la méthylation des histones H3K9me2 et la désacétylation des histones au niveau du promoteur du gène *HACE1*.

a) Quel rôle pour l'hyperméthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène *HACE1* dans les lymphomes de type B ?

Concernant environ 65% des cancers, l'hyperméthylation de l'ADN est un acteur principal dans la tumorigénèse et cela principalement grâce à l'existence d'ADN méthyltransférase appelées DNMT^{3,258}. Un modèle a été adopté dans lequel l'établissement de profils de méthylation est assuré par les DNMT3a et -3b au cours du développement embryonnaire (« méthylases de novo »). Quand à DNMT1, elle est présentée comme une « méthylase de maintenance », chargée de transmettre le profil de méthylation des cellules mères aux cellules filles au cours de la réplication de l'ADN. Néanmoins, on observe une faible augmentation de l'activité ADN-méthyltransférase chez les cellules tumorales, mais cette augmentation ne semble pas justifier la présence d'hyperméthylation et moins encore sa présence ciblée et spécifique au niveau de certains promoteurs, comme observé chez le gène *HACE1*. Il existe aussi une surexpression des DNMT dans les LDGCB²⁵⁹ mais qui n'explique pas l'hyperméthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs dans les LDGCB. On pourrait interpréter cette spécificité comme le résultat de facteurs de transcription, ou du recrutement des DNMT par le complexe PRC2 au niveau du promoteur des gènes ciblés. C'est par exemple le cas de la protéine de fusion PMLRAR α (promyelocytic leukemia-récepteur α de l'acide rétinoïque) impliquée dans les leucémies promyélocyaires aiguës²⁶⁰. Dans des

tumeurs d'origines diverses (tumeur de Wilm's, tumeur colorectal, tumeur gastrique) il a été montré que le promoteur du gène *HACE1* était hyperméthylé au niveau de son promoteur plus précisément sur le site CpG177. Ces mêmes études montrent que l'hyperméthylation du promoteur *HACE1* régule son activité transcriptionnelle^{261,262}. En effet, elles décrivent une corrélation inverse entre le niveau de méthylation des sites CpG (îlot CpG 177) du promoteur *HACE1* et l'expression du gène *HACE1* dans ces tumeurs. Cependant, la sous-expression du gène *HACE1* n'est pas toujours liée directement à la méthylation de son promoteur au niveau de l'îlot CpG 177. En effet, dans les lymphomes de type B et en particulier les LDGCB, nous avons montré que le gène *HACE1* est hyperméthylé au niveau de ce même site (par deux techniques différentes, MSP et pyroséquençage) mais qu'il n'y avait pas d'impact sur l'expression du gène *HACE1* (test de Mann-Whitney, $p=0.248$). De plus, l'analyse épigénétique du promoteur de *HACE1* sur 3 lignées de lymphomes que sont RL (DLBCL), Ramos (Lymphome de Burkitt) et Raji (Lymphome du Burkitt), a montré que le 5'Azacytidine (agent déméthylant) n'a pas d'effet sur l'expression de *HACE1* malgré l'observation d'une déméthylation consécutive à ce traitement (par qRT-PCR) ($p=0.357$, test de Kruskal-Wallis). L'hyperméthylation du promoteur *HACE1* au niveau de l'îlot CpG 177 n'a donc pas un impact direct sur l'expression du gène. Il est à noter que le profil de méthylation et son impact sur l'expression génique est tissus-dépend. Gutierrez et al²⁶³ a montré que la méthylation pouvait être active ou passive vis-à-vis de l'expression génique. Par ailleurs, grâce à des transfections transitoires, des chercheurs ont établi que les protéines Dnmt1, Dnmt3a et DNMT3b répriment de manière active la transcription d'un gène après la fusion à un domaine de liaison à l'ADN et cela sans activité méthyltransférase. En effet, elles interagissent avec les histones-désacétylases qui sont également des enzymes impliquées dans la répression génique^{264,265,266,267}. Ainsi, il a été révélé à travers ces travaux un nouveau mécanisme par lequel les Dnmt verrouillent l'expression génique. En effet, Dnmt3L, démunie de son

domaine catalytique, et donc d'une activité méthyltransférase, peut enrôler les enzymes HDAC pour empêcher la transcription⁵¹ en compactant la chromatine au niveau du promoteur. Ainsi avec ces travaux une nouvelle fonction des Dnmt est révélée: ce sont des protéines à rôles multiples jouant ainsi des rôles cellulaires complémentaires et/ou additionnels à leur capacité de méthyler l'ADN²⁶⁸. Les Dnmt pourraient donc constituer des plates-formes permettant le recrutement, au sein du génome, des enzymes de modification de la chromatine comme les désacétylases (HDAC) et cela à travers les mécanismes de méthylation de l'ADN. En effet, de nombreux promoteurs hyperméthylés dans les cancers sont associés à une hypoacétylation des histones sous-jacentes. Cela peut s'observer par exemple chez les promoteurs *BRCA1*, *MTA1* et *p14ARF/p1614*. Nous retrouvons ce type de profil dans notre étude du gène *HACE1* où le promoteur *HACE1* au niveau de l'îlot CpG 177 est hyperméthylé avec une désacétylation massive des histones H3 sous-jacentes. Cependant cette hyperméthylation n'est pas retrouvée au niveau de l'îlot CpG 88, un autre îlot incluant le site +1. Néanmoins, cet îlot CpG 88 présente également une désacétylation des histones sous-jacentes et une hyperméthylation à la fois des histones H3K9me2 et H3H27me3. Une étude épigénétique en utilisant un inhibiteur des HDAC, la trichostatine A (TSA), montrera qu'effectivement la désacétylation des histones jouant un rôle clefs dans la répression du gène *HACE1*.

b) L'augmentation de l'expression du gène *HACE1* subséquente au traitement avec un inhibiteur des HDAC, la TSA.

Dans les cellules Ramos, RL et Raji, la trichostatine-A (TSA) augmente l'expression du gène *HACE1* sans modifier le statut de méthylation de l'ADN de son promoteur mais en hyperacétylant les histones sous-jacentes H3K9ac comme nous l'a montré l'expérience de ChIP. L'hyperacétylation entraîne une décompaction de la chromatine et ce résultat est conforme avec celui obtenu dans d'autres études en lymphomagénèse¹⁸⁷ et paraît en accord avec l'activité principale de la TSA qui est l'inhibition des HDACs et non des DNMT. Toutefois, différentes équipes ont montré que la TSA peut diminuer la méthylation de l'ADN. Selker a en effet trouvé que la TSA réduit la méthylation de l'ADN dans le champignon *Neurospora crassa*²⁶⁹. De plus, la TSA induit la déméthylation partielle du gène *IGF2R*²⁷⁰. En outre, une étude récente décrit une nouvelle voie d'interaction entre la TSA et les ADN méthyltransférases par le biais de la réduction de la stabilité de l'ARNm DNMT3B²⁷¹. La surexpression du gène *HACE1* par la TSA dans les cellules de lymphomes suggèrent que l'activation du gène *HACE1* par hyperacétylation des histones ne requiert pas l'hypométhylation de son promoteur. De plus, les data GSE46229 (puce affymetrix) montrent également des résultats similaires dans les cellules Ramos et Raji traitées à la TSA. Dans les cellules de lignées de lymphomes l'association de la TSA à l'azacytidine n'amplifie pas le taux d'ARNm *HACE1* au-delà de celui obtenu avec la TSA seule renforçant l'idée que le rôle répressif de l'expression est joué principalement par les modifications chimiques des histones dont la désacétylation.

c) Le rôle de la méthylation H3K9me2 des histones dans la sous-expression du gène *HACE1*

Cependant, des travaux menés ces dernières années révèlent que l'inhibition de la transcription résulte aussi d'un autre type de modification de la chromatine, la méthylation des histones.

