



**HAL**  
open science

## Analyse de la régulation du facteur de transcription

### E2F1 par cIAP1

Jennifer Allègre-Cultot

► **To cite this version:**

Jennifer Allègre-Cultot. Analyse de la régulation du facteur de transcription E2F1 par cIAP1. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI013 . tel-02101414

**HAL Id: tel-02101414**

**<https://theses.hal.science/tel-02101414v1>**

Submitted on 16 Apr 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE – FRANCHE COMTE  
UFR des Sciences de la Vie



**THÈSE**  
Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Bourgogne – Franche Comté**  
**Discipline : Sciences de la Vie**  
**Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Soutenue publiquement le jeudi 02 février 2017 par

**Jennifer ALLEGRE – CULTOT**

# **Analyse de la régulation du facteur de transcription E2F1 par cIAP1**

Membres du Jury :

Dr Olivier COUX

Dr Philippe JUIIN

Dr Béatrice EYMIN

Dr Mickael RIALLAND

Dr Laurence DUBREZ

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse

Unité INSERM UMR1231 « Lipides, Nutrition, Cancer  
Equipe : SAPHIHR (*signaling and physiology in hematological research*).  
Faculté de Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon.

**« Le jour idéal pour réaliser une chose, c'est le jour où on a décidé de la faire. »**

Proverbe Japonais 1895.

**« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »**

Léonard De Vinci.

## Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Un grand merci au D<sup>r</sup> Olivier COUX et au D<sup>r</sup> Philippe JUIN qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail en qualité de rapporteur lors des périodes de fêtes. Je remercie également le D<sup>r</sup> Béatrice EYMIN, le D<sup>r</sup> Mickaël RIALLAND pour leurs participations à mon jury de thèse en qualité d'examineur.

Je remercie bien évidemment le D<sup>r</sup> Laurence DUBREZ pour m'avoir accueillie au sein de son équipe depuis ma première année de master. J'ai pu grâce à toi apprendre énormément tout en ayant une certaine liberté. Ces années passées dans ton équipe m'ont permis d'acquérir des compétences en tant que futur chercheur mais m'ont également apporté énormément sur plan personnel. Je suis heureuse d'avoir pu faire ma thèse dans une équipe avec un directeur de thèse qui est présent et à l'écoute de son étudiant. Je te remercie pour ton soutien, pour ta confiance ainsi que pour m'avoir permis de faire de l'enseignement et espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Merci à Etienne, Pierre, Alexia, Victor et Laeti pour votre soutien durant ces années, pour les soirées décompression au Beer Country avec un peu de philosophie devant le passage piéton (dur dur pour certains le lendemain mais heureusement il y a la vitre du PSM pour éviter la chute !). Je tiens également à tous vous remercier pour votre présence à mon mariage et pour tout ce que vous avez fait pour moi ce jour-là mais aussi tous les autres jours au laboratoire. Un petit clin d'œil à Victor pour m'avoir aidé le jour de la journée japonaise, j'espère que tu n'es pas trop traumatisé... Je te remercie également Victor pour toutes tes corrections d'anglais et pour le magnifique cd Radio L2. Merci pour toutes les soirées pain, vin, fromage. Et oui je me suis mise au fromage par votre faute si je pars à l'étranger et que je n'y ai plus accès ce sera votre faute si je sombre dans la déprime ! Je n'oublie pas Marion et Vincent ainsi que Hélène, Jean, Thibault, Amandine et Flavie, merci pour les moments passés en votre compagnie.

Je te remercie particulièrement Laeti pour m'avoir écoutée, soutenue, par contre je ne te remercie pas pour les attaques sournoises avec les emballages des colis de Trizol et pour toutes ces licornes qui nous envahissent. Et j'oubliais, je vous attends tous pour la journée ou semaine ski à la Roche bien entendu.

Un grand merci à Chris, mon éternel co-référent L2 pour les moments de délires, les parties de badminton, de foot ou les sorties roller (enfin roller et chasse de pokémon). Même si tu es asocial, que tu n'écoutes rien et restes braqué selon certains (pas de polémique voyons), je te remercie pour ton soutien, pour les séances psy dans mon box ainsi que pour la petite pause thé qui s'impose. En parlant de badminton, je remercie Guillaume pour son magnifique lancé et Burhan pour son magnifique soutien lors de la partie. Merci pour tes conseils de manga Burhan mais aussi pour tes conseils scientifiques.

Un grand merci à toi aussi Seb, pour ton soutien, pour le magnifique fourreau et ta bonne humeur générale. J'ai hâte de manger cet œuf d'autruche. Un grand merci à Jean qui m'a formé lors de mon stage de première année de master et qui m'a conseillé jusqu'à son départ.

Merci également à la Team LD : Laurent, Jean Noël, Ronan, Marie, Magalie, François, Valérie. Je remercie particulièrement Anne qui m'a fait découvrir Spotify et pour le soutien que tu m'as apporté lors des journées qui s'éternisaient ainsi que pour les débats politiques ou autres. Magalie merci pour tes conseils, ils m'ont été d'un grand secours.

Un grand merci à tous les participants du jeudi football : Victor, Chris, Burhan (magnifique lancé de bouteille), Romain, Alex, Thibault, Amandine, Ben, Guillaume, pour cette activité décompression après le labo. Et dommage que François soit arrivé en hiver et que tu n'aies donc pas pu participer.

Je remercie également Cindy pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté durant ces trois années de thèse. Merci pour ces moments de rire, de soutien lors des galères (extinction des lumières lors des injections) et d'avoir fait parler mon petit Natsu ! Je remercie par la même occasion Olivier et Julien pour leur aide lors du prélèvement des poumons, et pour ton rire Julien qui égaye notre journée.

Je remercie également Catherine et Carla pour leurs conseils.

Un grand merci également à Arlette pour sa présence en cytométrie (même si j'ai fait très peu d'expériences, tes conseils ont été indispensables), pour la dégustation de très bons vins avec un peu de truffe, pour la préparation du repas de Noël et surtout pour ta joie de vivre.

Je te remercie Baptiste pour avoir été un stagiaire motivé, agréable, drôle, avec un magnifique sens de l'art (mon timer est magnifique, certains sont jaloux) et pour ton aide apportée en cette fin de thèse. Je remercie également Pierre-Marie pour son aide lors des révisions du papier.

Un grand merci à tout le 3<sup>ème</sup> étage pour ces années passées en votre compagnie. Je remercie particulièrement Cédric et Dominique pour leur soutien et pour les discussions que nous avons pu avoir dans le L2.

Je tiens à remercier également ma famille et ma belle-famille pour son soutien : ma maman pour ces encouragements, ma sœur pour sa compréhension et son soutien, mon père, Nico, Patrick, Jean Paul et Corinne bien entendu pour ces sms d'encouragement.

Un petit clin d'œil également à Tsuky, Kaze et Yuki (n'oublions pas Kiwi même si sa présence fut brève) pour leur chant réconfortant. Merci à mon petit Natsu pour tout le bonheur que tu m'apportes.

Un énorme merci à mon chéri qui sans lui ma thèse aurait été très difficile, merci pour ton soutien lors de mes déprimés, tes encouragements, tes corrections. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeurs, de comprendre que même le week-end certaines expériences nécessitent de revenir au laboratoire. Je pourrais te remercier pour pleins d'autres choses mais cela risque d'être trop long donc merci pour tout.

## **Résumé :**

clAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis 1*) possède une activité E3-ubiquitine ligase et présente des propriétés oncogéniques. Récemment, notre équipe a montré que clAP1 pouvait réguler l'activité du facteur de transcription E2F1. L'objectif de mon travail de thèse était d'approfondir les mécanismes de cette régulation et d'évaluer l'importance de la coopération clAP1-E2F1 dans l'activité oncogénique de clAP1.

J'ai démontré une interaction d'E2F1 avec la poche hydrophobe du domaine BIR3 de clAP1. J'ai par ailleurs démontré l'importance de la première hélice  $\alpha$  de ce domaine pour l'interaction de clAP1 avec E2F1 et avec les autres protéines partenaires de clAP1 capables de lier la poche hydrophobe du domaine BIR3.

De plus, j'ai participé au travail montrant pour la première fois une régulation d'E2F1 par une ubiquitinylation non dégradative. clAP1 permet la conjugaison de chaînes d'ubiquitines de type K63 sur les lysines 161 et 164 d'E2F1. Cette modification post-traductionnelle est indispensable à la stabilisation de la protéine lors d'un stress génotoxique et elle permet le recrutement du facteur de transcription sur les promoteurs des gènes cibles.

Enfin, l'analyse des propriétés oncogéniques de clAP1 n'ont pas permis, à ce jour, d'évaluer l'importance de la coopération clAP1-E2F1. Cependant, nous avons montré l'importance du domaine BIR1 pour les propriétés oncogéniques de clAP1 (domaine nécessaire à l'interaction de clAP1 avec l'adaptateur moléculaire TRAF2).

**Mots clés :** clAP1, E2F1, ubiquitinylation, IBM.

## **Abstract:**

The cellular inhibitor of Apoptosis 1 (clAP1) behaves as an E3 ubiquitin ligase and has oncogenic properties. Previously, our team has shown that clAP1 can regulate the E2F1 transcription factor activity. My research project has been focused on deepening our current knowledge on this interaction. Firstly, we characterized the E2F1-clAP1 interaction, then we analyzed the regulation of E2F1 by clAP1 and finally assessed the importance of the clAP1-E2F1 interaction for the oncogenic properties of clAP1.

I have demonstrated a interaction of E2F1 with the hydrophobic pocket of the BIR3 domain of clAP1. Moreover, I highlighted that the alpha 1 helix of the BIR3 domain is mandatory for the stability of this pocket. Moreover, we discovered an ubiquitination on lysine 161 and 164 of E2F1 by clAP1. This ubiquitination is essential for the stability and transcriptional activity of E2F1. Finally, it appears that the clAP1 BIR1 domain that is required for the interaction with TRAF2 is involved in its oncogenic properties.

**Keys words:** clAP1, E2F1, ubiquitination, IAP-Binding-Motif.

## Table des matières

I)	Situation du sujet de thèse : .....	14
II)	Introduction Bibliographique 1 <sup>ère</sup> partie : cIAP1. ....	16
1)	cIAP1 membre de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis) : .....	16
a)	Découverte de la famille des IAP : .....	16
b)	Structure de cIAP1 : .....	17
c)	Mécanisme d'ubiquitylation : .....	22
d)	Régulation de l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1 : .....	26
2)	Fonctions de cIAP1 : .....	28
a)	Apoptose : .....	28
b)	Régulation de la signalisation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B : importance des partenaires RIP1, NIK .....	31
c)	Immunité innée : importance des partenaires RIP2, TRAF3 .....	34
d)	Autres Fonctions : .....	35
e)	Analyse des souris déficientes : .....	37
3)	Implication de cIAP1 dans le cancer : .....	37
4)	Antagonistes des IAP : les « Smac mimetics » .....	38
III]	Introduction Bibliographique 2 <sup>ème</sup> partie : E2F1. ....	41
1)	E2F1 membre de la famille E2F .....	41
a)	Découverte et classification de la famille E2F : .....	41
b)	Fonction d'E2F : .....	44
2)	Régulation du facteur de transcription E2F1 .....	46
a)	Régulation du facteur de transcription E2F1 au cours du cycle cellulaire : .....	49
b)	Régulation du facteur de transcription E2F1 lors d'un stress génotoxique : .....	53
c)	Stimulation spécifique de gènes cibles d'E2F1 : .....	55
3)	E2F1 et Cancer : .....	59
IV]	Résultats : .....	61
1)	Etude des mécanismes de régulation d'E2F1 par cIAP1 .....	62
2)	Caractérisation de l'interaction cIAP1 – E2F1 : .....	75
3)	Etude des propriétés oncogéniques de cIAP1 : .....	82
V]	Discussion : .....	88

1) Régulation d'E2F1 par cIAP1 : .....	88
2) Détermination des sites importants pour l'interaction entre cIAP1 et E2F1 : .....	92
3) Etude des propriétés oncogéniques de cIAP1 : .....	96
4) Conclusion : .....	99
VI] Bibliographie : .....	102
VII] Annexe: .....	123
1) Matériel et méthode .....	123
a) Culture cellulaire et traitements : .....	123
b) Construction plasmidique et transfection d'ARN interférents : .....	123
c) Test de transactivation : .....	124
d) Extrait cellulaire et immuno-blotting : .....	125
e) Test d'ubiquitinylation : .....	126
f) GST-pull Down : .....	126
g) Test de prolifération cellulaire : .....	127
h) Purification des ARN, Reverse Transcription et qPCR : .....	128
i) Immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) : .....	128
j) Analyse du cycle cellulaire : .....	129
k) Création des lignées MEF cIAP1 <sup>-/-</sup> cIAP2 <sup>-/-</sup> restaurées avec les différents mutants de cIAP1 : 129	
l) Expérimentation in vivo sur la souris Nude : .....	129
m) Test statistique : .....	129
2) Article : .....	130



## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1: Principales cibles de cIAP1 .....</b>	<b>36</b>
<b>Tableau 2: Cibles d'E2F1 : .....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau 3:Micro-ARN ciblant le facteur de transcription E2F1 :.....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 4:Liste non exhaustive de cofacteurs d'E2F1 :.....</b>	<b>47</b>

## Liste des figures :

Figure 1: Propriétés acquises de la cellule cancéreuse au cours du mécanisme de transformation d'après Hanahan & Weinberg.....	14
Figure 2: Structure des membres de la famille des IAP.....	17
Figure 3: Alignement des séquences de cIAP1, cIAP2 et XIAP.....	18
Figure 4: Structure 3D des domaines BIR1 et BIR3.....	18
Figure 5: Reconnaissance des motifs IBM par cIAP1.....	20
Figure 6: Réaction d'ubiquitylation.....	23
Figure 7: Représentation 3D et séquence de l'ubiquitine.....	24
Figure 8: Différents types d'ubiquitylation.....	26
Figure 9: Notion de conformation fermée et ouverte de cIAP1.....	27
Figure 10: régulation des caspases par cIAP1.....	29
Figure 11: Inhibition de la formation des plateformes protéiques impliquées dans l'apoptose par cIAP1.....	31
Figure 12: Régulation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par cIAP1.....	33
Figure 13: Régulation de cIAP1 de l'immunité innée.....	35
Figure 14: Structure de certains Smac-mimetics et du térapeptide AVPI.....	40
Figure 15: Structure des membres de la famille E2F.....	42
Figure 16: Structure de la famille DP et dimérisation.....	43
Figure 17: Niveau d'expression d'E2F1 au cours du cycle cellulaire.....	49
Figure 18: E2F1 en phase G0 du cycle cellulaire.....	50
Figure 19: E2F1 en phase G1 – S.....	51
Figure 20: E2F1 au cours de la phase S.....	52
Figure 21: E2F1 en fin de phase S et début de phase G2.....	52
Figure 22: Modification post-traductionnelle impliquée dans la stabilisation du niveau protéique d'E2F1.....	55
Figure 23: Orientation du rôle d'E2F1 par ses modifications post-traductionnelles.....	57
Figure 24: Sites des modifications post-traductionnelles d'E2F1.....	58
Figure 25: cIAP1 stabilise et stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 par ubiquitylation :.....	64
Figure 26: cIAP1 régule E2F1 par ubiquitylation de type K63 des lysines 161 et 164 d'E2F1.....	66
Figure 27: Analyse de l'ubiquitylation d'E2F1 et de ses mutants K161/164R et K185R.....	67
Figure 28: Les lysines 161 et 164 d'E2F1 sont essentielles à son activité.....	68
Figure 29: cIAP1 stabilise E2F1 lors d'un endommagement de l'ADN.....	70
Figure 30: Une étape préalable de méthylation d'E2F1 par une arginine méthylase est nécessaire pour l'ubiquitylation d'E2F1 induite par cIAP1.....	71
Figure 31: L'ubiquitylation de type K63 d'E2F1 réalisée par cIAP1 est régulée au cours du cycle cellulaire.....	73
Figure 32: Influence de Rb sur l'ubiquitylation d'E2F1.....	74

<b>Figure 33: E2F1 interagit avec la poche hydrophobe de cIAP1 .....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 34: l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 est essentielle au maintien de la poche hydrophobe .</b>	<b>78</b>
<b>Figure 35:: Recherche d'un « IAP Binding Motif ».....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 36: Caractérisation du mutant E2F1<math>\Delta</math>IBM .....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 37: Analyse de l'impact de la restauration de cIAP1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de cIAP1 ou de cIAP1 et cIAP2. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 38: Impact de la restauration de mutants de cIAP1 sur la croissance tumorale et la formation de nodules pulmonaires .....</b>	<b>85</b>
<b>Figure 39: Hypothèse d'action de cIAP1 et des déubiquitinasés UCH37 et POH1</b> Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 40: Alignement de la séquence du domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 et du motif de liaison du domaine BIR3 de XIAP présent chez ARTS.....</b>	<b>94</b>

## Abréviations :

**Apaf-1:** Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

**APC/C:** Anaphase-promoting complex/cyclosome

**ATM:** Ataxia telangiectasia mutated

**ATR:** ATM Rad3 related

**BIR:** Baculovirus Iap Repeat

**CARD:** Caspase Recruitment Domain

**Caspase 3/7/9:** Cysteine-dependent aspartate-directed protease 3/7/9

**Chk1:** checkpoint kinase 1

**ciAP1/2:** cellular Inhibitor of Apoptosis 1/2

**d'IKK $\gamma$ :** Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma

**DAMPs:** Danger/Damage-Associated Molecular Patterns

**DHFR:** Dihydrofolate reductase

**DISC:** Death inducing signaling complex

**DP1:** Dimerization Partner 1

**DUB:** deubiquitinating enzyme

**E2F:** E2 promoter binding factor

**E2F1:** E2 promoter binding factor 1

**EGFR:** Epidermal growth factor receptor

**FADD:** Fas associated protein with death domain

**HAT:** Histone acetyltransferase

**HCF1:** Host cell factor 1

**HDAC:** Histone deacetylase

**HECT:** Homologous to E6-accessory protein Carboxy Terminus

**IAP:** Inhibitor of Apoptosis

**IBM:** IAP Binding Motif

**IL-1 $\beta$ :** Interleukin 1 beta

**IRF:** Interferon Regulatory Factor

**I $\kappa$ B:** inhibitor of kappa B

**JAMMs:** JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes

**LUBAC:** linear ubiquitin chain assembly complex

**MAP3K5:** Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase 5

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase

**MCL1:** Myeloid Cell Leukemia 1

**MDM2:** mouse double minute

**MLL:** mixed-lineage leukemia

**MyD88:** Myeloid Differentiation primary response protein 88

**NEAT2:** nuclear enriched abundant transcript 2

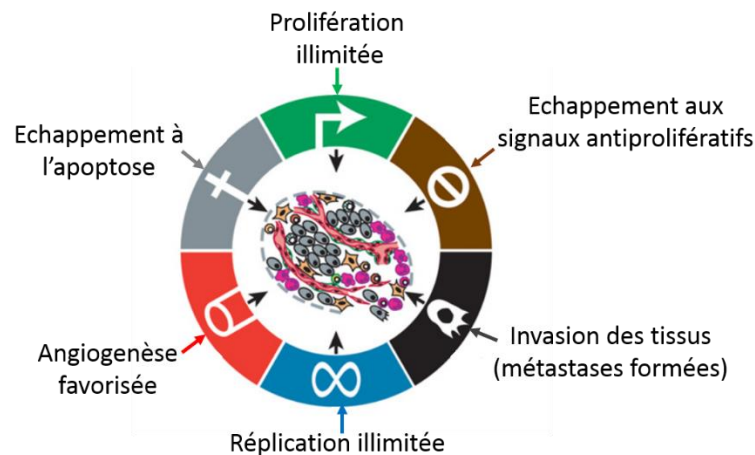
**NEDD8:** neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8

**NES**: nuclear export signal  
**NF- $\kappa$ B**: Nuclear factor kappa b  
**NIK**: Nuclear factor kappa b Inducing Kinase  
**NLR**: Nod-Like Receptor  
**NLRP3**: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3  
**OTUs**: ovarian tumour proteases  
**PAD4**: peptidyl arginine deiminase 4  
**PAMP**: Pathogen Associated Molecular Patterns  
**Pc2**: Polycomb 2 protein  
**PCNA**: proliferating cell nuclear antigen  
**PRMT1/5**: Protein arginin N-methyltransferase 1/5  
**PRRs**: Pattern Recognition Receptor  
**Rb**: Retinoblastoma  
**RING**: Really INteresting Gene  
**RIP1**: Receptor interacting serine/threonine protein kinase 1  
**RLR**: RIG-Like Receptor  
**SENp8**: SUMO/sentrin peptidase family member, NEDD8 specific  
**Skp2**: S-phase kinase-associated protein 2  
**SM**: Smac mimetics  
**Smac**: second mitochondria derived activator of caspase  
**SUMO**: Small Ubiquitin-like MOdifier  
**TAK1**: Transforming growth factor beta activated kinase 1, TAK1/TAB  
**TLR**: Toll-Like-Receptor  
**TNFR1**: Tumor Necrosis Factor Receptor 1  
**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor alpha  
**TRADD**: Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain  
**TRAF2**: TNF receptor associated factor 2  
**UBA**: Ubiquitin Binding Associated  
**UCHs**: ubiquitin-specific proteases  
**XIAP**: X-chromosome-linked IAP

# INTRODUCTION

## I) Situation du sujet de thèse :

La tumorigenèse est un processus complexe réalisé en plusieurs étapes au cours desquelles une cellule saine va progressivement acquérir différentes propriétés lui conférant un avantage sélectif. En 2000, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont identifié six propriétés essentielles à la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. Ces propriétés incluent la capacité à proliférer même en milieu hostile, l'insensibilité des cellules à des signaux antiprolifératifs, l'échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), un potentiel réplcatif illimité, la capacité de maintenir une angiogenèse favorable à la tumeur et pour finir la capacité d'invasion de nouveaux tissus afin de former des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette liste a ensuite été complétée par la capacité des cellules à reprogrammer leur métabolisme ainsi que leur capacité à échapper au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011).



**Figure 1: Propriétés acquises par la cellule cancéreuse au cours du mécanisme de transformation d'après Hanahan & Weinberg.**

L'acquisition de ces propriétés est le résultat d'une accumulation successive d'altérations géniques et épigénétiques. Parmi ces altérations, on compte des anomalies d'expression d'une famille de protéines nommée IAP (*Inhibitor of Apoptosis*). Mon équipe d'accueil s'intéresse particulièrement à un membre de cette famille nommé cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis 1*).

cIAP1 est une protéine à activité E3-ubiquitine ligase identifiée grâce à sa capacité à bloquer l'apoptose. Elle est cependant impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires incluant la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose, la réponse immunitaire innée, l'inflammation, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Les travaux antérieurs de mon équipe d'accueil ont montré une double localisation subcellulaire de cette protéine (Plenchette et al., 2004). cIAP1 est exprimé dans le noyau des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et des cellules épithéliales peu différenciées (Plenchette et al., 2004).

Lors de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en macrophages, cIAP1 subit une translocation du noyau vers le cytoplasme, plus précisément au niveau de l'appareil de golgi (Didelot et al., 2008; Plenchette et al., 2004). Cette translocation est nécessaire à la différenciation.

Dans le cytoplasme des monocytes et des macrophages, cIAP1 contrôle la durée d'activation de NF- $\kappa$ B grâce à sa capacité à lier, à ubiquitinyler et à stimuler la dégradation par le protéasome de l'adaptateur moléculaire TRAF2 (Dupoux et al., 2009). Dans une seconde étude, mon équipe montra la liaison de cIAP1 cytoplasmique avec RhoA, Rac1 et cdc42. Ce sont des petites protéines G de la famille Rho qui régulent des modifications du cytosquelette d'actine. cIAP1 contrôle l'activation de cdc42 suite à une stimulation des cellules par le TNF $\alpha$  et contrôle la formation de filopodes. De plus, cIAP1 contrôle les propriétés invasives des cellules (Marivin et al., 2014).

Lors d'une recherche de partenaires nucléaires de cIAP1, Jessy Cartier a identifié le facteur de transcription E2F1 (Cartier et al., 2011). Ce facteur est un important régulateur du cycle cellulaire et stimule l'activité des gènes responsables du passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. cIAP1 peut lier E2F1 dans toutes les phases du cycle cellulaire. Cette protéine est recrutée avec E2F1 sur les promoteurs des cyclines E et A en phase S du cycle cellulaire et stimule l'activité du facteur de transcription. Cette fonction de cIAP1 est liée à son expression nucléaire puisqu'elle n'a pas été retrouvée dans des cellules exprimant la protéine cIAP1 exclusivement dans le cytoplasme. Mon sujet de thèse est issu de cette étude et avait pour objectifs de comprendre les mécanismes de régulation d'E2F1 par cIAP1 et d'évaluer l'importance de cette interaction dans les propriétés oncogéniques de cIAP1.

Pour la compréhension des travaux effectués et des résultats obtenus au cours de mes trois années de thèse, un rapport bibliographique est présenté sous forme d'introduction.



## II) Introduction Bibliographique 1<sup>ère</sup> partie : cIAP1.

### 1) cIAP1 membre de la famille des IAP (Inhibitor of APoptosis) :

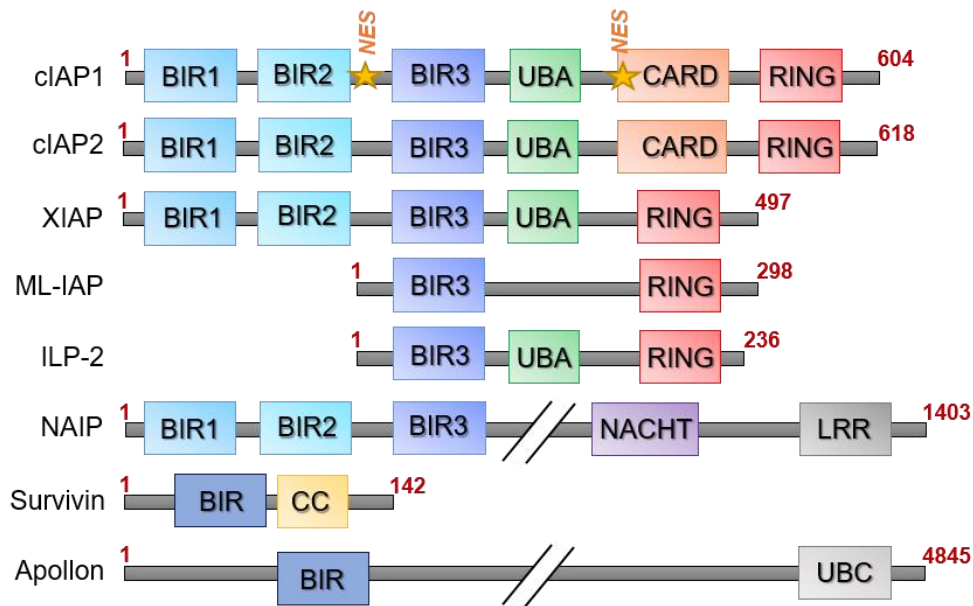
#### a) Découverte de la famille des IAP :

L'appellation « *inhibitor of apoptosis* » a été évoquée pour la première fois en 1993 par l'équipe de Miller. En effet, lors d'une étude menée chez le baculovirus visant à trouver des analogues fonctionnels du gène codant la protéine p35 (protéine possédant des propriétés anti-apoptotiques permettant au virus de se répliquer dans des cellules hôtes d'insectes), un nouveau gène nommé « *inhibitor of apoptosis* » codant une protéine de 31kDa a été identifié. L'expression de ce gène permet d'inhiber l'apoptose de cellules SF-2 (cellules du papillon « *spodoptera frugiperda* ») infectées ou l'apoptose induite par l'actinomycine D (Crook et al., 1993).

Un homologue de ce gène a été isolé chez un autre papillon nommé « *Orygia pseudotsugata* » (Birnbaum et al., 1994) puis chez la drosophile, le nématode, le poisson zèbre et les mammifères (Fraser et al., 1999; Hay et al., 1995; Uren et al., 1996). Ces différents homologues possèdent un motif particulier composé de cystéine et histidine retrouvé en position N-terminale, nommé « *Baculovirus Iap Repeat* » (BIR) : GX<sub>2</sub>YX<sub>4</sub>DX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>WX<sub>9</sub>HX<sub>6</sub><sub>-10</sub>C. La présence de ce motif désignera l'appartenance d'une protéine à la famille des IAP (Birnbaum et al., 1994).

Huit membres (Figure n°2) de la famille des IAP, possédant un ou 3 domaines BIR, sont retrouvés chez les mammifères (Silke and Vucic, 2014):

- NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*; BIRC1: *Baculoviral IAP repeat-containing protein1*),
- cIAP1 (*cellular IAP1*; BIRC2; HIAP2; MIHB),
- cIAP2 (*cellular IAP2*; BIRC3; HIAP1; MIHC),
- XIAP (*X-chromosome-linked IAP*; BIRC4; hILP ; MIHA),
- Survivin (BIRC5 ; TIAP),
- Apollon (BIRC6 ; Bruce),
- ML-IAP (*MeLanoma IAP*; BIRC7; KIAP; Livin)
- ILP-2 (*IAP-Like Protein 2*; BIRC8).



**Figure 2: Structure des membres de la famille des IAP**

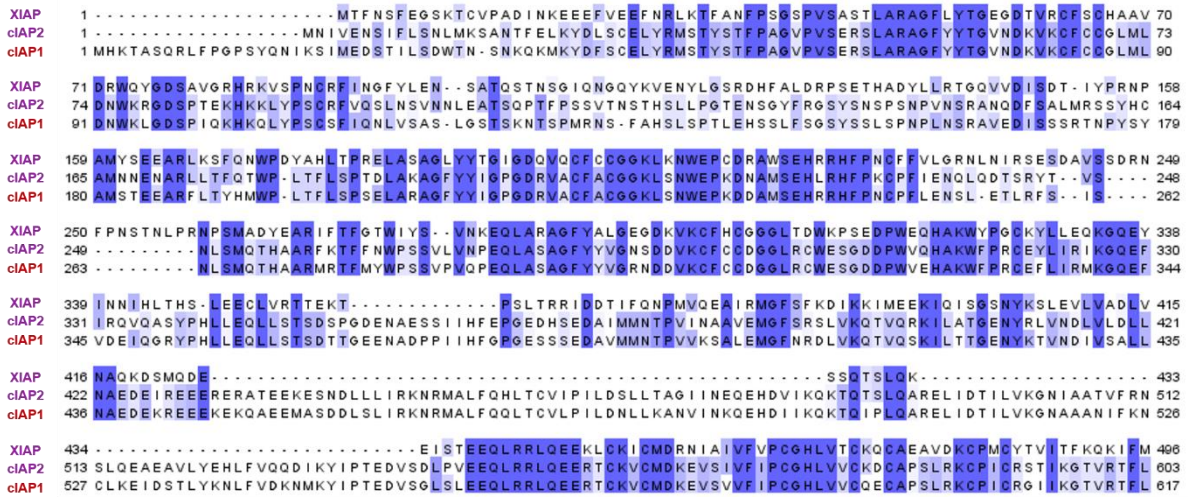
Représentation de la structure des membres de la famille des IAP d'après Silke & Vucic, 2014.

**BIR** : *Baculovirus Iap Repeat* : domaine d'interaction protéine-protéine. **UBA** (*Ubiquitin Binding Associated*) : domaine de liaison de chaînes d'ubiquitines de protéines ubiquitinylées. **CARD** (*Caspase Recruitment Domain*) : régulateur du domaine RING (inhibe l'activité E3 ubiquitine ligase). **RING** (*Really INteresting Gene*) : domaine en doigt conférant une activité E3 ubiquitine ligase. Ce domaine RING permet aussi une homodimérisation nécessaire à l'activité E3-ubiquitine ligase (voir ubiquitinylation chapitre II)1d)); **UBC** (*ubiquitin-associated domain*) : permet à Apollon d'agir comme une enzyme E2 de conjugaison dans les réactions d'ubiquitinylation. **CC** (*coiled coil*) : domaine retrouvé dans les protéines associées aux microtubules; **NACHT** (*NAIP, CIITA, HET-E and TP1*) appelé aussi domaine NOD (*Nucleotide-binding and Oligomerisation Domain*) : domaine d'oligomérisation; **LRR** (*Leucine-Rich-Repeat*) : domaine de reconnaissance de molécules dérivés de pathogènes; **NES** (*nuclear export signal*) : séquences d'export nucléaire.

Mon sujet de thèse a porté essentiellement sur clAP1, la structure et les fonctions de cette protéine seront présentées dans la suite du manuscrit.

## b) Structure de clAP1 :

clAP1 possède de grandes homologies structurales et fonctionnelles avec clAP2 (Figure n°3). En effet, clAP1 et clAP2 possèdent trois domaines BIR d'interaction protéine-protéine, un domaine UBA de liaison de chaînes d'ubiquitines, un domaine CARD régulateur et un domaine RING (Figure n°2). Bien qu'il ne possède pas de domaine CARD, XIAP présente aussi de fortes homologies avec clAP1 et clAP2 (Figure n°3).



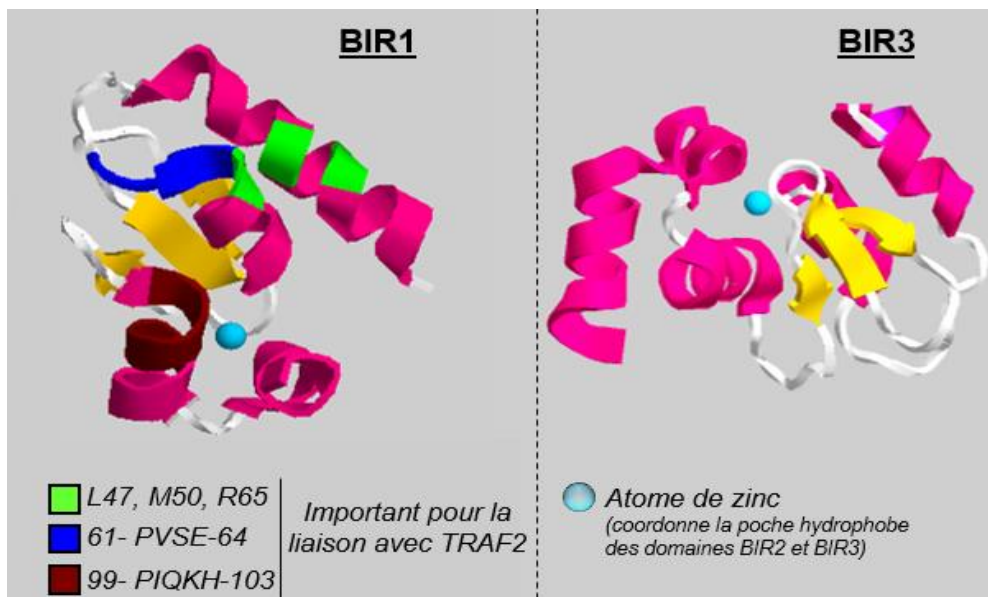
**Figure 3: Alignement des séquences de cIAP1, cIAP2 et XIAP**

Le degré d'homologie est représenté par l'intensité de coloration bleue.

L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel Jalview et des séquences importées via la base de données Uniprot.

❖ **Les domaines BIR :**

Deux types de domaine BIR ont été décrits en fonction de la présence ou non d'une poche hydrophobe qui reconnaît un motif particulier nommé IBM (Gyrd-Hansen and Meier, 2010).



**Figure 4: Structure 3D des domaines BIR1 et BIR3**

Représentation des structures 3D du domaine BIR1 et du domaine BIR3 de cIAP1 réalisée grâce au logiciel RasTop, aux données de la banque « Protein Data Bank » et d'après les articles (Mace et al., 2010; Samuel et al., 2006).

Le domaine BIR1 de cIAP1, de cIAP2 et de XIAP sont des domaines de type I ne possédant pas de poche hydrophobe. Ils permettent l'interaction des IAP avec des molécules de signalisation cellulaire. Concernant cIAP1, le domaine BIR1 permet son interaction avec TRAF2 et TRAF1 (Mace et al., 2010; Roy et al., 1997).

L'analyse des mécanismes d'interaction entre cIAP1 et TRAF2 ainsi que l'étude de la séquence acide aminé de TRAF2 ont mis en évidence l'importance des résidus E64, R65 (Samuel et al., 2006) d'une part, et des résidus L47 (Mace et al., 2010) d'autre part, qui sont indispensables à l'interaction. Les résidus M50 et R65 sont également importants puisque leurs mutations atténuent fortement l'interaction de cIAP1 avec TRAF2 (Mace et al., 2010; Samuel et al., 2006). De plus, l'étude de Mace et al. a démontré que le domaine BIR1 de cIAP1 est capable de lier un trimère de TRAF2 (Mace et al., 2010).

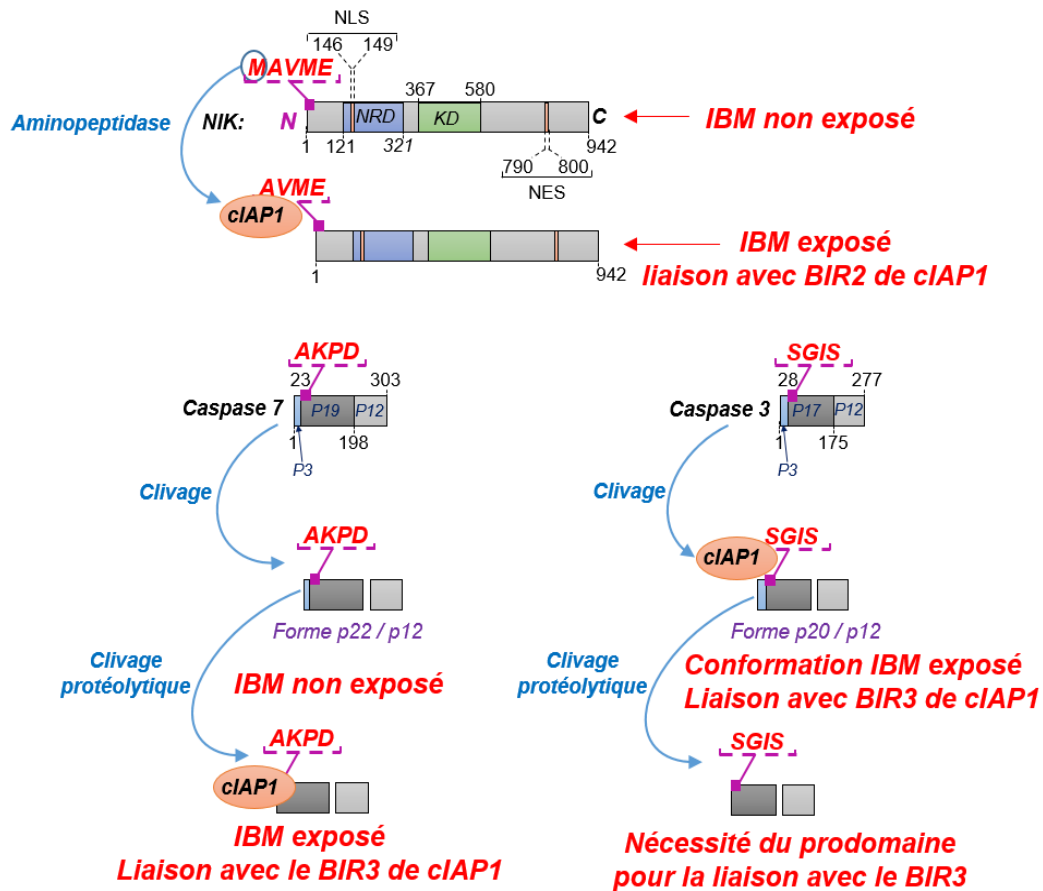
Les domaines BIR2 et BIR3 quant à eux, possèdent une poche hydrophobe qui permet l'ancrage d'un motif peptidique particulier nommé IBM (*IAP Binding Motif*). Ce motif est caractérisé par la séquence A(K/T/V/I) (P/A/E) (F/E/I/S/Y) (Vaux and Silke, 2005), avec quelques variations possibles. Le motif IBM est retrouvé chez de nombreux partenaires. Les mieux caractérisés sont les protéases de l'apoptose : les caspases 3, 7 et 9 ainsi que les inhibiteurs endogènes des IAP comme Smac (*second mitochondria derived activator of caspase*) et HtrA2 qui entrent en compétition avec les caspases pour la liaison aux IAP.

D'autres partenaires « IBM » ont aussi été décrits comme la kinase NIK (*Nuclear factor kappa b Inducing Kinase*) impliquée dans la signalisation NF- $\kappa$ B, la kinase chk1 (*checkpoint kinase 1*) impliquée dans la réponse aux dommages portés à l'ADN et dans le cycle cellulaire, la protéine GSPT1/eRF3 (*G1 to S phase transition 1/ eukaryotic polipeptide chain release factor 3*) impliquée également dans le contrôle du cycle cellulaire (Galvan et al., 2004; Hegde et al., 2003; Lee et al., 2014).

Ce motif doit être exposé en position N-terminale de la protéine pour pouvoir s'ancrer dans la poche hydrophobe. Le motif IBM des caspase 7 et de la caspase 9a situé en position N-terminale de la grande sous-unité active est exposé lors du clivage protéolytique activateur des formes pro-caspases. Les motifs IBM de Smac (AVPI) et HtrA2 sont exposés suite à l'élimination par protéolyse de la séquence d'adressage à la mitochondrie et la libération de la mitochondrie vers le cytosol des protéines matures au cours de l'apoptose. Le motif IBM de la kinase NIK est rendu accessible après élimination de la méthionine placée en position 1 par une aminopeptidase (Figure n° 5).

Des travaux plus récents ont montré que dans certaines conditions où les protéines se trouvent dans une conformation propice permettant une exposition du motif IBM, l'IBM peut s'ancrer dans la poche hydrophobe même lorsqu'il est situé à l'intérieur de la protéine. C'est le cas d'un variant de la caspase 9 nommé caspase 9b et l'intermédiaire p20/p12 de la caspase 3 constitué d'une part du pro-domaine et la sous-unité p20, et d'autre part de la petite sous-unité libre p12 (Choi et al., 2009; Vu et al., 2016).

Lors d'un criblage de partenaires potentiels de cIAP1, un motif atypique de liaison avec le BIR3 de cIAP1 a été décrit. Ce motif appelé « IBM non conventionnel » présente la séquence SR(V/P) (Kurakin and Bredesen, 2007) et est situé à l'intérieur de la protéine.



**Figure 5: Reconnaissance des motifs IBM par cIAP1**

L'aminopeptidase permet à la kinase NIK d'exposer son motif IBM « AVME », étape nécessaire à la liaison de la poche hydrophobe du domaine BIR2 de cIAP1 par NIK.

La caspase 7 doit subir des étapes de clivage afin de rendre visible son motif IBM « AKPD » alors que la forme intermédiaire p20/p12 de la caspase 3 possède une conformation permettant l'exposition de son motif IBM « SGIS ».

Les domaines BIR2 et BIR3 possèdent des spécificités et des préférences de liaison. Par exemple, l'IBM de NIK est reconnu par le domaine BIR2 tandis que les IBM de Smac, HtrA2 et de la caspase-9 sont préférentiellement reconnus par le BIR3. Cependant, sous forme de dimère, l'IBM de la première sous-unité de Smac lie le domaine BIR2 tandis que l'IBM de la seconde sous-unité lie le domaine BIR3 de XIAP (Eckelman et al., 2008; Lee et al., 2014).

### ❖ Le domaine UBA :

Les domaines UBA (*UBiquitine Associated*) sont des « récepteurs » d'ubiquitine. L'UBA de cIAP1 peut lier des molécules « mono-ubiquitine » mais aussi les chaînes « poly-ubiquitine ». Ce domaine permet à cIAP1 de lier des protéines poly-ubiquitinylées et de former des complexes de signalisation (Blankenship et al., 2009). Par exemple, lors d'un stress génotoxique, cIAP1 peut lier la forme poly-ubiquitinylée de la protéine TRAF6. Le complexe cIAP1 – TRAF6 participera ensuite à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Hinz et al., 2010). Le domaine UBA permettrait aussi la reconnaissance de la forme poly-ubiquitinylée d'IKK $\gamma$  (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma*), aussi appelée NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*), aussi impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Gyrd-Hansen et al., 2008).

Le domaine UBA permet aussi la reconnaissance de l'enzyme « *E2-ubiquitin conjugating* » UbcH5B liée à l'ubiquitine activée et favorise l'auto, mono-ubiquitinylation de cIAP1 et cIAP2 (Budhidarmo and Day, 2015).

### ❖ Le domaine CARD :

Le domaine CARD (*Caspase recruitment domain*) est un domaine conservé, retrouvé en position N-terminale ou C-terminale de protéines appelées « protéines CARD ». Dans cette situation, ce domaine permet une interaction homotypique. Il permet par exemple l'interaction de l'adaptateur Apaf-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) avec la caspase 9 (*Cysteine-dependent aspartate-directed protease 9*) lors de la formation de l'apoptosome (complexe d'activation de la caspase-9 lors de la voie intrinsèque de l'apoptose) (Lopez et al., 2011). Concernant cIAP1, le domaine CARD est situé en position centrale et aucun partenaire de cIAP1 liant le domaine CARD n'a été découvert à ce jour. Le domaine CARD permet à cIAP1 d'adopter une conformation dite fermée grâce à la création de charges électrostatiques entre les domaines CARD, BIR3, UBA et RING (voir chapitre II)1 d)).

### ❖ Le domaine RING :

Le domaine RING (*Really interesting gene*) est un domaine en doigt de zinc présentant un octet de cystéines et d'histidines. Il y a deux types de domaine RING : le domaine RING-H2 et le domaine RING retrouvé chez cIAP1 nommé RING-HC ou C3HC4. Le domaine-H2 présente six cystéines et deux histidines (position 4 et 5) alors que le domaine RING-HC possède quant à lui sept cystéines et une seule histidine retrouvée en position 4 (Jackson et al., 2000).

Ce domaine confère à cIAP1 une activité E3-ligase dans la réaction d'ubiquitylation et de neddylation (Zhuang et al., 2013). L'histidine H588 est nécessaire à l'activité E3-ligase de cIAP1.

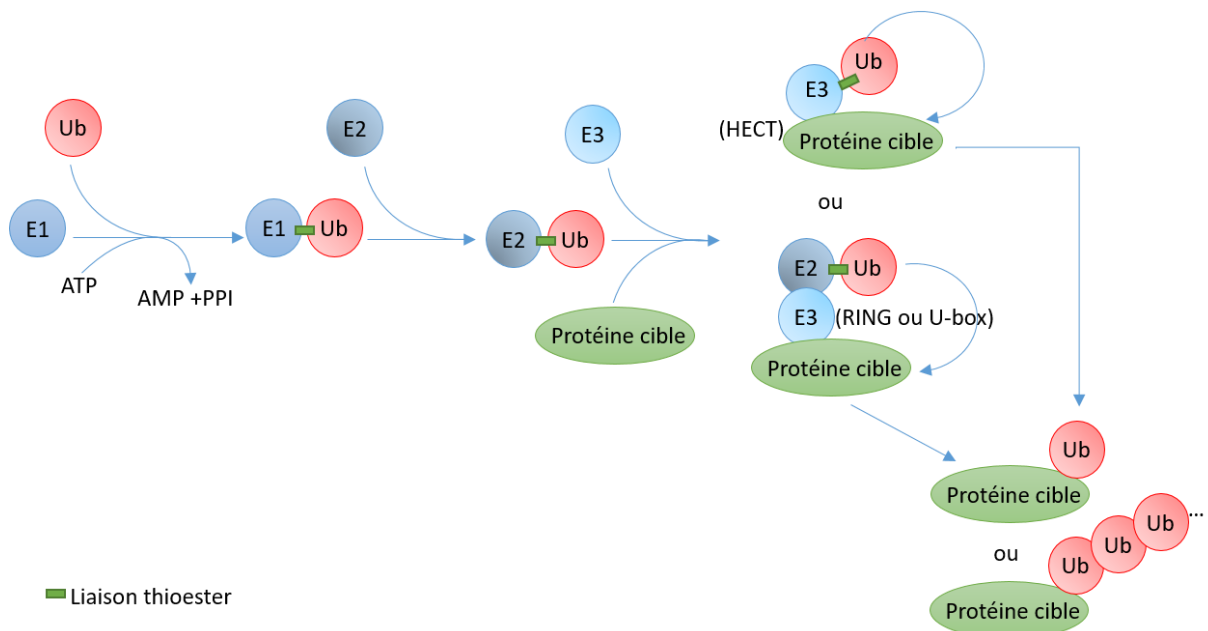
### c) Mécanisme d'ubiquitylation :

L'ubiquitylation et la neddylation sont des réactions enzymatiques permettant *in fine* la conjugaison de molécules d'ubiquitines ou de NEDD8 ainsi que des chaînes d'ubiquitines sur une protéine partenaire. Ces modifications post-traductionnelles des protéines peuvent moduler leur fonction, leur localisation, leur stabilité et leur recrutement dans des complexes multi-protéiques de signalisation.

Les réactions d'ubiquitylation et de neddylation sont très proches. Je me concentrerai sur la réaction d'ubiquitylation. Elle se fait en trois étapes impliquant trois enzymes clés :

- l'enzyme activatrice E1 (*ubiquitin-activating enzyme*)
- l'enzyme de conjugaison E2 (*ubiquitin-conjugation enzyme*)
- l'enzyme ligase E3 (*ubiquitin ligase*).

L'étape n°1 nécessite un apport d'énergie sous forme d'ATP. C'est une étape d'activation de l'ubiquitine au cours de laquelle l'enzyme E1 fixe une molécule d'ubiquitine grâce à une liaison thioester. L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'enzyme de conjugaison E2 qui va faciliter la liaison de l'ubiquitine active directement sur la protéine cible par l'E3 ubiquitine ligase, ou transmettre l'ubiquitine à l'enzyme E3 ubiquitine ligase qui par la suite transférera cette molécule sur la protéine cible.



**Figure 6: Réaction d'ubiquitylation**

L'enzyme E1 activatrice lie l'ubiquitine par une liaison thioester au niveau de la cystéine de son site actif grâce à un apport d'énergie. L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'enzyme E2 de conjugaison qui facilitera la liaison de l'ubiquitine à la protéine cible par l'E3 ubiquitine ligase. Les E3 ubiquitine ligases sont divisées majoritairement en deux groupes différents : les E3 contenant un domaine HECT (*Homologous to E6-accessory protein Carboxy Terminus*) ou les E3 contenant un domaine RING (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Les E3 ligases de la famille HECT lient l'enzyme E2 qui transférera l'ubiquitine sur l'E3 ligase de la famille HECT. Cette dernière E3 va ensuite transférer l'ubiquitine sur la protéine cible, par contre les E3 à domaine RING formeront un complexe avec l'enzyme E2 facilitant ainsi le passage de l'ubiquitine de l'enzyme E2 sur la protéine cible (Hatakeyama and Nakayama, 2003).

Chez l'homme, au moins 38 gènes codant pour une enzyme E2 ont été décrits. Une enzyme E2 peut interagir avec différentes E3 ubiquitine ligases (Ye and Rape, 2009). La protéine cIAP1 peut interagir avec les enzymes de conjugaison de la famille UbcH5 (UbcH5a/b/c), Ube2Q2, tsg101, Ube2S, Rad6b (Dynek et al., 2010b), avec Ubc6 (Wu et al., 2005), UbcH8 (Choi et al., 2009) et UBC13 (Shembade et al., 2010). cIAP1 catalyse la conjugaison de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers un substrat spécifique lié à cIAP1 via un domaine BIR. L'ubiquitine lie le substrat par une liaison isopeptidique entre la glycine 76 de l'ubiquitine et le groupement  $\epsilon$ -amino de la lysine de la protéine cible.

L'ubiquitine est une protéine de 76 résidus et contient 7 lysines, elle possède donc 7 sites potentiels de liaison d'une autre ubiquitine permettant la formation de chaînes d'ubiquitines. Un huitième site particulier, la méthionine 1 en N-terminal, permet de réaliser une chaîne d'ubiquitines nommée chaîne linéaire (Yau and Rape, 2016). Il existe donc de nombreuses possibilités de modifications de protéines par ubiquitylation en fonction de la conjugaison d'une seule molécule d'ubiquitine sur une lysine (mono-ubiquitylation) ou sur différentes lysines (multi-mono-ubiquitylation) ou la conjugaison de chaînes d'ubiquitines (poly-ubiquitylation).



La nature de la chaîne d'ubiquitines sera définie en fonction du site d'ancrage du maillon ubiquitine : M1 pour les chaînes linéaires et K6, K11, K27, K29, K48, K63 suivant la lysine de l'ubiquitine impliquée.



**Figure 7: Représentation 3D et séquence de l'ubiquitine**

La glycine 76 liant la protéine cible est représentée en violet, les lysines sites potentiels d'ubiquitinylation sont représentées en rouge. La méthionine en position 1 est représentée en vert.

Réalisation de cette figure à l'aide du logiciel RasTop, des données de la base de données « PDB » (*protein data bank*) et de la revue (Swatek and Komander, 2016).

Le devenir de la protéine modifiée va différer suivant le type de chaînes d'ubiquitines. En effet, les chaînes d'ubiquitines de type K48 et K11 sont reconnues par les récepteurs Rpn10 et Rpn13 du complexe 19S du protéasome permettant ensuite de provoquer la dégradation de la protéine. Les chaînes de type K11 n'entraînent pas toujours une dégradation de la protéine mais peuvent être un signal important dans différentes voies de signalisation (Grice et al., 2015).

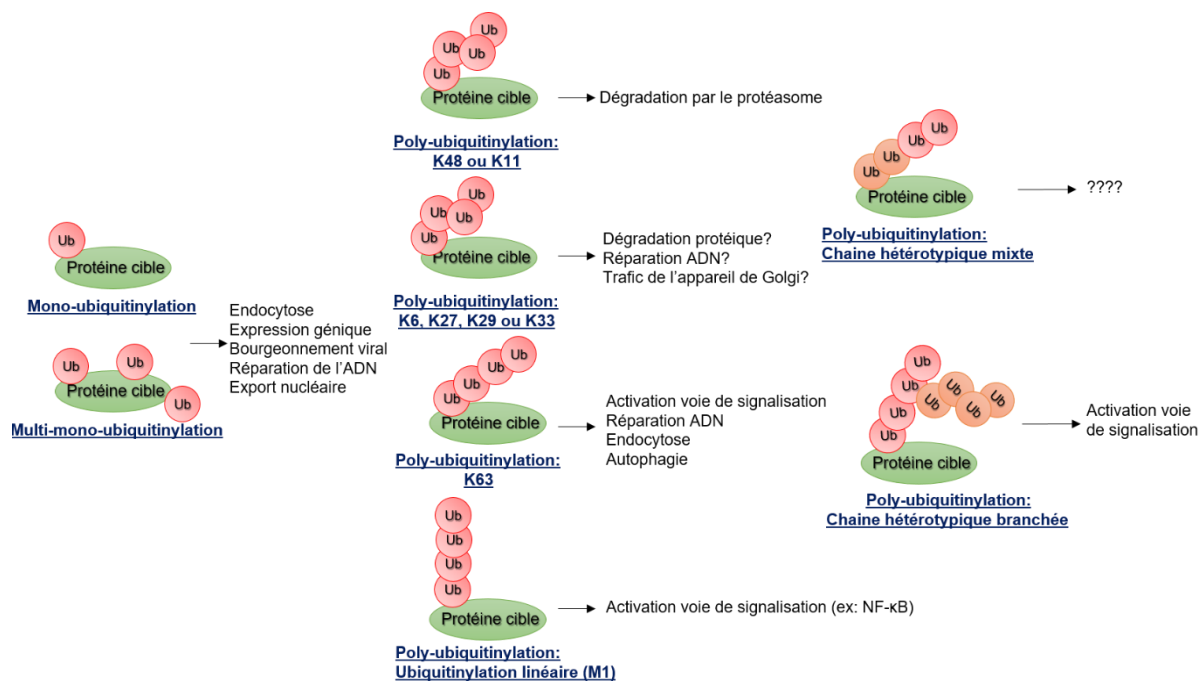
La conjugaison d'une chaîne de type K63, quant à elle, a été impliquée dans des processus cellulaires non dégradatifs comme la réparation de l'ADN, la régulation transcriptionnelle, l'endocytose, ou l'activation de protéines kinases... (Woelk et al., 2007). L'ubiquitinylation de type K63 de la kinase RIP1 par CIAP1 est reconnue par des domaines de liaison d'ubiquitines des protéines TAB2, d'IKKγ et de HOIP et permet l'assemblage d'une plateforme multi-protéique de signalisation cellulaire. La formation de chaîne M1 est impliquée dans des mécanismes de régulation de voie de signalisation, elle est notamment importante pour la réponse immunitaire (activation de la voie NF-κB). L'impact de la formation des autres chaînes (K6, K27, K29 et K33) est peu décrit à ce jour.

Pour finir, la complexité du « code ubiquitine » se poursuit avec la formation possible de chaînes hétérotypiques dites mixtes ou branchées (Yau and Rape, 2016) et l'association de différentes formes de modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation et la phosphorylation ou l'acétylation (modification post-traductionnelle remaniant le signal produit) (Swatek and Komander, 2016).

Une étude récente montre une protection de l'ubiquitylation K63 induite par TRAF6 par l'ajout de chaînes K48 par HUWE1 (empêche la déubiquitylation). Cette ubiquitylation branchée K48 - K63 est reconnue par TAB2, ce qui amplifie l'activation de NF- $\kappa$ B (Ohtake et al., 2016).

L'E3 ubiquitine ligase cIAP1 est capable de catalyser des mono-ubiquitylations ainsi que des poly-ubiquitylations de types K6, K11, K48 et K63 (Blankenship et al., 2009). cIAP1 peut induire différents type d'ubiquitylation sur une même protéine, avec des conséquences différentes. Par exemple, cIAP1 peut catalyser une ubiquitylation de type K48 de RIP1 provoquant sa dégradation ou une ubiquitylation de type K11 ou K63 qui bloquera son activité kinase et permettra la formation de complexes de signalisation conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B (Bertrand et al., 2008; Park et al., 2004). De plus cIAP1 favorise l'ubiquitylation de type K11 et de type linéaire de RIP1, ce qui permettra aussi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Bertrand et al., 2011).

La réaction d'ubiquitylation tout comme les autres modifications post-traductionnelles sont réversibles. La réaction d'ubiquitylation est réversible par l'intermédiaire de déubiquitinases (DUB : *deubiquitinating enzyme*). Ces enzymes sont regroupées en cinq familles différentes : les familles UCHs (*ubiquitin-specific proteases*), OTUs (*ovarian tumour proteases*), Josephins qui sont des protéases à cystéines et la famille JAMMs (*JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes*) de métalloprotéases. Les déubiquitinases permettent de garder un pool d'ubiquitines libres disponible pour une éventuelle nouvelle réaction d'ubiquitylation, de stabiliser une protéine en prévenant sa dégradation par ubiquitylation dégradative mais permettent aussi de moduler les chaînes d'ubiquitines (Komander et al., 2009). La stabilité de cIAP1 est notamment contrôlée par une déubiquitinase nommée OTUB1. En effet, OTUB1 enlève les chaînes de type K48 présentes sur cIAP1 prévenant ainsi la dégradation de cIAP1 par le protéasome (Goncharov et al., 2013).



**Figure 8: Différents types d'ubiquitinylation**

D'après les articles de(Ohtake et al., 2016b; Swatek and Komander, 2016; Woelk et al., 2007; Yau and Rape, 2016; Ye and Rape, 2009).

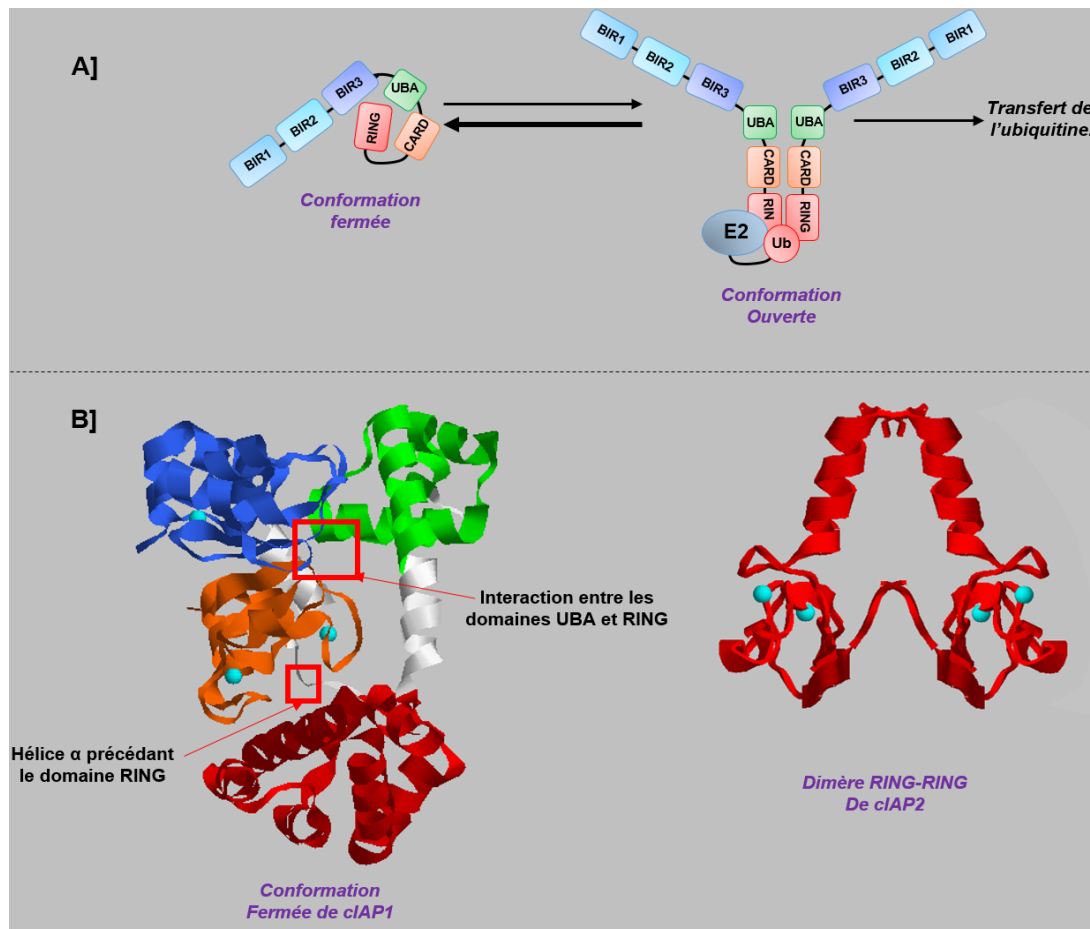
#### d) Régulation de l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1 :

Le domaine RING est fonctionnel lorsqu'il est sous forme de dimère. La dimérisation implique la phénylalanine 616 de chaque monomère, située à l'extrémité C-terminale des protéines. La dimérisation est nécessaire au recrutement de l'enzyme E2 de conjugaison ainsi que la conjugaison de l'ubiquitine sur le substrat (Silke and Vucic, 2014).

cIAP1 possède deux conformations différentes, l'une est dite fermée et l'autre est dite ouverte (Figure n°9). En conformation fermée, le domaine RING de cIAP1 est empaqueté ce qui inhibe l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 (Fulda and Vucic, 2012). Cette conformation fermée est maintenue par des liaisons électrostatiques entre les domaines RING, CARD, UBA et BIR3.

En conformation ouverte, le domaine RING de cIAP1 est exposé permettant ainsi l'homodimérisation spontanée de cIAP1 et le recrutement de l'enzyme E2, ce qui active l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 (Fulda and Vucic, 2012). Le domaine CARD est primordial dans la régulation de ces changements de conformation. En effet, l'absence de ce domaine conduit à une dimérisation et activation spontanée de cIAP1 se traduisant par une auto-ubiquitinylation et une dégradation par le protéasome (Lopez et al., 2011).

La liaison du domaine BIR3 par un « *smac mimetic* » conduit aussi à une dimérisation de cIAP1, responsable d'une activation exacerbée de l'activité E3-ligase de cIAP1, d'une auto-ubiquitinylation ce qui conduira à la dégradation de la protéine par le protéasome, (voir chapitre II)1) f) (Budhidarmo and Day, 2015).



**Figure 9: Notion de conformation fermée et ouverte de cIAP1**

A) Représentation schématique des conformations possibles de la protéine cIAP1.

B) Représentation de la structure 3D de la protéine cIAP1 en conformation fermée et de la dimérisation par le RING de la protéine cIAP1 (utilisation du logiciel Rastop et de la banque de donnée PDB).

Les domaines BIR sont représentés en bleu (bleu foncé pour le domaine BIR3), le domaine UBA en vert, le domaine CARD en orange et le domaine RING en rouge. Les atomes de zinc sont représentés par une sphère bleue.

Les domaines RING, CARD, UBA et BIR3 forment des liaisons électrostatiques entre eux permettant de maintenir la conformation fermée. Lorsque cette conformation est perturbée (par exemple par la liaison d'un *smac mimetic* au domaine BIR3), cIAP1 passe en conformation ouverte, exposant ainsi son RING qui dimérisera avec une autre RING.

D'après (Budhidarmo and Day, 2015; Fulda and Vucic, 2012).

## 2) Fonctions de cIAP1 :

Les fonctions cellulaires de cIAP1 sont directement liées à sa capacité à lier des protéines partenaires via un domaine BIR et à catalyser la conjugaison d'ubiquitines, modulant ainsi leur stabilité, leur recrutement dans des plateformes de signalisation ou leur activité (Tableau n°1). L'identification de nouveaux partenaires des IAP est donc un enjeu important afin de mieux comprendre l'activité de cette protéine et son rôle dans la carcinogenèse. Les partenaires les plus étudiés sont des acteurs des voies de mort cellulaire et des régulateurs des voies d'activation de NF- $\kappa$ B.

### a) Apoptose :

Il existe deux voies différentes d'activation de l'apoptose : la voie extrinsèque impliquant des récepteurs de mort et la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie.

Le premier rôle attribué aux membres de la famille des IAP, comme leur nom le suggère, est l'inhibition de l'apoptose. cIAP1 peut contrôler l'apoptose par deux mécanismes distincts :

- en modulant l'activité des caspases, protéases à cystéine effectrices de l'apoptose ;
- en empêchant la formation de plateforme d'activation des caspases.

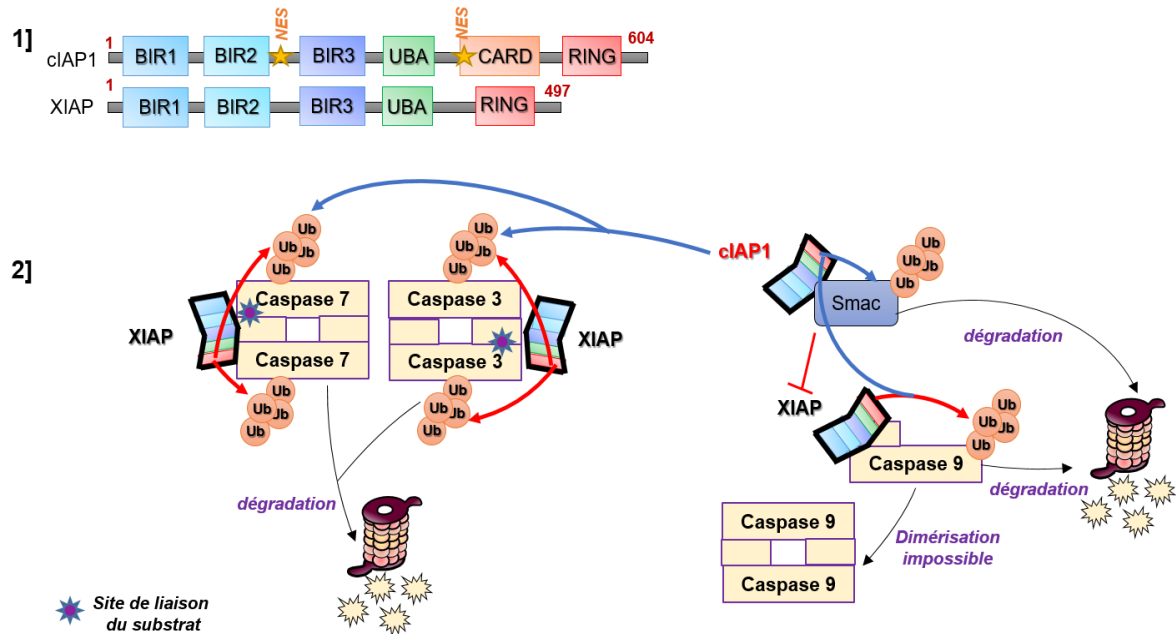
#### ❖ Régulation des caspases par cIAP1 :

Les membres de la famille des IAP sont capables de lier directement les caspases-3, 7 et 9. XIAP a la capacité d'inhiber directement l'activité des caspase-3 et 7. En effet, XIAP lie l'IBM des caspases 3 et 7 *via* les poches hydrophobes des domaines BIR2 et BIR3, et, grâce à des résidus (résidus 140 à 156) situés en amont du domaine BIR2, va masquer le site de liaison du substrat de la caspase, la rendant ainsi inactive. En ce qui concerne la caspase 9, XIAP lie son motif IBM et empêche sa dimérisation activatrice (Chai et al., 2001; Eckelman and Salvesen, 2006; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). De plus, le domaine RING de XIAP permet la dégradation des caspases 3, 7 et 9 par ubiquitinylation dégradative (Chen et al., 2003; Creagh et al., 2004; Morizane et al., 2005; Suzuki et al., 2001).

L'effet inhibiteur de XIAP peut être contrecarré par la protéine Smac. Cette protéine est présente au niveau de la membrane mitochondriale. Lors d'un stimulus pro-apoptotique, la séquence d'adressage à la mitochondrie de Smac est clivée, permettant ainsi sa libération dans le cytoplasme sous forme mature. Smac sous forme mature va ensuite se lier à XIAP via les domaines BIR et inhiber de façon compétitive l'interaction XIAP-caspases (Verhagen et al., 2000).

Les résidus permettant à XIAP d'inhiber les caspases ne sont pas retrouvés dans cIAP1. En accord avec cette observation, cIAP1 est incapable d'inhiber directement l'activité des caspases.

Cependant, les domaines BIR2 et BIR3 de cIAP1 peuvent lier les IBM des formes actives des caspases et l'IBM de Smac. Ainsi, cIAP1 est capable tout comme XIAP d'induire une ubiquitinylation dégradative des caspases 3 et 7. L'analyse de l'affinité des IAP avec les caspases et Smac suggèrent cependant que cIAP1 serait plus enclin à inhiber l'apoptose en neutralisant Smac empêchant ainsi son action inhibitrice sur XIAP. De plus, cIAP1 est capable d'induire l'ubiquitinylation de Smac qui sera alors dégradé par le protéasome (Hu and Yang, 2003)



**Figure 10: régulation des caspases par cIAP1**

1] Structure de cIAP1 et XIAP

2] cIAP1 et XIAP interagissent avec l'IBM (IAP Binding Motif) des caspases via la poche hydrophobe des domaines BIR3 ou BIR2 et BIR3 respectivement. Cette interaction leur permet de lier des chaînes d'ubiquitines de type K48 sur les caspases grâce à leur activité E3 ubiquitine ligase de leur domaine RING. Cette ubiquitinylation engendre la dégradation des caspases par le protéasome.

XIAP en liant la caspase 9 empêche la dimérisation de celle-ci et donc empêche son activation.

cIAP1 lie et ubiquitinylyle (K48) l'inhibiteur endogène des IAP nommé Smac (*second mitochondria derived activator caspases*) favorisant ainsi le rôle inhibiteur de XIAP sur la caspase 9.

❖ Régulation de la formation des complexes d'activation des caspases :  
importance du partenaire RIP1 :

Les caspases initiatrices sont activées dans des plateformes de signalisation impliquant au moins une protéine adaptatrice et la pro-caspase. Les caspases-8 et 10 sont activées au sein de différentes plateformes protéiques :

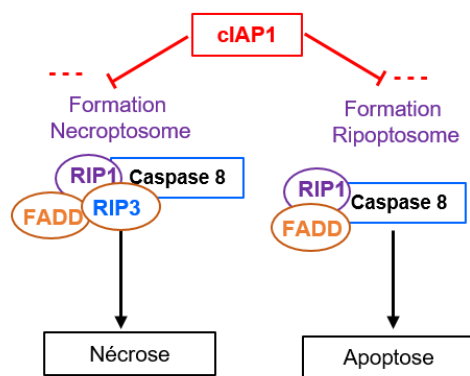
- Le DISC (Death inducing signaling complex). Celui-ci est formée suite à une stimulation du récepteur de mort Fas/CD95 ou TRAIL qui induit le recrutement sur le récepteur de la protéine adaptatrice FADD et des pro-caspases 8 ou 10. La formation de ce complexe provoque l'activation des caspases 8 et 10 qui activeront à leur tour les caspases effectrices entraînant donc la mort des cellules par apoptose (Kim et al., 2000; Scaffidi et al., 1999).

- Les Complexes II. Une stimulation du récepteur TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) par la cytokine TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) provoque le recrutement des protéines cIAP1, TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*) et RIP1 (*Receptor interacting serine/threonine protein kinase 1*) via l'adaptateur TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain*). La plateforme ainsi formée appelée complexe I permettra à terme d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (partie développée chapitre II)2 b)). Une inhibition de NF- $\kappa$ B, ou l'absence de cIAP1 ou de TRAF2 conduit à la formation de complexes secondaires appelés complexes II. Ces complexes sont formés par une interaction homotypique entre TRADD (complexe IIa) ou RIP1 (complexe IIb) et l'adaptateur FADD (*Fas associated protein with death domain*), ce dernier recrutant la pro-caspase 8 ou 10. Ces complexes II conduisent à terme à la mort de la cellule par apoptose ou nécroptose (Micheau and Tschopp, 2003; Varfolomeev et al., 2007; Vince et al., 2008). De plus, le clivage de RIP1 au niveau de l'acide aspartique 324 par la caspase 8 donne naissance à deux produits de RIP1 : un fragment N-terminal contenant le domaine sérine/thréonine de RIP1 et un fragment C terminal contenant le domaine intermédiaire et de mort de RIP1. Le fragment C terminal de RIP1 favorise l'apoptose en permettant le recrutement de FADD au niveau du récepteur TNFR1 (Kim et al., 2000).

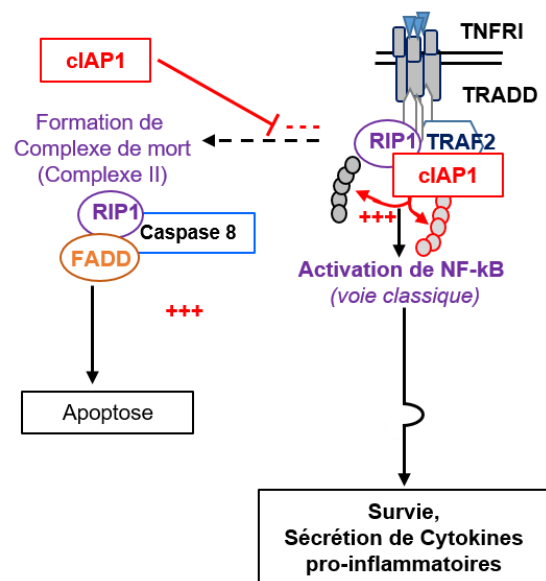
- Le Ripoptosome. Cette plateforme contient la protéine RIP1, la caspase 8 et FADD (Geserick et al., 2009). Ce complexe est formé indépendamment de l'activation des récepteurs de mort, suite à un dommage porté à l'ADN après stress génotoxique ou suite à une délétion de cIAP1 mais aussi par l'accumulation de la protéine RIP1 (Tenev et al., 2011). Une fois formé, ce complexe entraînera l'activation de la caspase 8 qui aboutira à la mort des cellules par apoptose. La présence au sein de ce complexe de la protéine RIP3 formera un nouveau complexe nommé « *necroptosome* ». Ce complexe aboutira cette fois-ci à la mort des cellules par nécrose (Bertrand et al., 2011; Feoktistova et al., 2011; Zhang et al., 2009).

clAP1 est un déterminant de l'assemblage des plateformes dépendantes de la protéine RIP1 grâce à sa capacité à modifier par ubiquitinylation cette kinase. Dans le complexe I, clAP1 induit une ubiquitinylation de type K63 et K11 de RIP1. L'ubiquitinylation de RIP1 est un signal permettant le rapprochement de complexes protéiques et engendra à terme l'activation de NF-κB (voir chapitre suivant). De plus, l'ubiquitinylation de la lysine 377 de RIP1 par clAP1 inhibe l'activité kinase de RIP1 nécessaire à la formation du Ripoptosome (Tenev et al., 2011). Pour finir clAP1 peut induire une ubiquitinylation de type K48 conduisant à la dégradation de RIP1 (Bertrand et al., 2011).

**Traitement Génotoxique (étoposide par exemple),  
Accumulation de la protéine RIP1:**



**Stimulation TNF-α:**



**Figure 11: Inhibition de la formation des plateformes protéiques impliquées dans l'apoptose par clAP1**

clAP1 peut inhiber l'apoptose en ubiquitinylant RIP1 (K63, K11 et linéaire) ce qui permet à terme à l'activation de la voie classique du facteur de transcription NF-κB. Le variant Caspase 9b augmente l'activité E3 ubiquitine ligase de clAP1 et favorise l'activation classique de la voie NF-κB. clAP1 inhibe la formation du Ripoptosome et du Necroptosome par ubiquitinylation (K48) de RIP1 qui sera alors dégradé par le protéasome.

TNFR1: *Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor*, RIP1: *Receptor-Interacting Protein 1*, TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*, TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*, clAP1: *cellular Inhibitor of Apoptosis 1*, FADD: *Fas-Associated protein with Death Domain*, APAF1: *Apoptotic peptidase activating factor 1*.

**b) Régulation de la signalisation du facteur de transcription NF-κB : importance des partenaires RIP1, NIK**

Le facteur de transcription NF-κB est retrouvé dans la cellule en tant qu'homodimère ou hétérodimère formé à partir de cinq membres : p65 (ou RelA), p105/p50 (NF-κB1), p100/p52 (NF-κB2), RelB et cRel. Cette homo ou hétéro-dimérisation est possible grâce au domaine RHD (*Rel homology domain*) présent en N terminal de ces différents membres.



A l'état inactif, les dimères NF- $\kappa$ B sont associés à une protéine de la famille I $\kappa$ B (*inhibitor of kappa B*) : I $\kappa$ B $\alpha$  (*inhibitor of kappa B alpha*), I $\kappa$ B $\beta$  (*inhibitor of kappa B beta*), I $\kappa$ B $\epsilon$  (*inhibitor of kappa B epsilon*) ou aux précurseurs p100 et p105 (Hayden and Ghosh, 2008).

Il existe deux voies différentes d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B : la voie classique ou canonique et la voie alternative ou non canonique. La protéine cIAP1 régule ces deux voies de signalisation.

❖ **Voie classique ou canonique :**

La stimulation par le TNF- $\alpha$  du récepteur TNFR1 conduit à la formation du complexe I (voir paragraphe précédent). Au sein de ce complexe, cIAP1 s'auto-ubiquitinylera et ubiquitinylera la protéine RIP1.

Les chaînes d'ubiquitines formées par cIAP1 sur RIP1 sont de plusieurs types :

- type K63 : prévient l'interaction de RIP1 avec FADD et la caspase 8 empêchant la formation du complexe II et sert de plateforme pour le recrutement d'effecteurs tels que le complexe TAK1/TAB (*Transforming growth factor beta activated kinase 1*), le complexe IKK (*I $\kappa$ B kinase*, IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$ ) et le complexe LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex* composé HOIP, HOIL-1L, SHARPIN). Ce recrutement est possible grâce au domaine de liaison d'ubiquitine présent sur TAB2 et IKK $\gamma$  (Mahoney et al., 2008; Varfolomeev et al., 2008).

- type K11 : permet d'augmenter le recrutement d'IKK $\gamma$  et donc de stimuler l'activation de NF- $\kappa$ B (Dynek et al., 2010b).

- type linéaire : permettrait d'augmenter comme celle réalisée par LUBAC, la stabilité du complexe I ainsi que le recrutement d'IKK $\gamma$  (Bertrand et al., 2011; Ofengeim and Yuan, 2013).