Cette modification post-traductionnelle des histones, et en particulier de la lysine 9 de l'histone H3, s'avère fondamentale pour la répression de l'expression génique²⁷². Bien que nous ayons constaté une surexpression des H3K9me2 sous-jacentes au promoteur du gène *HACE1*, nous n'avons pas eu accès à des inhibiteurs des HMT spécifiques de la H3K9me2 afin d'investiguer leur effet sur la méthylation des histones elles-mêmes mais également sur la méthylation de l'ADN et sur l'expression du gène *HACE1*. Cependant, la trichostatine A (TSA), inhibiteur des HDAC, a engendré une diminution de l'expression de H3K9me2 suivi d'une augmentation de l'expression de *HACE1*. Cette observation souligne donc un lien étroit entre l'acétylation des histones et la méthylation des histones. Par ailleurs, les travaux initiaux de Bird²⁷³ et Wolffe¹⁰ ont témoigné d'un lien fonctionnel non seulement entre ces modifications post-traductionnelles de la chromatine, mais également entre méthylation de l'ADN²⁷⁴. Ces études démontrent que les répresseurs à domaine MBD (methyl-CpG-binding domain), se fixant particulièrement à l'ADN méthylé, peuvent enrôler des histone-déacétylases (HDAC) dans les séquences génomiques méthylées. Cela résulte en une désacétylation des histones et en un maintien d'une chromatine à structure resserrée, ce qui réprime la transcription^{275,276}. Une méthylation des histones (H3K9me2) par les histone-méthyltransférase (HMT) résulte de cette désacétylation, fournissant ainsi la possibilité au répresseur HP1 (heterochromatin protein 1), une protéine participant à la formation d'hétérochromatine, de se fixer à l'ADN et de recruter les DNMT afin de perpétuer le cycle de répression. E. Selker et S. Jacobsen constatent que les mutations des gènes *dim-5* et *kryptonite* chez le champignon *Neurospora crassa* et la plante *Arabidopsis thaliana*, respectivement, résultent en une baisse considérable de méthylation de l'ADN chez ces organismes. Or, on a découvert que les gènes *dim-5* et *kryptonite* codaient pour des enzymes qui ont pour rôle la méthylation d'histone H3 sur la lysine 9. De plus, des mutations de ces gènes qui affectent l'activité de méthylation des histones induisent également des défauts de la méthylation de l'ADN^{75,74}.

d) La méthylation de l'ADN, une conséquence de la méthylation et de la désacétylation des histones ?

Cette étude met pour la première fois en évidence une connexion entre la méthylation de l'ADN et la méthylation/désacétylation des histones dans la régulation épigénétique du gène *HACE1* dans les lymphomes B. En outre, il en découle de ces travaux que les modifications chimiques des histones semblent plutôt être initiateurs de la répression génique et de manière indépendante de la méthylation de l'ADN comme le montre le traitement à la TSA qui induit une acétylation et une déméthylation des histones suivi d'une réexpression de *HACE1* sans la nécessité d'avoir une hypométhylation de l'ADN. Ces observations suggèrent un rôle de la méthylation de l'ADN en tant que verrouillage de l'expression et non pas un rôle initiateur qui lui serait plutôt joué par les modifications chimiques des histones. En désacétylant les résidus lysine, les HDAC permettent de passer d'une chromatine «permissive» pour la transcription à une chromatine «réprimée», cet effet étant renforcé par l'intervention ultérieure d'histone-méthyltransférases (HMT) ciblant les mêmes résidus comme observé grâce aux expériences de ChIP. De plus au cours de cette étude, malgré la déméthylation du promoteur d'*HACE1* grâce au 5'azacytidine, nous n'avons pas observé d'impact sur l'expression du gène *HACE1* contrairement à d'autres études menées dans le cancer colorectal, dans les lymphomes T, dans le cancer gastrique ou encore dans les tumeurs de Wilm's^{277,278,179,177}. La méthylation de l'ADN n'a donc pas un lien direct avec l'expression du gène *HACE1* cependant elle servirait de «lock in» à la répression du gène c'est-à-dire que la méthylation de l'ADN pourrait faciliter la méthylation des histones et la désacétylation des histones. Bien que ces observations doivent encore être étayées par d'autres études, elles suggèrent d'ores et déjà

l'existence d'une boucle de régulation entre la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones en passant par la désacétylation des histones, qui aurait pour conséquence de maintenir et de propager les états épigénétiques répressifs de la chromatine au cours des divisions cellulaires successives.

II - Le code histone peut-il expliquer l'expression basale du gène *HACE1* malgré une conformation répressive de la chromatine au niveau de son promoteur ?

Malgré une conformation qui semble répressive de la chromatine au niveau du promoteur, nous retrouvons une expression basale du gène *HACE1* dans les lignées de lymphomes B agressifs. Nous n'avons pas une extinction totale du gène. Or d'après le site *ENCODE* *NCBI*²⁷⁹ il existe une région promotrice du gène *HACE1* avec des îlots CpG riches en Histone H3K4me3. Or, selon l'hypothèse du code histone, les modifications post-traductionnelles des histones agissent seules ou en combinaison. Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones peut aboutir à l'activation ou à la répression de l'expression génique selon les lysines méthylées et leur degré de méthylation (mono-, di-, tri-). Ainsi, la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de l'histone H3 (H3K4, H3K36 et H3K79) est corrélée à l'activation transcriptionnelle. A l'inverse, un taux élevé de tri-diméthylation des histones sur les lysines 9 et 27 de H3 (H3K9, H3K27) et sur la lysine 20 de H4 (H4K20), est associé à l'hétérochromatine. Cette région riche en H3K4me3 pourrait jouer un rôle de *enhancer* permettant une expression basale de *HACE1*, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier cette hypothèse dans les lymphomes B.

III - La Voie Polycomb : la protéine EZH2 régulerait-elle l'expression du gène *HACE1* ?

Outre la méthylation des histones H3K9, d'autres modifications d'histones semblent entraîner une répression génique d'*HACE1*. En effet, le promoteur *HACE1* est enrichi en histone H3K27 triméthylée dans le cas des lignées Ramos et Raji mais seulement au niveau du promoteur CpG 88 qui est un promoteur hypométhylé contrairement à l'îlot CpG 177 qui lui est hyperméthylé mais pauvre en H3K27me3. Cette surexpression des histones H3K27me3 serait suffisante pour entraîner une diminution de l'expression du gène *HACE1*. La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27, une autre marque de répression transcriptionnelle est catalysée par les complexes répresseurs PRC2 et PRC3 (*Polycomb repressive complex*) à activités histones méthyltransférases dont la sous-unité catalytique est la protéine E(Z) (*enhancer of zeste*) à domaine SET (ou son homologue humain EZH2). L'utilisation d'un inhibiteur d'EZH2, le DZNep, entraîne une diminution du niveau de H3K27me3 au niveau de l'îlot CpG88 suivi d'une augmentation de l'expression de *HACE1*. Il a été démontré que le DZNep entraînerait une déméthylation des histones H3K27me3 seulement au niveau des îlots CpG non hyperméthylés et donc chez des gènes non régulés par l'hyperméthylation de l'ADN. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine EZH2 sert de plateforme de recrutement pour les DNMT, soulignant ainsi une connexion directe entre deux systèmes clés de répression épigénétique, la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones. EZH2 recrute les DNMT au niveau de certains gènes cibles qui à leur tour recrutent massivement des HDAC entraînant ainsi une désacétylation massive des histones causes de la compaction de la chromatine et de la répression génique renforcée par une triméthylation de la lysine 27 de l'Histone H3 catalysée par EZH2. L'îlot CpG 88 a également des histones sous jacentes riches en H3K9me2 et pauvres

en H3K9ac. L'association de la TSA et du DZNep engendre une ré-expression plus importante du gène *HACE1* qu'en monothérapie. Cela sous-entend un rôle plus important de l'îlot CpG 88 que l'îlot CpG 177 sur l'expression du gène *HACE1*.

IV - Le gène *HACE1* serait-il donc un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la lymphomagénèse ?