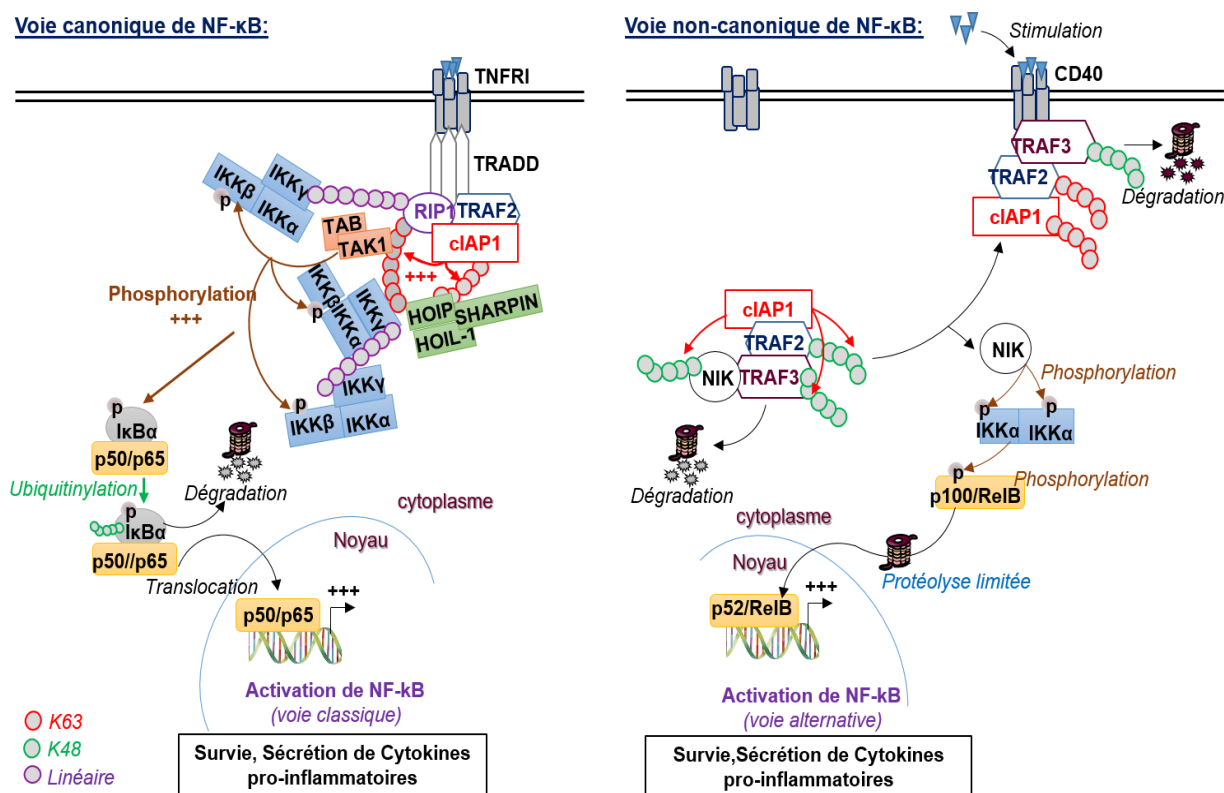
Au sein de cette plateforme de signalisation, TAK1 phosphoryle IKK $\beta$ . Cette phosphorylation entraîne la stimulation de la phosphorylation du répresseur I $\kappa$ B $\alpha$ , signal entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome ce qui libère le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (p50/p65 ou p50/cRel). Ce facteur de transcription sera transloqué dans le noyau et activera les gènes de survies (Bcl-xl, Bcl-2, Nr13, c-FLIP...) ainsi que les gènes responsables de la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8...) (Catz and Johnson, 2001; Collart et al., 1990; Hiscott et al., 1993; Kang et al., 2007; Kreuz et al., 2001; Lee et al., 1999; Mahoney et al., 2008; Son et al., 2008).

❖ Voie alternative ou non canonique :

La kinase NIK (*NF-κB inducing kinase*) est nécessaire à l'activation de la voie alternative de NF-κB en permettant la phosphorylation activatrice de la sous-unité α d'IKK (Figure n°12). Sans stimulation, le complexe TRAF2-cIAP1 lie TRAF3 qui recrute la protéine NIK. Au sein de ce complexe cIAP1 induit l'ubiquitinylation de type K48 de NIK favorisant sa dégradation par le protéasome.

Lors de la stimulation des récepteurs CD40, LTβR (Lymphotoxin β receptor), BAFF-R (BAFF receptor), le complexe cIAP1-TRAF2-TRAF3 va être recruté au niveau de ces récepteurs. Ce recrutement libère la kinase NIK. TRAF2 et TRAF3 seront dégradés suite à une ubiquitinylation dégradative de ces protéines par cIAP1 au niveau des récepteurs.

Une fois libre, NIK va phosphoryler IKKα qui phosphorylera à son tour le précurseur p100, permettant sa protéolyse limitée par le protéasome pour donner naissance à p52. Pour finir le dimère p52/RelB est transloqué dans le noyau où il active des gènes de survies ou des gènes des cytokines et chémokines pro-inflammatoires (Varfolomeev et al., 2007; Zarnegar et al., 2008).



cIAP1 régule la voie classique d'activation de NF-κB en ubiquitinylant RIP1 (K63, K11 et linéaire). Cette ubiquitinylation permet le rapprochement des complexes protéiques essentiels à l'activation de NF-κB.

De plus cIAP1 régule la voie alternative de NF-κB par l'ubiquitinylation dégradative de NIK, acteur indispensable à l'activation de cette voie alternative. Suite à une stimulation, le complexe cIAP1 TRAF2 est recruté au niveau des récepteurs, NIK est libéré et pourra activer la voie alternative.

### c) Immunité innée : importance des partenaires RIP2, TRAF3

Les récepteurs de la famille PRRs (*Pattern Recognition Receptor*) reconnaissent des motifs moléculaires nommés PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), générés suite à une infection par des pathogènes. Ces récepteurs peuvent aussi reconnaître des molécules endogènes intracellulaire: les DAMPs (*Danger/Damage-Associated Molecular Patterns*) (Bertrand et al., 2009).

La famille des récepteurs PRRs comprend plusieurs sous-familles : les récepteurs de la famille NLR (*Nod-Like Receptor*) incluant NOD1 et NOD2, les récepteurs de la famille TLR (*Toll-Like-Receptor*), les récepteurs de la famille RLR (*RIG-Like Receptor*). La stimulation des PRRs peut conduire à la formation de l'inflammasome permettant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18, à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B permettant la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires, à la sécrétion de molécules d'adhésion et de peptides antimicrobiens et à l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) ou de la voie IRF (*Interferon Regulatory Factor*).

clAP1 peut intervenir à différents niveaux :

- clAP1 contrôle l'activation de NF- $\kappa$ B. Il est recruté avec la kinase RIP2 au niveau des récepteurs NOD1/2 et catalyse l'ubiquitylation de type K63 sur la kinase RIP2. Ces chaînes d'ubiquitines sont des signaux permettant la formation de la plateforme d'activation de NF- $\kappa$ B comme précédemment décrit (Bertrand et al., 2009).

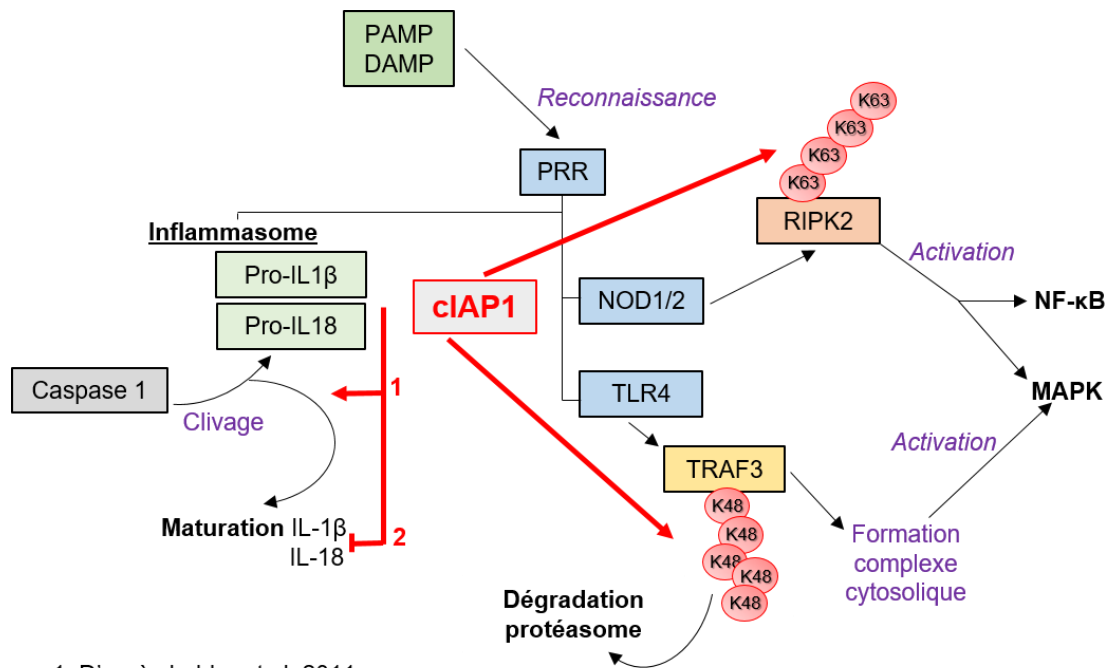
- clAP1 régule le pool d'expression de TRAF3. TRAF3 prévient la translocation cytosolique de complexes importants pour l'activation de la voie MAPK dépendante de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*). TRAF3 est donc un régulateur négatif de la voie MAPK. Lors d'une stimulation du récepteur TLR4 par le LPS, un complexe multi-protéique est formé au niveau du récepteur. Ce complexe contient : clAP1, TRAF3, TRAF6.

clAP1 ubiquityle TRAF3 (type K48) permettant sa dégradation par le protéasome.

Le régulateur négatif TRAF3 étant dégradé, la voie des MAPK peut être activée permettant ainsi la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (Tseng et al., 2010).

Des résultats contradictoires montrent un rôle de clAP1 dans la régulation de l'inflammasome. La première étude montre que clAP1 est capable d'induire une ubiquitylation de type K63 de la caspase 1 (composant de l'inflammasome), favorisant ainsi son activation et la production d'IL-1 $\beta$  mature (Labbé et al., 2011). La seconde équipe montre un effet inhibiteur de clAP1 sur la maturation de la pro-IL-1 $\beta$  après une stimulation des TLR.

Une délétion de cIAP1, cIAP2 et XIAP entraîne une augmentation de l'activation de l'inflammasome contenant l'adaptateur NLRP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*). Cette activation nécessite la kinase RIP3 et la production de radicaux oxygénés (Vince et al., 2012).



1: D'après Labbe et al, 2011  
2 : D'après Vince et al, 2012

**Figure 13: Régulation par cIAP1 de l'immunité innée**

Lors d'une réponse immunitaire cIAP1 permet d'ubiquitinyler RIPK2 entraînant la production de cytokines, chemokines ou protéines impliquées dans la réponse immunitaire via l'activation de la voie NF-κB et des MAP kinases. De plus cIAP1 provoque la dégradation de TRAF3 par le protéasome ce qui permet l'activation des MAP Kinases. Enfin, deux études contradictoires ont montré la capacité de cIAP1 à favoriser le clivage de la pro-IL-1β et pro-IL18 entraînant leur maturation ou à l'inverse empêchant la maturation de ces deux protéines.

#### d) Autres Fonctions :

D'autres partenaires de cIAP1 ont été identifiés et sont présentés dans le tableau n°1. Ces partenaires sont impliqués dans différents processus cellulaires comme le remodelage du réseau d'actine et la migration cellulaire, la différenciation, la prolifération cellulaire ...

**Tableau 1: Principales cibles de cIAP1**

Cibles	Action de cIAP1	Effet de cIAP1	Processus biologique impliqué	Référence
<b>Caspase 3, 7, 9a</b>	Ubiquitinylation dégradative (K48)	Inhibition	Apoptose	(Choi et al., 2009; Srinivasula et al., 2001)
<b>Caspase 1, pro-IL-18</b>	- Ubiquitinylation non dégradative	Stimulation	Inflammation	(Labbé et al., 2011)
<b>c-RAF</b>	Ubiquitinylation dégradative	Inhibition	Migration cellulaire et voie MAP kinases	(Dogan et al., 2008)
<b>cdc42</b>	Liaison : stabilisation forme inactive de cdc42	Régulation de l'activité	Remodelage du réseau d'actine : formation de filopodes.	(Marivin et al., 2014)
<b>Mad1</b>	Ubiquitinylation dégradative (K48)	Inhibition	Activation c-myc, Prolifération	(Xu et al., 2007)
<b>NIK</b>	Ubiquitinylation dégradative (K48)	Inhibition	Voie NF-κB	(Varfolomeev et al., 2007; Zarnegar et al., 2008)
<b>Rac 1</b>	Ubiquitinylation dégradative	Inhibition	Migration cellulaire	(Oberoi et al., 2012)
<b>RIP1</b>	Ubiquitinylation dégradative (K48) et non dégradative (K11, K63 et linéaire)	Stimulation Inhibition	Voie NF-κB Formation Ripoptosome	(Dynek et al., 2010; Mahoney et al., 2008; Ofengeim and Yuan, 2013)
<b>RIP2</b>	Ubiquitinylation non dégradative (K63)	Stimulation	Voie NF-κB et MAP kinases	(Bertrand et al., 2009)
<b>TRAF2</b>	-Ubiquitinylation dégradative -Liaison avec cIAP1 : recrutement au niveau des récepteurs de mort	Inhibition Stimulation	- Différenciation des macrophages - Voie NF-κB	(Dupoux et al., 2009; Li et al., 2002; Mace et al., 2010; Roy et al., 1997; Samuel et al., 2006)
<b>TRAF3</b>	Ubiquitinylation dégradative (K48)	Stimulation	Voie MAP kinases	(Tseng et al., 2010)
<b>TRAF6 - ATM</b>	Liaison avec cIAP1	Stimulation	Réponse aux dommages à l'ADN	(Hinz et al., 2010)
<b>Chk1</b>	Liaison avec cIAP1	Rôle indéterminé	Réponse aux dommages à l'ADN	(Galvan et al., 2004)
<b>Régulateurs</b>	Action du régulateur	Effet sur cIAP1	Processus biologique impliqué	Référence
<b>OTUB1</b>	Favorise l'activation de NF-κB stabilisant de cIAP1 (enlève les chaînes K48 de cIAP1)	Stabilisation	Voie NF-κB	(Goncharov et al., 2013)
<b>Caspase 9b</b>	Liaison : stimulation de l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1	Stabilisation	Voie NF-κB	(Vu et al., 2016)
<b>HSP90B</b>	Liaison avec cIAP1 : translocation du noyau vers le cytoplasme	Translocation	Différenciation cellulaire	(Didelot et al., 2008)

### e) Analyse des souris déficientes :

clAP1, clAP2 et XIAP présentent de fortes homologies structurales et fonctionnelles. Ils ont la capacité de lier des partenaires communs, au moins *in vitro*. Par exemple, clAP1 et clAP2 sont capables d'interagir avec l'adaptateur moléculaire TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) et la protéine kinase RIP1 (*Receptor-Interacting Protein 1*) (Park et al., 2004; Samuel et al., 2006). De plus, clAP1, clAP2 et XIAP sont tous les trois capables de lier Smac/Diablo, l'inhibiteur endogène des IAP.

Il existe donc des mécanismes de compensation et redondance fonctionnelle entre les membres de cette famille. Les souris dépourvues de clAP1, clAP2 ou XIAP ne présentent aucune anomalie phénotypique. Les souris clAP1<sup>-/-</sup> ont un niveau d'expression de clAP2 augmenté dans certains tissus tels que la rate. Inversement, une augmentation de clAP1 est retrouvée dans tous les tissus, en particulier au niveau de la rate, dans les cellules immunitaires du tissu splénique, dans les cellules du thymus, les fibroblastes embryonnaires et dans les macrophages (Mahoney et al., 2008) des souris clAP2<sup>-/-</sup>.

Une élégante étude menée par Moulin et collaborateurs dans l'équipe du Dr David Vaux (Melbourne, Australie) a montré que la délétion combinée de clAP1 et clAP2 ou clAP1 et XIAP entraîne une létalité embryonnaire des souris par hémorragie et défaillance cardiaque (Moulin et al., 2012) alors que les souris clAP2<sup>-/-</sup> XIAP<sup>-/-</sup> survivent, soulignant l'importance de clAP1. Les mécanismes de létalité ont été étudiés et impliquent la signalisation du TNFR1 et un rôle important de la kinase RIP1. En effet, les auteurs montrent qu'une perte du récepteur TNFR1 permet aux souris déficientes en clAP1 et en clAP2 de naître. De plus, les souris clAP1<sup>-/-</sup> clAP2<sup>-/-</sup> ne possédant plus la protéine kinase RIP1 sont vivantes au stade embryonnaire E15.5 alors que celles possédant la protéine RIP1 meurent entre le stade E10.5 et E11.5 (Moulin et al., 2012).

### 3) Implication de clAP1 dans le cancer :

Les propriétés oncogéniques de clAP1 ont été mises en évidence en 2006 dans un modèle d'hépatocarcinome murin. Les auteurs ont transplanté chez la souris des hépatoblastes p53<sup>-/-</sup> exprimant c-myc. Une analyse génomique des tumeurs a montré la présence dans une proportion significative de tumeurs de l'amplification d'une région chromosomique (amplicon 9A1) contenant les gènes codant clAP1, clAP2 et Yap. Une transplantation secondaire de ces cellules dans lesquelles clAP1 a été inactivé par une stratégie d'interférence à ARN diminue considérablement la croissance tumorale (Zender et al., 2006).

Dans une seconde étude visant à déterminer les évènements associés à la perte de p53 dans le développement d'ostéosarcome, l'amplicon 9A1 a aussi été identifié (Ma et al., 2009).

Enfin, dans une étude recherchant l'impact de la délétion de p53 et de Rb (*Retinoblastoma*) sur le développement de cancer mammaire, l'amplicon a de nouveau été mis en évidence dans les tumeurs issues de cellules p53<sup>-/-</sup> Rb<sup>+/+</sup> mais jamais dans les échantillons p53<sup>-/-</sup> Rb<sup>-/-</sup> suggérant que l'amplicon 9A1 pourrait compenser la perte de Rb dans le développement tumoral (Cheng et al., 2010).

Dans les tumeurs humaines, l'amplification de la région équivalente (amplicon 11q21-22) a été retrouvée dans des hépatocarcinomes (Zender et al., 2006) ainsi que dans des glioblastomes (Weber et al., 1996), médulloblastomes (Reardon et al., 1997), cancer du poumon (Dai et al., 2003; Ferreira et al., 2001), cancer de l'œsophage (Imoto et al., 2001), cancer du col de l'utérus (Imoto et al., 2002), cancer ORL (Snijders et al., 2005), cancer du pancréas (Bashyam et al., 2005).

Indépendamment de l'amplification de cette région chromosomique, cIAP1 est surexprimée dans le cancer du col de l'utérus (Liu et al., 2001), le cancer de la prostate (Krajewska et al., 2003), le cancer colorectal (Ponnelle et al., 2003), la leucémie lymphoïde chronique (Grzybowska-Izydorczyk et al., 2010; Silva et al., 2006; Vallat et al., 2003), le carcinome de la tête et du cou (cellules épidermiques) (Tanimoto et al., 2005), le carcinome de la langue (Qi et al., 2008) et le cancer de la vessie (Che et al., 2012).

De plus, des études de cohortes cliniques montrent une corrélation positive entre l'augmentation d'expression nucléaire de cIAP1 et un mauvais pronostic des patients atteints d'un carcinome primaire épidermique utérin ou d'un carcinome épidermique de la tête et du cou (Che et al., 2012). Cette corrélation a été retrouvée aussi dans le cancer de la vessie (où l'expression nucléaire de cIAP1 semble favoriser la récurrence tumorale et le risque de mortalité des patients) (Che et al., 2012) et dans la leucémie lymphoïde chronique (Grzybowska-Izydorczyk et al., 2010).

cIAP1 possède aussi des propriétés suppressives de tumeur dans certaines conditions. En effet, les gènes codant pour cIAP1 et cIAP2 sont mutés dans des échantillons de myélomes. Cette mutation entraîne une activation constitutive de la voie alternative de NF-κB (Keats et al., 2007).

#### 4) Antagonistes des IAP : les « *Smac mimetics* »

Afin de neutraliser l'activité des IAP dans les tumeurs, des antagonistes ont été synthétisés. L'objectif initial était d'inhiber l'activité « anti-caspase » de XIAP. La stratégie utilisée a consisté à construire des molécules mimant l'activité de Smac, l'inhibiteur endogène des IAP. Ces molécules ont été appelées « *Smac mimetics* » (SM). La première génération de molécules lie un seul domaine BIR2 ou BIR3 de XIAP. Ce sont des SM monovalents.

La seconde génération inclue des molécules bivalentes qui miment l'action du dimère Smac. Les SM bivalents lient le BIR2 et le BIR3 des IAP et montrent une meilleure efficacité *in vitro* que les SM monovalents (Fulda and Vucic, 2012; Welsh et al., 2016). Cependant, ces molécules ont le désavantage de présenter une mauvaise solubilité. A la différence des SM monovalents, ils ne peuvent pas être administrés par voie orale.

Les SM sont capables de lier aussi bien XIAP, cIAP1, cIAP2 que ML-IAP. Comme initialement espéré, les SM bloquent l'activité « anti-caspase » de XIAP. Cependant, ces molécules ont aussi la particularité d'induire la dimérisation et l'activation très rapide de l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1. Ceci conduit dans un premier temps à l'ubiquitylation de RIP1 et l'activation de NF- $\kappa$ B induisant la production de cytokines pro-inflammatoires, puis à une auto-ubiquitylation de cIAP1 et dans certains modèles cellulaires l'ubiquitylation par cIAP1 de cIAP2 et XIAP conduisant à une dégradation et déplétion très rapide des IAP. Ceci favorise considérablement la formation du Ripoptosome suite à stress génotoxique ou à la formation d'un complexe II suite à une stimulation des récepteurs de mort conduisant à une mort apoptotique ou nécrotique (Fulda and Vucic, 2012).

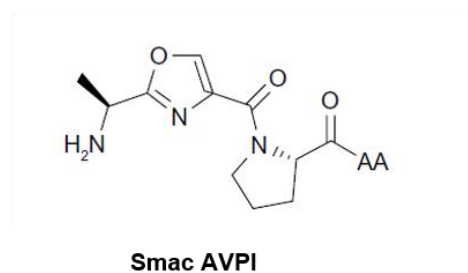
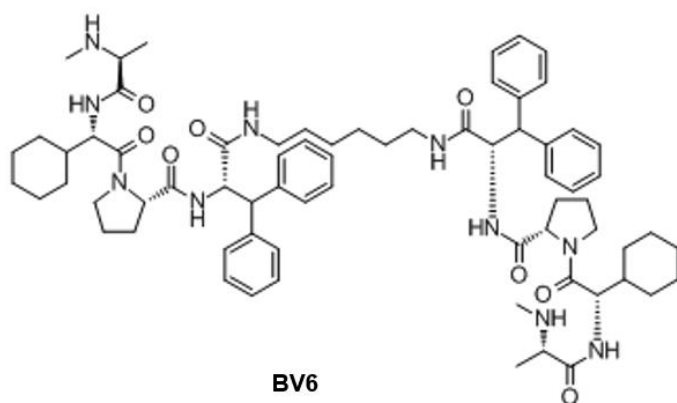
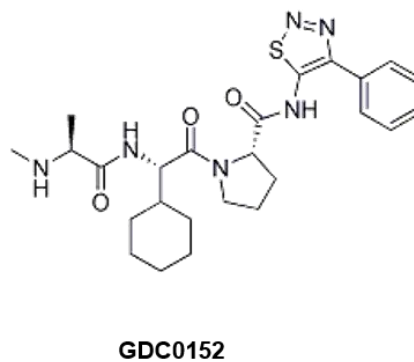
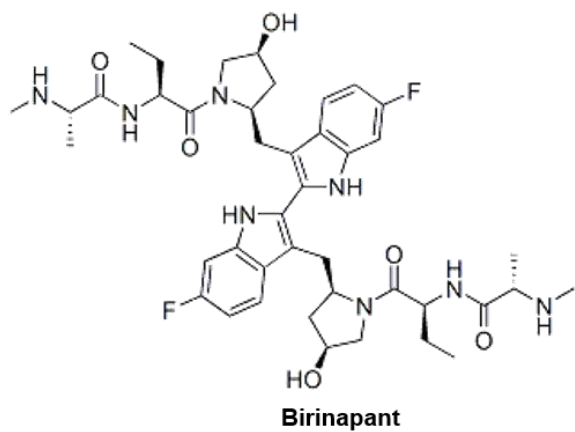
Les essais précliniques montrent une efficacité anti-tumorale dans des tumeurs solides ainsi que dans des leucémies lymphoïdes aiguës et des myélomes. Ces molécules sont de puissants agents sensibilisants à la mort cellulaire induite par la chimiothérapie, la radiothérapie ou par des agents ciblant les récepteurs de mort (Pour revue (Dubrez et al., 2013)).

Plusieurs problèmes se posent quant à l'utilisation de ces molécules. Les SM provoquent une production de cytokines pro-inflammatoires pouvant entraîner des effets secondaires indésirables sur les cellules saines du patient :

- La dégradation de cIAP1 par ajout d'un *Smac mimetic* dans des cellules de glioblastome provoque une activation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B. Cette activation favorise la sécrétion de TNF et la migration des cellules (Tchoghandjian et al., 2013)
- L'ajout de *Smac mimetics* entraîne une activation aberrante de la voie alternative de NF- $\kappa$ B. Cette activation stimule l'ostéoclastogenèse entraînant le développement de l'ostéoporose (Yang et al., 2013).

Pour finir, cIAP1 et les autres IAP possèdent de nombreux rôles importants au bon développement de la cellule, il serait donc intéressant de cibler la ou les fonctions de ses protéines impliquée(s) dans leurs propriétés oncogéniques et non dégrader la protéine entière.





**Figure 14: Structure de certains Smac-mimetics et du tétrapeptide AVPI**

Représentation de la structure chimique de deux *Smac mimetics* bivalents : le birinapant et le BV6, d'un monovalent : le GDC0152 et le tétrapeptide correspondant à l'IBM de Smac : AVPI.

### III] Introduction Bibliographique 2<sup>ème</sup> partie : E2F1.

#### 1) E2F1 membre de la famille E2F

##### a) Découverte et classification de la famille E2F :

Le premier membre de la famille E2F (*E2 promoter binding factor*), a été découvert en 1986 dans l'équipe de recherche dirigée par le Dr JR Nevins. Ce membre a été décrit comme facteur nucléaire capable d'activer le promoteur adénoviral E2 en réponse à la protéine virale E1A (Kovesdi et al., 1986). Dans les années suivantes, la même équipe a identifié différents gènes cibles de E2F dans les cellules de mammifère dont *c-myc*, *c-myb*, *DHFR* (*Dihydrofolate reductase*) et *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*). De plus cette équipe a démontré une activation précoce de ce facteur de transcription en réponse à des signaux mitogènes (Mudryj et al., 1990).

En 1991-1992, la découverte de la régulation d'E2F par le produit du gène suppresseur de tumeur Rétinoblastome (Rb) et la cycline A a fait l'objet de très nombreux articles (pour revue (Nevins, 1992)). L'équipe de recherche dirigée par le Dr LaThangue a aussi fortement contribué aux connaissances sur la biologie E2F par l'identification des co-régulateurs de la famille DP, mais aussi par l'identification d'autres membres de la famille E2F et par son analyse des mécanismes de régulation de ces protéines par des modifications post-traductionnelles.

La protéine Rb et les E2F sont très conservés et des homologues de ces protéines sont retrouvés chez de nombreuses espèces telles que les drosophiles, les vers, les grenouilles, les poulets, certaines plantes et les mammifères (Dimova and Dyson, 2005). La famille E2F comporte 10 membres chez les mammifères codés par 8 gènes : E2F1, E2F2, E2F3a, E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7a et 7b et E2F8 (Figure n°15) (pour revue (Ertosun et al., 2016)).

Les E2F sont des facteurs de transcription, capables d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles. Ils ont été divisés en trois groupes selon leur fonction dans la régulation transcriptionnelle :

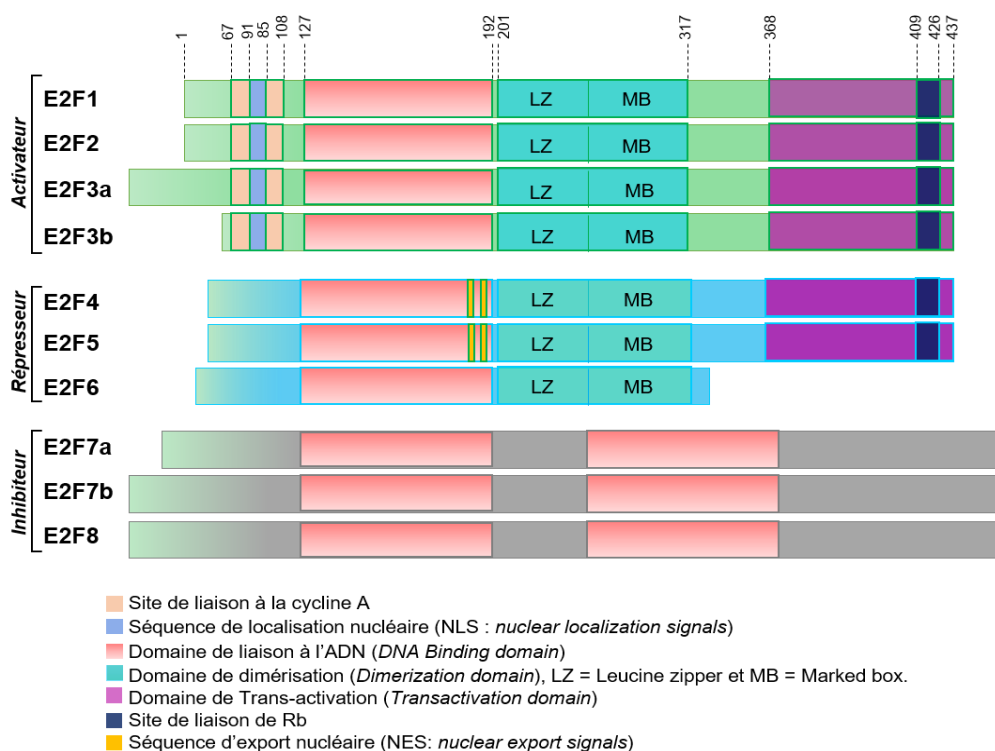
- les activateurs de la transcription E2F1, E2F2 et E2F3a sont capables de recruter une histone acétyltransférase (HAT), enzyme favorisant l'activation de la transcription en décondensant la chromatine via le transfert d'un groupement acétyle sur une histone (Ertosun et al., 2016). Leur expression est régulée au cours du cycle cellulaire. Leur activité maximale se situe en fin de phase G1, permettant l'expression des gènes nécessaires pour la synthèse de l'ADN et la progression des cellules en phase S.

- les répresseurs E2F3b, E2F4 et E2F5 ont une expression constitutive. Ils répriment la transcription de gènes contrôlant la prolifération cellulaire.

E2F4 et E2F5 interagissent avec une histone désacétylase (HDAC), enzyme possédant un rôle inverse de l'histone acétyltransférase c'est-à-dire qu'elle réprime l'expression des gènes (Ertosun et al., 2016). Concernant E2F3b, bien qu'il soit classé dans les « répresseurs », son activité est proche des E2F activateurs.

- les E2F inhibiteurs E2F6, E2F7a, E2F7b et E2F8 rentrent en compétition avec les autres membres E2F pour la liaison sur les promoteurs cibles E2F (Ertosun et al., 2016).

Tous les membres de cette famille possèdent au moins un domaine de liaison à l'ADN (E2F7a et b, E2F8 possèdent deux domaines de liaison à l'ADN). Les différents domaines présents chez les E2F activateurs, répresseurs et inhibiteurs sont représentés dans la figure n°15.



**Figure 15: Structure des membres de la famille E2F**

Représentation de la structure des différents domaines des membres de la famille E2F qui sont divisés en 3 groupes distincts: activateur, répresseur et inhibiteur.

**Les E2F activateurs** possèdent une séquence NLS (*nuclear localization signal*), signal d'import nucléaire de la protéine réaliser par un transport actif (Ivanova et al., 2007), un site de liaison du complexe cycline A/cdk2, un site de dimérisation (contenant une glissière à leucine et une « marked box » : (permet l'interaction des E2F avec des corégulateurs) impliquée dans les fonctions pro-apoptotiques d'E2F1), un domaine de transactivation contenant un site de liaison des « protéines à poche » (*pocket proteins*).

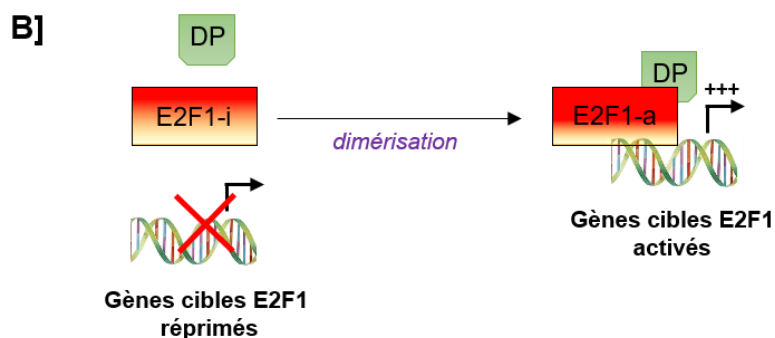
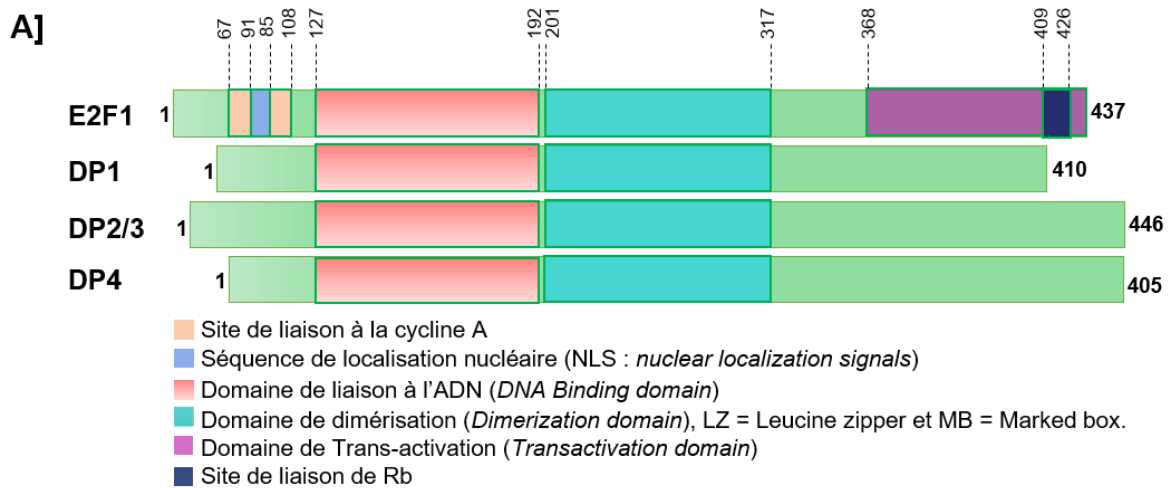
**Les E2F répresseurs** possèdent des séquences d'export nucléaire NES (*Nuclear export signal*), un domaine de dimérisation, un site de liaison des « protéines à poche ».

**Les E2F inhibiteurs** quant à eux possèdent un ou deux domaines de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation uniquement pour la protéine E2F6. Le site de liaison des « protéines à poche » permet aux E2F de lier les protéines de la famille Rb : E2F1, E2F2 et E2F3 lient principalement la protéine Rb tandis que E2F4 lie Rb mais aussi deux autres membres de cette famille p107 et p130. E2F5 quant à elle s'associe avec p130 (Dyson et al., 1998).

Le domaine de dimérisation présent sur certains membres de la famille E2F (E2F1 à E2F6) permet à ces protéines de former un hétérodimère avec un membre de la famille DP (*Dimerization Partner*) : DP1 ou DP2. La formation de cet hétérodimère permet la liaison de ces E2F sur leur promoteur cible et est donc indispensable à leur activité transcriptionnelle (Polager and Ginsberg, 2008). DP4, un autre membre de la famille DP, peut lier E2F1 via ce domaine mais contrairement à DP1 et DP2/3, il agit en tant qu'inhibiteur de l'activité d'E2F1 (Poppy Roworth et al., 2015).

La fonction du complexe E2F/DP est déterminée par la protéine E2F (DeGregori and Johnson, 2006). E2F7 et E2F8 contrairement aux autres membres ne forment pas d'hétérodimère avec la famille DP, mais forment des homodimères E2F7-E2F7 ou E2F8-E2F8 ainsi qu'un hétérodimère E2F7-E2F8, leur permettant de lier l'ADN et d'exercer leur activité transcriptionnelle sur leurs promoteurs cibles (Polager and Ginsberg, 2008).

La structure des membres de la famille DP possède des homologies avec la structure des membres de la famille E2F.



**Figure 16: Structure de la famille DP et dimérisation**

A] Représentation de la structure des membres de la famille DP (*Dimerization Partner*) d'après (DeGregori and Johnson, 2006).

B] E2F1 inactive liera son partenaire DP1 ou DP2, ce qui augmentera l'affinité de liaison d'E2F1 sur les promoteurs de ces gènes cibles permettant ainsi leur transcription.

## b) Fonction d'E2F :

Bien que des fonctions non transcriptionnelles aient aussi été décrites, la principale activité d'E2F1 est liée à son activité stimulateur de la transcription. Les cibles E2F1 sont impliquées dans différents processus cellulaires qui peuvent être antagonistes tels que la transition G1-S du cycle cellulaire, la réponse des cellules à un dommage porté à l'ADN, l'apoptose, l'autophagie, l'angiogenèse (Tableau n°2). Suivant le contexte cellulaire, E2F1 peut donc être promoteur de la prolifération cellulaire, favoriser un arrêt des cellules dans le cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN ou encore stimuler l'apoptose. La fonction la plus étudiée d'E2F1 est sa fonction régulatrice du cycle cellulaire.

Les souris dépourvues d'un des membres activateurs de la famille E2F (E2F1, E2F2 ou E2F3) sont viables mais présentent des anomalies de prolifération cellulaire. La viabilité de ces souris a été expliquée par l'effet compensateur des différents membres entre eux, par contre la perte d'E2F1 combinée à E2F3 ou la perte d'E2F1, E2F2 et E2F3 est létale au stade de développement embryonnaire (Wu et al., 2001). Les souris dépourvues d'E2F1 présentent une hyperplasie et néoplasie en vieillissant (Wu et al., 2001) et possèdent une augmentation de la prolifération de thymocytes immatures au niveau du cortex du thymus. Cette augmentation provoquée par un défaut d'apoptose des thymocytes se traduit par la présence d'un thymus de taille plus importante (Field et al., 1996).

De plus une augmentation de la prolifération des cellules hématopoïétiques est observée dans des souris déficientes en E2F2 (Zhu et al., 2001).

Un rôle autonome d'E2F3 sur la prolifération cellulaire a été démontré par le système Cre-Flox dans des fibroblastes de souris. En effet, les souris déficientes en E2F3 n'étant pas viable, il a été nécessaire de passer dans un modèle d'extinction conditionnelle du gène codant pour E2F3 afin d'étudier son impact sur la prolifération cellulaire. Les cellules dépourvues d'E2F1 et d'E2F2 présentent une prolifération cellulaire excessive qui est complètement inhibée par la perte d'E2F3 (Wu et al., 2001).

**Tableau 2: Cibles d'E2F1 :**

Cibles	Fonctions	Références
Cycline A, E	Cycle cellulaire	(Duronio and O'Farrell, 1995; Stanelle et al., 2002)
DHFR ( <i>Dihydrofolate réductase</i> )		(Ishida et al., 2001)
PCNA ( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> )		(Duronio et al., 1995)
Cdc20, 25A ( <i>cell division cycle 20, 25 A</i> )		(Ishida et al., 2001; Stanelle et al., 2002)
p14 <sup>ARF</sup> ( <i>Alternate Reading Frame tumor suppressor</i> )		(Bates et al., 1998)
ASPP ( <i>Apoptosis stimulating Protein of p53</i> )	Réponse Aux dommages A l'ADN	(Hershko et al., 2005)
JMY ( <i>Junction mediating and regulatory protein</i> )		
TP53INP1 ( <i>Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1</i> )		
ATM ( <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> )		(Berkovich and Ginsberg, 2003)
ATR ( <i>ATM Rad3 related</i> )		(Rogoff et al., 2002)
FAK ( <i>Focal Adhesion Kinase</i> )		(Lieman et al., 2005)
cFlips ( <i>short c Flice like inhibitory protein</i> )		(Salon et al., 2006)
p73		(Irwin et al., 2000)
PKR ( <i>protein kinase RNA activated</i> )		(Vorburger et al., 2002)
PUMA ( <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i> )		
BIM ( <i>Bcl2 like 11</i> )		(Hershko and Ginsberg, 2004)
NOXA ( <i>NADPH oxidase activator</i> )		
BIK ( <i>Bcl2 interacting killer</i> )		(Stanelle et al., 2002)
DIP ( <i>Death associated protein kinase (DAPK) interacting protein</i> )		(Stanelle et al., 2005)
Caspase 3, 7, 8, 9 ( <i>cysteine-dependent aspartate-directed protease 3,7,8,9</i> )		(Nahle et al., 2002)
MAP3K5 ( <i>Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase 5</i> )		(Müller et al., 2001)
Smac/Diablo		(Xie et al., 2006)
APAF1 ( <i>Apoptosis Protease Activating Factor 1</i> )		(Moroni et al., 2001)
Bcl2 ( <i>B-cell lymphoma 2</i> )		
MCL1 ( <i>Myeloid Cell Leukemia 1</i> )		(Stanelle and Pützer, 2006)
MCPH1 ( <i>Microcephalin 1</i> )		
BRCA1 ( <i>BReast CAncer 1</i> )		(Polager et al., 2002; Ren et al., 2002; Yang et al., 2008)
CHK1 ( <i>Checkpoint kinase 1</i> )		
NER ( <i>Nucleotide excision Repair</i> )		(Guo et al., 2011)
NBS1 ( <i>Nijmegen Breakage Syndrome 1</i> )		
MRN ( <i>Mre 11-Rad50-NBS1</i> )		(Chen et al., 2011)
TRAF2 ( <i>Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2</i> )		(Phillips et al., 1999)
BNip3 ( <i>Bcl2/adenovirus E1B nineteen kilodalton interacting protein 3</i> )	(Tracy et al., 2007)	
MAP1LC3 ( <i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3</i> )		
ATG1, 5 ( <i>AuTophagy related 1,5</i> )	(Polager et al., 2008)	
DRAM ( <i>Damage Regulated Autophagy Modulator</i> )		
Acaca ( <i>AcetylCoA Carboxylase</i> )		
Scd1 ( <i>StearoylCoA Desaturase 1</i> )		
Fasn ( <i>Fatty Acid Synthase</i> )	(Denechaud et al., 2016)	
SreBP1c ( <i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i> )		
CHREBP ( <i>Carbohydrate responsive element binding protein</i> )		
KiR6.2 ( <i>K<sup>+</sup> ATP Channel inward rectifier</i> )	(Annicotte et al., 2009)	
ASK1 ( <i>Apoptosis signal regulating kinase 1</i> )	(Hershko et al., 2006)	
Gab2 ( <i>Grb2 associated binder 2</i> )	(Chaussepied and Ginsberg, 2004)	
VEGF ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )	(Pillai et al., 2010)	
FGF ( <i>Fibroblast growth factor</i> )	(Tashiro et al., 2003)	
IGF-1 ( <i>Insulin like growth factor 1</i> )	(Schayek et al., 2010)	
IL-1 $\beta$ ( <i>Interleukin 1 beta</i> )	(Iglesias et al., 1998)	
	Signalisation cellulaire	

## 2) Régulation du facteur de transcription E2F1

E2F1 possède des fonctions antagonistes, celles-ci impliquent la présence de mécanismes de régulation très fins.

Cette régulation se fait à différents niveaux :

### - Régulation post-transcriptionnelle :

Des petits ARN simple brin (21 à 23 nucléotides), nommés micro-ARN, peuvent se lier à l'ARN messenger grâce à une partie homologue avec leur séquence et ainsi empêcher la traduction de cet ARN qui pourra être dégradé ou seulement réprimé.

Un grand nombre d'études montrent que le facteur de transcription E2F1 peut être réprimé par l'action de différents micro-ARN. Une liste non exhaustive de micro-ARN ciblant E2F1 sont répertoriés dans le tableau n°3.

**Tableau 3: Micro-ARN ciblant le facteur de transcription E2F1 :**

MicroARN	Types de Cellules étudiées	Références
miR-10b	Glioblastome	(Teplyuk et al., 2015)
miR-17	Cellule cancer du col de l'utérus, cellule lymphoblastoïde	(O'Donnell et al., 2005)
miR-17-5p	Cellule du cancer du poumon, cellule mononucléaire du sang périphérique	(Coller et al., 2007; Sarhan et al., 2015)
miR-17-92	Fibroblaste	(Pickering et al., 2009)
miR-20a	Cellule cancer du col de l'utérus, cellule lymphoblastoïde	(O'Donnell et al., 2005)
miR-34a	Cellule lymphoblastoïde, fibroblaste	(Zauli et al., 2011)
miR-106-25	Cellule de l'estomac	(Petrocca et al., 2008)
miR-106a	Glioblastome	(Yang et al., 2011a)
miR-122	Hépatocyte	(Wang et al., 2014)
miR-136	Glioblastome	(Chen et al., 2014)
miR-149*	Cellule cancer du col de l'utérus, neuroblastome	(Lin et al., 2010)
miR-205	Mélanome	(Dar et al., 2011)
miR-223	Lymphome	(Pulikkan et al., 2010)
miR-320	Ostéosarcome	(Wu et al., 2016)
miR-320b	Cellule du cancer du sein	(Cataldo et al., 2016)
miR-330	Cellule du cancer de la prostate	(Lee et al., 2009)
miR-331-3p	Cellule du rein	(Guo et al., 2010)
miR-342-3p	Cellule cancer du poumon	(Tai et al., 2015)
miR-493	Cellule du cancer du poumon	(Gu et al., 2014)

En dehors de ces micro-ARN, l'activation du promoteur d'E2F1 peut être régulée par E2F1 lui-même mais aussi par d'autres membres de la famille E2F tels que E2F7 et E2F8 (Li et al., 2008), les co-activateurs DP ainsi qu'un bon nombre d'autres protéines.

Par exemple, DP1 réglera positivement la transcription du gène codant pour E2F1 (Bandara et al., 1994) alors que DP4 réprimera la transcription de ce gène (Milton et al., 2006).

- **Régulation par des cofacteurs :**

Les premiers cofacteurs associés à E2F1 découverts sont la protéine Rb et la protéine DP1.

La protéine Rb inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1 (voir chapitre III)2 a)) alors que le facteur DP1 est essentiel à l'activité d'E2F1.

De nombreux cofacteurs réprimant ou activant une fonction particulière d'E2F1 ont été identifiés à ce jour, certains cofacteurs sont répertoriés dans le tableau n°4.

**Tableau 4: Liste non exhaustive de cofacteurs d'E2F1 :**

Cofacteurs	Action sur E2F1	Référence
pRb	Inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1	(Lees et al., 1993)
Cycline A	Inhibe la capacité d'E2F1 à lier l'ADN	(Xu et al., 1994)
KAP1	Inhibe l'acétylation d'E2F1 nécessaire à sa stabilisation	(Wang et al., 2007)
DP4	Inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1	(Milton et al., 2006)
NPDC1	Inhibe la capacité d'E2F1 à lier l'ADN	(Sansal et al., 2000)
Alien	Inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1, la prolifération cellulaire	(Tenbaum et al., 2007)
Ebp1	Inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1	(Zhang et al., 2003)
DP1	Stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1	(Bandara et al., 1994)
EAPP	Stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 pour les cibles impliquées dans la prolifération et réprime celles impliquées dans l'apoptose.	(Novy et al., 2005)
ATAD2	Stimule l'activité d'E2F1	(Revenko et al., 2010)
ACTR	Stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et l'activation des cibles impliqués dans le cycle cellulaire	(Louie et al., 2004)
BRD2	Stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et l'activation des cibles impliqués dans le cycle cellulaire	(Peng et al., 2007)
JAB1	Stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et l'activation des cibles pro-apoptotiques	(Hallstrom and Nevins, 2006)
MDM2	Stimule la formation du complexe E2F1-DP1	(Martin et al., 1995)

- **Régulation post-traductionnelle :**

Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles permettant de réguler le devenir et la fonction d'une protéine.



Le facteur de transcription E2F1 subit une régulation très fine afin de pouvoir remplir le large éventail de rôles qui lui ont été attribués.

Ce facteur subira différentes modifications post-traductionnelles qui pourront alors soit le stabiliser, stimuler son activité, ou au contraire l'inhiber ou provoquer sa dégradation.

Sa régulation par des modifications post-traductionnelles a très bien été caractérisée au cours du cycle cellulaire ainsi que lors de la réponse aux dommages à l'ADN.

Les différentes modifications post-traductionnelles pouvant réguler E2F1, sont les suivantes :

- la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation : réaction permettant l'ajout respectivement d'un groupement fonctionnel phosphate, acétyle ou méthyle sur une protéine,

- l'ubiquitinylation (voir chapitre III) 2) b) pour le processus détaillé),

- la neddylation : ajout d'une molécule NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8*) sur une protéine cible par un mécanisme similaire à celui d'ubiquitinylation impliquant trois enzymes : une enzyme activatrice E1 (APPBP-1-UBA3), une enzyme E2 de conjugaison (UBC12 ou UBE2F) et une ligase E3 spécifique du substrat (Loftus et al., 2012).

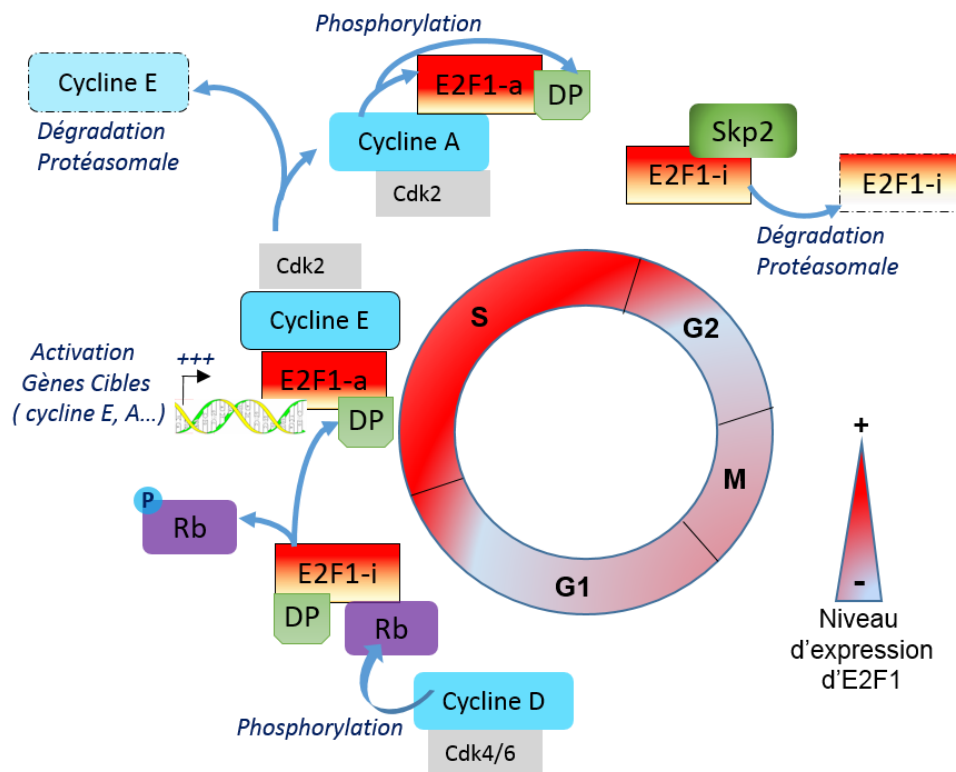
- la sumoylation : tout comme la neddylation et l'ubiquitinylation, c'est une réaction impliquant trois enzymes mais qui permet cette fois-ci de lier une protéine nommée SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*).

- la citrullination : réaction permettant la transformation d'une arginine en citrulline (acide 2-amino-5-(carbamoylamino)-pentanoïque, acide aminé non protéinogène)(Ghari et al., 2016).

## a) Régulation du facteur de transcription E2F1 au cours du cycle cellulaire :

L'expression d'E2F1 est régulée au cours du cycle cellulaire, un pic d'expression est observé en fin de phase G1 permettant l'expression des gènes impliqués dans la transition de la phase G1-S.

Le niveau protéique d'E2F1 diminuera ensuite en fin de phase S. Cette différence de niveau d'expression est régulée par des modifications post-traductionnelles.



**Figure 17: Niveau d'expression d'E2F1 au cours du cycle cellulaire**

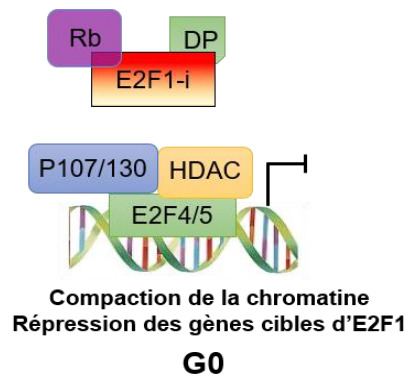
En début de phase de phase G1, la protéine Rb (Rétinoblastome) est sous forme hypophosphorylée et lie le complexe E2F1-DP.

Le complexe cycline D-cdk4/6 phosphoryle Rb libérant ainsi E2F1-DP, activateur de gènes impliqués dans la phase S du cycle (cycline A, cycline E...). En fin de phase S, la cycline E est dégradée permettant au complexe cycline A/cdk2 de se former et d'inactiver E2F1 par phosphorylation. E2F1 est ensuite dégradé par le complexe SCF<sup>skp2</sup> (skp1, Cullin-1, Rbx1 et skp2).

L'intensité de la couleur rouge représente le niveau d'expression d'E2F1.

**Quiescence** : les sites de liaison E2F sur les promoteurs des cibles « prolifération » sont occupés par E2F4 et E2F5. Ces facteurs de transcription inhibent la liaison des E2F activateurs et recrutent des histones désacétylases (HDAC ; exemple : HDAC1) favorisant ainsi la compaction de la chromatine et donc la répression des gènes cibles d'E2F1. Les HDAC désacétylent la lysine 9 de l'histone H3 qui est aussi méthylée par une méthyltransférase SUV39H1 (liée à la protéine Rb). Cette méthylation favorise la compaction de la chromatine et donc la répression des gènes cibles d'E2F1 (Stevens and La Thangue, 2003).

E2F1 est réprimé *via* la liaison de son domaine de transactivation à la protéine Rb qui se trouve sous forme hypophosphorylée.



**Figure 18: E2F1 en phase G0 du cycle cellulaire**

En phase G0 l'expression des gènes cibles d'E2F1 sont réprimés via la liaison des E2F répresseurs aux niveaux des promoteurs de ces gènes. Ces derniers, associés aux protéines p107 et p130 (membres de la famille Rb) recrutent des histones désacétylases favorisant ainsi la compaction de la chromatine et donc la répression des gènes. Par exemple, le complexe comprenant l'histone désacétylase HDAC1 et mSin3B réprime spécifiquement les gènes cibles des E2F. La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, représentée par un rond gris sur le schéma, favorise la compaction de la chromatine.

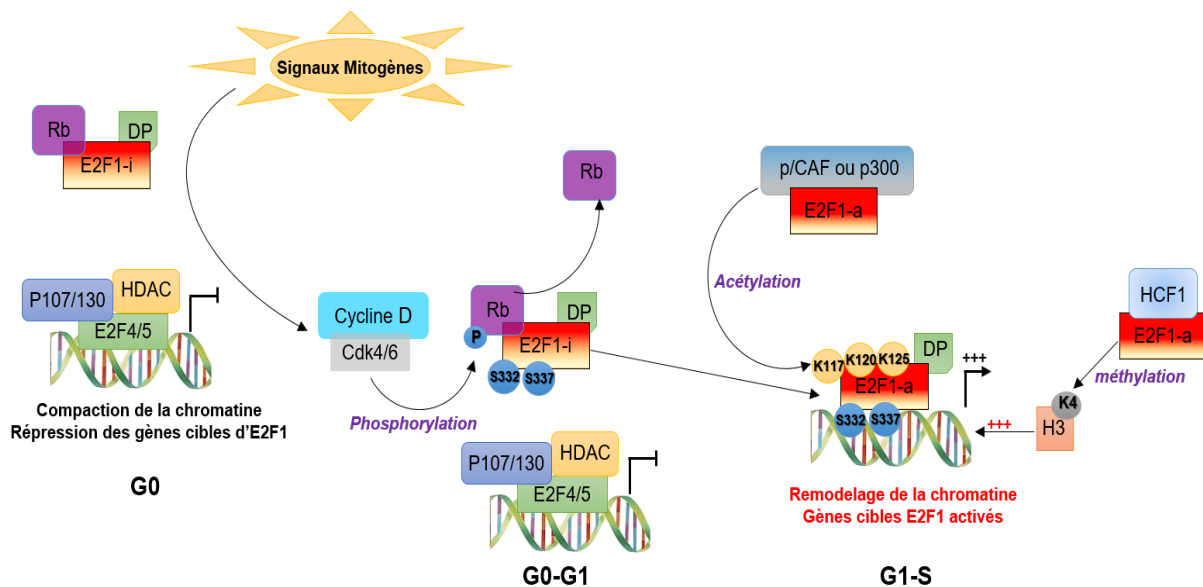
**Fin de la phase G1 : Etape d'activation d'E2F1** : Suite à des signaux mitogènes, les E2F « répresseurs » cèdent leur place, au complexe E2F1/DP1 sur les promoteurs des gènes cibles E2F importants pour la synthèse d'ADN (par exemple, la DHFR : dihydrofolate réductase) ou de gènes nécessaires à la transition en phase S comme les cyclines E et A (Stevens and La Thangue, 2003).

La protéine Rb sous une forme déphosphorylée inhibe l'activité du facteur de transcription en se liant au domaine de transactivation de E2F1, bloquant ainsi le recrutement de la machinerie de la transcription et en favorisant le recrutement d'histones désacétylases. La phosphorylation de Rb par les complexes cycline D/cdk4 et cycline D/cdk6 en fin de phase G1 chasse Rb et libère E2F1/DP1. Le complexe cycline D/cdk peut aussi phosphoryler E2F1 au niveau des sérines 332 et 337, ce qui entrainera une stabilisation d'E2F1 et empêchera toute liaison de Rb (Fagan et al., 1994).

E2F1-DP1 recrute :

- les histone-acétyltransférases (HAT) p300 et p/CAF. Ces HAT peuvent d'une part catalyser l'acétylation de l'histone H3K9 favorisant le décompactage de la chromatine et induire l'acétylation des lysines 117,120 et 125 d'E2F1 favorisant ainsi son activation et sa stabilisation.

- Le co-régulateur HCF1 (*Host cell factor 1*). Celui-ci recrute les méthyltransférases Set1 et MLL (*mixed-lineage leukemia*) capables de catalyser la méthylation de l'histone H3 au niveau de sa lysine 4. Cette méthylation (H3K4) entraîne un remodelage de la chromatine favorisant l'expression génique (Eletr and Wilkinson, 2011; Tyagi and Herr, 2009).



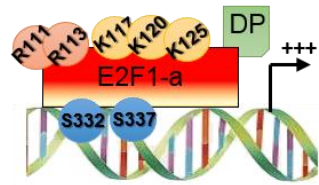
**Figure 19: E2F1 en phase G1 – S**

En fin de phase G1 la phosphorylation de Rb permet la libération du complexe E2F1-DP. La protéine E2F1 est stabilisée par phosphorylation de ses sérines 332 et 337. Le complexe E2F1-DP est recruté au niveau des promoteurs cibles d'E2F1. Cette liaison à l'ADN est augmentée par l'acétylation des lysines 117, 120 et 125 d'E2F1 permettant ainsi l'expression des gènes cibles d'E2F1. La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 entraîne le remodelage de la chromatine favorisant ainsi la transcription des gènes cibles d'E2F1.

**Phase S : Activité E2F1 :** La transition G1-S est catalysée par l'expression de protéines de synthèse d'ADN et de protéines permettant la transition dans la phase S comme les cyclines E et A. Les gènes codant ces protéines sont sous le contrôle d'E2F1. La cycline E, associée à la kinase cdk2 prend le relais des complexes cycline D/cdc4, cycline D/cdc6 et maintient la protéine Rb sous une forme hyperphosphorylée « inactive », c'est-à-dire incapable de réprimer E2F1, permettant ainsi une activité maximale de E2F1 tout au long de la phase S. De plus, une protéine nommée Mdm2(*mouse double minute 2*) protège E2F1 des ubiquitinylation dégradatives (Zhang et al., 2005).

Au cours de la phase S, E2F1 est retrouvé sous forme phosphorylé, acétylé et méthylé. En effet, afin de stabiliser la protéine, E2F1 est :

- Méthylé au niveau de ses arginines 111 et 113 par une méthyle-transférase nommée PRMT5 (*Protein arginin N-methyltransferase 5*). Cette méthylation est qualifiée de symétrique (type II c'est-à-dire que les deux groupements méthyles ajoutés sont positionnés sur chaque azote) et favorise la progression du cycle cellulaire (Cho et al., 2012).
- Phosphorylé au niveau des sérines 332 et 337.
- Acétylé au niveau de ses lysines 117, 120 et 125.



**Gènes cibles E2F1  
Impliqués dans la progression  
du cycle cellulaire activés**

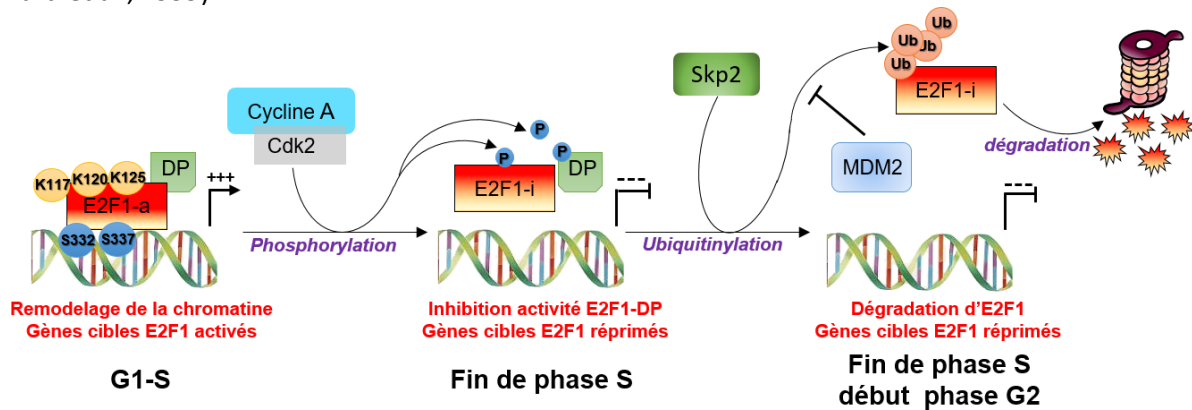
**S**

**Figure 20: E2F1 au cours de la phase S**

Au cours de la phase S, E2F1 subit plusieurs modifications post-traductionnelles afin de stabiliser son niveau protéique et de stimuler son activité sur ses gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Les phosphorylations sont identifiées par un cercle orange, les acétylations par un cercle jaune et les phosphorylations par un cercle bleu.

**En fin de phase S, G2 et M : inactivation d'E2F1** : La cycline E est dégradée par le protéasome, ce qui permet la libération de cdk2 et la formation du complexe cycline A-cdk2. Ce complexe nouvellement formé va lier puis phosphoryler E2F1 et DP1 diminuant ainsi leur activité (Krek et al., 1994).

Dans un second temps, le complexe E2F1-MDM2 diminue pour laisser place au complexe E2F1-skp2 favorisant ainsi la dégradation d'E2F1 (Zhang et al., 2005). En effet, au cours de la phase S, en dehors de la stimulation de l'expression par E2F1 de la cycline E, E2F1 stimule l'expression d'une E3 ubiquitine ligase appartenant au complexe SCF<sup>skp2</sup> (*skp1*, *Cullin-1*, *Rbx1* et *skp2*) nommée *skp2* (*S-phase kinase-associated protein 2*). En fin de phase S, *skp2* ubiquitinyne E2F1 qui sera alors dégradé par le protéasome. Cet évènement entraine un arrêt de prolifération de la cellule qui rentre en phase G2 (Marti et al., 1999).



**Figure 21: E2F1 en fin de phase S et début de phase G2**

Le complexe cycline A – Cdk2 phosphoryle DP et E2F1 diminuant ainsi leur activité. L'E3 ubiquitine ligase *skp2* ubiquitinyne E2F1 qui sera alors dégradée par le protéasome. Jusqu'en fin de phase S la protéine MDM2 protège E2F1 de son ubiquitinylation dégradative par *skp2*.

En phase G2, les cibles d'E2F1 n'étant plus liées à E2F1, vont se retrouver alors liées par les E2F répresseurs. Ces E2F bloqueront l'activation de ces gènes.

Enfin, lors de la mitose, en prométaphase, E2F1 est dégradé par le système APC (*Anaphase promoting complex*) /cdh1 par une ubiquitinylation de type K11 reconnue comme signal de dégradation par le protéasome (Budhavarapu et al., 2012).

## **b) Régulation du facteur de transcription E2F1 lors d'un stress génotoxique :**

Les cellules au cours du temps ont établi un système de défense afin d'empêcher toute instabilité du génome, ce système est nommé « réponse aux dommages portés à l'ADN ». Une fois l'endommagement identifié, la cellule arrêtera de proliférer puis engendra une réparation de l'ADN ou si aucune réparation n'est possible entrera en apoptose ou en sénescence. Des radiations ionisantes ainsi que divers agents thérapeutiques provoquant des dommages à l'ADN tels que le cisplatine, l'adriamycine, l'étoposide, la doxorubicine, vont entraîner une stabilisation du facteur de transcription E2F1 (Blattner et al., 1999; Huang et al., 1997; Höfferer et al., 1999; Lin et al., 2001; Meng et al., 1999).

Cette stabilisation d'E2F1 permettra à la cellule d'activer un programme d'apoptose ou d'engager des mécanismes de réparations de l'ADN. De nombreux travaux ont porté sur l'analyse des mécanismes responsable de la stabilisation d'E2F1 ont mis en évidence la présence d'un réseau complexe et interconnecté de modifications post-traductionnelles d'E2F1 (Figure n°24).

### **1) Phosphorylation :**

Sous un stress génotoxique, E2F1 est stabilisé par sa phosphorylation au niveau de la sérine 364 par la protéine Chk2 (kinase impliquée dans la surveillance des dommages portés à l'ADN) et au niveau de la sérine 31 par ATM (*Ataxia telangectasia mutated*) /ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) qui sont des senseurs des dommages portés à l'ADN.

De plus, la phosphorylation de la sérine 403 d'E2F1 par une kinase non identifiée à ce jour stabilise aussi le niveau protéique d'E2F1 (Real et al., 2010). Contrairement aux phosphorylations évoquées précédemment, les phosphorylations de la sérine 403 et de la thréonine 433 par la kinase cdk7 entraînent une dégradation d'E2F1 (Vandel and Kouzarides, 1999).

### **2) Méthylation :**

Deux équipes différentes ont montré que la méthyltransférase Set9 méthyle E2F1 au niveau de sa lysine 185 et que LSD1 déméthyle cette même lysine.

La première équipe montre que la méthylation d'E2F1 par Set9 inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur ces cibles apoptotiques et entraîne sa dégradation par le protéasome après un stress génotoxique et que LSD1 au contraire stabilise E2F1 via sa déméthylation (Kontaki and Talianidis, 2010). Alors que la seconde équipe montre l'extrême opposé (Xie et al., 2011).

Les auteurs expliquent cette différence par l'utilisation de différents agents thérapeutiques, la première équipe utilisant de l'étoposide ou la doxorubicine et la seconde utilisant le cisplatine et l'adriamycine ; ainsi que l'utilisation de lignées cellulaires différentes (Xie et al., 2011).

Suite aux dommages portés à l'ADN, le taux de cycline A lié à E2F1 diminue laissant la place à la protéine PRMT1. Cette protéine est une arginine N-méthyltransférase qui favorise l'activité apoptotique d'E2F1 via une méthylation asymétrique (type I) de l'arginine 109 d'E2F1. Dans des cellules sans stress génotoxique, la liaison entre PRMT1 (*Protein arginin N-methyltransferase 1*) et E2F1 est empêchée par la cycline A, ce qui favorise au contraire la liaison d'une autre arginine méthyltransférase : PRMT5 (*Protein arginin N-methyltransferase 5*) (voir chapitre III)2 a)).

Ce mécanisme de compétition entre PRMT1 et PRMT5 permet de contrôler le devenir de la cellule en fonction des signaux environnementaux (Cho et al., 2012).

### **3) Acétylation :**

L'acétylation d'E2F1 au niveau de ses lysines 117, 120 et 125 semble être très importante pour l'activité d'E2F1, que ce soit en phase S du cycle cellulaire ou suite à un stress génotoxique.

Une protéine retrouvée dans la leucémie myéloïde aigue (AML : *acute myeloid leukemia*) nommé ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*) a été identifiée comme partenaire de la méthyltransférase MLL. Cette protéine est un facteur d'élongation nécessaire au déplacement de l'ARN polymérase II et donc à la synthèse d'ARN messager. ELL interagit avec E2F1 provoquant ainsi la déacétylation des lysines 117, 120 et 125 d'E2F1 via le recrutement de l'histone désacétylase 1 (HDAC1) indépendamment de la protéine Rb. Cette désacétylation inhibe l'activation des gènes cibles d'E2F1 tels que le gène *p73* ou *apaf1*... L'inhibition de l'activité d'E2F1 par ELL est très importante. En effet, lors de la fusion entre ELL et MLL due à la translocation chromosomique t(11; 19)(q23 ;p13.1), retrouvée dans la leucémie myéloïde aigue, elle provoque une levée de l'inhibition de l'activité d'E2F1 et une surexpression des gènes apoptotiques induites suite à un dommage à l'ADN par E2F1 (Zhang et al., 2014).

### **4) Neddylation :**

L'équipe de La Thangue a montré une neddylation d'E2F1 sur les lysines 117, 120 et 125. La neddylation d'E2F1 entraîne une instabilité de la protéine ainsi qu'une baisse de son activité transcriptionnelle et un ralentissement de la croissance cellulaire.

Lors d'un stress génotoxique, E2F1 est déneddylé par la protéine NEDP1 permettant ainsi de stimuler l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur ces gènes cibles tels que par exemple *p73* (Loftus et al., 2012).

## 5) Ubiquitylation :

L'ubiquitylation de type K63 d'E2F1 semble réduire l'activité d'E2F1 sur les promoteurs p14<sup>ARF</sup>, caspase 3, caspase 7 et Apaf1 lors d'un stress génotoxique. La déubiquitinase (DUB) UCH37 va déubiquityler E2F1 et favoriser son action sur les promoteurs de ces gènes cibles (Mahanic et al., 2015). Une autre DUB, nommée POH1, permet de stabiliser E2F1. En effet, POH1 enlève les chaînes K63 d'E2F1 ce qui permet à E2F1 d'activer ces gènes cibles et notamment ceux de la survivine et de Foxn1. Cependant, un mutant d'E2F1 ne pouvant plus être ubiquitylé K63, ne voit pas son niveau d'expression diminuer lors de l'ajout d'un ARN interférent visant POH1. Ces résultats sous entendent la nécessité de la présence d'une ubiquitylation de type K63 d'E2F1 qui sera ensuite éliminée par la DUB POH1 afin de conserver la stabilité d'E2F1 (Wang et al., 2015).

Stress Génotoxique	
Stabilisation d'E2F1	Déstabilisation d'E2F1
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Acétylation:<ul style="list-style-type: none"><li>• Lysine 117</li><li>• Lysine 120</li><li>• Lysine 125</li></ul>par p/CAF ou p300</li><li>➤ Méthylation:<ul style="list-style-type: none"><li>• Lysine 185 par Set9</li><li>↳ Déméthylation par LSD1</li></ul></li><li>➤ Phosphorylation:<ul style="list-style-type: none"><li>• Sérine 364 par CHK2</li><li>• Sérine 31 par ATM/ATR</li><li>• Sérine 403 par ???</li></ul></li><li>➤ Neddylation:<ul style="list-style-type: none"><li>↳ Dénéddylation des lysines 117,120 et 125 par NEDP1.</li></ul></li><li>➤ Ubiquitylation:<ul style="list-style-type: none"><li>↳ Déubiquitylation par UCH37 et POH1</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Méthylation:<ul style="list-style-type: none"><li>• Lysine 185 par Set9</li><li>↳ Déméthylation par LSD1</li></ul></li><li>➤ Neddylation:<ul style="list-style-type: none"><li>• Lysine 117,120 et 125.</li></ul></li><li>➤ Phosphorylation :<ul style="list-style-type: none"><li>• Sérine 403</li><li>• Thréonine 433</li></ul>par Cdk7</li><li>➤ Ubiquitylation K63</li></ul>

**Figure 22: Modification post-traductionnelle impliquée dans la stabilisation du niveau protéique d'E2F1**

La méthylation par Set9 et la déméthylation par LSD1 ont différents devenir suivant le contexte cellulaire et l'utilisation d'un type d'agents thérapeutiques.

## c) Stimulation spécifique de gènes cibles d'E2F1 :

Les gènes activés par E2F1 seront différents suivant le contexte cellulaire. En effet, E2F1 permettra la progression des cellules dans le cycle cellulaire suite à un signal mitogène alors qu'il sera promoteur d'un arrêt du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN ou de l'induction de l'apoptose suite à un stress génotoxique.



Ceci implique un recrutement différentiel d'E2F1 sur les promoteurs dits « prolifération » (les plus étudiés sont les promoteurs des cyclines E et A ainsi que DHFR) par rapport aux promoteurs qualifiés « apoptose » (les plus étudiés étant TP73, APAF1, Caspase 3 et 7). Différentes modifications post-traductionnelles peuvent moduler cette activité différentielle d'E2F1.

**1) Méthylation :**

Comme évoqué dans les chapitres III)2) a) et III)2) b), E2F1 peut être méthylé par PRMT1 ou PRMT5 suivant le contexte cellulaire : par PRMT1 lors d'un stress génotoxique et par PRMT5 au cours du cycle cellulaire.

**2) Citrullination :**

L'arginine 109 d'E2F1 est importante pour la méthylation d'E2F1 par PRMT1 mais semble aussi importante pour la citrullination d'E2F1 lors d'une réponse inflammatoire.

La citrullination d'E2F1 est réalisée par PAD4 (*peptidyl arginine deiminase 4*) lors de la réponse inflammatoire et permettra l'activation de gènes cibles d'E2F1 impliqués dans l'inflammation : les gènes des cytokines TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), CCL3 (*chemokine (C-C motif) ligand-3*), IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ) (Ghari et al., 2016).

**3) Sumoylation :**

De plus, la lysine 226 d'E2F1 peut être sumoylée par l'intermédiaire de Pc2 (*Polycomb 2 protein*) non méthylé et d'un ARN non codant NEAT2 (*nuclear enriched abundant transcript 2*) ce qui permet l'activation des gènes impliqués dans la croissance cellulaire (Yang et al., 2011b).

**4) Neddylation :**

L'équipe de La Thangue montre une neddylation d'E2F1 entraînant une diminution de sa stabilité, de son activité transcriptionnelle corrélée avec une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, ils observent une diminution du niveau de Neddylation d'E2F1 lors d'un stress génotoxique induit par la doxorubicine ou l'étoposide (Loftus et al., 2012).

La déneddylation d'E2F1 est nécessaire à la stimulation de son activité transcriptionnelle sur le promoteur p73. En effet, lors d'un stress génotoxique, SENP8 (*SUMO/sentrin peptidase family member, NEDD8 specific*) déneddyle E2F1 ce qui favorise l'interaction entre E2F1 et la microcéphaline. Cette interaction est indispensable à l'action du gène codant p73 (Aoki et al., 2013).

### 5) **Acétylation :**

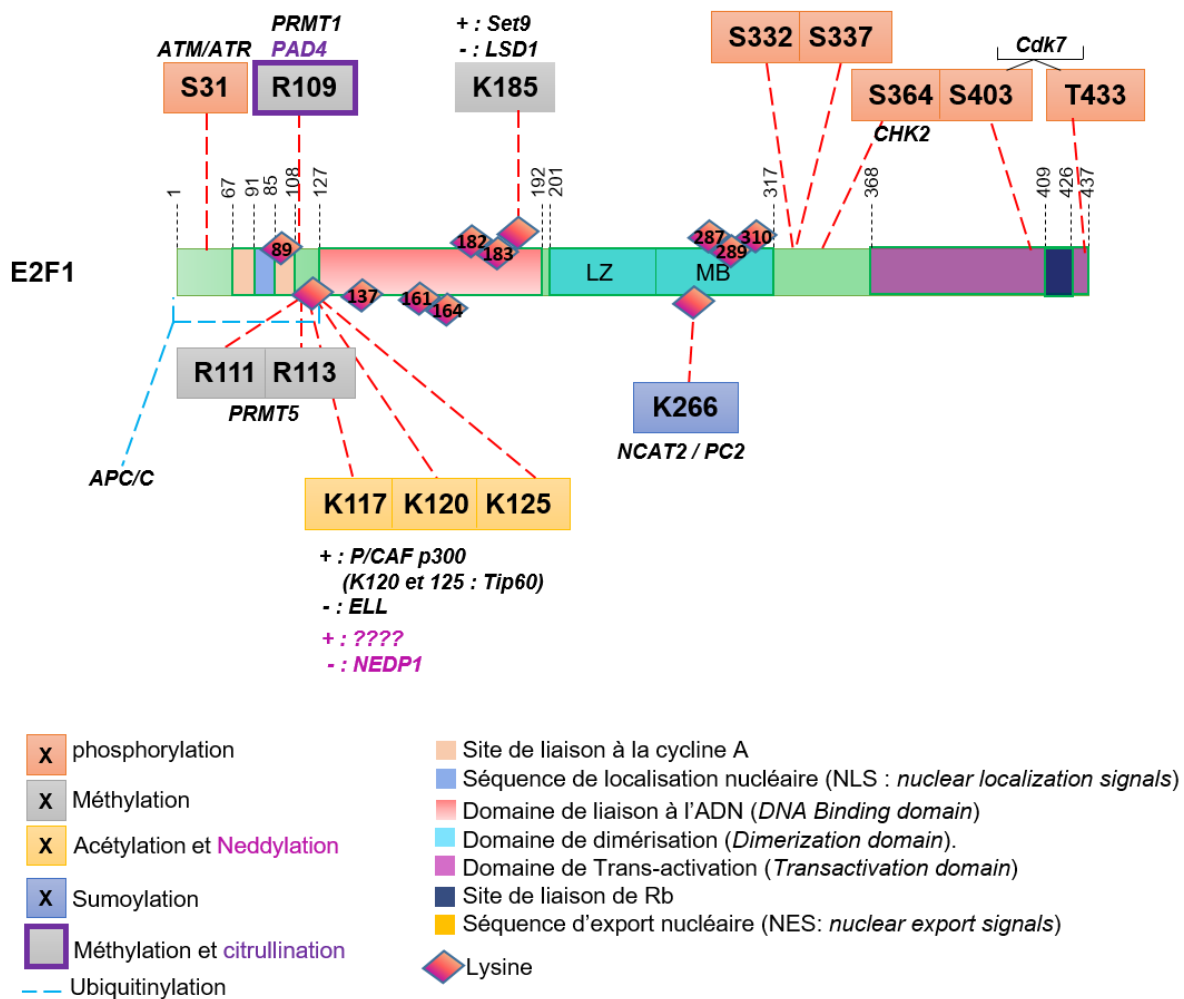
L'acétylation d'E2F1 joue également un rôle important dans la régulation d'E2F1. Elle permet la stabilisation d'E2F1 lors d'un stress génotoxique qui permettra à E2F1 d'activer l'apoptose via p73 (Pediconi et al., 2009) ou une réparation de l'ADN (Guo et al., 2010; Van Den Broeck et al., 2012).

La stabilisation d'E2F1 par acétylation ainsi que la stimulation de son activité transcriptionnelle sont aussi observées au court du cycle cellulaire afin de favoriser la progression des cellules mais aussi lors d'une stimulation par le VEGF afin de favoriser l'angiogénèse (Pillai et al., 2010).

Stress Génotoxique		Etat physiologique
Apoptose	Inflammation	Transition phase G1/S
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Méthylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 109 par PRMT1 (asymétrique)</li> </ul> </li> <li>➤ Acétylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lysine 117</li> <li>• Lysine 120 par p/CAF ou p300</li> <li>• Lysine 125</li> </ul> </li> <li>➤ Dénéddylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Par SENP8</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Citrullination:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 109 par PAD4</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acétylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lysine 117</li> <li>• Lysine 120 par p/CAF ou p300</li> <li>• Lysine 125</li> </ul> </li> <li>➤ Méthylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 111</li> <li>• Arginine 113</li> </ul> </li> <li>➤ Sumoylation:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lysine K266 par Pc2 et NEAT2.</li> </ul> </li> </ul>

**Figure 23: Orientation du rôle d'E2F1 par ses modifications post-traductionnelles**

Les différents sites de modification post-traductionnelle d'E2F1 sont représentés sur la structure d'E2F1 présentée dans la figure ci-dessous :



**Figure 24: Sites des modifications post-traductionnelles d'E2F1**

Représentation de la structure d'E2F1 avec ses différents sites de modifications post-traductionnelles.

Le signe + signifie l'ajout d'une modification alors que le signe - indique l'enlèvement d'une modification post-traductionnelle.

Ces différentes modifications permettent donc à E2F1 d'avoir différentes fonctions qui peuvent être contradictoires, ce qui pourrait expliquer d'ailleurs son rôle à la fois tumorigène et suppresseur de tumeurs.

### 3) E2F1 et Cancer :

Le facteur de transcription E2F1 est un élément clé de processus opposés, en effet il peut favoriser la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion des cellules mais aussi l'apoptose des cellules. Ces différentes fonctions accordent à E2F1 un rôle anti-tumorigène tout en lui conférant des propriétés oncogéniques suivant le contexte.