S'il semble établi que les modifications chimiques de la chromatine de certains gènes est une cause plutôt qu'une conséquence de la tumorigénèse, l'observation d'une telle modification épigénétique implique-t-elle forcément que le gène *HACE1* affecté soit un gène suppresseur de tumeur? L'utilisation de modèles animaux a permis de répondre à cette question dans le cas de *HACE1*. Le gène *HACE1* a été isolé dès 2004 grâce aux translocations chromosomiques au sein des tumeurs de Wilms situé en 6q16.3. Cependant, sa fonction de gène suppresseur de tumeur n'a été établie que très récemment en 2007 grâce à l'obtention de souris hétérozygotes qui, ayant une copie du gène invalidée par recombinaison homologe (*HACE1*^{+/-}), développent tardivement dans leur vie des tumeurs spontanées dont des lymphome B et T¹³¹. De plus in vitro, nous avons constaté qu'une sous-expression du gène *HACE1*, grâce à l'utilisation de lentivirus permettant une transduction de shRNA, dans les lignées de lymphome B, Ramos et Raji, entraînait une résistance à l'apoptose (après un traitement à la staurosporine) et un arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2 /M. Ces résultats ont aussi été montré dans le cas des lymphomes T¹⁷⁹.

V - Intérêt et avenir de la thérapie épigénétique

Les nombreuses conclusions expérimentales acquises sur de multiples lignées cellulaires¹⁰² démontrant un dialogue entre les modifications chimiques des histones et l'ADN^{100,101}, poussent la thérapie vers un emploi d'inhibiteurs épigénétiques en combinaisons ou en complément de thérapies classiques. Malgré le grand nombre de questionnement qui restent à résoudre, particulièrement de spécificité et de toxicité, et malgré le manque d'élucidation de l'ensemble des mécanismes moléculaires¹⁰³, cette nouvelle approche d'aborder la thérapie promet sûrement un beau futur dans la stratégie de prise en charge de nombreux cancers. Au-delà d'une compréhension mécanistique de la régulation de l'expression des gènes comme nous l'avons fait avec *HACE1*, l'épigénétique ouvre également des perspectives intéressantes pour l'utilisation de nouvelles approches thérapeutiques. Celles-ci fourniraient alors la capacité de rétablir l'expression de plusieurs gènes hyperméthylés et désacétylés au sein d'un même type de cancer grâce aux inhibiteurs des HDACs ainsi que des HMT tel que les inhibiteurs d'EZH2. La combinaison du DZNep et la TSA a montré des résultats meilleurs que ceux avec un traitement en monothérapie sur l'expression de *HACE1* mais il serait intéressant de voir l'impact de cette combinaison sur l'apoptose et le cycle cellulaire dans les cellules de lymphomes B. La TSA en monothérapie a montré une augmentation de l'apoptose dans les cellules Ramos, Raji et RL à la même dose permettant une réexpression d'*HACE1* (**figure en annexe**). Il serait intéressant de savoir si cette apoptose est due spécifiquement à la réexpression d'*HACE1*. Comme la modification épigénétique est une modification chimique réversible, une thérapie épigénétique des cancers à base d'inhibiteurs des méthyltransférases de l'ADN, des histones et des histone-désacétylases est certainement envisageable. Clairement que cette nouvelle thérapie devra être plus spécifique et sélective quant aux gènes à réactiver. Pour y arriver, il est nécessaire de comprendre précisément comment les

mécanismes par lesquels les ADN méthyltransférases et les modifications chimiques de la chromatine sont intimement connectés. Les études à venir devront cibler particulièrement le processus des événements qui va de la méthylation l'ADN à la modification de l'état de la chromatine conduisant à la sous-expression voire l'extinction génique. L'examen de la relation entre les modifications d'histones post-traductionnelles autre que l'acétylation et la méthylation des histones, comme la ribosylation ou la phosphorylation, et les Dnmnt sera également un point important dans l'avancée de la thérapie épigénétique.

Bibliographie

¹ Ray-Gallet D., Gérard A., Polo S. & Almouzni G. (2005) "Variations sur le thème du 'code histone'". *Médecine/Sciences*, 21: 384-389.

² Haoyang L., Xinzhou L., Yulin D. & Hong Q. (2013) "DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases". *Review ARTICLE Front. Aging Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2013.00085>.

³ Xie S., Wang Z., Okano M., Nogami N. et al. (1999) "Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family". *Gene*, 236: 87-95.

⁴ Bestor T.H. (2000) "The DNA methyltransferases of mammals". *Hum Mol Genet*, 9: 2395-2402.

⁵ Jeltsch A. (2006) "Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases." *Curr Top Microbiol Immunol*, 301: 203–225.

⁶ Okano M., Xie S., Li E. (1998) “Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells.” *Nucleic Acids Res*, 26 (11): 2536–2540.

⁷ Okano M., Xie S., Li E. (1998) “Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells.” *Nucleic Acids Res*, 26 (11): 2536–2540.

⁸ Bell A.C. & Felsenfeld G. (2000) “Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene”. *Nature*, 405: 482-485.

⁹ Moens U., Subramaniam N., Johansen B., & Aarbakke J (1993) “The c-fos cAMP-response element : regulation of gene expression by a beta 2-adrenergic agonist, serum and DNA methylation”. *Biochim Biophys Acta*, 29 : 63-70.

¹⁰ Cedar H. & Verdine G.L. (1999) “The amazing demethylase.” *Nature*, 397: 568-569.

¹¹ Bhattacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni N. et al. (1999) “A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA.” *Nature*, 397: 579-583.

¹² Howell C.Y., Bestor T.H., Ding F. et al. (2001) “Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene.” *Cell*, 104: 829-838.

¹³ Ko Y., Nishino K., Hattori N. et al. (2005) “Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development.” *J Biol Chem*, 280: 9627-9634.

¹⁴ Mertineit C., Yoder J., Taketo T. et al. (1998) “Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells.” *Development*, 125 :889-897.

¹⁵ Doherty A.S., Bartolomei M.S. & Schultz R.M. (2002) “Regulation of stage-specific nuclear translocation of *Dnmt1* during preimplantation mouse development.” *Dev Biol*, 242: 255-266.

¹⁶ Wu H. & Zhang Y. (2011) “Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation.” *Genes Dev*. 25: 2436-2452.

-
- ¹⁷ Ito S., Shen L., Dai Q. et al. (2011) “Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.” *Science*, 333: 1300-1303.
- ¹⁸ Pfaffeneder T., Spada F., Wagner M. et al. (2014) “Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA.” *Nat Chem Biol*, 10: 574-581.
- ¹⁹ Métivier R., Gallais R., Tiffocche C. et al. (2008) “Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter.” *Nature*, 452: 45-50.
- ²⁰ Kangaspeska S., Stride B., Métivier R. et al. (2008) “Transient cyclical methylation of promoter DNA.” *Nature*, 452: 112-115.
- ²¹ Chen C., Wang K. & Shen C. (2013) “DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases.” *J Biol Chem*, 288: 9084-9091.
- ²² Li Y., Zhou P., Zheng X. et al. (2007) “Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair.” *Nucleic Acids Res*, 35: 390-400.
- ²³ Boland M. & Christman J. (2008) “Characterization of Dnmt3b :thymine-DNA glycosylase interaction and stimulation of thymine glycosylase-mediated repair by DNA methyltransferase(s) and RNA.” *J Mol Biol*, 379: 492-504.
- ²⁴ Cartron P., Nadaradjane A., LePape F. et al. (2013) “ Identification of TET1 partners that control its DNA demethylating function.” *Genes & Cancer*, 4: 235-241.
- ²⁵ Schäfer A., Karaulanov E., Stapf U. et al. (2013) “Ing1 functions in DNA demethylation by directing Gadd45a to H3K4me3.” *Genes Dev*, 27: 261-273.
- ²⁶ Arab K., Park Y., Lindroth A. et al. (2014) “Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A.” *Mol Cell*, 55: 604-614.

-
- ²⁷ Wolffe A.P. & Kurumizaka H. (1998) “The nucleosome: a powerful regulator of transcription”. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 61: 379-422.
- ²⁸ Malik H.S. & Henikoff S. (2003) “Phylogenomics of the nucleosome”. *Nat Struct Biol*, 10: 882-891.
- ²⁹ Clark D.J. & Kimura T. (1990) “Electrostatic mechanism of chromatin folding”. *J Mol Biol*, 211: 883-896.
- ³⁰ Arents G., Burlingame R.W., Wang B.C., Love W.E. & Moudrianakis E.N. (1991) “The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and left-handed superhelix”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10148-10152.
- ³¹ Arents G. & Moudrianakis E.N. (1995) “The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11170-11174.
- ³² Bhaumik S.R., Smith E. & Shilatifard, A. (2007) “Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis”. *Nat Struct Mol Biol*, 14: 1008-1016.
- ³³ Kouzarides T. (2007) “Chromatin modifications and their function”. *Cell*, 128: 693-705.
- ³⁴ Strahl B.D. & Allis C.D. (2000) “The language of covalent histone modifications”. *Nature*, 403: 41-45.
- ³⁵ Wang Z., Zang C., Cui K., Schones D.E. et al. (2009) “Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes”. *Cell*, 138: 1019-1031.
- ³⁶ Shahbazian M.D. & Grunstein M. (2007) “Function of site-specific histone acetylation and deacetylation”. *Annu Rev Biochem*, 76: 75-100.
- ³⁷ Turner B.M. (2000) “Histone acetylation and an epigenetic code.” *Bioessays*, 22: 836-845.

³⁸ Workman J.L. & Kingston R.E. (1998) “Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation”. *Annu Rev Biochem*, 67: 545-579.

³⁹ Cheng X. & Blumenthal R.M. (2008) “Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective”. *Structure*, 16: 341-350.

⁴⁰ van Attikum H. & Gasser S.M. (2009) “Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response”. *Trends Cell Biol*, 19: 207-217.

⁴¹ Zhang L., Liu Y., Yang S., Gao C. et al. (2009) “Archaeal eukaryote-like Orc1/Cdc6 initiators physically interact with DNA polymerase B1 and regulate its functions”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 7792-7797.

⁴² <http://www.webbooks.com/MoBio/Free/images/Ch4G1.gif>, et <http://bricker.tcnj.edu/Amb/le9/Acy.jpg>

⁴³ Verdin E., Dequiedt F., & Kasler, H.G. (2003) “Class II histone dyacetylases: versatile regulators”. *Trends Genet*, 19: 286-293.

⁴⁴ Martin M., Kettman R. & Dequiedt F. (2007) “Class IIa histone dyacetylases: regulating the regulators”. *Oncogene*, 26: 5450-5467.

⁴⁵ Saunders L.R. & Verdin E. (2007) “Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging”. *Oncogene*, 26: 5489-5504.

⁴⁶ Vaquero A., Scher M.B., Lee D.H., Sutton A. et al. (2006) “SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis”. *Genes Dev*, 20: 1256-1261.

⁴⁷ Gao L., Cueto M.A., Asselbergs F. & Atadja P. (2002) “Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family”. *J Biol Chem*, 277: 25748-25755.

⁴⁸ Yang X.J. & Seto E. (2007) “HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention”. *Oncogene*, 26: 5310-5318.

-
- ⁴⁹Rice J.C. & Allis C.D. (2001) “Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation”. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 263-273.
- ⁵⁰Kubicek S. & Jenuwein T. (2004) “A crack in histone lysine methylation”. *Cell*, 119: 903-906.
- ⁵¹Heintzmann N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y. et al. (2007) “Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome”. *Nat Genet*, 39: 311-318.
- ⁵²Bannister A.J., Schneider R., Myers F.A., Thome A.W. et al. (2005) “Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes”. *J Biol Chem*, 280: 17732-17736.
- ⁵³Talasz H., Lindner H.H., Sarg B. & Helliger W. (2005) “Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation”. *J Biol Chem*, 280: 38814-38822.
- ⁵⁴Vakoc C.R., Sachdeva M.M., Wang H. & Blobel G.A. (2006) “Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin”. *Mol Cell Biol*, 26: 9185-9195.
- ⁵⁵Noma K., Allis C.D. & Grewal S.I. (2001) “Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries”. *Science*, 293: 1150-1155.
- ⁵⁶Peters A.H., Mermoud J.E., O’Carroll D., Pagani M. et al. (2002) “Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin”. *Nat Genet*, 30: 77-80.
- ⁵⁷Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A. et al. (2004) “A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin”. *Genes Dev*, 18: 1251-1262.
- ⁵⁸Peters A.H. & Schubeler D. (2005) “Methylation of histones: playing memory with DNA”. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 230-238.

⁵⁹ Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T. et al. (2006) “Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells”. *Nature*, 441: 349-353.

⁶⁰ Roh T.Y., Cuddapah S., Cui K. & Zhao K. (2006) The genomic landscape of histone modifications in human T cells”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 15782-15787.

⁶¹ Umlauf D., Goto Y., Cao R., Cerqueira F. et al. (2004) “Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes”. *Nat Genet*, 36: 1296-1300.

⁶² Berger S.L. (2007) “The complex language of chromatin regulation during transcription”. *Nature*, 447: 407-412.

⁶³ Jenuwein T., Laible G., Dorn R. & Reuter G. (1998) “SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin”. *Cell Mol Life Sci*, 54: 80-93.

⁶⁴ Aagard L., Laible G., Selenko P., Schmid M. et al. (1999) “Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su(var)3- 9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31”. *Embo J*, 18: 1923-1938.

⁶⁵ Lan F., Collins R.E., De Cegli R., Alpatov R. et al. (2007) “Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression”. *Nature*, 448: 718-722.

⁶⁶ Tian X. & Fang J. (2007) “Current perspectives on histone demethylases”. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39: 81-88.

⁶⁷ Hendrich B. & Bird A. (1998) “Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins”. *Mol Cell Biol*, 18: 6538-6547.

⁶⁸ Fuks F. (2003) “DNA methyltransferases: from chromatin remodeling to cancer”. *Med Sci*, 19: 477-480.

⁶⁹ Roloff T.C., Ropers H.H. & Nuber U.A (2003) “Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins”. *BMC Genomics*, 4: 1.

⁷⁰ Paro R. & Hogness D.S. (1991) “The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 263-267.

⁷¹ Pearce J.J., Singh P.B. & Gaunt S.J. (1992) “The mouse has a Polycomb-like chromobox gene”. *Development*, 114: 921-929.

⁷² Nielsen P.R., Nietlispach D., Mott H.R., Callaghan J. et al. (2002) “Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9”. *Nature*, 416: 103-107.

⁷³ Min J., Zhang Y. & Xu R.M. (2003) “Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27”. *Genes Dev*, 17: 1823-1828.

⁷⁴ Fischle W., Wang Y., Jacobs S.A., Kim Y. et al (2003a) “Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains”. *Genes Dev*, 17: 1870-1881.

⁷⁵ Saunders W.S., Chue C., Goebel M., Craig C. et al. (1993) “Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity”. *J Cell Sci*, 104 (Pt 2): 573-582.

⁷⁶ Wreggett K.A., Hill F., James P.S., Hutchings A. et al. (1994) “A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin”. *Cytogenet Cell Genet*, 66: 99-103.

⁷⁷ Jones D.O., Cowell I.G. & Singh P.B. (2000) “Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organization and expression”. *Bioessays*, 22: 124-137.

⁷⁸ Lomberk G., Wallrath L. & Urrutia R. (2006a) “The Heterochromatin Protein 1 family”. *Genome Biol*, 7: 228.

⁷⁹ Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A. et al. (2001) “Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain”. *Nature*, 410: 120-124.

⁸⁰ 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.

⁸¹ Powers J.A. & Eisenberg J.C. (1993) "Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding". *J Cell Biol*, 120: 291-299.

⁸² Badugu R., Yoo Y., Singh P.B. & Kellum R. (2005) "Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution". *Chromosoma*, 113: 370-384.