Tout d'abord, différentes études ont montré l'importance de ce facteur pour la formation de métastases : la surexpression d'E2F1 est corrélée avec la formation de métastases chez des patients atteints d'un cancer de la vessie et une perte de la protéine Rb (responsable de l'expression ectopique d'E2F1 (Engelmann and Pützer, 2010; Sharma et al., 2010).

Lors d'un stress génotoxique, E2F1 devrait stimuler les gènes pro-apoptotiques afin de détruire par apoptose les cellules cancéreuses. Malgré une surexpression d'ATM et CHK2, dans certains cas, E2F1 n'active pas la voie apoptotique mais une autre voie permettant la réparation de l'ADN.

En effet, dans des cellules résistantes aux traitements chimio-thérapeutiques, outre la surexpression d'ATM, de CHK2 et d'E2F1, la surexpression de FoxM1 (*forkhead box M1*) est retrouvée. FoxM1 va permettre à la cellule cancéreuse d'entrer dans un processus de réparation de l'ADN, lui permettant ainsi d'éviter de mourir par apoptose et donc de continuer à proliférer. La réparation de l'ADN impliquant FoxM1 est médiée par E2F1. De plus, E2F1 activera les gènes d'autres protéines impliquées dans cette voie de réparation tels que le gène codant pour Tip60 (protéine acétylant les lysines 120 et 125 d'E2F1, stabilisant ainsi la protéine). Tip60 lié à E2F1 activera la voie de réparation de l'ADN par le contrôle d'ERCC1 (*excision repair cross-complementing group 1*). De plus CHK2 sensée stabiliser E2F1 pour permettre l'activation des gènes pro-apoptotiques par E2F1 peut aussi phosphoryler KAP1 (*the Krüppel-associated box (KRAB)- associated corepressor 1*) ce qui favorisera la formation du complexe E2F1-KAP1. Ce complexe quant à lui, va lier les promoteurs des gènes pro-apoptotiques et recruter une HDAC1 afin de réprimer leur activation (Engelmann and Pützer, 2010).

Différents phénomènes se mettent en place pour favoriser l'activité prolifératif et réparatrice de l'ADN d'E2F1 au détriment de l'activation de l'apoptose par E2F1. Par exemple, la protéine SIRT1 déacétylera E2F1 lié aux promoteurs pro-apoptotiques empêchant ainsi leur activation ; la production d'un mutant de p73 (DNp73) par E2F1 inhibera aussi la voie apoptotique normalement activée par p73. Outre cette déviance pour la répression de la voie apoptotique et l'activation de la prolifération cellulaire, E2F1 peut notamment stimuler des oncogènes tel que l'EGFR.

D'après ces différentes données, il serait intéressant d'inhiber l'expression d'E2F1 afin de réduire la prolifération des cellules cancéreuses et la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques. Cependant, il est important de noter qu'E2F1 est aussi considéré comme suppresseur de tumeur via l'activation de l'apoptose.

# RESULTATS

## IV] Résultats :

La localisation nucléaire de cIAP1 dans le cancer de l'œsophage (Imoto et al., 2001), dans le cancer de la vessie (Che et al., 2012), le cancer du col de l'utérus (Imoto et al., 2002), le cancer colorectal (Ponnelle et al., 2003), le cancer de la tête et du cou (Tanimoto et al., 2005), le cancer de la langue (Qi et al., 2008) a été corrélée à une mauvaise réponse aux traitements thérapeutiques et à un mauvais pronostic. Ceci suggère l'importance des fonctions nucléaires de cIAP1 dans son activité oncogénique. Dans un travail publié en 2011, Jessy Cartier et Jean Berthelet ont montré que dans le noyau des cellules, cIAP1 pouvait lier le facteur de transcription E2F1 (Cartier et al., 2011) et stimuler son activité sur les promoteurs des gènes *ccne* (codant la cycline E) et *ccna* (codant la cycline A). cIAP1 peut lier E2F1 dans toutes les phases du cycle cellulaire. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont mis en évidence la liaison de cIAP1 sur les sites de liaison E2F des promoteurs *ccne* et *ccna* en phase S du cycle cellulaire, en même temps qu'E2F1. Par ChIP et re-ChIP, Jessy Cartier a montré que les deux protéines sont recrutées ensemble sur les promoteurs. La présence d'E2F1 est nécessaire au recrutement de cIAP1 et inversement, la présence de cIAP1 est nécessaire au recrutement d'E2F1. Enfin, la délétion de cIAP1 ralentit la prolifération cellulaire, inhibe l'expression des cyclines E et A, et diminue le pourcentage des cellules en phase S du cycle cellulaire.

Nous avons émis l'hypothèse que cette fonction de cIAP1 pourrait contribuer à son activité oncogénique. L'objectif de mon travail de thèse était d'analyser les mécanismes de l'activité oncogénique de cIAP1 et plus précisément d'étudier l'importance de la fonction régulatrice d'E2F1. Nous avons d'une part entrepris la caractérisation de l'interaction E2F1-cIAP1 afin de produire un mutant de cIAP1 incapable de lier E2F1 et d'autre part mis en place un modèle d'étude de l'activité oncogénique de cIAP1.

De plus, j'ai finalisé un travail initié par Jean Berthelet (étudiant en thèse, actuellement chercheur post-doctorant) puis par Valérie Glorian (Chercheur Post-doctorant, actuellement Attachée de Recherche Clinique) dont l'objectif était d'analyser les mécanismes par lesquels cIAP1 contrôlent l'activité de E2F1.

## 1) Etude des mécanismes de régulation d'E2F1 par cIAP1

Article soumis après révision dans le journal « Cell Death and Differentiation » : « **E2F1 stabilization and activation involves cIAP1-mediated K63-poly-ubiquitination** »

### **E2F1 stabilization and activation involves cIAP1-mediated K63-poly-ubiquitination**

Valérie Glorian<sup>\*1,2</sup>, Jennifer Allègre<sup>\*1,2</sup>, Jean Berthelet<sup>\*1,2</sup>, Baptiste Dumetier<sup>1,2</sup>, Pierre-Marie Boutanquoi<sup>1,2</sup>, Nathalie Droin<sup>5</sup>, Cémile Kayaci<sup>1,2</sup>, Jessy Cartier<sup>1,2,4</sup>, Simon Gemble<sup>1,2</sup>, Guillaume Marcion<sup>1,2</sup>, Daniel Gonzalez<sup>1,2,3</sup>, Romain Boidot<sup>1,2,3</sup>, Carmen Garrido<sup>1,2</sup>, Eric Solary<sup>5,6</sup> and Laurence DUBREZ<sup>1,2</sup>

*\*These authors contributed equally to this work*

From :

<sup>1</sup> Université de Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), LNC UMR1231, 21000 Dijon, France

<sup>3</sup> Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon France.

<sup>4</sup> present address: Endocrinology Unit, University/BHF Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

<sup>5</sup> Inserm U1170, Gustave Roussy, 94804 Villejuif, France

<sup>6</sup> Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

Corresponding author: Laurence Dubrez, Inserm LNC UMR1231, Faculty of Medicine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon cedex, France. E-mail: [ldubrez@u-bourgogne.fr](mailto:ldubrez@u-bourgogne.fr); Tel: (33) 380 393 356; Fax: (33) 380 393 434

Running title: cIAP1 mediates K63-ubiquitination of E2F1.

Keywords: cellular Inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1), E2 factor 1 (E2F1), transcriptional regulation, Ubiquitination.

Final character count (including references and figure legends): 60 753

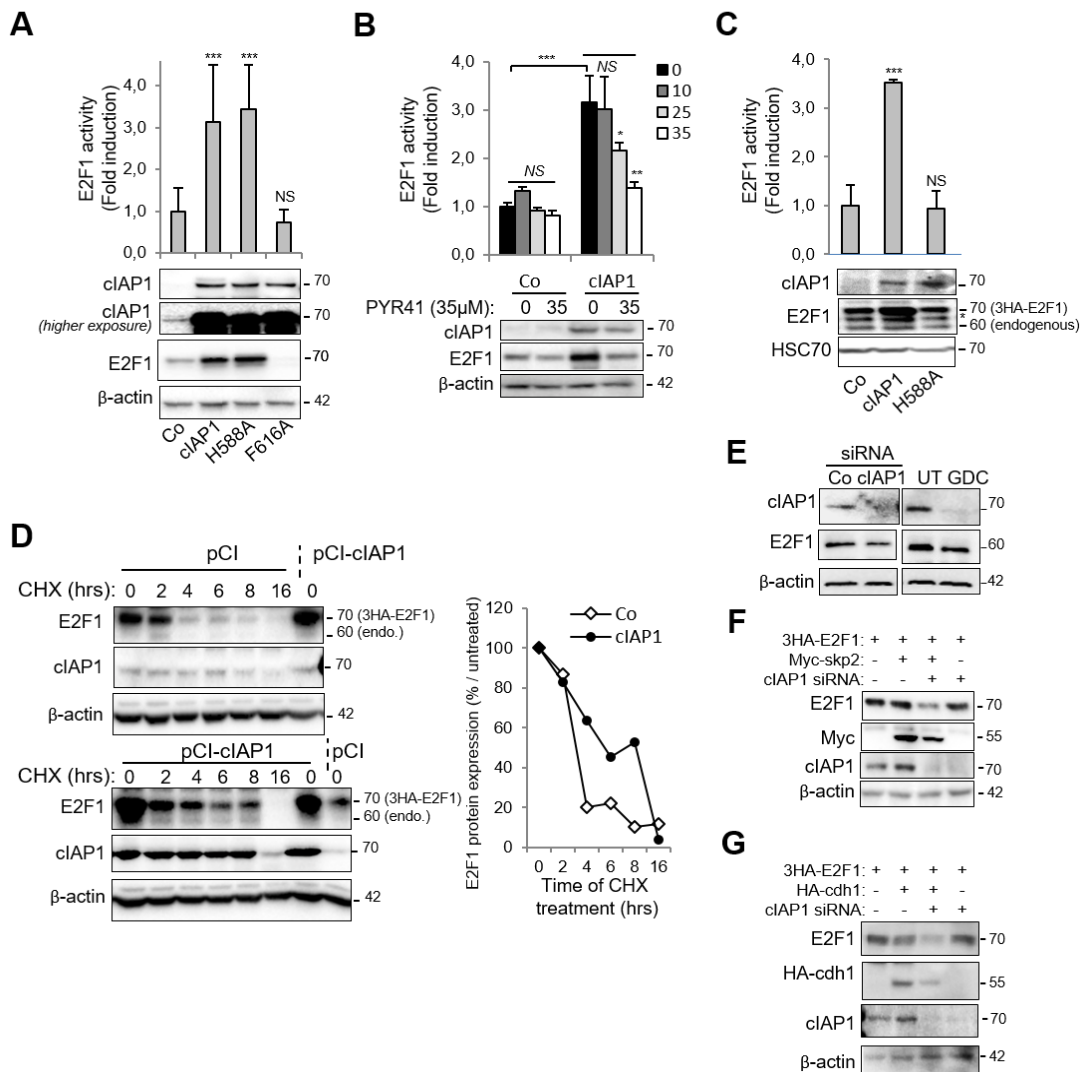
➤ **clAP1 stabilise et stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 par ubiquitinylation :**

Au cours d'une étude précédente, mon équipe d'accueil a démontré la capacité de clAP1 à stimuler l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de la cycline E (Cartier et al., 2011). Nous avons dans un premier temps, décidé d'évaluer l'importance de l'activité E3 ubiquitine ligase de clAP1.

Lors de tests de transactivation utilisant une construction dont le gène luciférase est placé sous le contrôle du promoteur de la cycline E contenant 3 sites de liaison E2F, nous avons confirmé la capacité de clAP1 à stimuler l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de la cycline E (Figure n°25A et 25C) dans des cellules HeLa. Cette activité est associée à une augmentation drastique de l'expression d'E2F1. La mutation de l'histidine 588 en alanine qui abolie l'activité E3-ubiquitine ligase de clAP1 ne modifie pas cette activité, cependant une inhibition de la réaction d'ubiquitinylation (inhibiteur de l'enzyme E1) par le PYR-41 inhibe la capacité de clAP1 à stimuler E2F1 de façon dose dépendante (Figure n°25B) suggérant l'importance de la réaction d'ubiquitinylation. clAP1 est actif sous forme d'un homodimère. La mutation du site de dimérisation (phénylalanine 616 en alanine) qui empêche la dimérisation de clAP1 abolie complètement la capacité de clAP1 à moduler l'activité et l'expression d'E2F1 (Figure n°25A) dans les cellules HeLa et l'expression du mutant H588A dans des cellules dépourvues de clAP1 (MEF clAP1<sup>-/-</sup>) n'est plus capable de stimuler E2F1 (Figure n°25C). Ces résultats suggèrent que dans les cellules HeLa, le mutant H588A pourrait former un dimère avec un clAP1 endogène et que l'activité E3-ligase de clAP1 est nécessaire pour l'activation d'E2F1.

Une inhibition de la traduction par la cycloheximide montre que clAP1 stabilise l'expression protéique d'E2F1 (Figure n°25D). Inversement, une extinction de clAP1 par ARN interférence (Figure n°25 E, F et G) ou par un traitement des cellules par le GDC-0152 (Figure n°25E), un antagoniste des IAP qui induit une dégradation très rapide de clAP1, diminue l'expression d'E2F1 (figure n°25E) et favorise la dégradation d'E2F1 par l'expression des E3-ubiquitine ligase skp2 et cdh1 (Figure n°25F).





**Figure 25: clAP1 stabilise et stimule l'activité transcriptionnelle d'E2F1 par ubiquitinylation :**

**A-C.** Expression et activité d'E2F1 dans des cellules HeLa (A&B) ou MEF *clAP1*<sup>-/-</sup>/*clAP2*<sup>-/-</sup> (C) transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur CCNE, le plasmide pCMV-3HA-E2F1, avec soit un plasmide contrôleur (Co), un plasmide exprimant clAP1, ou les mutants clAP1-H588A (perte de l'activité E3 ubiquitine-ligase) ou clAP1-F616A (perte de la capacité de dimérisation). Les cellules HeLa sont traitées pendant 24 heures avant l'analyse avec du PYR-41 10-35  $\mu$ M (B). L'activité luciférase est normalisée par l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et rapportée à l'induction de l'activité par E2F1 seul. Moyenne  $\pm$  écart type de 3 expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est un test t de Student. \*\*\*,  $p < 0.001$ , \*\*,  $0.001 < p < 0.01$ , \*,  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . **D.** Expérience de cycloheximide (CHX). L'expression des transgènes indiqués est induite pendant 48h, les cellules sont traitées avec de la cycloheximide 100 $\mu$ g/ml. L'expression d'E2F1 et de clAP1 est analysée par immunoblotting. L'expression d'E2F1 a été quantifiée via le logiciel Image J. **E.** Analyse de l'expression d'E2F1 et clAP1 dans des cellules U2OS après ajout d'un ARN interférent dirigé contre clAP1 ou d'un antagoniste des IAP GDC-0152. UT : cellules non traitées. **F&G.** Analyse de l'expression d'E2F1 et de clAP1 dans des cellules HeLa en présence de cdh1 ou skp2.

➤ **clAP1 catalyse la conjugaison de chaînes d'ubiquitines de type K11 et K63 sur E2F1:**

Nous avons ensuite évalué la capacité de clAP1 à induire une ubiquitylation d'E2F1. clAP1 est capable d'induire la conjugaison de chaînes d'ubiquitines sur E2F1 dans un test in vitro utilisant des protéines recombinantes purifiées ou dans un lysat cellulaire (Figure n°26A).

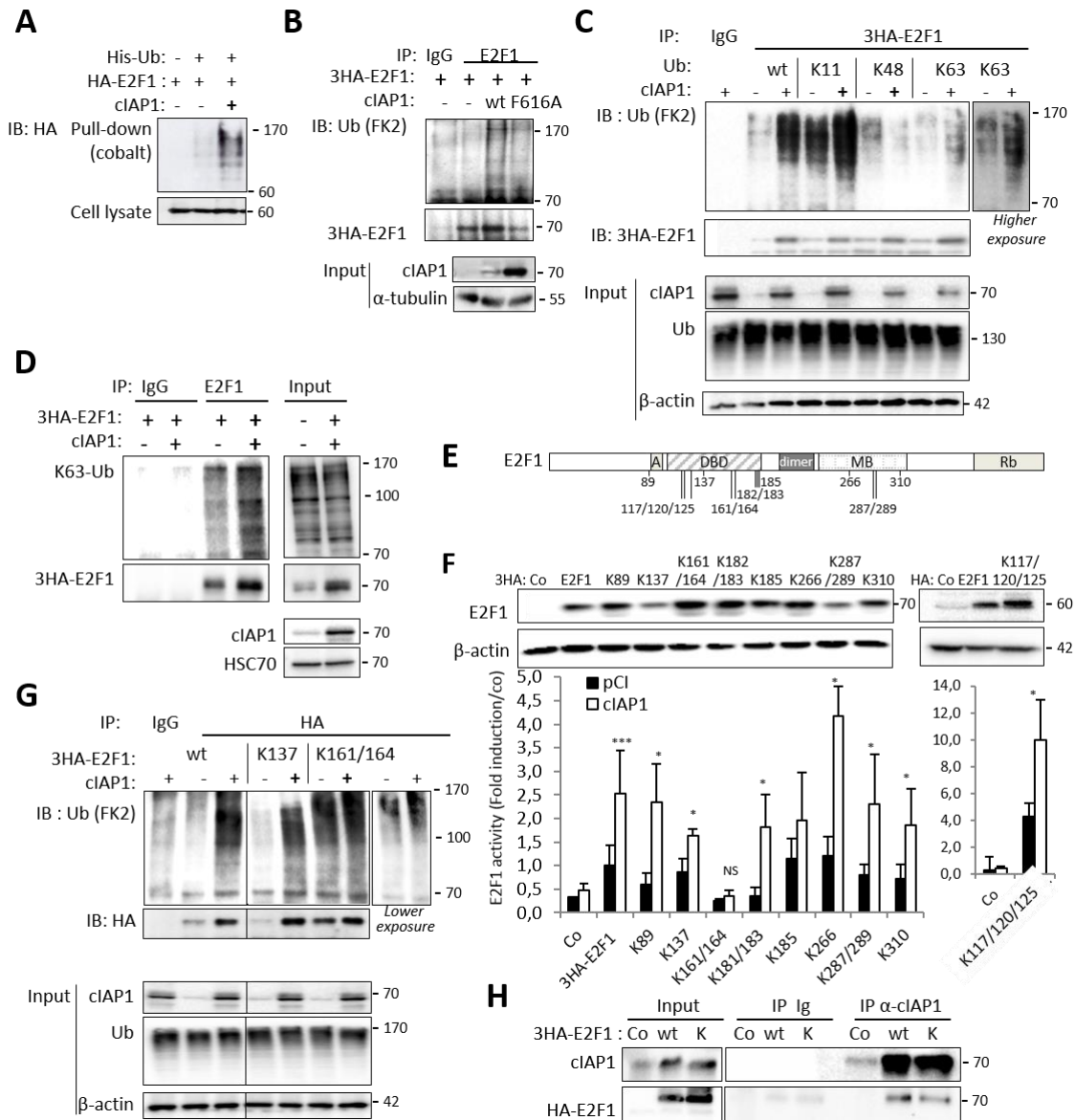
clAP1 a été exprimée dans des cellules HeLa en présence d'ubiquitines natives et le profil d'ubiquitylation d'E2F1 a été analysé après immunoprécipitation d'E2F1 et révélation de l'ubiquitine par un anticorps reconnaissant l'ubiquitine sous forme monomères ou assemblés en chaînes de poly-ubiquitines de différents types.

La surexpression de clAP1 induit l'accumulation de forme multi-ubiquitylée d'E2F1 (Figure n°26C). L'utilisation de mutants d'ubiquitine dans lesquels toutes les lysines sauf la lysine 11 (K11 only), 48 ou 63 ont été remplacées par une arginine montre que clAP1 favorise la conjugaison de chaînes de type K11 ou K63 mais pas de type K48 (Figure n°26B, C). L'utilisation d'un anticorps ne reconnaissant que les chaînes de type K63 confirme la capacité de clAP1 à induire l'accumulation d'E2F1 sous une forme poly-ubiquitylée de type K63 (figure n°26D).

➤ **clAP1 permet la conjugaison d'ubiquitine sur les lysines 161 et 164 d'E2F1 :**

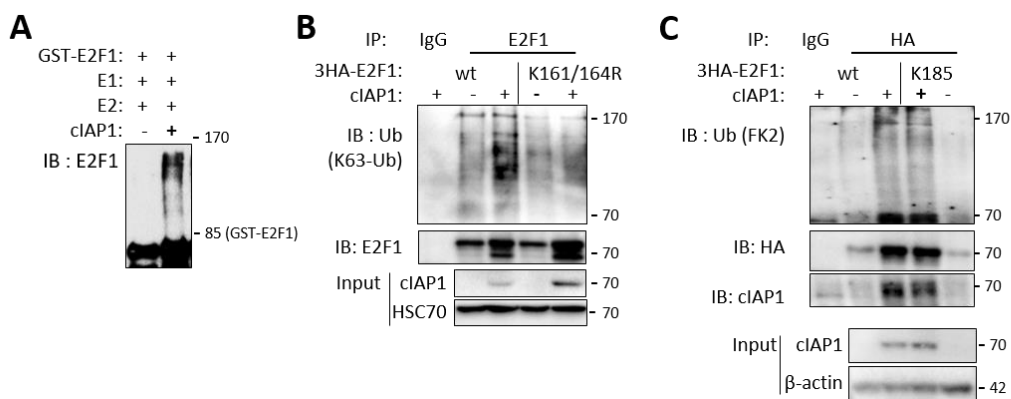
La conjugaison d'ubiquitines se fait sur les lysines des protéines cibles. E2F1 possède 14 lysines pouvant potentiellement être des sites accepteurs d'ubiquitines. Différents mutants d'E2F1 dans lesquels une ou plusieurs lysine(s) ont été remplacées par de l'arginine ont été synthétisés. Tous les mutants possèdent une activité transcriptionnelle à l'exception des mutants K161/164R et K181/183R. En accord avec les données de la littérature (Marzio et al., 2000), le mutant K117/120/125 possède une très forte activité transcriptionnelle. clAP1 est capable d'augmenter l'activité de tous les mutants, sauf le mutant K161/164R (Figure n°26F). clAP1 favorise l'accumulation des formes ubiquitylées des mutants K137R mais pas du mutant K161/164R (Figure n°26G et 27A), bien qu'il soit toujours capable d'interaction (Figure 26H). Le mutant K185R est faiblement stimulé par clAP1 (Figure n°26F). Cependant, il est toujours capable de lier clAP1 (Figure n°27B) et subit une ubiquitylation en présence de clAP1.

En résumé, nous avons montré que clAP1 favorisait une ubiquitylation de type K63 sur le doublet de lysines 161 et 164 d'E2F1.



**Figure 26: cIAP1 régule E2F1 par ubiquitinylation de type K63 des lysines 161 et 164 d'E2F1**

Test d'ubiquitinylation *in vitro* utilisant un lysat cellulaire de 293T transfectés avec His-Ubiquitine, HA-E2F1 et cIAP1. Les protéines ubiquitinylées sont immobilisées sur des billes de cobalt et l'analyse du profil d'ubiquitinylation d'E2F1 est réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le tag HA. **B-D.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans des cellules HeLa co-transfectées avec pCMV-3HA-E2F1 et His-ubiquitine wt ou un mutant d'ubiquitine ne pouvant former qu'un seul type de chaînes : K11, K48 ou K63 (C), en présence de cIAP1 ou de son mutant cIAP1-F616A. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-HA ou anti-E2F1 et le profil d'ubiquitine est analysé à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitinylation (FK2) ou spécifiquement les chaînes de type K63 (K63-Ub). **E.** Représentation schématique d'E2F1. A: cycline A; DBD: DNA Binding Domain, dim: Dimerization domain; MB: marked box; Rb: Rb binding domain. **F.** Test de transactivation : les cellules HeLa sont transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur CCNE, pCMV-HA, HAE2F1 (un seul HA ou 3HA) ou un mutant d'E2F1 dans lequel la lysine K a été mutée en arginine R, avec un plasmide contrôle (Co) ou cIAP1. L'activité luciférase est normalisée par l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et rapportée à l'induction de l'activité par E2F1 seul. Moyenne  $\pm$  S.D. de 3 expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est un test t de Student. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . **G.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans des cellules HeLa co-transfectées avec pCMV-3HA-E2F1 ou un mutant d'E2F1 indiqué, et His-ubiquitine en présence ou absence de cIAP1. E2F1 est immunoprécipité par l'utilisation d'un anticorps anti-HA. Le profil d'ubiquitinylation est analysé à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines (FK2). **H.** Analyse de l'interaction entre le mutant K161/164 d'E2F1 avec cIAP1. Les cellules HeLa sont transfectées avec E2F1 ou son mutant ainsi que cIAP1. cIAP1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre cIAP1. L'interaction avec E2F1 est analysée par immuno-blotting.



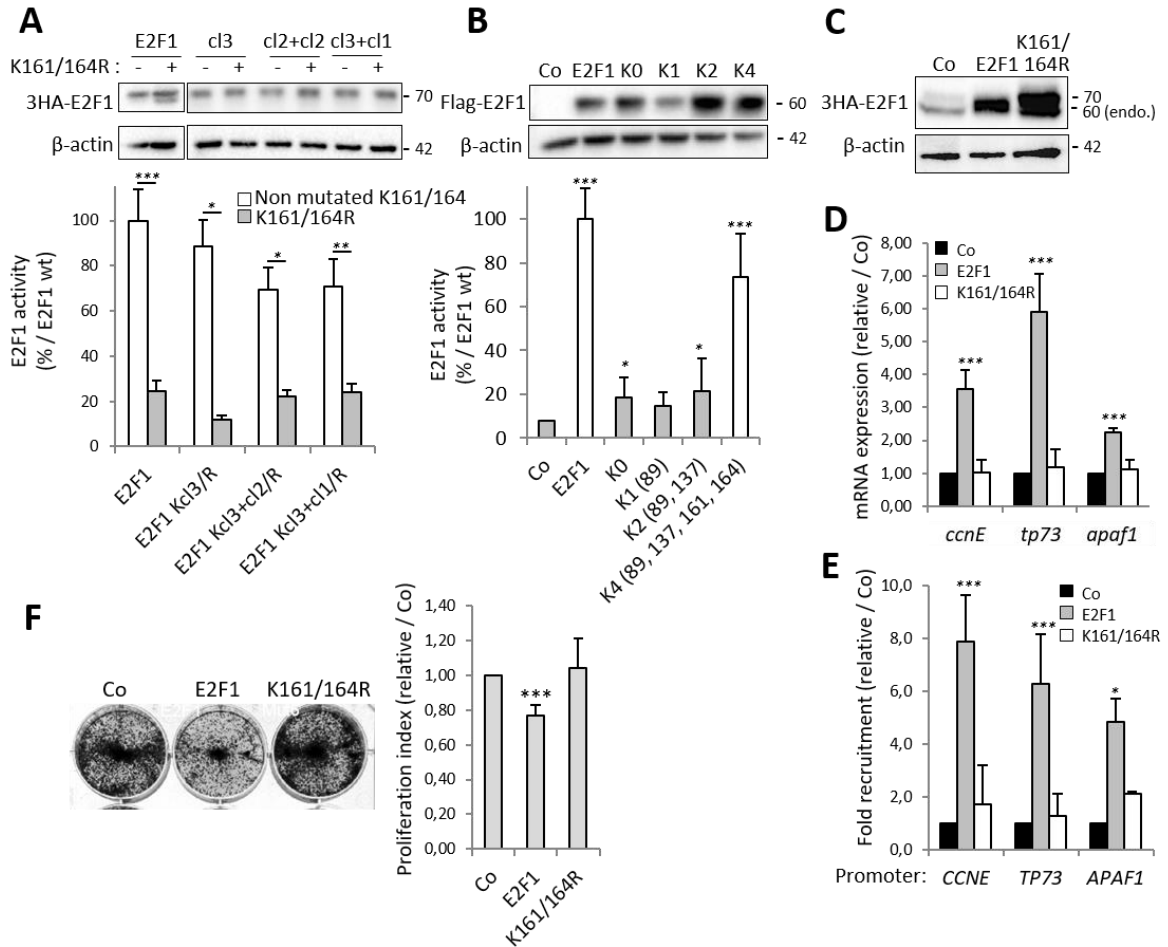
**Figure 27: Analyse de l'ubiquitinylation d'E2F1 et de ses mutants K161/164R et K185R**

**A.** Test d'ubiquitinylation *In vitro* de la protéine de fusion GST-E2F1 immobilisée sur billes Gluthation-sépharoses. **B&C.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans des cellules HeLa co-transfectées avec pCMV-3HA-E2F1 wt, les mutants K161/164R (B) ou K185R (C), et His-ubiquitine (C) ou le mutant d'ubiquitine formant seulement les chaînes de type K63 (B) en présence ou absence de cIAP1. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre le tag HA et le profil d'ubiquitinylation est analysé à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines (FK2).

➤ **Les lysines 161/164 d'E2F1 sont essentielles à son activité :**

Les lysines 161 et 164 semblent importantes pour l'activité d'E2F1 régulée par cIAP1. La perte de ces lysines suffit à abolir l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de la cycline E (figure n°28A). Un mutant d'E2F1 dépourvu de lysines (K0) ou ne contenant qu'une seule lysine (K1) ou seulement deux lysines (K2) n'a aucune activité transcriptionnelle. Par contre, la restauration des lysines 161 et 164 est suffisante pour restaurer 75% de l'activité transcriptionnelle (figure n°28B). La mutation des lysines 161 et 164 inhibe la capacité d'E2F1 à induire l'expression des gènes cibles cycline E, p73 et d'APAF1 (Figure n°28D) et empêche le recrutement d'E2F1 sur les promoteurs de ces gènes cibles (Figure n°28E). De plus, ces mutations affectent la capacité d'E2F1 à moduler la prolifération cellulaire (Figure n°28F).

Ces différents résultats montrent l'importance des lysines 161 et 164 pour l'activité d'E2F1.



**Figure 28: Les lysines 161 et 164 d'E2F1 sont essentielles à son activité**

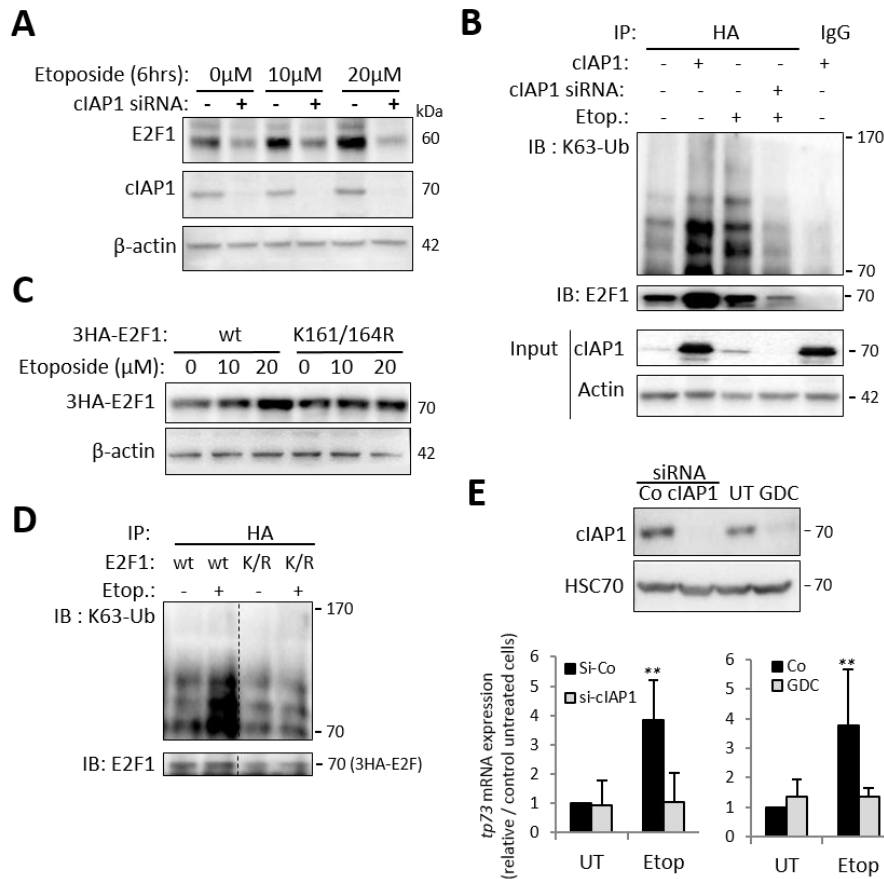
**A&B.** Expérience de transactivation réalisée dans des cellules HeLa transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur CCNE et les plasmides pCMV-3HA-E2F1 ou les mutants d'E2F1. L'activité luciférase est normalisée par l'activité de la β-galactosidase et rapportée à l'induction de l'activité par E2F1 seul. Moyenne ± S.D. de 3 expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est un test t de Student. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . **Mutants d'E2F1:** Kcl3/R: mutation des lysines K226/287/289/310 (cluster3) en arginine; Kcl2+3/R: mutation des lysines K226/287/289/310 (cluster3) et K182/183/185 (cluster 2) en arginine R; cl1+3/R: mutation de K226/287/289/310 (cluster3) et K117/120/125 (cluster 1) en arginine; K0: mutation de toutes les lysines en arginine; K1 (89): mutation de toutes les lysines en arginine à l'exception de la lysine 89; K2 (89, 137): mutation de toutes les lysines en arginine à l'exception des lysines 89 et 137; K4 (89, 137, 161, 164): mutation de toutes les lysines en arginine à l'exception des lysines 89,137,161 et 164. **C-F.** Les cellules HeLa ont été transfectées pendant 48H avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 ou le mutant pCMV-3HA-E2F1-K161/164R. (C) Analyse de l'expression d'E2F1 et du mutant K161/164 dans les cellules HeLa. (D) Expression relative de l'ARNm de la cycline E (*ccne*), *tp73* et *apaf1* déterminée 48h après transfection par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par l'expression relative de l'ARNm de *hprt* et de l'expression relative de l'ARNm des cellules transfectées avec un plasmide contrôle. Moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. (E) Expérience d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 ou d'un anticorps contrôle (IgG). Le recrutement relatif d'E2F1 sur les promoteurs *ccne*, *tp73* et *apaf1* est déterminé par qPCR. Les résultats sont normalisés par le lysat prélevé avant immunoprécipitation, par le contrôle IgG et par les cellules transfectées avec un plasmide contrôle. (F) Etude de la prolifération par coloration au cristal violet de cellules U2OS transfectées par un plasmide contrôle ou par E2F1 ou son mutant K161/164. Moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est le test t de Student. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ .

➤ **clAP1 stabilise E2F1 lors d'un stress génotoxique induit par l'étoposide :**

Un stress génotoxique stabilise l'expression d'E2F1 (voir chapitre III)2 b)), notre hypothèse était que la protéine clAP1 pourrait être impliquée dans cette stabilisation. Un traitement des cellules U2OS par l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II humaine) augmente le niveau protéique d'E2F1 de manière dose dépendante, cet effet est prévenu par une inhibition de clAP1 par un ARN interférent (Figure n°29A). De plus, nous observons la présence d'une forme poly-ubiquitinylée de type K63 d'E2F1 après un traitement étoposide. Cette modification est aussi inhibée par l'ARN interférent inhibant l'expression de clAP1 (Figure n°29B). La mutation des lysines 161 et 164 inhibe la stabilisation (Figure n°29C) et l'ubiquitinylation (Figure n°29D) d'E2F1.

Une inhibition de clAP1 par un ARN interférent ou par un traitement des cellules par le *Smac mimetic* GDC052 empêche l'expression induite par l'étoposide du gène cible d'E2F1 nommé TP73 (figure 4E).

Ces résultats montrent l'importance de clAP1 pour la stabilisation d'E2F1 lors d'un stress génotoxique induit par l'étoposide.



**Figure 29: cIAP1 stabilise E2F1 lors d'un endommagement de l'ADN**

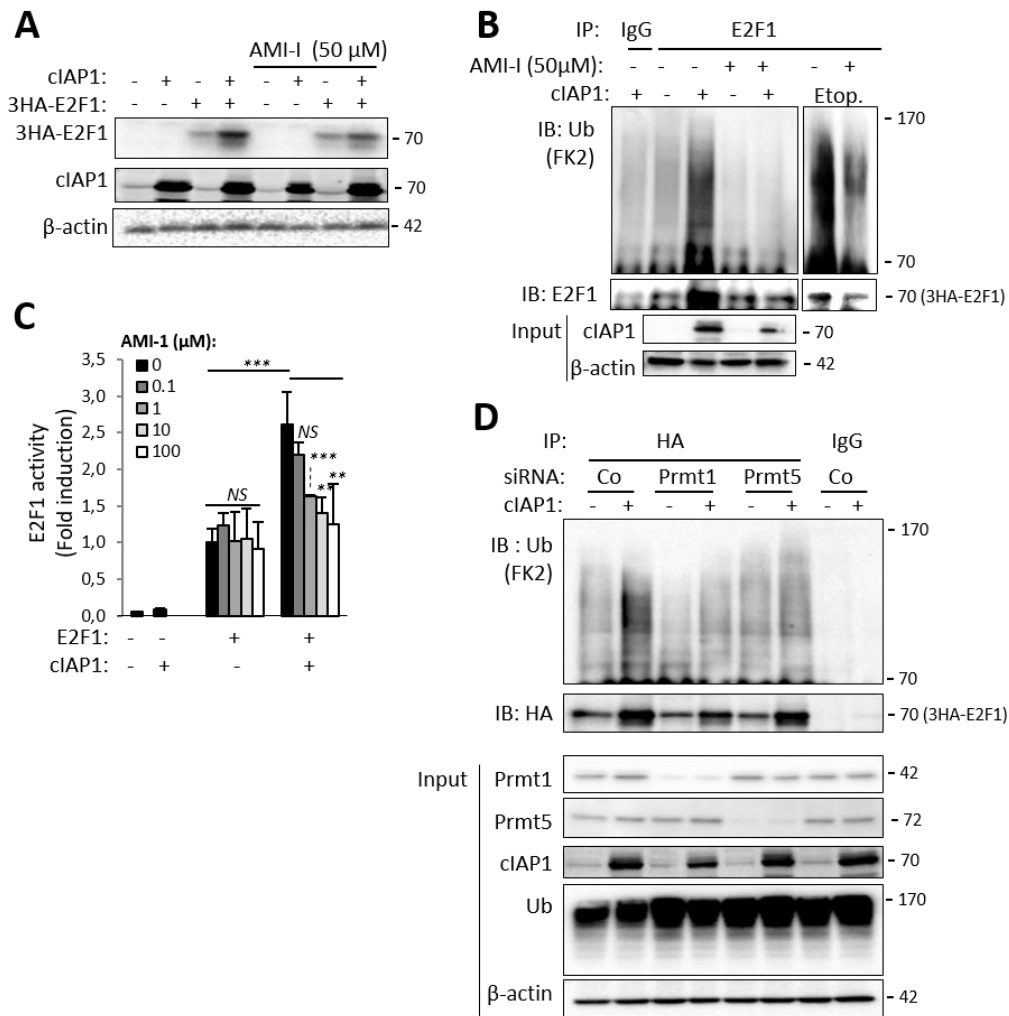
**A.** Analyse de l'expression d'E2F1 et de cIAP1 dans des cellules U2OS transfectées avec un siRNA-cIAP1. Les cellules sont traitées 48h après transfection, pendant 6h avec de l'étoposide. **B.** Profil d'ubiquitylation d'E2F1 dans des cellules HeLa transfectées avec un ARN interférent dirigé contre cIAP1 ou un siARN contrôle, avec les plasmides 3HA-E2F1 et His-ubiquitine. Les cellules sont traitées pendant 6h avec 10μM d'étoposide. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-HA et son ubiquitylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les chaînes d'ubiquitines de type K63 (K63-Ub). **C.** Analyse de l'expression d'E2F1 dans des cellules U2OS transfectées avec les plasmides exprimant 3HA-E2F1 ou 3HA-E2F1-K161/164R. Quarante-huit heures après transfection les cellules sont traitées 6h avec de l'étoposide aux concentrations indiquées. **D.** Profil d'ubiquitylation d'E2F1 dans des cellules HeLa transfectées avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 ou pCMV-3HA-E2F1 K161/164R (indiqué K/R), et le plasmide His-ubiquitine, puis traitées 6h avec 10μM d'étoposide. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-HA et son ubiquitylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les chaînes d'ubiquitines de type K63 (K63-Ub). Le niveau d'expression d'E2F1 a été ajusté afin d'obtenir la même quantité d'ubiquitine entre les cellules non traitées. **E.** Les cellules U2OS ont été transfectées avec un ARN dirigé contre cIAP1 ou traitées avec du GDC0152 17nM pendant 1h, elles ont également été traitées avec de l'étoposide 10μM pendant 48h. L'expression de l'ARNm de *tp73* est mesurée par RT-qPCR. UT: cellules non traitées. Les résultats sont normalisés par rapport à l'ARNm de *hprt* mRNA et l'expression relative de l'ARNm des cellules contrôles non traitées. Moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes.