⁸³ Furuta K., Chan E.K., Kiyosawa K., Reimer G. et al. (1997) "Heterochromatin protein HP1Hsbeta (p25beta) and its localization with centromeres in mitosis". *Chromosoma*, 18: 411-422.

⁸⁴ Minc E., Courvalin J.C. & Buendia B. (2000) "HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes". *Cytogenet Cell Genet*, 90: 279-284.

⁸⁵ Lomberk G., Bensi D., Fernandez-Zapico M.E. & Urrutia R. (2006b) "Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code". *Nat Cell Biol*, 8: 407-415.

⁸⁶ Cao R., Wang L., Wang H., Xia L. et al. (2002) "Role of histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing". *Science*, 26: 26.

⁸⁷ Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V. et al. (2002) "Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites". *Cell*, 111: 185-196.

⁸⁸ Simon J.A. & Kingston R.E. (2009) "Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 697-708.

⁸⁹ Fuks F. (2005) "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes". *Curr Opin Genet Dev*, 15: 490-495.

-
- ⁹⁰ Jaenisch R. & Bird A. (2003) “Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals”. *Nat Genet*, 33 (Suppl.): 245-254.
- ⁹¹ Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X. & Jacobsen S.E. (2002) “Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase”. *Nature*, 416: 556-560.
- ⁹² Tamaru H. & Selker E.U. (2001) “A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*”. *Nature*, 414: 277-283.
- ⁹³ Minucci S. & Pelicci P.G. (2006) “Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer”. *Nat Rev Cancer*, 6: 38-51.
- ⁹⁴ Santoro R. & Grummt I. (2005) “Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation”. *Mol Cell Biol*, 25: 2536-2546.
- ⁹⁵ Martin C. & Zhang Y. (2005) “The diverse functions of histone lysine methylation”. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 838-849.
- ⁹⁶ Seligson D.B., Horvath S., Shi T., Yu H. et al. (2005) “Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence”. *Nature*, 435: 1262-1266.
- ⁹⁷ Barlési F., Giaccone G., Gallegos-Ruiz M.I., Loundou A. et al. (2007) “Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer.” *J Clin Oncol*, 25: 4358-4364.
- ⁹⁸ Mohamed M.A., Greif P.A., Diamond J., Sharaf O. et al. (2007) “Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma”. *BJU Int*, 99: 908-915.
- ⁹⁹ Feinberg A.P., Ohlsson R. & Henikoff S. (2006) “The epigenetic progenitor origin of human cancer”. *Nat Rev Genet*, 7: 21-33.

¹⁰⁰ Pardal R., Clarke M.F. & Morrison S.J. (2003) “Applying the principles of stem-cell biology to cancer”. *Nat Rev Cancer*, 3: 895-902.

¹⁰¹ Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J. & Clarke M.F. (2003) “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3983-3988.

¹⁰² Cariati M. & Purushotham A.D. (2008) “Stem cells and breast cancer”. *Histopathology*, 52: 99-107.

¹⁰³ Graziano A., d’Aquino R., Tirino V., Desiderio V. et al. (2008) “The stem cell hypothesis in head and neck cancer”. *J Cell Biochem*, 103: 408-412

¹⁰⁴ Kasper S. (2008) “Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell”. *Stem Cell Rev*, 4: 193-201.

¹⁰⁵ Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B. et al. (1994) “A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice”. *Nature*, 367: 645-648.

¹⁰⁶ Lee C.J., Dosch J. & Simeone D.M. (2008) “Pancreatic cancer stem cells”. *J Clin Oncol*, 26: 2806-2812.

¹⁰⁷ Takaishi S., Okumura T. & Wang T.C. (2008) “Gastric cancer stem cells”. *J Clin Oncol*, 26: 2876-2882.

¹⁰⁸ Clarke M.F. (2005) “A self-renewal assay for cancer stem cells”. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56 Suppl 1: 64-68.

¹⁰⁹ Mathews L.A., Crea F. & Farrar W.L (2009) “Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer”. *Differentiation*, 78: 1-17.

¹¹⁰ Deng G., Nguyen A., Tanaka H., Matsuzaki K. et al. (2006) “Regional hypermethylation and global hypermethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer”. *Intl J Cancer*, 118: 2999-3005.

-
- ¹¹¹ Lopez-Serra L., Ballestar E., Fraga M.F., Alaminos M. et al. (2006) “A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer”. *Cancer Res*, 66: 8342-8346.
- ¹¹² Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z. et al. (2009) “The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores”. *Nat Genet*, 41: 178-186.
- ¹¹³ Mulero-Navarro S. & Esteller M. (2008) “Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now”. *Crit Rev Oncol Hematol*, 68: 1-11.
- ¹¹⁴ Baylin S.B. (2005) “DNA methylation and gene silencing in cancer”. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 (Suppl.): 4-11.
- ¹¹⁵ Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y. et al. (2007) “High-resolution profiling of histone methylations in the human genome”. *Cell*, 129: 823-837.
- ¹¹⁶ Valk-Lingbeek M.E., Bruggeman S.W. & van Lohuizen M. (2004) “Stem cells and cancer; the polycomb connection”. *Cell*, 118: 409-418.
- ¹¹⁷ Lund A.H., van Lohuizen M. (2004) “Epigenetics and cancer”. *Genes Dev*, 18: 2315-2335.
- ¹¹⁸ Fahrner J.A. & Baylin S.B. (2003) “Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad”. *Genes Dev*, 17: 1805-1812.
- ¹¹⁹ Bachman K.E., Park B.H., Rhee I., et al. (2003) “Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene”. *Cancer Cell*, 3: 89-95.
- ¹²⁰ Gius D., Cui H., Bradbury C.M., et al. (2004) “Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach”. *Cancer Cell*, 6: 361-371.

¹²¹ Villar-Garea A. & Esteller M. (2003) “DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why”. *Curr Drug Metab*, 4: 11-31.

¹²² Lyko F. & Brown R. (2005) “DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies”. *J Natl Cancer Inst*, 97: 1498-1506.

¹²³ Jones P.A., Taylor S.M. & Wilson V.L. (1983) “Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine”. *Recent Results Cancer Res*, 84: 202-211.

¹²⁴ Worm J. & Guldborg P. (2002) “DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy”. *J Oral Pathol Med*, 31: 443-449.

¹²⁵ Schneider-Stock R., Diab-Assef M., Rohrbeck A., Foltzer-Jourdainne C. et al. (2005) “5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms”. *J Pharmacol. Exp Ther*, 312: 525-536.

¹²⁶ Garcia-Manero G., Kantarjian H.M., Sanchez-Gonzalez B., Yang H. et al. (2006) “Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia”. *Blood*, 108: 3271-3279.

¹²⁷ Blum W., Klisovic R.B., Hackanson B., Liu Z. et al. (2007) “Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia”. *J Clin Oncol*, 25: 3884-3891.

¹²⁸ Soriano A.O., Yang H., Faderl S., Estrov Z. et al. (2007) “Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome”. *Blood*, 110: 2302-2308.

¹²⁹ Zhou L., Cheng X., Connolly B.A., Dickman M.J. et al. (2002) “Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases”. *J Mol Biol*, 321: 591-599.

-
- ¹³⁰ Cheng J.C., Matsen C.B., Gonzales F.A., Ye W. et al. (2003) “Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine“. *J Natl Cancer Inst*, 95: 399-409.
- ¹³¹ Cheng J.C., Weisenberger D.J., Gonzales F.A., Liang G. et al. (2004) “Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells“. *Mol Cell Biol*, 24: 1270-1278.
- ¹³² Neureiter D., Zopf S., Leu T., Dietze O. et al. (2007) “Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models“. *Scand J Gastroenterol*, 42: 103-116.
- ¹³³ Fang M.Z., Wang Y., Ai H., Hou Z. et al. (2003) “Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines“. *Cancer Res*, 63: 7563-7570
- ¹³⁴ Brueckner B., Garcia Boy R., Siedlecki P., Musch T. et al. (2005) “Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases“. *Cancer Res*, 65: 6305-6311.
- ¹³⁵ Adcock I.M. & Lee K.Y. (2006) “Abnormal histone acetylase and deacetylase expression and function in lung inflammation“. *Inflamm Res*, 55: 311-321.
- ¹³⁶ Dokmanovic M. & Marks P.A. (2005) “Prospects: histone deacetylase inhibitors“. *J Cell Biochem*, 96: 293-304.
- ¹³⁷ Johnstone R.W. (2002) “Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer“. *Nat Rev Drug Discov*, 1: 287-299.
- ¹³⁸ Lin H.Y., Chen C.S., Lin S.P., Weng J.R. & Chen C.S. (2006) “Targeting histone deacetylase in cancer therapy“. *Med Res Rev*, 26: 397-413.
- ¹³⁹ Camphausen K. & Tofilon P.J. (2004) “Combining radiation and molecular targeting in cancer therapy“. *Cancer Biol Ther*, 3: 247-250.

¹⁴⁰ Duvic M., Talpur R., Ni X., Zhang C. et al. (2007) “Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)”. *Blood*, 109 (1): 31-39.

¹⁴¹ O’Connor O.A. (2005) “Targeting histones and proteasomes: new strategies for the treatment of lymphoma”. *J Clin Oncol*, 23 (26): 6429-6436.

¹⁴² Pera B., Tang T., Marullo R., Yang S.N. et al. (2016) “Combinatorial epigenetic therapy in diffuse large B cell lymphoma pre-clinical models and patients.” *Clin Epigenetics*, 8: 79.

¹⁴³ Assouline S.E., Nielsen T.H., Yu S., Alcaide M. et al. (2016) “Phase 2 study of panobistat with or without rituximab diffuse large B-cell lymphoma.” *Blood*, 128: 185-194.

¹⁴⁴ Emadali A., Hoghoughi N., Duley S., Hajmirza A. et al. (2016) “Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms.” *Blood*, 127: 3040-3053.

¹⁴⁵ Soriano A.O., Yang H., Faderl S., Estrov Z. et al. (2007) “Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.” *Blood*, 110: 2302-2308.

¹⁴⁶ Issa J.P. & Kantarjian H.M. (2009) “Targeting DNA methylation.” *Clin Cancer Res*, 15: 3938-3946.

¹⁴⁷ Raffoux E., Cras A., Recher C., Boëlle P.Y. et al. (2010) “Phase 2 clinical trial of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome.” *Oncotarget*, 1: 34-42.

¹⁴⁸ Silverman L.R., Fenaux P., Mufti G.J., Santini V. et al. (2008) “The effects of continued azacytidine treatment cycles on response in higher risk patients with myelodysplastic syndromes: an update.” *Ecancermedicalscience*, 2: 118.

¹⁴⁹ Kirschbaum, M. (2009) “Comeback for camptothecins?” *Leuk Lymphoma*, 50: 1914-1915.

-
- ¹⁵⁰ Gore S.D., Baylin S., Sugar E., Carraway H. et al. (2006) “Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms.” *Cancer Res.*, 66: 6361-6369.
- ¹⁵¹ Prébet T. & Vey N. (2010) “Vorinostat in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.” *Expert Opin Investig Drugs*, 20: 287-295.
- ¹⁵² Garcia-Manero G., Kantarjian H.M., Sanchez-Gonzalez B., Yang H. et al. (2006) “Phase ½ study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia.” *Blood*, 108: 3271-3279.
- ¹⁵³ Tadorelli M., Tibiletti M.G., Martin V., Pozzi B. et al. (2006) “Chromosome band 6q deletion pattern in malignant lymphomas”. *Cancer Genet Cytogenet*, 165: 106–113.
- ¹⁵⁴ Gaidano G., Hauptschein R.S., Parsa N.Z., Offit K., et al. (1992) “Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma”. *Blood*, 80: 1781–1787.
- ¹⁵⁵ Offit K., Parsa N.Z., Gaidano G., Filippa D.A., et al. (1993) “6q deletions define distinct clinicopathologic subsets of non-Hodgkin’s lymphoma”. *Blood*, 82: 2157– 2162.
- ¹⁵⁶ Zhang L., Anglesio M.S., O’Sullivan M., Zhang F. et al. (2007) “The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers.” *Nat Med*, 13: 1060-1069.
- ¹⁵⁷ Torrino S., Visvikis O., Doye A., Boyer L. et al. (2011) “The E3 Ubiquitin-Ligase HACE1 Catalyzes the Ubiquitylation of Active Rac1.” *Dev Cell*, 21: 959-965.
- ¹⁵⁸ Cetinbas N., Daugaard M., Mullen A.R., Hajee S. et al. (2014) “Loss of the tumor suppressor Hace1 leads to ROS-dependent glutamine addiction.” *Oncogene*, 34: 4005-4010.
- ¹⁵⁹ Cheng T., Sudderth J., Yang C., Mullen A.R. et al. (2011) “Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 8674-8679.

-
- ¹⁶⁰ Mukhopadhyay D. & Riezman H. (2007) “Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling”. *Science*, 315: 201-205.
- ¹⁶¹ Mettouchi A. & Lemichez E. (2012) “Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1.” *Small GTPases*, 3: 102-106.
- ¹⁶² Heasman S.J. & Ridley A.J. (2008) “Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.” *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 690-701.
- ¹⁶³ Boquet P. & Lemichez E. (2003) “Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis?” *Trends Cell Biol*, 13: 238–246.
- ¹⁶⁴ Castillo-Lluva S., Tan C.T., Daugaard M., Sorensen P.H. & Malliri A. (2013) “The tumor suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation.” *Oncogene*, 32: 1735-1742.
- ¹⁶⁵ Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K. et al. (2010) “The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1.” *Nat Cell Biol*, 12: 213-23.
- ¹⁶⁶ Mathews L.A., Crea F. & Farrar W.L (2009) “Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer”. *Differentiation*, 78: 1-17.
- ¹⁶⁷ Liu Z., Chen P., Gao H., Gu Y. et al. (2014) “Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression.” *Cancer Cell*, 26: 106-120.
- ¹⁶⁸ Fisher S.G. & Fisher R.I. (2004) “The epidemiology of non-Hodgkin’s lymphoma”. *Oncogene*, 23: 6524-6534.
- ¹⁶⁹ Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C. et al. (2000) “Distinct type of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling”. *Nature*, 403: 503-511.

¹⁷⁰ Dunleavy K., Pittaluga S., Czuczman M.S., Dave S.S. et al. (2009) “Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma”. *Blood*, 109: 31-39.

¹⁷¹ Lenz G., Wright G.W., Emre N.C., Kohlhammer H. et al. (2008) “Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13520-13525.

¹⁷² Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., Connors J.M. et al. (2002) “The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma”. *N Engl J Med*, 346: 1937-1947.

¹⁷³ Rosenwald A., Wright G., Leroy K., Yu X. et al. (2003) “Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identified a clinically favorable subgroup of diffuse large B-cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma”. *J Exp Med*, 198: 851-862.

¹⁷⁴ Staudt L.M. & Dave S. (2005) “The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling”. *Adv Immunol*, 87: 163-208.

¹⁷⁵ Feuerhake F., Kutok J.L., Montl S., Chen W. et al. (2005) “NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes”. *Blood*, 106: 1392-1399.

¹⁷⁶ Monti S., Savage K.J., Kutok J.L., Feuerhake F. (2005) “Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response”. *Blood*, 105: 1851-1861.

¹⁷⁷ Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U. and Staudt L.M. (2001) “Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells”. *J Exp Med*, 194: 1861-1874.

¹⁷⁸ Karin M., Cao Y., Greten F.R. & Li Z.W. (2002) “NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit”. *Nat Rev Cancer*, 2: 301-310.

¹⁷⁹ Karin M. & Lin A. (2002) “NF-kappaB at the crossroads of life and death”. *Nat Immunol*, 3: 221-227.