➤ **La méthylation de résidus arginines d'E2F1 est nécessaire pour l'ubiquitylation par cIAP1 :**

La stabilisation d'E2F1 par un stress génotoxique implique différentes modifications post-traductionnelles (voir chapitre III)2 b)). Une inhibition de PRMT1 permettant la méthylation d'E2F1 sur l'arginine 109, inhibe la capacité de cIAP1 à stabiliser E2F1 (Figure n°30A) et sa capacité à stimuler son activité (Figure n°30B) et à augmenter son profil d'ubiquitylation (Figure n°30C).

Des ARN interférants dirigés contre les protéines Prmt1 et Prmt5 inhibent aussi l'accumulation de formes ubiquitinylées d'E2F1 par cIAP1 (Figure n°30D).

La méthylation par prmt5 favorise l'entrée en cycle des cellules suggérant que l'ubiquitinylation d'E2F1 par cIAP1 pourrait être régulée au cours du cycle cellulaire.



**Figure 30: Une étape préalable de méthylation d'E2F1 par une arginine méthylase est nécessaire pour l'ubiquitinylation d'E2F1 induite par cIAP1**

**A.** Analyse de l'expression d'E2F1 et de cIAP1 dans des cellules HeLa transfectées avec les plasmides exprimant 3HA-E2F1 et cIAP1, puis traitées pendant 16h avec un inhibiteur des PRMT (AMI-1) à 50μM. **B.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1, pCI-cIAP1, et avec His-ubiquitine, puis traitées pendant 24h avec de l'AMI-1 50μM ± 6h de traitement à l'étoposide 10μM. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-HA et son ubiquitinylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines (FK2). **C.** Expérience de transactivation réalisée dans des cellules HeLa transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur CCNE et les plasmides pCMV-3HA-E2F1 et pCI-contrôle ou pCI-cIAP1, puis traitées avec une concentration croissante d'AMI-1 pendant 24h. Moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est le test t de Student. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . **D.** Profil d'ubiquitinylation E2F1 dans des cellules HeLa transfectées avec des ARN interférants dirigés contre Prmt1 ou Prmt5, et avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1, pCI-cIAP1, His-ubiquitine. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 et son ubiquitinylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines (FK2).

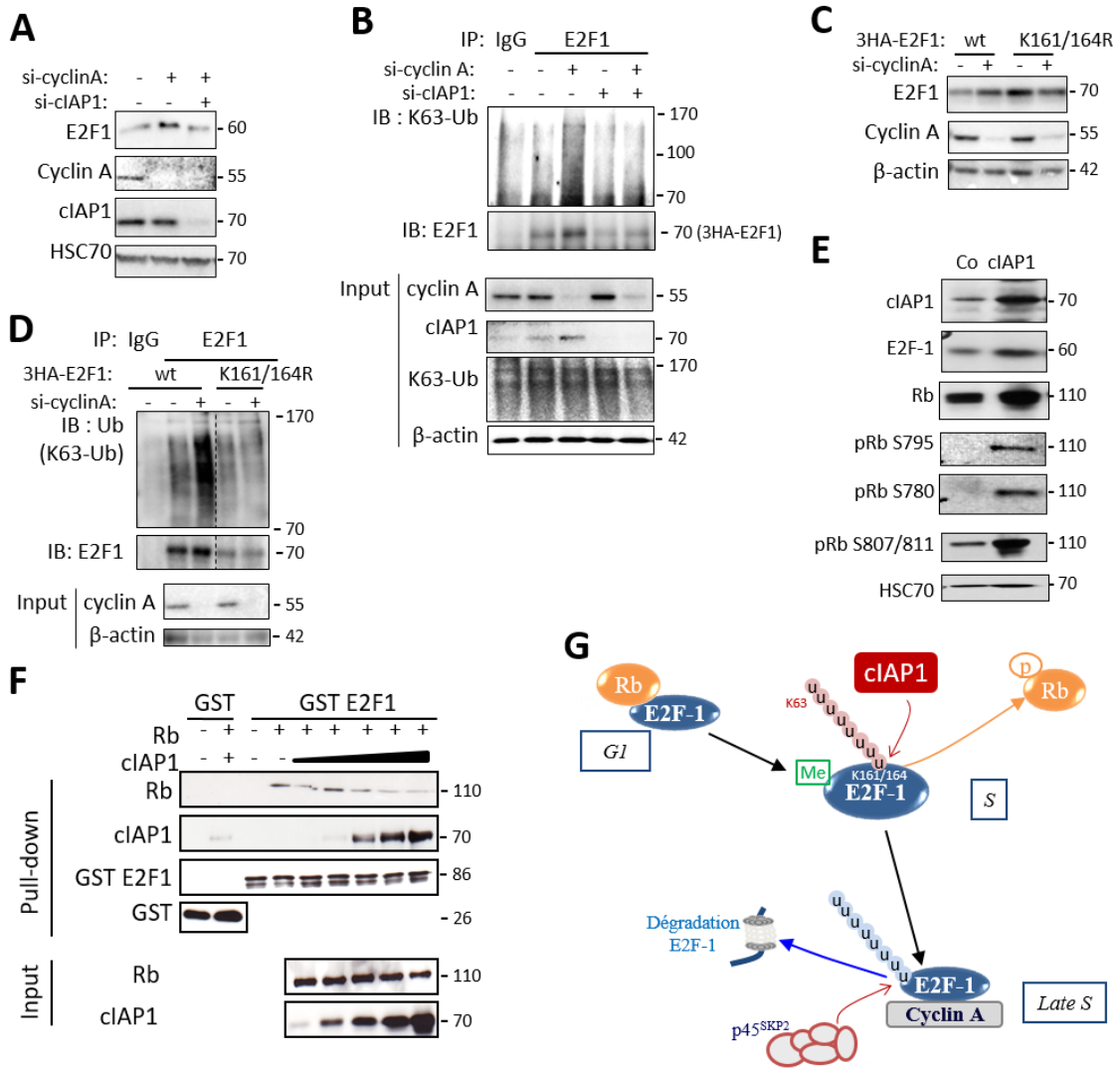


➤ **L'ubiquitinylation K63 d'E2F1 induite par cIAP1 est régulée au cours du cycle cellulaire :**

L'expression d'E2F1 est régulée au cours du cycle cellulaire et présente un pic d'expression et d'activité en début de phase S. En fin de phase S, la cycline A lie E2F1 et le complexe cycline A/cdk2 induit la phosphorylation d'E2F1. Ceci conduira à une inactivation puis à la dégradation d'E2F1 (voir chapitre III)2 a)). Les cellules ont été bloquées en phase S du cycle cellulaire par l'action d'un ARN interférent dirigé contre la cycline A (Figure n°32A).

Un ARN interférent dirigé contre la cycline A augmente l'expression protéique et l'ubiquitinylation de type K63 d'E2F1, démontrant pour la première fois une ubiquitinylation non dégradative d'E2F1 en phase S du cycle cellulaire. Ces deux phénomènes sont prévenus par une inhibition de cIAP1 (Figure n°31A et 31B) ou par la mutation des lysines 161 et 164 d'E2F1 (Figure n°31C et 31D), démontrant l'importance de cIAP1.

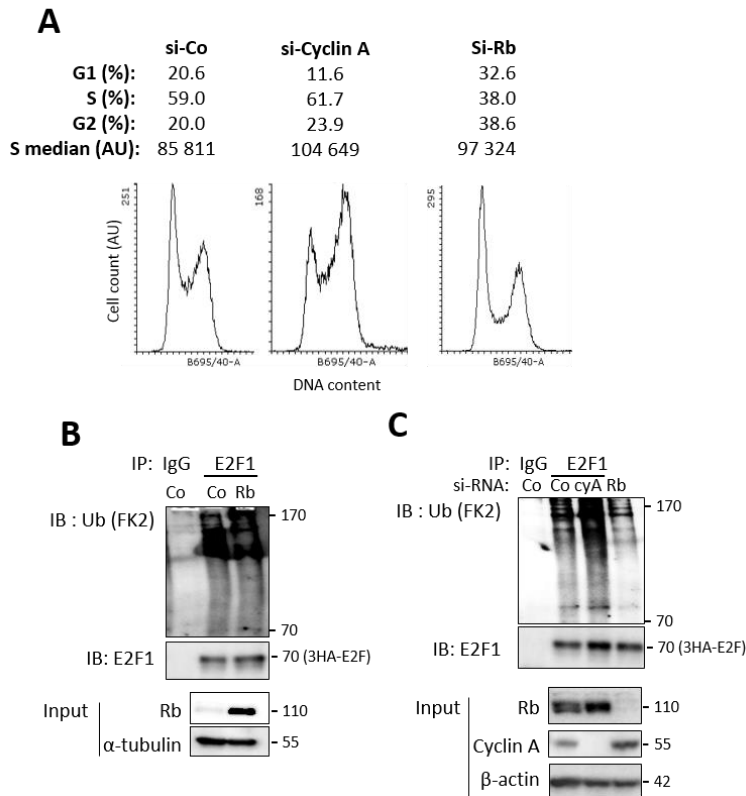
Au cours du cycle cellulaire, l'activité d'E2F1 est contrôlée par la protéine à poche Rb. En phase G1, la protéine Rb sous forme hypophosphorylée inhibe l'activité d'E2F1. Lors de la transition G1/S, Rb sera phosphorylée ce qui permettra la libération d'E2F1 qui devient actif. Une inhibition de Rb par un ARN interférent, provoque un dérèglement du cycle cellulaire. Nous observons une diminution du pourcentage des cellules en phase S alors que les cellules en phase G1 et G2/M augmentent (Figure n°32A). L'inhibition de Rb module légèrement le niveau d'ubiquitinylation d'E2F1, en accord avec la diminution du pourcentage de cellules en phase S (Figure n° 32B). Au contraire, une surexpression de cIAP1 augmente la phosphorylation de Rb (Figure 31E) en accord avec une activation d'E2F1. De plus, une analyse par GST-pull down de l'interaction de Rb avec E2F1 en présence de quantité croissante de cIAP1 suggèrent que cIAP1 pourrait inhiber l'interaction Rb-E2F1 et donc empêcher l'activité répressive de Rb sur E2F1 (Figure 31F).



**Figure 31: L'ubiquitinylation de type K63 d'E2F1 réalisée par cIAP1 est régulée au cours du cycle cellulaire**

**A.** Analyse de l'expression d'E2F1, de la cycline A et de cIAP1 dans des cellules U2OS transfectées avec un ARN interférent dirigé contre la cycline A ± un ARN interférent dirigé contre cIAP1. **B.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans des cellules HeLa transfectées avec un ARN interférent dirigé contre la cycline A ± un ARN interférent dirigé contre cIAP1, puis 24h plus tard elles sont transfectées avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 et His-ubiquitine. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 et son ubiquitinylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les chaînes d'ubiquitines de type K63 (K63-Ub). **C.** Analyse de l'expression de la protéine 3HA-E2F1 wt ou du mutant K161/164R et de la cycline A dans des cellules HeLa transfectées avec un ARN interférent dirigé contre la cycline A. **D.** Profil d'ubiquitinylation d'E2F1 dans des cellules HeLa transfectées avec un ARN interférent dirigé contre la cycline A, puis 24h après avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1, pCMV-E2F1-K161/164R et un plasmide exprimant un mutant d'ubiquitine qui peut uniquement réaliser des chaînes d'ubiquitines de type K63. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 et son ubiquitinylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines(FK2). Le niveau d'expression d'E2F1 a été ajusté afin d'obtenir la même quantité d'ubiquitine entre les cellules transfectées avec un ARN interférent contrôle. **E.** Analyse de l'expression protéique de cIAP1, E2F1, la cycline E, Rb, phospho (S795, S750, S780 and S810) Rb dans des cellules U2OS transfectées avec cIAP1. **F.** Analyse par GST-pull down de l'interaction entre la protéine de fusion GST-E2F1 et la protéine Rb en présence d'une quantité croissante de cIAP1. **G.** Représentation schématique de la régulation d'E2F1 par cIAP1. En phase G1 du cycle cellulaire, E2F1 est lié à Rb. En phase S, E2F1 est dans un premier temps méthylé sur des résidus arginine par PRMT. Ensuite, cIAP1 catalyse la formation de chaînes d'ubiquitines de type K63 sur les lysines 161 et 164. Cette ubiquitinylation stabilise E2F1 et stimule l'activité d'E2F1. En fin de phase S, la cycline A inhibe la formation de chaînes de types K63 sur E2F1, lie E2F1 et entraîne sa dégradation par le protéasome via l'intermédiaire de skp2.

## Supplementary Figure 2



**Figure 32: Influence de Rb sur l'ubiquitylation d'E2F1**

**A.** Analyse du cycle cellulaire des cellules U2OS après 48h de transfection d'ARN interférent contrôlé, dirigé contre la cycline A ou contre Rb. Le pourcentage de cellules présentes dans les différentes phases du cycle est indiqué au-dessus des graphiques. **B-C.** Influence de Rb sur l'ubiquitylation d'E2F1. Les cellules HeLa sont co-transfectées avec un plasmide exprimant la protéine Rb (B) ou les cellules U2OS avec un ARN interférent dirigé contre la cycline A ou Rb (C), et avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 et His-ubiquitine. E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 et son ubiquitylation est analysée à l'aide d'un anticorps reconnaissant les chaînes de poly-ubiquitines (FK2).

### Conclusion :

Cet article montre une régulation d'E2F1 par cIAP1 via un mécanisme d'ubiquitylation non dégradative.

Une ubiquitylation de type K63 sur les lysines 161 et 164 d'E2F1 par cIAP1 est observée en phase S du cycle cellulaire et après un stress génotoxique. Cette ubiquitylation nécessite une étape préliminaire de méthylation sur des résidus arginines. Ces modifications contribuent à la stabilisation du facteur de transcription et à son activité.

## 2) Caractérisation de l'interaction cIAP1 – E2F1 :

Afin d'étudier précisément le rôle de cIAP1 sur la régulation d'E2F1 et notamment sur l'importance potentielle de cette interaction pour les propriétés oncogéniques de cIAP1, nous avons décidé de créer un mutant de cIAP1 incapable d'interagir avec E2F1.

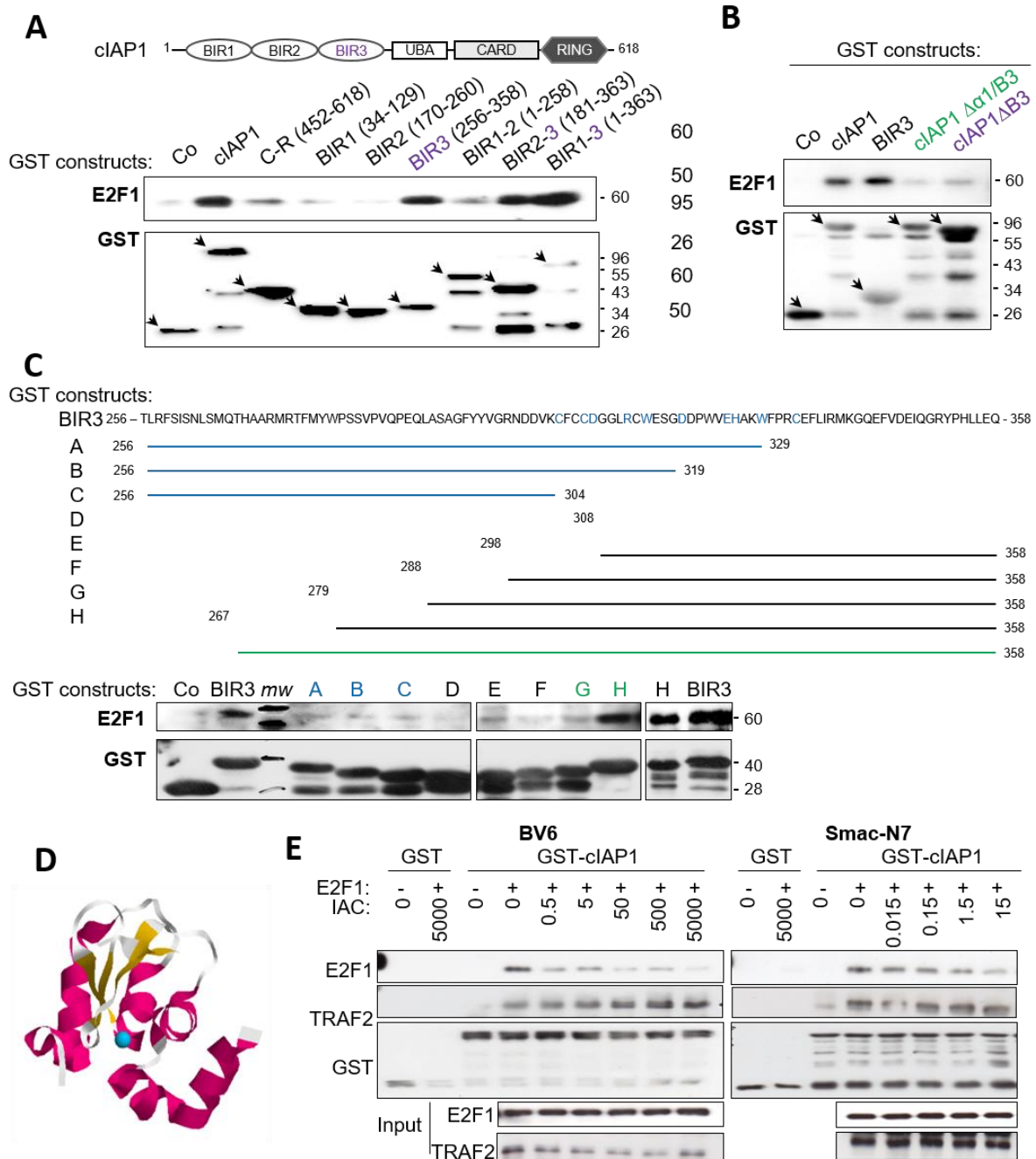
Jean Berthelet a initié ce projet par la recherche du domaine de cIAP1 impliqué dans son interaction avec E2F1. J'ai poursuivi ce travail par la recherche de la séquence de ce domaine impliquée dans cette interaction.

### ➤ E2F1 interagit avec la poche hydrophobe du domaine BIR3 de cIAP1 :

cIAP1 possède trois domaines BIR dédiés à l'interaction avec des protéines partenaires. Par GST-pull-down en utilisant des protéines de fusion-GST ne contenant qu'un ou plusieurs domaines de cIAP1 (Figure n° 33A), nous avons montré qu'E2F1 liait préférentiellement les constructions qui contiennent le domaine BIR3 (Figure n°33A). L'importance du domaine BIR3 a été confirmée par la création d'un mutant délété du domaine BIR3 fusionné à la GST qui perd sa capacité à interagir avec E2F1 (Figure n°33 B, piste 5).

Le domaine BIR3 est formé de 4 hélices alpha et 3 feuillets beta (Figure n°33D). Les acides aminés V<sup>298</sup>, D<sup>304</sup>, K<sup>206</sup>, G<sup>312</sup>, L<sup>314</sup>, R<sup>315</sup>, W<sup>317</sup>, D<sup>320</sup>, E<sup>325</sup>, W<sup>329</sup> et F<sup>330</sup> forme la poche hydrophobe d'interaction, consolidé par un atome de zinc liant les résidus C<sup>207</sup>, C<sup>210</sup>, H<sup>326</sup> et C<sup>333</sup>. Afin d'affiner le site d'interaction, différents mutants de délétion du domaine BIR3 ont été créés (Figure n°33C) et fusionnés à la GST. Tous les mutants présentant une poche hydrophobe tronquée perdent leur capacité à lier E2F1 (mutant A, B, C, D, E) suggérant une interaction avec cette poche. Afin de confirmer ces résultats nous avons analysé la capacité du peptide Smac-N7 correspondant à l'IBM de Smac ou du *smac mimetic* BV6, tous deux connus pour lier la poche hydrophobe du domaine BIR3 à entrer en compétition avec E2F1 pour la liaison à cIAP1. Ces deux molécules inhibent de manière dose dépendante l'interaction entre E2F1 et cIAP1 (Figure n°33E), alors qu'ils n'interfèrent pas avec l'interaction de cIAP1 avec TRAF2 qui lie le domaine BIR1 de cIAP1.

Ces résultats montrent l'importance de la poche hydrophobe de cIAP1 pour la liaison d'E2F1.



**Figure 33: E2F1 interagit avec la poche hydrophobe de cIAP1**

**A,B,C,E]** Les protéines de fusion GST-cIAP1, GST-CARD-RING (C-R), GST-BIR1, GST-BIR2, GST-BIR3, GST-BIR1-2, GST-BIR2-3, GST-BIR1-3 ou les constructions A à H ainsi que les mutants de cIAP1 délétés du domaine BIR3 (cIAP1ΔBIR3) ou de l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 (cIAP1Δα1BIR3) sont produits dans des bactéries BL21 et immobilisés sur des billes glutathion sépharose. Elles sont ensuite incubées avec la protéine HA-E2F1. L'interaction cIAP1-E2F1 est analysée par immuno-blotting.

**C]** Acide-aminés en bleu important pour la poche hydrophobique.

**D]** Structure 3D du domaine BIR3, l'atome de zinc maintenant la poche hydrophobe est représenté en bleu.

**E]** Des quantités croissantes du *smac mimetic* BV6 (Bivalent) ou du peptide Smac N7 (monovalent) sont ajoutés afin d'évaluer leur impact sur l'interaction E2F1-cIAP1 lors de l'incubation des constructions GST-vidé et GST-cIAP1 avec E2F1. L'interaction cIAP1-E2F1 est analysée par immuno-blotting.

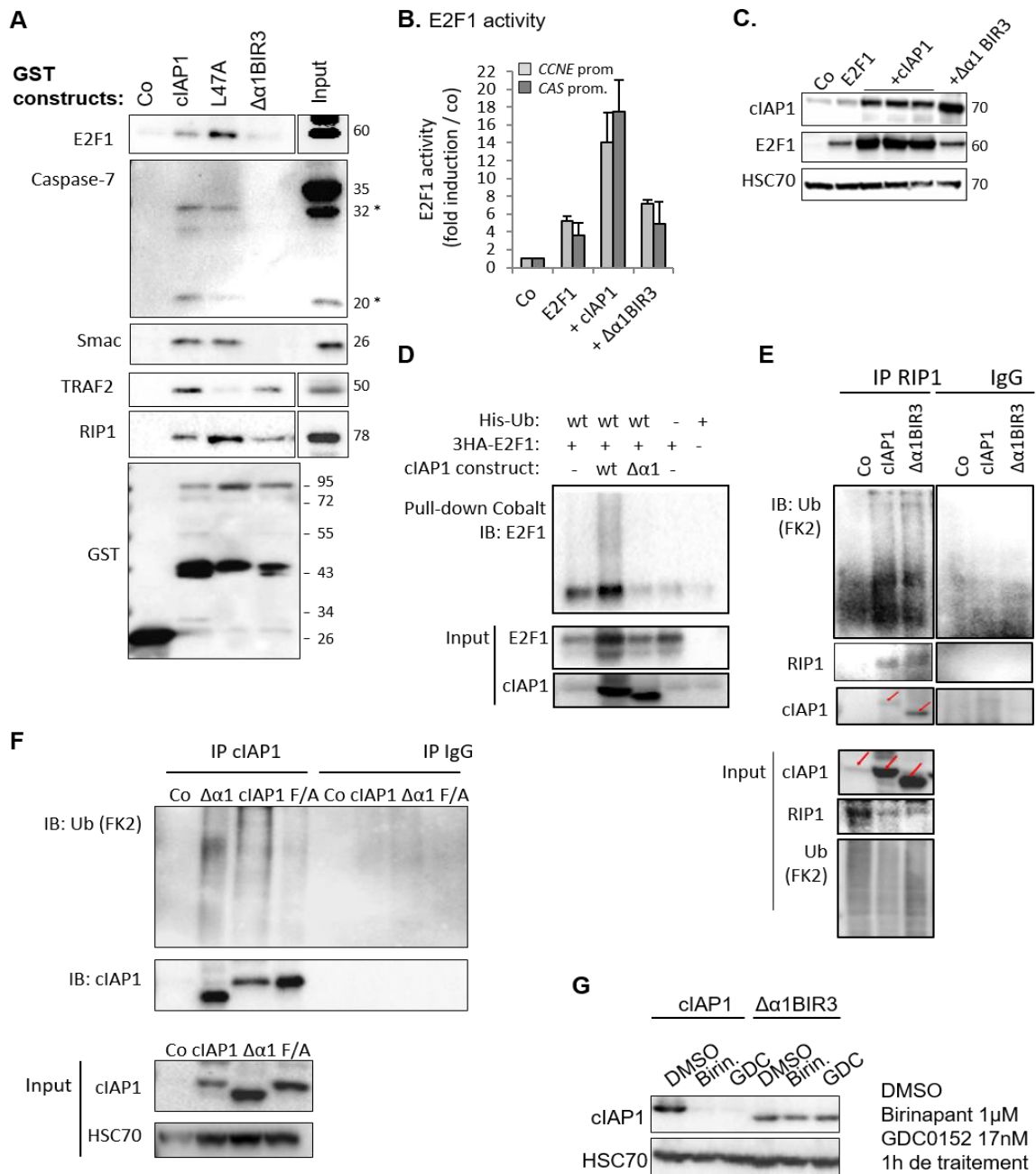
➤ **L'hélice alpha 1 du domaine BIR3 de cIAP1 est essentielle aux interactions IBM – poche hydrophobe :**

De manière inattendue, la délétion des acides aminés 267 à 278 (QTHAARMRTFMY) correspondant à l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 est suffisante pour abolir l'interaction entre cIAP1 et E2F1 (Figure n°33 C, construction G comparée à la construction H). La délétion de cette hélice dans la protéine cIAP1 (mutant cIAP1  $\Delta\alpha 1$  BIR3) diminue fortement l'interaction entre cIAP1 et E2F1 dans des expériences de GST-pull-down (figure n°33B) ou de co-précipitation (Figure n°34A), la capacité de cIAP1 à stimuler l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur les promoteurs *ccne* (gène codant la cycline E) et *casp-7* (gène codant la caspase-7 (Figure n°34B), la capacité de cIAP1 à stabiliser E2F1 (Figure n°34C) et à favoriser l'accumulation de forme ubiquitylée d'E2F1 (Figure n°34D). La délétion de l'hélice alpha 1 abolie la liaison de cIAP1 avec les formes p32 et p20 de la caspase-7 ainsi qu'avec Smac (Figure n°34A), deux protéines qui lient la poche hydrophobe du BIR3, par contre, le mutant cIAP1 $\Delta\alpha 1$ BIR3 est toujours capable de lier TRAF2 et RIP1 qui ne lient pas le domaine BIR3 (Figure n°34A). Nous avons utilisé comme contrôle le mutant L47A dans lequel le site de liaison à TRAF2 a été muté. Ce mutant peut lier toutes les protéines partenaires testées sauf TRAF2.

Le mutant cIAP1 $\Delta\alpha 1$ BIR3 conserve son activité E3-ubiquitine ligase. En effet, il est toujours capable d'ubiquityler RIP1 (Figure n°34E) et de s'auto-ubiquityler bien que le profil d'auto-ubiquitylation obtenu semble être un peu différent par rapport à celui obtenu avec la protéine cIAP1 native (Figure n°34F).

Les *Smac mimetics* lient la poche hydrophobe de cIAP1 ce qui stimule sa dimérisation, son auto-ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. Nos expériences ont montré une dégradation de cIAP1 dès 15 minutes après un traitement des cellules par un *Smac mimetic* (résultats non montrés). Nous avons donc analysé la capacité des *Smac mimetics* à dégrader le mutant cIAP1 $\Delta\alpha 1$ BIR3 et montré que ce mutant est complètement résistant à l'action du GDC0152, un *Smac mimetic* monovalent ne liant qu'un BIR domaine mais aussi du birinapant qui lui est un *Smac mimetic* bivalent, c'est-à-dire qu'il lie à la fois le domaine BIR2 et BIR3 (Figure n°34G).

Nous montrons donc pour la première fois l'importance de l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 dans le maintien de la poche hydrophobe de ce domaine. De plus, nous avons créé un mutant de cIAP1 incapable de lier E2F1, Smac et les caspases alors qu'il conserve sa capacité à lier TRAF2 et RIP1. Ce mutant est complètement résistant à l'action délétère des *Smac mimetics*. Cette construction pourra être un outil important pour analyser spécifiquement l'activité de cIAP1 sur TRAF2 et RIP1 dans des cellules dans lesquels cIAP1 endogène aura été déplétée par un traitement avec un *Smac mimetic*.



**Figure 34: l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 est essentielle au maintien de la poche hydrophobe**

**A]** Les protéines de fusion GST-cIAP1, GST-L47A (mutant incapable d'interagir avec TRAF2), GST-cIAP1Δα1BIR3 et GST-vidé sont produits dans des bactéries BL21 et immobilisés sur billes glutathion sépharose. Elles sont ensuite incubées avec la protéine HA-E2F1 ou avec un lysat cellulaire contenant de la caspase 7 ou l'un des trois partenaires de cIAP1 : Smac, TRAF2 et RIP1. L'interaction cIAP1 avec ses différents partenaires est analysée par immuno-blotting

**B, C, D, E, F, G]** Les cellules HeLa sont transfectées avec les différentes constructions indiquées sur les figures.

**B]** La capacité d'E2F1 à stimuler le promoteur de la cycline E et de la caspase 7 en présence ou non de cIAP1 ou du mutant cIAP1Δα1BIR3 est évaluée par test de transactivation 48h après transfection.

**D, E, F]** L'ubiquitinylation est analysée par immuno-blotting après immunoprécipitation de l'ubiquitine totale (His-ubiquitine) sur billes de cobalt ou après immunoprécipitation de RIP1 ou de cIAP1 à l'aide d'un anticorps anti-RIP1 ou cIAP1 réciproquement.

**G]** Les cellules HeLa sont traitées pendant 1h avec le *smac mimetic* indiqué 48h après transfection et la dégradation de cIAP1 est évaluée par immuno-blotting.

➤ **E2F1 contient un IBM atypique :**

La poche hydrophobe du domaine BIR3 permet la reconnaissance de motifs IBM spécifiques ayant comme séquence préférentielle A (K/T/V/I) (P/A/E) (F/E/I/S/Y) (Vaux and Silke, 2005)(IBM conventionnel) ou SR (V/P) W (IBM non conventionnel) (Voir chapitre II)1) b)).

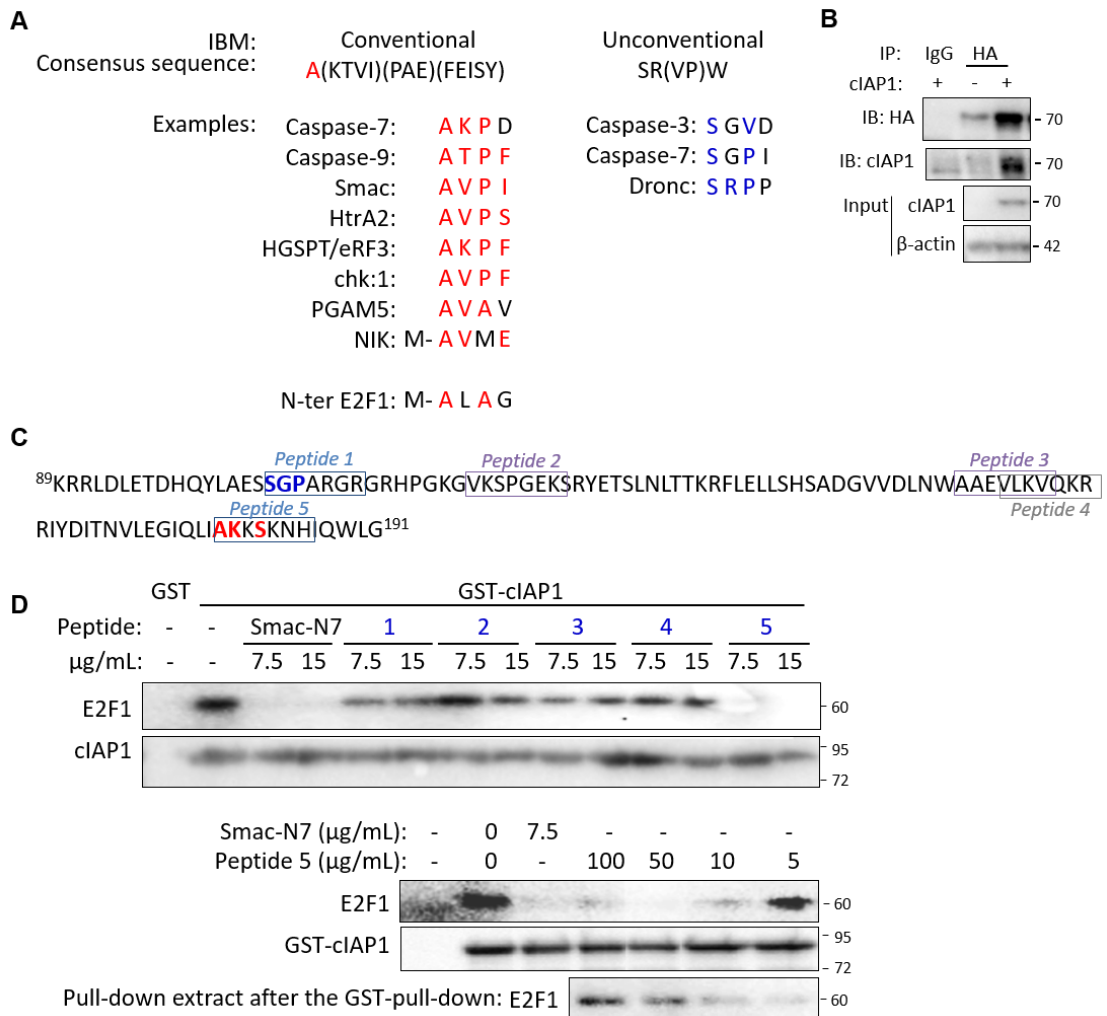
L'IBM « conventionnel » doit être exposé en position N-terminale pour pouvoir s'ancrer dans la poche de liaison. La séquence protéique E2F1 débute par la séquence M-ALAP qui pourrait agir comme un IBM classique, après élimination de la méthionine par une aminopeptidase, comme cela a été démontré pour l'IBM de NIK (Figure n°5, chapitre II)1) b)). Dans la construction 3HA-E2F1, les deux premiers acides aminés MA ont été tronqués et le site IBM potentiel est masqué par la conjugaison de trois *tags* HA en position N-terminale. Cette construction conserve sa capacité à lier cIAP1 suggérant que « ALAP » n'est pas un IBM ou qu'il existe plusieurs sites d'interaction.

Un travail de collaboration avec l'équipe dirigée par Béatrice Eymin a montré que cIAP1 interagissait avec la région 89-191 d'E2F1 contenant le domaine de liaison à l'ADN (Cartier et al., 2011). Nous avons recherché la présence d'un motif ressemblant à un IBM dans la séquence du domaine de liaison à l'ADN d'E2F1. Nous avons retenu des séquences qui possèdent au moins 3 sur les 4 acides aminés de séquences IBM conventionnelles ou non-conventionnelles validées (Figure n°35A). Deux motifs ont été sélectionnés : AKKS, SGPA. Nous avons aussi sélectionné 2 motifs présentant des similitudes avec des IBM potentiels mais non validés de protéines capables de lier cIAP1 (Zhuang et al., 2013): VKSPGEK et AAEVLKV.

Des heptapeptides intégrant ces séquences ainsi qu'un heptapeptide contrôle (peptide 4, VLKVQR) ont été synthétisés afin d'analyser leur capacité à bloquer de façon compétitive l'interaction cIAP1-E2F1. Le peptide Smac N7 contenant l'IBM de Smac a été utilisé comme contrôle positif.

Comme le peptide Smac N7, le peptide AKKSKNH bloque l'interaction cIAP1-E2F1 de manière dose dépendante, suggérant que la séquence correspondante à ce peptide puisse être importante pour l'interaction (Figure n°35D).





Smac-N7: AVPIAQK

**Figure 35:: Recherche d'un « IAP Binding Motif »**

**A]** Représentation des séquences des IBM conventionnels et non conventionnels connus

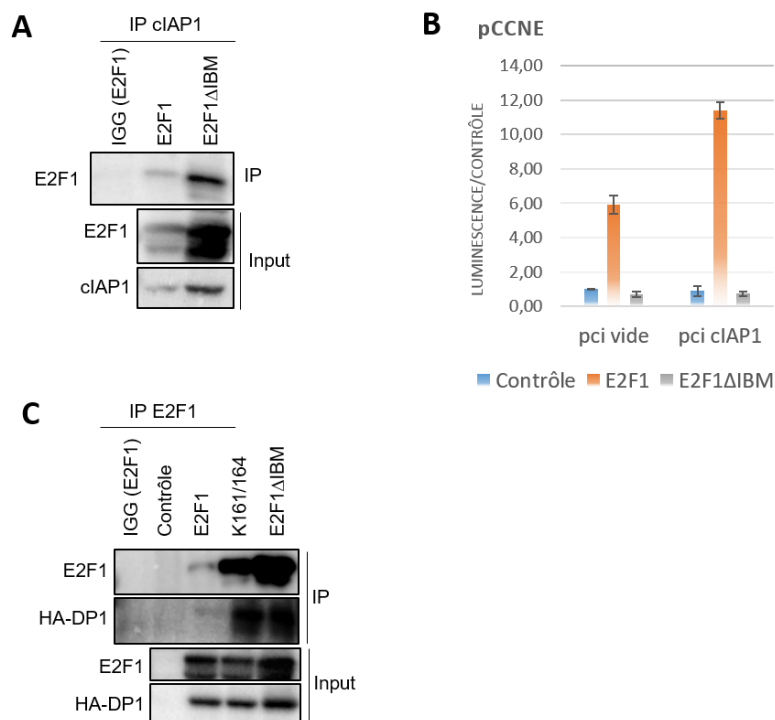
**B]** Les cellules HeLa sont transfectées avec un vecteur contrôle ou pCI-ciAP1 ainsi que la protéine E2F1-3HA (IBM N terminal délété). Une immuno-précipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette HA est réalisée afin d'étudier l'interaction ciAP1 avec E2F1 par immuno-blotting.

**C]** Représentation des séquences des peptides synthétisés pouvant représenter un potentiel IBM.

**D]** Etude par GST-pull down de la capacité des différents peptides à rentrer en compétition avec E2F1 pour l'interaction avec ciAP1. Les peptides et le smac N7 sont incubés 1h avec les constructions GST-ciAP1 puis la protéine E2F1 est ajoutée 1h aux constructions GST. L'interaction ciAP1-E2F1 est analysée par immuno-blotting.

Un mutant d'E2F1 dépourvu de cette région correspondant au « potentiel IBM » a été créé (mutant appelé ΔIBM). Ce mutant conserve sa capacité à lier ciAP1 ce qui invalide notre hypothèse (Figure n°35B et 36A).

Cependant, bien qu'il conserve son habilité à lier DP1 (Figure n°36C), il perd complètement son activité transcriptionnelle dans un test de transactivation et n'est plus stimulé par ciAP1 (Figure n°36B).



**Figure 36: Caractérisation du mutant E2F1ΔIBM**

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides pCMV-E2F1-3HA, pCMV-E2F1ΔIBM, **A]** pCMV-E2F1-K161/164, **B]** pGL-human CCNE (couplé au gène rapporteur luciférase), pCMV-β-gal et l'un des plasmides suivant: pCI-contrôle, pCI-cIAP1, **C]** pcDNA-DP1-HA.

Les cellules HeLa transfectées sont lysées 24h après transfection et immuno-précipitées par un anticorps anti-cIAP1 (**A]**) ou un anticorps anti-E2F1 (**C]**). L'interaction avec les protéines d'intérêts est analysée par immuno-blotting.

**B]** Quarante-huit heures après transfection, la luminescence est mesurée à l'aide du lecteur de plaque Envision pendant 12 secondes. Les résultats de luminescence sont normalisés par les valeurs de densité optique déterminées pour la β-galactosidase.

### Conclusion :

E2F1 lie la poche hydrophobe du domaine BIR3 de cIAP1. La ou les régions d'E2F1 permettant cette interaction reste(nt) à identifier. La région <sup>181</sup>AKKSKNH<sup>187</sup> du domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 est essentielle à son activité transcriptionnelle.

La première hélice alpha du domaine BIR3 de cIAP1 est nécessaire à l'interaction des protéines IBM et d'E2F1 avec la poche hydrophobe du BIR3. Ce domaine pourrait être important pour le maintien de la structure tertiaire de cette région.