¹⁸⁰ Schulze-Luehrmann J. & Ghosh S. (2006) “Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B”. *Immunity*, 25: 701-715

¹⁸¹ Li Q. & Verma I.M. (2002) “NF-kappaB regulation in the immune system”. *Nat Rev Immunol*, 2: 725-734.

¹⁸² Lam L.T., Davis R.E., Ngo V.N., Lenz G. et al. (2008) “Compensatory IKKalpha activation of classical NF-kappaB signaling during IKKbeta inhibition identified by an RNA interference sensitization screen”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20798-20803.

¹⁸³ Martin-Subero J.I., Kreuz M., Bibikova M., Bentink S. et al. (2009) “New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling”. *Blood*, 113: 2488-2497.

¹⁸⁴ Boveri T. (1914) *Zur der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fischer.*

¹⁸⁵ Nowell P.C. & Hungerford D.A. (1960) “A minute chromosome in human genomic granulocytic leukemia”. *Science*, 132: 1497.

¹⁸⁶ Rowley, J.D. (1973) “A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining”. *Nature*, 243: 290-293.

¹⁸⁷ Heim S., Teixeira M.A. & Pandis N. (2001) “Are some breast carcinomas polyclonal in origin?” *J Pathol*, 194: 395-397.

¹⁸⁸ Swerdlow S., McColl K., Rong Y., Lam M. et al. (2008) “Apoptosis inhibition by Bcl-2 gives way to autophagy in glucocorticoid-treated lymphocytes.” *Autophagy*, 4: 612-620.

¹⁸⁹ Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C. et al. (2000) “Distinct type of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling”. *Nature*, 403: 503-511.

¹⁹⁰ Wright G., Tan B., Rosenwald A., Hurt E.H. et al. (2003) “A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 9991-9996.

¹⁹¹ Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C. et al. (2000) “Distinct type of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling”. *Nature*, 403: 503-511.

¹⁹² Pasqualucci L., Trifonov V., Fabbri G., Ma J. et al. (2011) “Analysis of the coding genome of diffuse large B cell lymphoma.” *Nat Genet*, 43: 830-837.

¹⁹³ Lohr J.G., Stojanov P., Lawrence M.S., Auclair D. et al. (2012) “Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 3879-3884.

¹⁹⁴ Zhang J., Grubor V., Love C.L., Banerjee A. et al. (2013) “Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 1398-1403.

¹⁹⁵ Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., Connors J.M. et al. (2002) “The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma”. *N Engl J Med*, 346: 1937-1947.

¹⁹⁶ Lenz G., Wright G.W., Emre N.C., Kohlhammer H. et al. (2008) “Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13520-13525.

¹⁹⁷ Young A.P. & Kaelin W.G. Jr. (2008) “Senescence triggered by the loss of the VHL tumor suppressor.” *Cell Cycle*, 7: 1709-1712.

¹⁹⁸ Pasqualucci L., Trifonov V., Fabbri G., Ma J. et al. (2011) “Analysis of the coding genome of diffuse large B cell lymphoma.” *Nat Genet*, 43: 830-837.

¹⁹⁹ Sneeringer C.J., Scott M.P., Kuntz K.W., Knutson S.K. et al. (2010) “Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on

histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 20980-20985.

²⁰⁰ Yap D.B., Chu J., Berg T., Schapira M. et al. (2011) “Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation.” *Blood*, 117: 2451-2459.

²⁰¹ Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M., Barrette T.R. et al. (2002) “The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.” *Nature*, 419: 624-629.

²⁰² Varambally S., Cao Q., Mani R.S., Shankar S. et al. (2008) “Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer.” *Science*, 322: 1695-1699.

²⁰³ Kleer C.G., Cao Q., Varambally S., Shen R. et al. (2003) “EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells.” *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 11606-11611.

²⁰⁴ Wagener N., Macher-Goeppinger S., Pritsch M., Hüsing J. et al. (2010) “Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma.” *BMC Cancer*, 10: 524.

²⁰⁵ Takawa M., Masuda K., Kunizaki M., Daigo Y. et al. (2011) “Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker.” *Cancer Sci.*, 102: 1298-1305.

²⁰⁶ Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C. et al. (2000) “Distinct type of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling”. *Nature*, 403: 503-511.

²⁰⁷ Lenz G., Wright G.W., Emre N.C., Kohlhammer H. et al. (2008) “Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13520-13525.

²⁰⁸ Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U. and Staudt L.M. (2001) “Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells”. *J Exp Med*, 194: 1861-1874.

²⁰⁹ Lam L.T., Davis R.E., Pierce J., Hepperle M. et al. (2005) “Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling.” *Clin Cancer Res*, 11: 28-40.

²¹⁰ Lenz G., Wright G.W., Emre N.C., Kohlhammer H. et al. (2008) “Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13520-13525.

²¹¹ Davis R.E., Ngo V.N., Lenz G., Tolar P. et al. (2010) “Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma.” *Nature*, 463: 88-92.

²¹² Gauld S.B. & Cambier J.C. (2004) “Src-family kinases in B-cell development and signaling.” *Oncogene*, 23: 8001-8006.

²¹³ Davis R.E., Ngo V.N., Lenz G., Tolar P. et al. (2010) “Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma.” *Nature*, 463: 88-92.

²¹⁴ Dal Porto J.M., Burke K., Cambier J.C. (2004) “Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck.” *Immunity*, 21: 443-453.

²¹⁵ Ngo V.N., Young R.M., Schmitz R., Jhavar S. et al. (2011) “Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma.” *Nature*, 470: 115-119.

²¹⁶ Martin-Subero J.I., Ammerpohl O., Bibikova M. et al. (2009) “A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms.” *PLoS One*, 4: e6986.

²¹⁷ Quesnel B., Guillermin G., Vereecque R. et al. (1998) “Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression.” *Blood*, 91: 2985-2990.

²¹⁸ Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B. & Herman J.G. (2001) “A gene hypermethylation profile of human cancer.” *Cancer Res*, 61: 3225-3229.

²¹⁹ Herman J.G., Civin C.I., Issa J.P., Collector M.I., et al. (1997) “Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies.” *Cancer Res*, 57: 837-841.

²²⁰ Garcia M.J., Martinez-Delgado B., Cebrian A., Martinez A., et al. (2002) “Different incidence and pattern of p15INK4b and p16INK4a promoter region hypermethylation in Hodgkin’s and CD30-Positive non- Hodgkin’s lymphomas.” *Am J Pathol*, 161: 1007-1013.

²²¹ Gonzalez M., Mateos M.V., Garcia-Sanz R., et al. (2000) “De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis.” *Leukemia*, 14: 183-187.

²²² Hofmann W.K., Tsukasaki K., Takeuchi N., Takeuchi S. & Koeffler H.P. (2001) “Methylation analysis of cell cycle control genes in adult T-cell leukemia/lymphoma.” *Leuk Lymphoma*, 42: 1107-1109.

²²³ de Carvalho F., Colleoni G.W., Almeida M.S., Carvalho A.L. & Vettore A.L. (2009) “TGFbetaR2 aberrant methylation is a potential prognostic marker and therapeutic target in multiple myeloma.” *Int J Cancer*, 125: 1985-1991.

²²⁴ Braggio E., Maiolino A., Gouveia M.E. et al. (2010) “Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma.” *Int J Hematol*, 91: 87-96.

²²⁵ Chim C.S., Liang R., Fung T.K., Choi C.L. & Kwong Y.L. “Epigenetic dysregulation of the death-associated protein kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in multiple myeloma.” *J Clin Pathol*, 60: 664-669.

²²⁶ Corcoran M., Parker A., Orchard J. et al. (2005) “ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia.” *Haematologica*, 90: 1078-1088.

²²⁷ Chantepie S.P., Vaur D., Grunau C. et al. (2010) “ZAP-70 intron1 DNA methylation status: determination by pyrosequencing in B chronic lymphocytic leukemia.” *Leuk Res*, 34: 800-808.

²²⁸ Villuendas R., Sanchez-Beato M., Martinez J.C., et al. (1998) “Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin’s lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression.” *Am J Pathol*, 153: 887-897.

²²⁹ Voso M.T., Gumiero D., D’Alo’ F., et al. (2006) “DAP-kinase hypermethylation in the bone marrow of patients with follicular lymphoma.” *Haematologica*, 91: 1252-1256.

²³⁰ Amara K., Trimeche M., Ziadi S., Laatiri A. et al. (2008) “Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas.” *Ann Oncol*, 19: 1774-1786.

²³¹ Esteller M., Gaidano G., Goodman S.N., et al. (2002) “Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA méthyltransférase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma.” *J Natl Cancer Inst*, 94: 26-32.

²³² Nakamichi I., Tomita Y., Zhang B. et al. (2007) “Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma.” *Ann Hematol*, 86: 557-564.

²³³ Willis T.G. & Dyer M.J. (2000) “The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies”. *Blood*, 98: 808-822.

²³⁴ Chao D.T. & Korsmeyer S.J. (1998) “BCL-2 family: regulators of cell death”. *Annu Rev Immunol*, 16: 395-419.

²³⁵ Cory S. & Adams J.M. (2002) “The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch”. *Nat Rev Cancer*, 2: 647-656.

²³⁶ Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R. & Newmeyer D.D. (1997) “The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis”. *Science*, 275: 1132-1136.

²³⁷ Vairo G., Innes K.M. & Adams J.M. (1996) “Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival”. *Oncogene*, 26: 9185-9195.

²³⁸ Sartorius U.A. & Kramer P.H. (2002) “Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines”. *Int J Cancer*, 97: 584-892.

²³⁹ Schmitt C.A., Rosenthal C.T. & Lowe S.W. (2000) “Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas”. *Nat Med*, 6: 1029-1035.

²⁴⁰ Husson H., Carideo E.G., Neuberg D., Schultze J et al. (2002) “Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays”. *Blood*, 99: 282-289.

²⁴¹ Schebesta M., Heavey B. & Busslinger M. (2002) “Transcriptional control of B-cell development”. *Curr Opin Immunol*, 14: 216-223.

²⁴² Ye B.H., Cattoretti G., Shen Q., Zhang J. et al. (1997) “The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th-2 type inflammation”. *Nat Genet*, 16: 161-170.

²⁴³ Reljic R., Wagner S.D., Peakman L.J. & Fearon D.T. (2000) “Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6”. *J Exp Med*, 192: 1841-1848.

²⁴⁴ Bastard C., Deweindt C., Kerckaert J.P., Lenormand B. et al. (1994) “LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin’s lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients”. *Blood*, 83: 2423-2427.

²⁴⁵ Chang C.C., Ye B.H., Chaganti R.S. & Dalla-Favera R. (1996) “BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 395-419.

²⁴⁶ Deweindt C., Albagli O., Bernardin F., Dhordain P. et al. (1995) “The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain”. *Cell Growth Differ*, 6: 1495-1503.

²⁴⁷ Dhordain P., Lin R.J., Quief S., Lantoine D. et al. (1998) “The LAZ3(BCL6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression”. *Nucleic Acids Res*, 26: 4645-4651.

²⁴⁸ McDonnell T.J. & Korsmeyer S.J. (1991) “Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)”. *Nature*, 349: 254-256.

²⁴⁹ Callanan M., Leroux D., Magaud J.P. & Rimokh R. (1996) “Implication of cyclin D1 in malignant lymphoma”. *Crit Rev Oncog*, 7: 191-203.

²⁵⁰ Thelander E.F., Ichimura K., Corcoran M., Barbany G. et al. (2008) “Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia.” *Leuk Lymphoma*, 49: 477-487.

²⁵¹ Anglesio M.S., Evdokimova V., Melnyk N., Zhang L. et al. (2004) “Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms’ tumor versus normal kidney.” *Hum Mol Genet*, 13: 2061-2074.

²⁵² Qu Y., Dang S. & Hou P. (2013) “Gene methylation in gastric cancer.” *Clin Chim Acta*, 424: 53-65.

²⁵³ Küçük C., Hu X., Igbal J., Gaulard P. et al. (2013) “HACE1 is a tumor suppressor gene candidate in natural killer cell neoplasms.” *Am J Pathol*, 182: 49-55.

-
- ²⁵⁴ Sakata M., Yokomizo K., Kitamura Y., Sakuraba K. et al. (2013) “Methylation of the HACE1 gene is frequently detected in hepatocellular carcinoma.” *Hepatogastroenterology*, 60: 781-783.
- ²⁵⁵ Deltour S., Chopin V. & Leprince D. (2005) “Epigenetics and cancer.” *Med Sci (Paris)*, 21: 405-411.
- ²⁵⁶ Jones P.A. & Takai D. (2001) “The role of DNA methylation in mammalian epigenetics”. *Science*, 293: 1068–1070.
- ²⁵⁷ Li E. (2002) “Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development”. *Nat Genet*, 3: 662-673.
- ²⁵⁸ Baylin S.B. & Herman J.G. (2000) “DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics”. *Trends Genet*, 16: 168–174.
- ²⁵⁹
- ²⁶⁰ Claus R. & Lübbert M. (2003) “Epigenetic target in hematopoietic malignancies”. *Oncogene*, 22: 6489-6496.
- ²⁶¹ El-Osta A., Kantharidis P., Zalcborg J.R. & Wolffe A.P. (2002) “Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation”. *Mol Cell Biol*, 22: 1844-1857.
- ²⁶² Nakayama M., Wada M., Harada T., Nagayama J. et al. (1998) “Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias”. *Blood*, 92: 4296-4307.
- ²⁶³ **Gutierrez et al**
- ²⁶⁴ Fuks F., Burgers W.A., Brehm A., Hughes-Davies L. & Kouzarides T. (2000) “DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity”. *Nat Genet*, 24: 88–91.

²⁶⁵ Robertson K.D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P.A. *et al.* (2000) “DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters”. *Nat Genet*, 25: 338–342.

²⁶⁶ Rountree M.R., Bachman K.E. & Baylin S.B. (2000) “DNMT1 binds HDAC2 and a new corepressor, DMAP1, to form a complex at replication foci”. *Nat Genet*, 25: 269–277.

²⁶⁷ Fuks F., Burgers W.A., Godin N., Kasai M. & Kouzarides T. (2001) “Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription”. *EMBO J*, 20: 2536-2544.

²⁶⁸ Ballestar E. & Esteller M. (2002) “The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing”. *Carcinogenesis*, 23: 1103–1109.

²⁶⁹ Selker E.U. (1998) “Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9430-9435.

²⁷⁰ Hu J.F., Pham J., Dey I., Lit T. *et al.* (2000) “Allele-specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene”. *Endocrinology*, 141: 4428-4435.

²⁷¹ Xiong Y., Dowdy S.C., Podratz K.C., Jin F. *et al.* (2005) “Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells”. *Cancer Res*, 65: 2684-2689.

²⁷² Nicolas E., Vandell & Trouche D. (2001) “Quand la méthylation des histones entre en scène”. *Med Sci*, 17: 476–479.

²⁷³ Bird A.P. & Wolffe A.P. (1999) “Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin”. *Cell*, 99: 451-454.

²⁷⁴

²⁷⁵ Nan X., Ng H.H., Johnson C.A., Laherty C.D. *et al.* (1998) “Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex”. *Nature*, 393: 386–389.

²⁷⁶ Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D. *et al.* (1998) “Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription”. *Nat Genet*, 19: 187–191.

²⁷⁷ Hibi K., Sakata M., Sakubara K., Shirahata A. *et al.* (2008) “Aberrant methylation of the HACE1 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer”. *Anticancer Res*, 28: 1581-1584.

²⁷⁸ Sakata M., Kitamura Y.H., Sakuraba K., Goto T. *et al.* (2009) “Methylation of HACE1 in gastric carcinoma”. *Anticancer Res*, 29: 2231-2233.

²⁷⁹ ENCODE NCBI – *voir conditions d’utilisation de leurs données pour citation.*