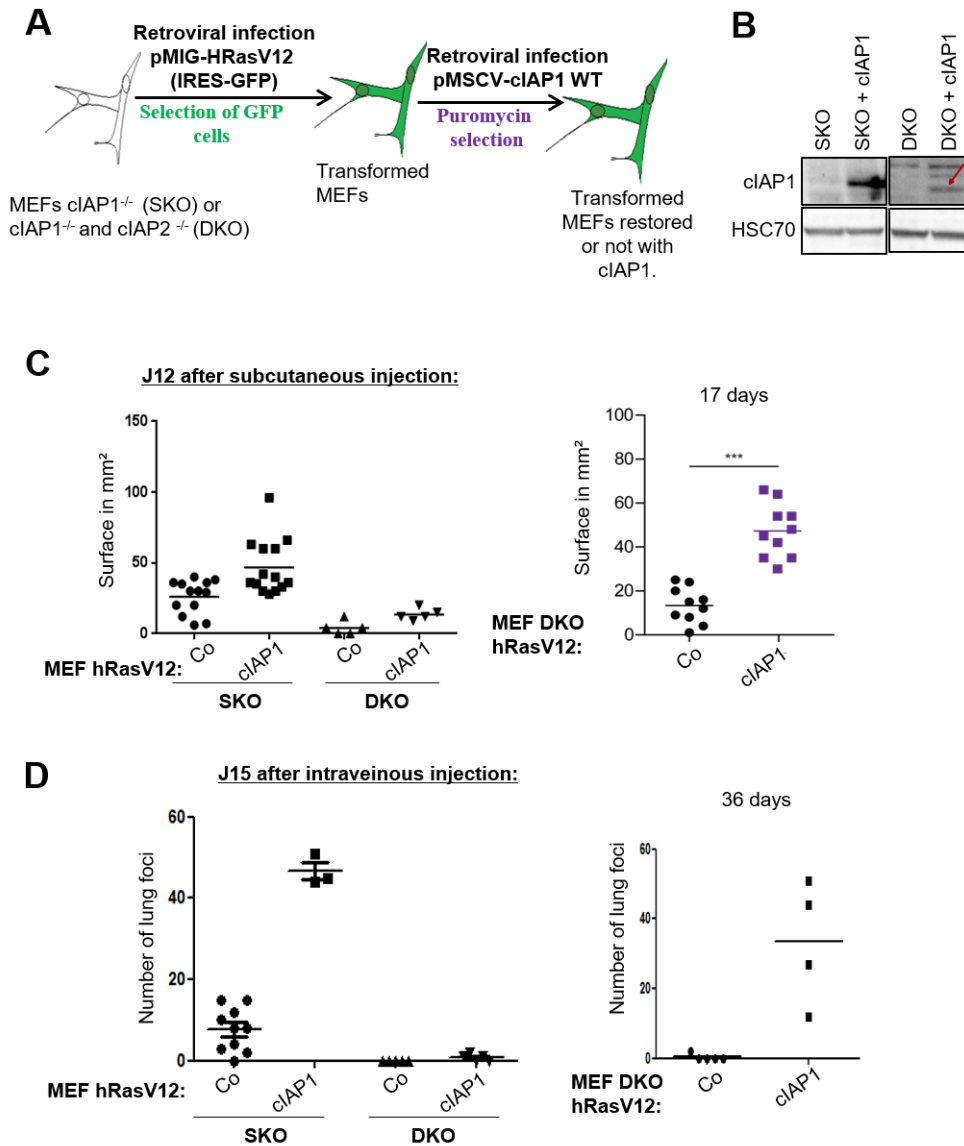
### 3) Etude des propriétés oncogéniques de cIAP1 :

➤ **cIAP1 stimule la croissance tumorale et la formation de métastases :**

cIAP1 est une protéine possédant des propriétés oncogéniques. Jean Berthelet a transformé des fibroblastes embryonnaires de souris cIAP1<sup>wt</sup> ou cIAP1<sup>-/-</sup> par l'oncogène H-Ras-V12 et analysé la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude. Les tumeurs cIAP1<sup>-/-</sup> ont une croissance ralentie par rapport aux tumeurs contrôles. Lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, l'absence de cIAP1 inhibe très significativement le développement de nodules pulmonaires cancéreux. Jean Berthelet a démontré que les cellules cIAP1<sup>-/-</sup> ont une capacité moindre à adhérer à un tapis de cellules endothéliales et à s'intercaler entre les cellules de ce tapis (Marivin et al., 2014).

Afin d'analyser les mécanismes de l'activité oncogénique de cIAP1, les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> (SKO) ont été restaurées par une infection rétrovirale avec la forme native de cIAP1. Afin d'éviter les problèmes de compensation entre cIAP1 et cIAP2, des MEF double KO (DKO : cIAP1<sup>-/-</sup> cIAP2<sup>-/-</sup>) ont aussi été utilisées (Figure n°37A et 37B).

La restauration de cIAP1 dans les lignées SKO ou DKO accélère la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude (Figure 37C) et la formation de nodules pulmonaires (figure 1D) avec un retard retrouvé lors de la perte combinée de cIAP1 et cIAP2. Ces résultats confirment les propriétés oncogéniques de cIAP1 dans ce modèle cellulaire.



**Figure 37: Analyse de l'impact de la restauration de clAP1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de clAP1 ou de clAP1 et clAP2.**

**A]** Modèle cellulaire.

**B]** Vérification de la restauration de clAP1 dans les lignées de fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en clAP1 (SKO) ou déficientes en clAP1 et clAP2 (DKO) par immuno-blotting.

**C][D]** Un million de cellules SKO ou DKO sont injectées par voie sous cutanée (C) ou par voie intraveineuse (D) chez la souris nude. La taille des tumeurs est évaluée à l'aide d'un pied à coulisse et le nombre de nodules pulmonaires quant à lui est déterminé après sacrifice des souris et récupération des poumons.

➤ **Le domaine BIR1 de clAP1 semble important pour les propriétés oncogéniques de clAP1 :**

Nous avons ensuite voulu analyser les mécanismes de l'activité oncogénique de clAP1 par la restauration de différents mutants de clAP1 incapables de lier un ou plusieurs partenaires spécifiques.

Les mutants ci-dessous ont été utilisés :

- L47A : mutation du site d'interaction avec d'adaptateur TRAF2, partenaire historique de cIAP1 (II)2 b)).
- H588A : mutant de cIAP1 dépourvu d'activité E3 ubiquitine ligase (Chapitre IV)1)).
- $\Delta\alpha$ 1BIR3 : mutant de cIAP1 incapable de lier E2F1, les caspases et smac (Chapitre IV)2)) mais conservant sa capacité à lier TRAF2, RIP1 (Figure n°34A).
- cIAP1 $\Delta$ BIR1 : mutant de cIAP1 dépourvu du domaine BIR1. Ce mutant n'est plus capable de lier TRAF2. Il conserve son interaction avec les autres partenaires notamment les caspases et Smac.
- cIAP1 $\Delta$ BIR2 : mutant de cIAP1 dépourvu du domaine BIR2. Ce mutant est incapable de lier la protéine cdc42, une petite protéine G de la famille des RhoGTPases contrôlant les modifications du cytosquelette d'actine (Marivin et al., 2014).

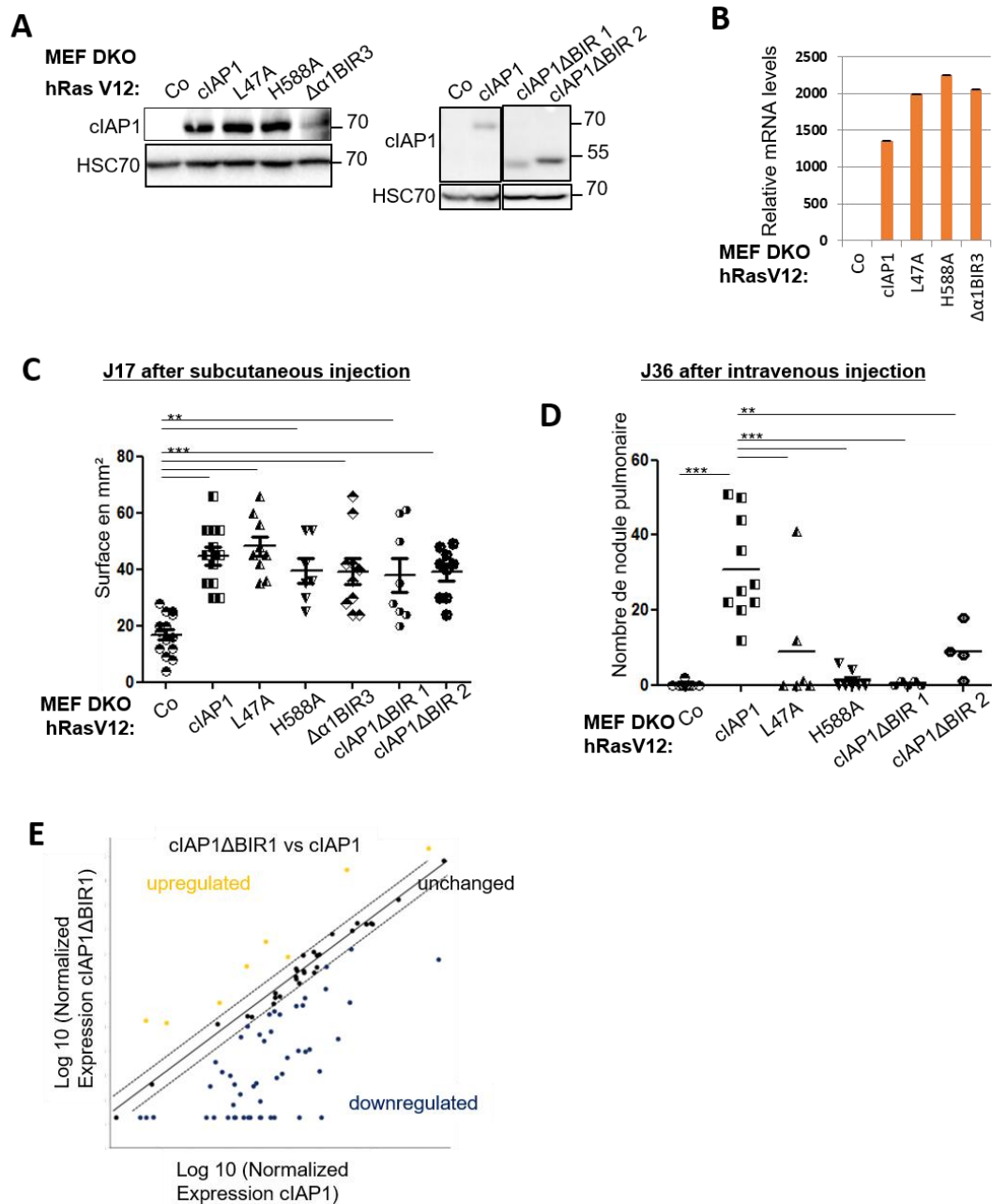
Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression stable des mutants dans les lignées générées. Les mutants L47A, H588A,  $\Delta$ BIR1 et  $\Delta$ BIR2 sont exprimés avec un niveau équivalent à la protéine cIAP1 native. Par contre, le mutant  $\Delta\alpha$ 1BIR3 est faiblement exprimé (Figure n°38A). Nous avons réitéré les infections plusieurs fois, sous-cloné la construction en suspectant une mutation lors de la mutagénèse dirigée dans des régions du vecteur permettant l'intégration virale sans amélioration. Le taux d'ARN messager  $\Delta\alpha$ 1BIR3 semble équivalent aux autres constructions (Figure n°38B) suggérant une instabilité de la protéine exprimée après infection virale.

Un million de cellules a été injecté chez la souris nude par voie sous cutanée ou par voie intraveineuse. cIAP1 et ses différents mutants stimulent la formation de tumeurs sous-cutanées de façon plus au moins équivalente (Figure n°38C). Ces expériences ont été reconduites par Baptiste Dumetier lors de son stage M2R en injectant 250 000 cellules au lieu d'un million. Dans ces conditions, les mutants cIAP1 $\Delta$ BIR1 et L47A, incapables de lier TRAF2, sont moins efficaces que cIAP1 pour stimuler la croissance tumorale.

Suite à une injection par voie intraveineuse des cellules, tous les mutants testés présentent une capacité moindre à former des nodules pulmonaires par rapport à cIAP1. La délétion du domaine BIR1 est suffisant pour abolir complètement la capacité de cIAP1 à induire la formation de nodules cancéreux pulmonaires (Figure n°38D). Cette expérience a ensuite été confirmée par Baptiste Dumetier dans deux expériences indépendantes.

Nous avons comparé par un « RT-qPCR array » l'expression de cibles du promoteur NF- $\kappa$ B (permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la survie cellulaire) dans la lignée exprimant cIAP1 sauvage *versus* celle exprimant le mutant cIAP1 $\Delta$ BIR1.

Cette dernière lignée possède de nombreux gènes régulés négativement par rapport à ceux de la lignée cIAP1 (Figure n°38E).



**Figure 38: Impact de la restauration de mutants de cIAP1 sur la croissance tumorale et la formation de nodules pulmonaires**

**A]** Vérification de la restauration des mutants de cIAP1 dans les lignées embryonnaires de fibroblastes de souris déficientes en cIAP1 et cIAP2 (DKO) par immuno-blotting.

**B]** Analyse par qPCR du taux d'ARN messager de cIAP1 ou de ces mutants dans les lignées restaurées avec cIAP1 ou l'un de ses mutants.

**C][D]** Un million de cellules DKO restaurées sont injectées par voie sous cutanée (C) ou par voie intraveineuse (D). La taille des tumeurs est évaluée à l'aide d'un pied à coulisse et le nombre de nodules pulmonaires quant à lui est déterminé après sacrifice des souris et récupération des poumons.

**E]** Analyse de l'activation de gènes cibles du promoteur NF-kB dans les lignées de fibroblastes embryonnaires cIAP1<sup>-/-</sup> cIAP2<sup>-/-</sup> restaurées avec cIAP1 versus celle restaurée avec cIAP1ΔBIR1 par qPCR (utilisation d'un « array » de chez Qiagen).

Jaune = gènes surexprimés dans la lignée cIAP1 ΔBIR1 ; noir = expression identique des gènes des deux lignées ; bleu = gènes sous-exprimés dans la lignée cIAP1 ΔBIR1.

## **Conclusion :**

Nous avons mis en place un modèle cellulaire permettant l'analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 dans une condition d'expression de l'oncogène H-Ras-V12. Nous n'avons pas réussi à déterminer l'importance de la coopération cIAP1-E2F1 dans cette activité. Cependant, j'ai montré l'importance du domaine BIR1 de cIAP1 qui permet son interaction avec l'adaptateur moléculaire TRAF2.

Une étude plus approfondie de l'importance du domaine BIR1 et du partenaire TRAF2 dans l'activité oncogénique de cIAP1 constitue le sujet de thèse de Baptiste Dumetier.

# DISCUSSION



## V] Discussion :

clAP1 est une protéine présentant une double localisation subcellulaire. Elle est exprimée dans le cytoplasme des cellules immunitaires comme les monocytes et les macrophages et dans des cellules épithéliales en phase terminale de différenciation (Plenchette et al., 2004). Par contre, cette protéine est retrouvée dans le noyau des cellules souches hématopoïétiques, des cellules épithéliales peu différenciées de la peau et du colon et dans certaines lignées de cellules cancéreuses. A ce jour les fonctions cytoplasmiques de clAP1 sont très bien décrites, notamment son rôle au sein de la signalisation du TNF- $\alpha$ . A l'inverse ces fonctions nucléaires restent peu décrites, mon équipe d'accueil a montré en 2011 la capacité de clAP1 à interagir et à moduler l'activité du facteur de transcription E2F1 (Cartier et al., 2011). Cette activité n'a été détectée que dans les cellules présentant un clAP1 nucléaire. De façon intéressante, une interaction d'E2F1 avec un autre membre de la famille IAP a été rapportée récemment (Cao et al., 2014). La délétion du domaine RING de XIAP induit sa localisation dans le compartiment nucléaire, où il s'associe au facteur de transcription. Ce travail confirme la capacité des IAP à lier E2F1 dans le noyau.

Notre équipe s'est par conséquent intéressée au rôle de clAP1 sur la régulation d'E2F1 et a voulu déterminer l'importance de cette relation dans la carcinogénèse.

Le facteur de transcription E2F1 contrôle l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ce facteur possède aussi un rôle dans l'apoptose et dans la réponse à l'endommagement de l'ADN en contrôlant la transcription de gènes clés de ces processus cellulaires. Une activité non transcriptionnelle de E2F1 dans la régulation de l'apoptose a aussi été décrite (Biswas and Johnson, 2012; Garcia-Garcia et al., 2012; Hao et al., 2012).

### **1) Régulation d'E2F1 par clAP1 :**

Nous avons montré la capacité de clAP1 à stabiliser E2F1. Ce facteur de transcription E2F1 contrôle l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Il possède aussi un rôle dans l'apoptose et dans la réponse des cellules aux dommages à l'ADN. Cette activité est étroitement liée à son niveau d'expression. En effet, un pic d'expression d'E2F1 est observé en phase S du cycle cellulaire et suite à une lésion de l'ADN. Une déplétion de clAP1 inhibe la stabilisation d'E2F1 dans les deux situations, montrant un rôle capital de clAP1. L'augmentation d'expression d'E2F1 est liée, pour une part importante à une stabilisation de la protéine (pour revue (Pützer and Engelmann, 2013)).

La stabilisation d'E2F1 peut passer par différents processus : elle peut être due à une simple liaison avec une protéine partenaire telle que la protéine Rb (Martelli and Livingston, 1999) ou encore la protéine MDM2 (Zhang et al., 2005), ou elle peut être associée à des modifications post-traductionnelles.

L'interaction entre cIAP1 et E2F1 est essentielle pour la stabilisation d'E2F1 puisque le mutant cIAP1 $\Delta\alpha$ 1BIR3, incapable d'interagir avec E2F1 perd sa capacité à le stabiliser. Cependant, elle est insuffisante. En effet, le mutant F616A qui conserve son habilité à lier E2F1 est incapable de le stabiliser. La Phénylalanine 616 est le site de dimérisation de cIAP1, nécessaire à son activité E3-ubiquitine ligase (Feltham et al., 2011). Par ailleurs, une inhibition de la réaction d'ubiquitylation bloque aussi la capacité de cIAP1 à stabiliser le facteur de transcription. La stabilisation d'E2F1 par cIAP1 nécessite donc une interaction avec cIAP1 combinée avec une ubiquitylation de ce facteur par cIAP1.

La stabilisation d'E2F1 pourrait s'expliquer par l'effet protecteur de cIAP1 vis à vis de l'action d'enzymes permettant la dégradation d'E2F1. E2F1 est dégradé en fin de phase S par une ubiquitylation par le complexe SCF<sup>skp2</sup> suivit d'une dégradation par le protéasome. En pro-métaphase, E2F1 est dégradé suite à une ubiquitylation par le complexe APC<sup>cdh1</sup>. Nous montrons qu'une perte de l'expression de cIAP1 par l'ajout d'un ARN interférant ciblant cIAP1, favorise la dégradation d'E2F1 par SCF<sup>skp2</sup> et APC<sup>cdh1</sup>. La protection d'E2F1 contre l'action du complexe SCF<sup>skp2</sup> est observée en phase S du cycle cellulaire par la liaison de la protéine MDM2 (Zhang et al., 2005). cIAP1 pourrait aussi avoir cet effet protecteur. E2F1 peut aussi être dégradé par le protéasome suite à la conjugaison d'un signal NEDD8. Dans un article publié en 2012, Loftus *et al.* montre que la neddylation d'E2F1 sur les lysines 117, 120 et 125 conduit à la dégradation de la protéine.

Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

1) Tout comme MDM2 qui protège E2F1 en empêchant la liaison du complexe SCF<sup>skp2</sup>, cIAP1 ou les chaînes d'ubiquitines K63 greffées par cIAP1 pourraient bloquer l'interaction d'E2F1 avec les autres E3-ubiquitine ou NEDD8-ligase. Les sites d'interaction d'E2F1 avec SCF<sup>skp2</sup> sont localisés dans la partie N-terminale (41 premiers acides aminés) (Marti et al., 1999), avec APC<sup>cdh1</sup> dans la partie C-terminale (acides aminés 359 à 437) (Budhavarapu et al., 2012). La NEDD8-ligase n'est pas connue à ce jour. Les sites d'interaction avec cIAP1 ne sont pas clairement définis (voir 2<sup>ème</sup> partie de la discussion) mais semblent impliquer une région contenant le domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 89-191) (Cartier et al., 2011). Ces sites d'interaction semblent très éloignés, cependant, ils pourraient être plus rapprochés si l'on tient compte de la structure quaternaire de la protéine. cIAP1 pourrait aussi gêner la liaison des autres E3-ligases indirectement via le recrutement de protéines inhibitrices.

Il est possible que les chaînes d'ubiquitines K63 puissent être reconnues par des protéines possédant un domaine de liaison de l'ubiquitine comme les domaines UBA ou UBD.

2) La fixation de cIAP1 sur E2F1 ou l'ubiquitinylation K63 des lysines 161 et 164 provoquerait un changement de conformation d'E2F1 masquant les sites de fixation des autres E3-ligases, d'ubiquitinylation ou de Neddylation. De façon intéressante, le mutant K161/K164 possède un profil de neddylation très important par rapport à la protéine sauvage (Loftus et al., 2012). De plus, nous avons montré que ce mutant présente aussi un très fort niveau basal d'ubiquitinylation totale. Enfin la surexpression de cIAP1 diminue le profil d'ubiquitinylation de type K48 d'E2F1 (Figure n°26C). L'ensemble de ces observations pourraient suggérer que l'ubiquitinylation des lysines 161 et 164 par cIAP1 pourrait protéger la protéine contre ces autres modifications.

3) cIAP1 et les complexes SCF<sup>skp2</sup> et APC<sup>cdh1</sup> ubiquityleraient le même site provoquant une compétition entre l'ubiquitinylation dégradative de ces deux complexes et l'ubiquitinylation stabilisatrice de cIAP1. Les sites ubiquitinylation par SCF<sup>skp2</sup> et APC<sup>cdh1</sup> n'ont pas été identifiés. Il serait intéressant de rechercher la capacité de APC<sup>cdh1</sup> et SCF<sup>skp2</sup> à ubiquityler le mutant E2F1 K161/164.

Nous avons montré que cIAP1 stabilise les formes ubiquitylées de type K11 et K63 d'E2F1. Dans la version révisée de l'article, nous montrons que cIAP1 est capable de conjuguer des chaînes d'ubiquitines de type K48, K11 et K63 mais uniquement capable de stabiliser les formes ubiquitylées K11 et K63 d'E2F1. Les chaînes K48 sont des signaux de reconnaissance par le protéasome. A ma connaissance, l'ubiquitinylation de type K48 d'E2F1 n'a pas été décrite. Le type d'ubiquitinylation par SCF<sup>skp2</sup> n'a pas été étudié. Dans la mesure où SCF<sup>skp2</sup> induit une dégradation d'E2F1, il est possible que cette E3-ligase conjugue des chaînes de type K48. J'ai recherché cette ubiquitinylation au cours de ma thèse mais je n'ai pas réussi à la mettre en évidence. APC<sup>cdh1</sup> est connu pour induire une ubiquitinylation de type K11 conduisant à la dégradation de la protéine (Budhavarapu et al., 2012). Notre travail montre que l'ubiquitinylation K11 d'E2F1 peut aussi être non dégradative. L'ubiquitinylation K63 est plutôt associée à un signal non protéolytique impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans la régulation transcriptionnelle, dans l'endocytose ou encore dans l'activation de protéines kinases (pour revue : (Woelk et al., 2007)) ce qui concorde avec nos résultats.

Nous ne pouvons pas exclure la présence de chaînes d'ubiquitines mixtes ou branchées. En effet, une étude récente montre une coopération surprenante entre l'ubiquitinylation de type K48 avec l'ubiquitinylation de type K63.

Cette coopération permet de protéger l'ubiquitinylation de type K63 de l'action des déubiquitinases et favorise l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Ohtake et al., 2016).

Le complexe E3-ligase APC est capable de former des chaînes branchées K11/K48 conduisant à la dégradation de la protéine (Meyer and Rape, 2014).

Deux travaux récents montrent une ubiquitinylation de type K63 d'E2F1 (Mahanic et al., 2015; Wang et al., 2015). Les E3-ligases n'ont pas été identifiées. L'article de Wang *et al.* montre qu'une déubiquitinase nommé POH1 stabilise E2F1 *via* sa capacité à enlever les chaînes d'ubiquitines de type K63 (Wang et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les chaînes K63 puissent donc être un signal dégradatif ce qui n'est pas en accord avec nos connaissances sur l'ubiquitinylation de type K63. L'article de Mahanic *et al.* montre que la déubiquitinase UCH37 enlève les chaînes d'ubiquitines de type K63 d'E2F1 ce qui stimule son activité transcriptionnelle sur ces gènes cibles prolifératifs (*ccnE*, *Cdc6*, *thymidine kinase*, *TopBP1*) et pro-apoptotiques (*caspase 3*, *p73* et *Apaf1*) (Mahanic et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'ubiquitinylation de type K63 pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle d'E2F1. Ceci est en opposition avec nos résultats puisque nous montrons d'une part que les lysines 161/164 sont indispensables à l'activité transcriptionnelle d'E2F1 et à sa capacité à lier les promoteurs des gènes cibles *ccne*, *tp73* et *apaf1*. En accord avec ces résultats, mon équipe d'accueil avait précédemment montré que cIAP1 était nécessaire au recrutement de E2F1 sur ces promoteurs (Cartier et al., 2011). Dans la version révisée de l'article, nous avons élargi cette observation par une analyse globale du recrutement d'E2F1 sur la chromatine par *ChIP-seq* et nous montrons que la déplétion de cIAP1 diminue considérablement la capacité d'E2F1 à lier la chromatine (Supplementary Figure 3, article en annexe). L'ensemble de ces résultats suggèrent le rôle très important de cIAP1 et de l'ubiquitinylation des lysine 161/164 dans la liaison d'E2F1 sur les promoteurs des gènes cibles.

Il serait intéressant de rechercher la capacité de POH1 et UCH37 à enlever les chaînes K63 greffées par cIAP1.

Les différents types de modifications (ubiquitinylations K11, K48, K63 et neddylation) observées peuvent intervenir à des moments différents du cycle cellulaire. Nous avons montré qu'une ubiquitinylation K63 d'E2F1 par cIAP1 en phase S du cycle cellulaire au moment où l'activité d'E2F1 est maximale. L'ubiquitinylation dégradative par SCF<sup>skp2</sup> a lieu en fin de phase S, stimulée par la liaison et la phosphorylation d'E2F1 par le complexe cyclineA/cdk2. Comme précédemment évoquée, nous pouvons supposer que l'ubiquitinylation K63 par cIAP1 inhibe le recrutement ou l'activité de SCF<sup>skp2</sup>. L'action d'une déubiquitinase permettant d'enlever les chaînes K63 pourrait être nécessaire pour permettre la progression des cellules en phase G2. De la même façon, un signal activateur de cIAP1 en début de phase S semble nécessaire.

Mon équipe d'accueil a précédemment montré que cIAP1 liait E2F1 durant toutes les phases du cycle cellulaire (Cartier et al., 2011) mais il semble que l'ubiquitinylation se fasse principalement en phase S.

En début de phase S, E2F1 est activé suite à la phosphorylation et libération de Rb (Fagan et al., 1994). Rb ne semble pas moduler la capacité de cIAP1 à induire une ubiquitinylation d'E2F1. Par contre, cIAP1 semble faciliter la dissociation Rb-E2F1.

De nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent moduler la stabilité d'E2F1. Ceci a essentiellement été démontré lors de la stabilisation d'E2F1 suite à des lésions de l'ADN. En effet, un endommagement de l'ADN peut conduire à la phosphorylation des sérines 31 (Lin et al., 2001), 332 et 337 (Fagan et al., 1994), 364 (Stevens et al., 2003), 403 (Real et al., 2010) ; la déméthylation des arginines 111 et 113 (Cho et al., 2012) et la méthylation de l'Arginine 109 (Zheng et al., 2013); l'acétylation des lysines 117, 120 et 125 (Martínez-Balbás et al., 2000; Pediconi et al., 2009; Pillai et al., 2010).

Une inhibition des méthyl-transférases PRMT1 et PRMT5 permettant respectivement la méthylation des arginine 109 après un endommagement de l'ADN et des Arginines 111 et 113 en phase S (Cho et al., 2012; Zheng et al., 2013) bloque l'ubiquitinylation par cIAP1. Une étape de méthylation semble donc essentielle. Par contre, l'ubiquitinylation d'E2F1 par cIAP1 semble indépendante de l'acétylation des lysines 117, 120 et 125 puisque la mutation de ces lysines ne module pas la capacité de cIAP1 à stimuler l'activité de E2F1 (Figure n°26F).

Il serait intéressant d'étudier l'impact de la phosphorylation, mais aussi des autres modifications post-traductionnelles comme la sumoylation et la citrullination.

Ces différents résultats montrent une régulation d'E2F1 par cIAP1 via un mécanisme d'ubiquitinylation. Il pourrait être intéressant d'analyser l'effet d'inhibiteurs des IAP et notamment de cIAP1 dans des échantillons tumoraux possédant un niveau protéique d'E2F1 excessif.

## **2) Détermination des sites importants pour l'interaction entre cIAP1 et E2F1 :**

cIAP1 possède différents domaines d'interaction protéine-protéine. Les substrats d'ubiquitinylation des IAP interagissent via les domaines BIR. Lors de la première étude menée par mon équipe d'accueil sur l'interaction entre cIAP1 et E2F1, Jessy Cartier a montré l'importance des domaines BIRs de cIAP1 pour son interaction avec E2F1 (Cartier et al., 2011). En accord avec ces données nous montrons une interaction de cIAP1 avec E2F1 via son domaine BIR3.

Le domaine BIR3 de cIAP1 est un domaine BIR de type II c'est-à-dire qu'il possède une poche hydrophobe (Gyrd-Hansen and Meier, 2010). La délétion de régions du domaine BIR3 essentielles à la formation de la poche hydrophobe entraîne une perte de la capacité de cIAP1 à interagir avec E2F1.

La protéine Smac ainsi que les caspases 7 et 9 lient ce domaine BIR3 via un motif nommé IBM (Eckelman and Salvesen, 2006; Vaux and Silke, 2005). L'ajout d'un *Smac mimetic* (structure basée sur la séquence de l'inhibiteur endogène des IAP nommé Smac) et de l'heptapeptide correspondant à l'IBM de Smac entraîne une diminution de l'interaction entre E2F1 et cIAP1 de manière dose dépendante. Ces résultats montrent qu'E2F1 lie la poche hydrophobe du domaine BIR3. Le domaine BIR2 de cIAP1 possède aussi une poche hydrophobe d'interaction présentant de grande similitude avec la poche BIR3. La délétion du domaine BIR3 n'abolie pas complètement l'interaction de cIAP1 avec E2F1 suggérant qu'E2F1 puisse aussi lier, avec une affinité moindre le domaine BIR2.

De manière surprenante, la délétion de la région QTHAARMRTFMY correspond à la première hélice alpha du domaine BIR3 mais extérieure à la poche hydrophobe d'interaction empêche l'interaction entre cIAP1 et E2F1. En accord avec les résultats attendus, la délétion de l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 de cIAP1 entraîne une perte de l'ubiquitylation et de la stabilisation d'E2F1 ainsi qu'une perte de la stimulation de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de la cycline E. La perte de cette région empêche aussi l'interaction de cIAP1 avec la caspase 7 et Smac connus pour lier la poche hydrophobe du BIR3 mais ne module pas la liaison de TRAF2 et RIP1 qui lient les domaines BIR1 et BIR2. L'hélice alpha 1 du domaine BIR3 de cIAP1 semble essentielle au maintien de la structure de la poche hydrophobe. Une étude sur l'interaction entre Smac et le domaine BIR3 de XIAP mentionne que l'hélice alpha 1 de ce domaine possède un site de liaison avec la protéine Smac. Cependant, l'interface créée entre l'hélice alpha1 et Smac aurait un rôle mineur dans l'interaction XIAP-Smac (Wu et al., 2000). Contrairement à ces données, le maintien de l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 de cIAP1 semble indispensable. De manière intéressant un mutant de cIAP1 dépourvu de cette hélice est résistant à la dégradation induite par des *Smac-mimetics*.

Le domaine BIR3 reconnaît des séquences consensus spécifiques appelés IBM (*IAP Binding motif*) capables de s'ancrer dans la poche hydrophobe. Il existe des IBM qualifiés d'IBM conventionnels et des IBM qualifiés d'IBM non conventionnels (Kurakin and Bredesen, 2007; Vaux and Silke, 2005).

Les IBM conventionnels doivent être exposés en position N-terminale pour pouvoir s'ancrer dans la poche hydrophobe. L'extrémité N-terminale d'E2F1 possède des ressemblances avec un IBM : M-A-L-A-G.

Cette séquence pourrait tout à fait correspondre à un IBM. Tout comme NIK (Lee et al., 2014), une aminopeptidase permettrait d'exposer l'IBM d'E2F1 qui se lierait alors à la poche hydrophobe du domaine BIR3 de cIAP1.

Le mutant 3HA-E2F1 (ne possède plus les résidus méthionine et alanine et possède une étiquette 3HA empêchant l'exposition N-terminale de l'IBM) conserve sa capacité à lier cIAP1. Ce résultat suggère que la région N-terminale d'E2F1 n'est pas un IBM.

Dans l'étude précédente (Cartier et al., 2011), des expériences d'interaction par GST-pull-down montrent une interaction de cIAP1 avec la région 89-181 contenant le « *DNA binding domain* » d'E2F1. La recherche de séquences se rapprochant d'IBM connus a identifié la séquence <sup>181</sup>AKKSKNH<sup>187</sup>. Isolée, cette séquence est capable d'inhiber l'interaction cIAP1-E2F1 suggérant qu'elle est capable de s'ancrer dans la poche du BIR3. Cependant, la délétion de cette séquence n'empêche malheureusement pas la capacité d'E2F1 à lier cIAP1. Ce motif a une structure proche d'un motif IBM conventionnel qui nécessite une exposition en position N-terminale. Or, il est situé à l'intérieur de la séquence E2F1 et cIAP1 lie la protéine native et non un fragment de clivage. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'E2F1 ne posséderait pas d'IBM conventionnel.

La séquence du domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 pourrait contenir un IBM non conventionnel qui ne nécessite pas une exposition en position N-terminale. Une protéine pro-apoptotique nommée ARTS (*Apoptosis Related protein in the TGF-β Signalling pathway*) lie le domaine BIR3 de XIAP grâce à un motif (QEHQGQGCH) ne ressemblant ni à un motif IBM conventionnel (A(KTVI)(PAE)(FEISY)) ni à un motif non conventionnel (SR(VP)W) (Bornstein et al., 2011; Edison et al., 2012). Il est donc envisageable qu'E2F1 lie le domaine BIR3 de cIAP1 via un nouveau type de motif ressemblant à celui retrouvé chez ARTS. L'alignement par ClustalW2 entre le motif de la protéine ARTS et le domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 identifie une séquence possédant de grande homologie : HPGKG (Figure n°39). Il serait intéressant de déterminer si la délétion de cette région abolit la liaison entre E2F1 et cIAP1.



**Figure 39 : Alignement de la séquence du domaine de liaison à l'ADN d'E2F1 et du motif de liaison du domaine BIR3 de XIAP présent chez ARTS**

Les séquences correspondant aux peptides synthétisés au cours de ma thèse sont encadrées en vert.

La séquence possédant une forte homologie (|) avec la séquence de ARTS essentielle à l'interaction avec XIAP est surlignée en bleu.

Un point représente une faible homologie et les deux points une grande homologie entre les acides aminés.

Curieusement La délétion de la séquence <sup>181</sup>AKKSKNH<sup>187</sup> (E2F1ΔIBM) abolie aussi l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur la cycline E. Ce mutant lie toujours cIAP1 et DP1 mais ne possède plus d'activité transcriptionnelle : cette région est sûrement essentielle pour la liaison d'E2F1 sur l'ADN tout comme l'arginine 166 d'E2F1 dont la mutation abolie sa capacité à lier l'ADN (Yu et al., 2011). De plus, la lysine 182 (conservée entre les différents membres de la famille E2F) lie l'ADN (Martínez-Balbás et al., 2000). Sa délétion ne peut pas à elle seule entrainer un défaut de liaison à l'ADN empêchant notre mutant d'exercer son activité transcriptionnelle sur les gènes cibles d'E2F1 puisque nous montrons que le mutant E2F1 K182/183 possède une activité transcriptionnelle sur le promoteur de la cycline E quasiment identique à la protéine sauvage lors de la surexpression de cIAP1. La mutation de la lysine 185 quant à elle semble favoriser l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de la cycline E bien que son activité ne soit plus stimuler par la surexpression de cIAP1. Pour finir, l'asparagine (N) 186 est elle aussi connue pour être importante pour la liaison d'E2F1 avec l'ADN (Zheng et al., 1999).

La délétion de la lysine 182 combinée à l'asparagine 186 est peut-être suffisante pour empêcher la liaison d'E2F1 sur l'ADN.

Des expériences complémentaires devront être réalisées afin d'identifier la séquence puis le ou les acide(s) aminé(s) d'E2F1 impliqué(s) dans l'interaction avec cIAP1. Notre approche de peptides compétiteurs n'ayant mené à aucun résultat positif, il serait peut-être judicieux de revenir à un système de délétion ou de mutation de séquences d'E2F1.

Nous pourrions fragmenter le domaine de liaison à l'ADN d'E2F1, ainsi que la partie N-terminale d'E2F1 et regarder quelles régions de ce domaine conservent leur capacité à lier cIAP1. Enfin nous pourrions affiner notre recherche par mutagenèse des différents acides aminés contenus dans la région d'intérêt identifiée.

D'après ces différentes données, la conformation de cIAP1 pour la liaison avec E2F1 est très importante, la poche hydrophobe du domaine BIR3 doit être intacte afin de garantir l'interaction entre E2F1 et cIAP1. Le mutant de cIAP1 n'interagissant plus avec cIAP1 (cIAP1Δα1BIR3) semble toujours capable de dimériser puisqu'il conserve son activité E3 ubiquitine ligase. Il serait intéressant d'étudier plus précisément la conformation adoptée par cIAP1 lors de son interaction avec E2F1 à l'aide, d'une part de logiciel informatique et d'autre part par cristallographie.

Même si nous n'avons pas clairement démontré les mécanismes d'interaction, nous possédons aujourd'hui un mutant de cIAP1 incapable de lier E2F1, les caspases et smac et de plus résistant à l'action des *Smac mimetics* et un mutant d'E2F1 incapable de lier l'ADN. Ces mutants seront des outils importants pour l'étude fonctionnelle de ces 2 protéines.



### 3) Etude des propriétés oncogéniques de cIAP1 :

cIAP1 a été décrit comme une protéine possédant des propriétés oncogéniques chez la souris pour la première fois en 2006 : associée à une délétion de p53, une amplification des gènes codant cIAP1, cIAP2 et YAP (amplicon 9A1) est responsable du développement d'hépatocarcinome chez la souris (Zender et al., 2006). La diminution de cIAP1 par action d'un ARN interférent inhibe la croissance tumorale dans ce même modèle. La présence de cet amplicon promoteur de tumeurs a ensuite été confirmée chez la souris dans des modèles d'ostéosarcomes et de tumeurs mammaires (Cheng et al., 2010; Ma et al., 2009). Chez l'homme la présence d'une amplification chromosomique équivalente (11q22) contenant les mêmes gènes a été détectée dans différents modèles tumoraux. Une surexpression de cIAP1 indépendamment de cet amplicon a aussi été observée (Bashyam et al., 2005; Che et al., 2012; Cheng et al., 2010; Dai et al., 2003; Ferreira et al., 2001; Grzybowska-Izydorczyk et al., 2010; Imoto et al., 2002; Imoto et al., 2001; Krajewska et al., 2003; Liu et al., 2001; Ma et al., 2009; Ponnelle et al., 2003; Qi et al., 2008; Reardon et al., 1997; Silva et al., 2006; Snijders et al., 2005; Tanimoto et al., 2005; Vallat et al., 2003; Zender et al., 2006). Malgré un grand nombre d'études présentant la surexpression de cIAP1 dans les cancers, la fonction de cIAP1 responsable de son oncogénicité n'est pas clairement identifiée. En effet, cIAP1 possède de nombreuses fonctions et peut agir sur divers processus biologiques qui pourraient chacun être responsable de son oncogénicité : cIAP1 intervient dans l'inhibition de l'apoptose, dans la réponse inflammatoire, dans l'immunité, dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Dupoux et al., 2009; Kearney et al., 2013). L'altération de chacune de ces voies pourrait conduire à la stimulation de la croissance tumorale. De façon intéressante, la localisation nucléaire de cIAP1 a été corrélée avec un mauvais pronostic et/ou une mauvaise réponse aux traitements thérapeutiques dans le cancer de l'œsophage (Imoto et al., 2001), dans le cancer de la vessie (Che et al., 2012), le cancer du col de l'utérus (Imoto et al., 2002), le cancer colorectal (Ponnelle et al., 2003), le cancer de la tête et du cou (Tanimoto et al., 2005), le cancer de la langue (Qi et al., 2008). Ceci suggère que l'activité nucléaire de cIAP1 pourrait être importante à son activité oncogénique.

Afin d'approfondir les mécanismes de l'activité oncogénique de cIAP1, un modèle d'étude a été mis en place. Des fibroblastes de souris ont été transformés par l'oncogène H-Ras-V12. L'injection de ces cellules chez la souris nude induit une tumeur sous-cutanée dans un modèle de xénogreffe ou la formation de nodules pulmonaires lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse. L'absence de cIAP1 ralentit le développement tumoral. Cet effet est amplifié avec des cellules dépourvues de cIAP1 et de cIAP2. Ce retard concorde avec l'effet de compensation existant entre cIAP1 et cIAP2 (Mahoney et al., 2008). La restauration de cIAP1 accélère considérablement la croissance tumorale.

Ce modèle devrait donc permettre d'analyser l'importance des différentes fonctions de cIAP1 en exprimant des mutants de cIAP1 ayant perdus l'une ou l'autres de ces fonctions.

Nous avons exprimé dans ces cellules notre mutant cIAP1 $\Delta\alpha$ 1BIR3 incapable de lier E2F1. La qualité de l'expression de notre mutant dans les lignées cIAP1<sup>-/-</sup>cIAP2<sup>-/-</sup> ou cIAP1<sup>-/-</sup> n'étant pas acceptable, nos résultats restent difficilement interprétables. Le niveau d'expression faible de notre mutant peut s'expliquer par un mauvais repliement de la protéine qui sera alors dégradée par cellule. Nous avons vu précédemment que la délétion de l'hélice alpha 1 du domaine BIR3 altère la poche hydrophobe et donc la conformation initiale de cIAP1, cette mauvaise conformation serait détectée par la cellule qui cherchera à éliminer cette protéine mal repliée. Ces différentes questions restent en suspens et méritent d'être résolues.

En effet, l'interaction entre E2F1 et cIAP1 pourrait avoir un rôle crucial pour les propriétés oncogéniques de cIAP1. Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe une corrélation entre l'agressivité de la tumeur et l'expression nucléaire de cIAP1 dans différents modèles tumoraux.

L'équipe du Dr Nikitin a mis au point un modèle mammaire dans le but de rechercher les anomalies génétiques associées au développement de tumeurs mammaires chez la souris (Cheng et al., 2010). La délétion de Rb seule est insuffisante pour induire le développement tumoral. Les auteurs montrent que deux anomalies sont nécessaires : soit une délétion combinée de Rb et p53, soit la délétion de p53 et la présence de l'amplicon 9A1 contenant le gène cIAP1. Ces résultats non seulement confirment les propriétés oncogéniques de cIAP1, mais suggèrent que la surexpression de cIAP1 et la délétion de Rb pourraient avoir la même finalité. Les deux anomalies induisent une activation exacerbée d'E2F1. Ces observations pourraient suggérer que l'activation d'E2F1 par cIAP1 serait un mécanisme important impliqué dans l'activité oncogénique de cIAP1 dans les tumeurs mammaires. Tout comme l'expression de cIAP1, celle d'E2F1 est retrouvée amplifiée dans de nombreux cancers tels que le cancer de la vessie (Lee et al., 2010; Sharma et al., 2010), du sein (Han et al., 2003; Zacharatos et al., 2004; Zhang et al., 2000), du col de l'utérus (Narayan and Murty, 2010; Wilting et al., 2008), de l'œsophage (Ebihara et al., 2004; Fujita et al., 2003), du poumon non à petites cellules (Huang et al., 2007; Imai et al., 2004; Tonon et al., 2005) et à petites cellules (Eymin et al., 2001; Mega et al., 2005), ovarien (De Meyer et al., 2009; Reimer et al., 2006; Suh et al., 2008) mais aussi dans l'adénocarcinome gastrique (Suzuki et al., 1999; Yasui et al., 2000), l'hépatocarcinome (Midorikawa et al., 2007; Palaiologou et al., 2012), glioblastome (Alonso et al., 2005) et le mélanome (Mannava et al., 2012; Nelson et al., 2006). Il pourrait être intéressant de regarder si la surexpression d'E2F1 dans ces différents cancers est accompagnée d'une augmentation du niveau protéique de cIAP1.

En effet, une surexpression de cIAP1 et d'E2F1 a été identifiée indépendamment l'une de l'autre dans le cancer du sein (Cheng et al., 2010; Han et al., 2003 ; Zacharatos et al., 2004; Zhang et al., 2000), dans le cancer du col de l'utérus (Imoto et al., 2002; Narayan et al., 2010; Wilting et al., 2008), dans le glioblastome (Alonso et al., 2005)... Cette surexpression d'E2F1 peut être due à sa stabilisation par la protéine cIAP1 qui est retrouvée en grande quantité dans ces cancers.

Si une concordance entre l'expression de cIAP1 et d'E2F1 est retrouvée, il pourrait être judicieux de vérifier le profil d'ubiquitylation d'E2F1 dans ces échantillons tumoraux et d'étudier l'impact de l'ajout d'un *Smac mimetic* sur ces tumeurs. De plus, l'extinction du gène codant pour cIAP1 dans des lignées tumorales surexprimant E2F1 pourrait être une stratégie d'étude intéressante.

Une étude de 2003, montre une induction de la sénescence par l'inhibition des gènes cibles E2F via Rb (Narita et al., 2003). Un régulateur du cycle cellulaire nommé Ecd (*Ecdysoneless*) interagit avec la forme hypophosphorylée de Rb et permet la libération d'E2F1 du complexe Rb-E2F1. Cette libération d'E2F1 favorisera la progression cellulaire (Kim et al., 2009). De plus, ce régulateur coopère avec HRas pour favoriser la prolifération cellulaire dans des cellules hMEC transformées (Bele et al., 2015). D'autres études montrent un rôle d'E2F1 dans l'inhibition de l'induction de la sénescence des cellules. Par exemple, une équipe montra qu'une répression de l'expression d'E2F1 entraîne une diminution de l'expression de Lsh (répresseur de p16<sup>INK4a</sup> qui est une protéine essentielle dans l'activation de la sénescence d'une cellule). L'induction de Lsh par E2F1 retarde la sénescence (Niu et al., 2011). De plus, dans le cancer du poumon non à petites cellules, il a été montré qu'une E3 ubiquitine ligase nommée E6AP induit l'expression de p16<sup>INK4a</sup> indirectement par l'inhibition de l'expression d'E2F1 (Gamell et al., 2017). Ces différentes données montrent un rôle d'E2F1 dans le contournement de la sénescence des cellules. Il pourrait être intéressant de vérifier si la régulation d'E2F1 par cIAP1 a un quelconque rôle dans ce contournement d'autant que cIAP1 est connu pour favoriser la prolifération cellulaire.

Pour finir avec E2F1, des études montrent un effet anti-tumoral d'E2F1 lors d'un stress génotoxique. Par exemple, lors d'un traitement de cellules de mélanomes avec un agent thérapeutique tel que l'étoposide et l'adriamycine, l'induction de l'expression d'E2F1 par un vecteur adénoviral sensibilise les cellules à la mort par apoptose (Dong et al., 2002). Cet effet a été retrouvé lors d'un traitement à la doxorubicine de cellules de mélanome (Hao et al., 2006). Nous montrons que cIAP1 stabilise l'expression d'E2F1 sous stress génotoxique induit par l'étoposide. L'apoptose des cellules induite par E2F1 pourrait être permise grâce à la stabilisation induite par cIAP1.

Ceci resterait surprenant puisque cIAP1 est plutôt connu comme inhibiteur de l'apoptose et activateur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Or, il a été montré qu'après traitement des cellules de mélanome avec de la doxorubicine, le facteur NF- $\kappa$ B était inactivé (Hao et al., 2009).

Bien que nous n'ayons pas pu évaluer l'importance de la régulation d'E2F1 par cIAP1 pour les propriétés oncogéniques de cIAP1, nos résultats semblent indiquer un potentiel rôle du domaine BIR1 de cIAP1 et de son activité E3 ubiquitine ligase dans ses propriétés oncogéniques.

En effet, la stimulation de la formation de nodules pulmonaires par les mutants H588A et cIAP1 $\Delta$ BIR1 est fortement diminuée par rapport à cIAP1 tandis que les mutants L47A et cIAP1 $\Delta$ BIR2 stimulent la formation de nodules pulmonaires de manière moins importante que cIAP1. De plus, les mutants cIAP1 $\Delta$ BIR1 et L47A stimulent plus faiblement que cIAP1 la croissance tumorale après injection chez la souris nude.

Le domaine BIR1 de cIAP1 est important pour l'interaction avec TRAF2, partenaire de cIAP1 essentiel dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (voir chapitre II)2 b)). Une expression anormale de TRAF2 et une activation aberrante de NF- $\kappa$ B sont retrouvées dans plusieurs cancers. TRAF2 est retrouvé surexprimé dans le cancer du sein, dans la leucémie myéloïde aiguë, dans la maladie inflammatoire de l'intestin (Sun et al., 2014). De plus, la phosphorylation de la sérine 55 de TRAF2 stabilisant TRAF2 dans des cellules transformées avec Ras-V12 permet aux cellules d'échapper à la mort (Thomas et al., 2009). L'oncogénicité liée à TRAF2 peut être associée à une activation aberrante de la voie classique de NF- $\kappa$ B (Fingas et al., 2010; Jang et al., 2011; Thomas et al., 2009; Zhou et al., 2013). cIAP1 liée à TRAF2 favorisera la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire stimulant ainsi la croissance tumorale par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. En accord avec ces données, la lignée présentant un cIAP1 dépourvu de son domaine BIR1 (site d'interaction entre cIAP1 et TRAF2) présente une diminution de l'expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B.

#### **4) Conclusion :**

Durant mes trois années de thèse, j'ai participé à la caractérisation de l'interaction entre cIAP1 et E2F1.

Nous avons montré une régulation du facteur de transcription E2F1 par ubiquitinylation K63 des lysines 161/164 par cIAP1 dans un contexte « normal » ainsi qu'après un endommagement de l'ADN.

Ce mécanisme nécessite une étape préalable de méthylation.

Nous avons identifié une région de cIAP1 essentielle au maintien de la poche hydrophobe : l'hélice alpha 1 de ce domaine. La conservation de cette région est indispensable pour l'interaction entre cIAP1 et E2F1 puisqu'E2F1 lie la poche hydrophobe de cIAP1.

Nous n'avons pas pu identifier exactement la ou les fonction(s) de cIAP1 impliquée(s) dans les propriétés oncogéniques de cIAP1 cependant nous avons mis en évidence l'importance du domaine BIR1 dans la stimulation de la croissance tumorale. Le rôle de ce domaine et l'implication de TRAF2 et de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B seront étudiés par Baptiste Dumetier au cours de sa thèse.

Pour finir, nous avons montré que l'interaction entre cIAP1 et E2F1 était inhibée par ajout de *Smac mimetics*. Il pourrait être intéressant d'évaluer le niveau d'expression de cIAP1 dans les cancers où E2F1 est surexprimé et d'étudier l'impact des *Smac mimetics* sur ces cancers.

# BIBLIOGRAPHIE

## VI] Bibliographie :

- Alonso, M.M., Fueyo, J., Shay, J.W., Aldape, K.D., Jiang, H., Lee, O.H., Johnson, D.G., Xu, J., Kondo, Y., Kanzawa, T., *et al.* (2005). Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst* 97, 1589-1600.
- Annicotte, J.S., Blanchet, E., Chavey, C., Iankova, I., Costes, S., Assou, S., Teyssier, J., Dalle, S., Sardet, C., and Fajas, L. (2009). The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol* 11, 1017-1023.
- Aoki, I., Higuchi, M., and Gotoh, Y. (2013). NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* 32, 3954-3964.
- Bandara, L.R., Lam, E.W., Sørensen, T.S., Zamanian, M., Girling, R., and La Thangue, N.B. (1994). DP-1: a cell cycle-regulated and phosphorylated component of transcription factor DRTF1/E2F which is functionally important for recognition by pRb and the adenovirus E4 orf 6/7 protein. *EMBO J* 13, 3104-3114.
- Bashyam, M.D., Bair, R., Kim, Y.H., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Karikari, C.A., Tibshirani, R., Maitra, A., and Pollack, J.R. (2005). Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia* 7, 556-562.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Bele, A., Mirza, S., Zhang, Y., Ahmad Mir, R., Lin, S., Kim, J.H., Gurumurthy, C.B., West, W., Qiu, F., Band, H., *et al.* (2015). The cell cycle regulator ecdysoneless cooperates with H-Ras to promote oncogenic transformation of human mammary epithelial cells. *Cell Cycle* 14, 990-1000.
- Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22, 161-167.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 518-528.
- Bertrand, M.J., Doiron, K., Labbé, K., Korneluk, R.G., Barker, P.A., and Saleh, M. (2009). Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* 30, 789-801.
- Bertrand, M.J., Lippens, S., Staes, A., Gilbert, B., Roelandt, R., De Medts, J., Gevaert, K., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2011). cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PLoS One* 6, e22356.
- Bertrand, M.J., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 30, 689-700.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68, 2521-2528.
- Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer research* 72, 13-17.

Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., *et al.* (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* *417*, 149-160.

Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* *19*, 3704-3713.

Bornstein, B., Gottfried, Y., Edison, N., Shekhtman, A., Lev, T., Glaser, F., and Larisch, S. (2011). ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists. *Apoptosis* *16*, 869-881.

Budhavarapu, V.N., White, E.D., Mahanic, C.S., Chen, L., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2012). Regulation of E2F1 by APC/C Cdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation. *Cell Cycle* *11*, 2030-2038.

Budhidarmo, R., and Day, C.L. (2015). IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* *39*, 80-90.

Cao, Z., Li, X., Li, J., Luo, W., Huang, C., and Chen, J. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) lacking RING domain localizes to the nuclear and promotes cancer cell anchorage-independent growth by targeting the E2F1/Cyclin E axis. *Oncotarget* *5*, 7126-7137.

Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., *et al.* (2011). Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 26406-26417.

Cataldo, A., Cheung, D.G., Balsari, A., Tagliabue, E., Coppola, V., Iorio, M.V., Palmieri, D., and Croce, C.M. (2016). miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response. *Oncotarget* *7*, 786-797.

Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* *20*, 7342-7351.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y., and Dataa, P. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* *104*, 769-780.

Chaussepied, M., and Ginsberg, D. (2004). Transcriptional regulation of AKT activation by E2F. *Mol Cell* *16*, 831-837.

Che, X., Yang, D., Zong, H., Wang, J., Li, X., Chen, F., Chen, X., and Song, X. (2012). Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients. *Urol Oncol* *30*, 450-456.

Chen, J., Zhu, F., Weeks, R.L., Biswas, A.K., Guo, R., Li, Y., and Johnson, D.G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* *10*, 1287-1294.

Chen, L., Smith, L., Wang, Z., and Smith, J.B. (2003). Preservation of caspase-3 subunits from degradation contributes to apoptosis evoked by lactacystin: any single lysine or lysine pair of the small subunit is sufficient for ubiquitination. *Mol Pharmacol* *64*, 334-345.

Chen, W., Yang, Y., Chen, B., Lu, P., Zhan, L., Yu, Q., Cao, K., and Li, Q. (2014). MiR-136 targets E2F1 to reverse cisplatin chemosensitivity in glioma cells. *J Neurooncol* *120*, 43-53.



Cheng, L., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Toshkov, I.A., Wang, W., Camps, J., Ried, T., and Nikitin, A.Y. (2010). Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene* 29, 5700-5711.

Cho, E.C., Zheng, S., Munro, S., Liu, G., Carr, S.M., Moehlenbrink, J., Lu, Y.C., Stimson, L., Khan, O., Konietzny, R., *et al.* (2012). Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *EMBO J* 31, 1785-1797.

Choi, Y.E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C.S., Cohen, G.M., and Bratton, S.B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem* 284, 12772-12782.

Collart, M.A., Baeuerle, P., and Vassalli, P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10, 1498-1506.

Coller, H.A., Forman, J.J., and Legesse-Miller, A. (2007). "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* 3, e146.

Creagh, E.M., Murphy, B.M., Duriez, P.J., Duckett, C.S., and Martin, S.J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 279, 26906-26914.

Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168-2174.

Dai, Z., Zhu, W.G., Morrison, C.D., Brena, R.M., Smiraglia, D.J., Raval, A., Wu, Y.Z., Rush, L.J., Ross, P., Molina, J.R., *et al.* (2003). A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet* 12, 791-801.

Dar, A.A., Majid, S., de Semir, D., Nosrati, M., Bezrookove, V., and Kashani-Sabet, M. (2011). miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein. *J Biol Chem* 286, 16606-16614.

De Meyer, T., Bijsmans, I.T., Van de Vijver, K.K., Bekaert, S., Oosting, J., Van Criekinge, W., van Engeland, M., and Sieben, N.L. (2009). E2Fs mediate a fundamental cell-cycle deregulation in high-grade serous ovarian carcinomas. *J Pathol* 217, 14-20.

DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 6, 739-748.

Denechaud, P.D., Lopez-Mejia, I.C., Giralt, A., Lai, Q., Blanchet, E., Delacuisine, B., Nicolay, B.N., Dyson, N.J., Bonner, C., Pattou, F., *et al.* (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J Clin Invest* 126, 137-150.

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquelin, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolonne, N., Chiosis, G., *et al.* (2008). Interaction of heat-shock protein 90 $\beta$  isoform (HSP90 $\beta$ ) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ*.

Dimova, D.K., and Dyson, N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24, 2810-2826.

Dogan, T., Harms, G.S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T.K., Alnemri, E.S., Rapp, U.R., and Rajalingam, K. (2008). X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 10, 1447-1455.

Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J., and McMasters, K.M. (2002). Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 62, 1776-1783.

Dubrez, L., Berthelet, J., and Glorian, V. (2013). IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 9, 1285-1304.

Dupoux, A., Cartier, J., Cathelin, S., Filomenko, R., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2009). cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* 113, 175-185.

Duronio, R.J., and O'Farrell, P.H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin Eis a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* 9, 1456-1468.

Duronio, R.J., O'Farrell, P.H., Xie, J.E., Brook, A., and Dyson, N. (1995). The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1445-1455.

Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., *et al.* (2010). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J* 29, 4198-4209.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Ebihara, Y., Miyamoto, M., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Cho, Y., Fukunaga, A., Murakami, S., Uehara, H., Kaneko, H., Hashimoto, H., *et al.* (2004). Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Dis Esophagus* 17, 150-154.

Eckelman, B.P., Drag, M., Snipas, S.J., and Salvesen, G.S. (2008). The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death Differ* 15, 920-928.

Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* 281, 3254-3260.

Edison, N., Reingewertz, T.H., Gottfried, Y., Lev, T., Zuri, D., Maniv, I., Carp, M.J., Shalev, G., Friedler, A., and Larisch, S. (2012). Peptides mimicking the unique ARTS-XIAP binding site promote apoptotic cell death in cultured cancer cells. *Clin Cancer Res* 18, 2569-2578.

Eletr, Z.M., and Wilkinson, K.D. (2011). An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell Biochem Biophys* 60, 3-11.

Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist Updat* 13, 119-131.

Erpapazoglou, Z., Walker, O., and Haguenaer-Tsapis, R. (2014). Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells* 3, 1027-1088.

Ertosun, M.G., Hapil, F.Z., and Osman Nidai, O. (2016). E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*.

Estornes, Y., and Bertrand, M.J. (2014). IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Seminars in cell & developmental biology*.

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2001). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 20, 1678-1687.

Fagan, R., Flint, K.J., and Jones, N. (1994). Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* 78, 799-811.

Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P.D., Shirley, S., Condon, S.M., Chunduru, S.K., McKinlay, M.A., Vaux, D.L., Silke, J., *et al.* (2011). Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *The Journal of biological chemistry* 286, 17015-17028.

Feltham, R., Moulin, M., Vince, J.E., Mace, P.D., Wong, W.W., Anderton, H., Day, C.L., Vaux, D.L., and Silke, J. (2010). Tumor necrosis factor (TNF) signaling, but not TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)-triggered cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) degradation, requires cIAP1 RING dimerization and E2 binding. *J Biol Chem* 285, 17525-17536.

Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* 43, 449-463.

Ferreira, C.G., van der Valk, P., Span, S.W., Jonker, J.M., Postmus, P.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. (2001). Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 12, 799-805.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549-561.

Fingas, C.D., Blechacz, B.R., Smoot, R.L., Guicciardi, M.E., Mott, J., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Sirica, A.E., and Gores, G.J. (2010). A smac mimetic reduces TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced invasion and metastasis of cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 52, 550-561.

Fraser, A.G., James, C., Evan, G.I., and Hengartner, M.O. (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* 9, 292-301.

Fujita, Y., Sakakura, C., Shimomura, K., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Aragane, H., Hagiwara, A., Abe, T., Inazawa, J., and Yamagishi, H. (2003). Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Hepatogastroenterology* 50, 1857-1863.

Fulda, S., and Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11, 109-124.

Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4, 930-939.

Galvan, V., Kurakin, A.V., and Bredesen, D.E. (2004). Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Lett* 558, 57-62.

Gamell, C., Gulati, T., Levav-Cohen, Y., Young, R.J., Do, H., Pilling, P., Takano, E., Watkins, N., Fox, S.B., Russell, P., *et al.* (2017). Reduced abundance of the E3 ubiquitin ligase E6AP contributes to decreased expression of the INK4/ARF locus in non-small cell lung cancer. *Sci Signal* *10*.

Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Tseng, M.T., Montes de Oca-Luna, R., Zhou, H.S., McMasters, K.M., and Gomez-Gutierrez, J.G. (2012). E2F-1 lacking the transcriptional activity domain induces autophagy. *Cancer Biol Ther* *13*, 1091-1101.

Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W.W., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., and Leverkus, M. (2009). Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J Cell Biol* *187*, 1037-1054.

Ghari, F., Quirke, A.M., Munro, S., Kawalkowska, J., Picaud, S., McGouran, J., Subramanian, V., Muth, A., Williams, R., Kessler, B., *et al.* (2016). Citrullination-acetylation interplay guides E2F-1 activity during the inflammatory response. *Sci Adv* *2*, e1501257.

Goncharov, T., Niessen, K., de Almagro, M.C., Izrael-Tomasevic, A., Fedorova, A.V., Varfolomeev, E., Arnott, D., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., and Vucic, D. (2013). OTUB1 modulates c-IAP1 stability to regulate signalling pathways. *EMBO J* *32*, 1103-1114.

Grice, G.L., Lobb, I.T., Weekes, M.P., Gygi, S.P., Antrobus, R., and Nathan, J.A. (2015). The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell Rep* *12*, 545-553.

Grzybowska-Izydorczyk, O., Cebula, B., Robak, T., and Smolewski, P. (2010). Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer* *46*, 800-810.

Gu, Y., Cheng, Y., Song, Y., Zhang, Z., Deng, M., Wang, C., Zheng, G., and He, Z. (2014). MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1. *PLoS One* *9*, e102602.

Guo, R., Chen, J., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2011). GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res* *39*, 1390-1397.

Guo, X., Guo, L., Ji, J., Zhang, J., Chen, X., Cai, Q., Li, J., Gu, Q., Liu, B., Zhu, Z., *et al.* (2010). miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* *398*, 1-6.

Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P.C., Zvelebil, M., Bujnicki, J.M., *et al.* (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* *10*, 1309-1317.

Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* *10*, 561-574.

Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. (2006). Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes Dev* *20*, 613-623.

Han, S., Park, K., Bae, B.N., Kim, K.H., Kim, H.J., Kim, Y.D., and Kim, H.Y. (2003). E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* *82*, 11-16.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanson, A.J., Wallace, H.A., Freeman, T.J., Beauchamp, R.D., Lee, L.A., and Lee, E. (2012). XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Molecular cell* 45, 619-628.
- Hao, H., Chen, C., Rao, X.M., Gomez-Gutierrez, J.G., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2012). E2F-1- and E2Ftr-mediated apoptosis: the role of DREAM and HRK. *J Cell Mol Med* 16, 605-615.
- Hao, H., Dong, Y.B., Bowling, M.T., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2006). Alteration of gene expression in melanoma cells following combined treatment with E2F-1 and doxorubicin. *Anticancer Res* 26, 1947-1956.
- Hao, H., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2009). Chemosensitization of tumor cells: inactivation of nuclear factor-kappa B associated with chemosensitivity in melanoma cells after combination treatment with E2F-1 and doxorubicin. *Methods Mol Biol* 542, 301-313.
- Harikumar, K.B., Yester, J.W., Surace, M.J., Oyeniran, C., Price, M.M., Huang, W.C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Yamada, A., Kong, X., *et al.* (2014). K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nature immunology* 15, 231-238.
- Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 635-645.
- Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83, 1253-1262.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., *et al.* (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 278, 38699-38706.
- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* 12, 377-383.
- Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279, 8627-8634.
- Hershko, T., Korotayev, K., Polager, S., and Ginsberg, D. (2006). E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 and Wip1. *J Biol Chem* 281, 31309-31316.
- Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S., Khanna, K.K., Dittmar, G., and Scheidereit, C. (2010). A cytoplasmic ATM-TRAF6-ciAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kB activation. *Mol Cell* 40, 63-74.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., and Bensi, G. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13, 6231-6240.
- Hu, S., and Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278, 10055-10060.

- Huang, C.L., Liu, D., Nakano, J., Yokomise, H., Ueno, M., Kadota, K., and Wada, H. (2007). E2F1 overexpression correlates with thymidylate synthase and survivin gene expressions and tumor proliferation in non small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* *13*, 6938-6946.
- Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T., and Yuan, Z.M. (1997). Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase. *Cancer Res* *57*, 3640-3643.
- Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszkowski, D.G., and Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* *104*, 781-790.
- Höffner, M., Wirbelauer, C., Humar, B., and Krek, W. (1999). Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* *27*, 491-495.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* *279*, 30830-30835.
- Iglesias, M., Yen, K., Gaiotti, D., Hildesheim, A., Stoler, M.H., and Woodworth, C.D. (1998). Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1 $\alpha$ . *Oncogene* *17*, 1195-1205.
- Imai, M.A., Oda, Y., Oda, M., Nakanishi, I., and Kawahara, E. (2004). Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* *130*, 320-326.
- Imoto, I., Tsuda, H., Hirasawa, A., Miura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., and Inazawa, J. (2002). Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* *62*, 4860-4866.
- Imoto, I., Yang, Z.Q., Pimkhaokham, A., Tsuda, H., Shimada, Y., Imamura, M., Ohki, M., and Inazawa, J. (2001). Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* *61*, 6629-6634.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* *407*, 645-648.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J.R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* *21*, 4684-4699.
- Ivanova, I.A., Vespa, A., and Dagnino, L. (2007). A novel mechanism of E2F1 regulation via nucleocytoplasmic shuttling: determinants of nuclear import and export. *Cell Cycle* *6*, 2186-2195.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* *10*, 429-439.
- Jang, K.W., Lee, K.H., Kim, S.H., Jin, T., Choi, E.Y., Jeon, H.J., Kim, E., Han, Y.S., and Chung, J.H. (2011). Ubiquitin ligase CHIP induces TRAF2 proteasomal degradation and NF- $\kappa$ B inactivation to regulate breast cancer cell invasion. *J Cell Biochem* *112*, 3612-3620.

Kang, H.B., Kim, Y.E., Kwon, H.J., Sok, D.E., and Lee, Y. (2007). Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev* *16*, 615-623.

Kearney, C.J., Sheridan, C., Cullen, S.P., Tynan, G.A., Logue, S.E., Afonina, I.S., Vucic, D., Lavelle, E.C., and Martin, S.J. (2013). Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonists regulate spontaneous and tumor necrosis factor (TNF)-induced proinflammatory cytokine and chemokine production. *J Biol Chem* *288*, 4878-4890.

Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* *12*, 131-144.

Kim, J.H., Gurumurthy, C.B., Naramura, M., Zhang, Y., Dudley, A.T., Doglio, L., Band, H., and Band, V. (2009). Role of mammalian Ecdysoless in cell cycle regulation. *J Biol Chem* *284*, 26402-26410.

Kim, J.W., Choi, E.J., and Joe, C.O. (2000). Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by proapoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* *19*, 4491-4499.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 550-563.

Kontaki, H., and Talianidis, I. (2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell* *39*, 152-160.

Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* *45*, 219-228.

Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., *et al.* (2003). Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* *9*, 4914-4925.

Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., and Livingston, D.M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* *78*, 161-172.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* *21*, 3964-3973.

Kurakin, A., and Bredesen, D.E. (2007). An unconventional IAP-binding motif revealed by target-assisted iterative screening (TAIS) of the BIR3-clAP1 domain. *J Mol Recognit* *20*, 39-50.

Labbé, K., McIntire, C.R., Doiron, K., Leblanc, P.M., and Saleh, M. (2011). Cellular inhibitors of apoptosis proteins clAP1 and clAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* *35*, 897-907.

Laine, A., and Westermarck, J. (2014). Molecular pathways: harnessing E2F1 regulation for prosenescence therapy in p53-defective cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 3644-3650.

Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9136-9141.

- Lee, J.S., Leem, S.H., Lee, S.Y., Kim, S.C., Park, E.S., Kim, S.B., Kim, S.K., Kim, Y.J., Kim, W.J., and Chu, I.S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J Clin Oncol* 28, 2660-2667.
- Lee, K.H., Chen, Y.L., Yeh, S.D., Hsiao, M., Lin, J.T., Goan, Y.G., and Lu, P.J. (2009). MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. *Oncogene* 28, 3360-3370.
- Lee, S., Challa-Malladi, M., Bratton, S.B., and Wright, C.W. (2014). Nuclear factor- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) contains an amino-terminal inhibitor of apoptosis (IAP)-binding motif (IBM) that potentiates NIK degradation by cellular IAP1 (c-IAP1). *J Biol Chem* 289, 30680-30689.
- Lees, J.A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., and Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 7813-7825.
- Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.Z., Kornacker, K., Liu, C.G., *et al.* (2008). Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell* 14, 62-75.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Lieman, J.H., Worley, L.A., and Harbour, J.W. (2005). Loss of Rb-E2F repression results in caspase-8-mediated apoptosis through inactivation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 280, 10484-10490.
- Lin, R.J., Lin, Y.C., and Yu, A.L. (2010). miR-149\* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog* 49, 719-727.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Liu, S.S., Tsang, B.K., Cheung, A.N., Xue, W.C., Cheng, D.K., Ng, T.Y., Wong, L.C., and Ngan, H.Y. (2001). Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 37, 1104-1110.
- Loftus, S.J., Liu, G., Carr, S.M., Munro, S., and La Thangue, N.B. (2012). NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO reports* 13, 811-818.
- Lopez, J., John, S.W., Tenev, T., Rautureau, G.J., Hinds, M.G., Francalanci, F., Wilson, R., Broemer, M., Santoro, M.M., Day, C.L., *et al.* (2011). CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol Cell* 42, 569-583.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., and Chen, H.W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24, 5157-5171.
- Ma, O., Cai, W.W., Zender, L., Dayaram, T., Shen, J., Herron, A.J., Lowe, S.W., Man, T.K., Lau, C.C., and Donehower, L.A. (2009). MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res* 69, 2559-2567.
- Mace, P.D., Smits, C., Vaux, D.L., Silke, J., and Day, C.L. (2010). Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J Mol Biol* 400, 8-15.



Mahanic, C.S., Budhavarapu, V., Graves, J.D., Li, G., and Lin, W.C. (2015). Regulation of E2 promoter binding factor 1 (E2F1) transcriptional activity through a deubiquitinating enzyme, UCH37. *J Biol Chem* *290*, 26508-26522.

Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T.W., Lacasse, E.C., Waring, J., *et al.* (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11778-11783.

Mannava, S., Omilian, A.R., Wawrzyniak, J.A., Fink, E.E., Zhuang, D., Miecznikowski, J.C., Marshall, J.R., Soengas, M.S., Sears, R.C., Morrison, C.D., *et al.* (2012). PP2A-B56 $\alpha$  controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells. *Oncogene* *31*, 1484-1492.

Marivin, A., Berthelet, J., Cartier, J., Paul, C., Gemble, S., Morizot, A., Boireau, W., Saleh, M., Bertoglio, J., Solary, E., *et al.* (2014). cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation. *Oncogene* *33*, 5534-5545.

Martelli, F., and Livingston, D.M. (1999). Regulation of endogenous E2F1 stability by the retinoblastoma family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2858-2863.

Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* *1*, 14-19.

Martin, K., Trouche, D., Hagemeyer, C., Sørensen, T.S., La Thangue, N.B., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* *375*, 691-694.

Martínez-Balbás, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* *19*, 662-671.

Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *The Journal of biological chemistry* *275*, 10887-10892.

Mega, S., Miyamoto, M., Ebihara, Y., Takahashi, R., Hase, R., Li, L., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Uehara, H., Kaneko, H., *et al.* (2005). Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated with characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* *18*, 109-113.

Meng, R.D., Phillips, P., and El-Deiry, W.S. (1999). p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int J Oncol* *14*, 5-14.

Meyer, H.J., and Rape, M. (2014). Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell* *157*, 910-921.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.

Midorikawa, Y., Makuuchi, M., Tang, W., and Aburatani, H. (2007). Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J Gastroenterol* *13*, 1487-1492.

Milton, A., Luoto, K., Ingram, L., Munro, S., Logan, N., Graham, A.L., Brummelkamp, T.R., Hijmans, E.M., Bernards, R., and La Thangue, N.B. (2006). A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene* *25*, 3212-3218.

Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., and Yasuda, H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem* *137*, 125-132.

Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.

Moulin, M., Anderton, H., Voss, A.K., Thomas, T., Wong, W.W., Bankovacki, A., Feltham, R., Chau, D., Cook, W.D., Silke, J., *et al.* (2012). IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *EMBO J* 31, 1679-1691.

Mudryj, M., Hiebert, S.W., and Nevins, J.R. (1990). A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J* 9, 2179-2184.

Munro, S., Carr, S.M., and La Thangue, N.B. (2012). Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* 31, 4343-4352.

Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S.W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

Nakatani, Y., Kleffmann, T., Linke, K., Condon, S.M., Hinds, M.G., and Day, C.L. (2013). Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. *The Biochemical journal* 450, 629-638.

Narayan, G., and Murty, V.V. (2010). Integrative genomic approaches in cervical cancer: implications for molecular pathogenesis. *Future Oncol* 6, 1643-1652.

Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N., Goulet, A.C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., *et al.* (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther* 5, 407-412.

Nevins, J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.

Niu, J., Chen, T., Han, L., Wang, P., Li, N., and Tong, T. (2011). Transcriptional activation of the senescence regulator Lsh by E2F1. *Mech Ageing Dev* 132, 180-186.

Novy, M., Pohn, R., Andorfer, P., Novy-Weiland, T., Galos, B., Schwarzmayr, L., and Rotheneder, H. (2005). EAPP, a novel E2F binding protein that modulates E2F-dependent transcription. *Mol Biol Cell* 16, 2181-2190.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.

Oberoi, T.K., Dogan, T., Hocking, J.C., Scholz, R.P., Mooz, J., Anderson, C.L., Karreman, C., Meyer zu Heringdorf, D., Schmidt, G., Ruonala, M., *et al.* (2012). IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J* 31, 14-28.

Ofengeim, D., and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 727-736.

Ohta, T., and Xiong, Y. (2001). Phosphorylation- and Skp1-independent in vitro ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases. *Cancer research* 61, 1347-1353.

Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- $\kappa$ B Signaling. *Mol Cell* 64, 251-266.

Palaiologou, M., Koskinas, J., Karanikolas, M., Fatourou, E., and Tiniakos, D.G. (2012). E2F-1 is overexpressed and pro-apoptotic in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 460, 439-446.

Park, S.M., Yoon, J.B., and Lee, T.H. (2004). Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *FEBS Lett* 566, 151-156.

Peart, M.J., Poyurovsky, M.V., Kass, E.M., Urist, M., Verschuren, E.W., Summers, M.K., Jackson, P.K., and Prives, C. (2010). APC/C(Cdc20) targets E2F1 for degradation in prometaphase. *Cell Cycle* 9, 3956-3964.

Pediconi, N., Guerrieri, F., Vossio, S., Bruno, T., Belloni, L., Schinzari, V., Scisciani, C., Fanciulli, M., and Levrero, M. (2009). hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 29, 1989-1998.

Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., *et al.* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5, 552-558.

Peng, J., Dong, W., Chen, L., Zou, T., Qi, Y., and Liu, Y. (2007). Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation. *Mol Cell Biochem* 294, 45-54.

Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pilozi, E., Liu, C.G., Negrini, M., *et al.* (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGF $\beta$ -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13, 272-286.

Pfleger, C.M., Lee, E., and Kirschner, M.W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes & development* 15, 2396-2407.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* 4, 771-781.

Pickering, M.T., Stadler, B.M., and Kowalik, T.F. (2009). miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. *Oncogene* 28, 140-145.

Pillai, S., Kovacs, M., and Chellappan, S. (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor receptors by Rb and E2F1: role of acetylation. *Cancer Res* 70, 4931-4940.

Plenchette, S., Cathelin, S., Rebe, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.H., Padua, R.A., *et al.* (2004). Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* 104, 2035-2043.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2008). E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 18, 528-535.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21, 437-446.

Polager, S., Ofir, M., and Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 27, 4860-4864.

Ponnelle, T., Chapusot, C., Martin, L., Bonithon-Kopp, C., Bouvier, A.M., Plenchette, S., Rageot, D., Faivre, J., Solary, E., and Piard, F. (2003). Subcellular expression of c-IAP1 and c-IAP2 in colorectal cancers: relationships with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract* 199, 723-731.

Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol Cell Oncol* 2, e970480.

Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer Zada, A.A., Müller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 1768-1778.

Pützer, B.M., and Engelmann, D. (2013). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends Mol Med* 19, 89-98.

Qi, S., Mogi, S., Tsuda, H., Tanaka, Y., Kozaki, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hasegawa, S., and Omura, K. (2008). Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37, 1047-1053.

Qi, Y., and Xia, P. (2012). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) plays a critical role in beta-cell survival under endoplasmic reticulum stress: promoting ubiquitination and degradation of C/EBP homologous protein (CHOP). *The Journal of biological chemistry* 287, 32236-32245.

Rahighi, S., and Dikic, I. (2012). Selectivity of the ubiquitin-binding modules. *FEBS letters* 586, 2705-2710.

Real, S., Espada, L., Espinet, C., Santidrián, A.F., and Tauler, A. (2010). Study of the in vivo phosphorylation of E2F1 on Ser403. *Biochim Biophys Acta* 1803, 912-918.

Reardon, D.A., Michalkiewicz, E., Boyett, J.M., Sublett, J.E., Entrekina, R.E., Ragsdale, S.T., Valentine, M.B., Behm, F.G., Li, H., Heideman, R.L., *et al.* (1997). Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57, 4042-4047.

Reimer, D., Sadr, S., Wiedemair, A., Goebel, G., Concin, N., Hofstetter, G., Marth, C., and Zeimet, A.G. (2006). Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 270-281.

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256.

Revenko, A.S., Kalashnikova, E.V., Gemo, A.T., Zou, J.X., and Chen, H.W. (2010). Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark. *Mol Cell Biol* 30, 5260-5272.

Riedl, S.J., Ratus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104, 791-800.

Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2002). E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 5308-5318.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925.

Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 13, 260-272.

Samuel, T., Welsh, K., Lober, T., Togo, S.H., Zapata, J.M., and Reed, J.C. (2006). Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J Biol Chem* 281, 1080-1090.

Sansal, I., Dupont, E., Toru, D., Evrard, C., and Rouget, P. (2000). NPDC-1, a regulator of neural cell proliferation and differentiation, interacts with E2F-1, reduces its binding to DNA and modulates its transcriptional activity. *Oncogene* 19, 5000-5009.

Sarhan, R.A., Aboelenein, H.R., Sourour, S.K., Fawzy, I.O., Salah, S., and Abdelaziz, A.I. (2015). Targeting E2F1 and c-Myc expression by microRNA-17-5p represses interferon-stimulated gene MxA in peripheral blood mononuclear cells of pediatric systemic lupus erythematosus patients. *Discov Med* 19, 419-425.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.

Schayek, H., Bentov, I., Rotem, I., Pasmanik-Chor, M., Ginsberg, D., Plymate, S.R., and Werner, H. (2010). Transcription factor E2F1 is a potent transactivator of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) gene. *Growth Horm IGF Res* 20, 68-72.

Sharma, A., Yeow, W.S., Ertel, A., Coleman, I., Clegg, N., Thangavel, C., Morrissey, C., Zhang, X., Comstock, C.E., Witkiewicz, A.K., *et al.* (2010). The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* 120, 4478-4492.

Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E.W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 327, 1135-1139.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16182-16187.

Silke, J., and Vucic, D. (2014). IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol* 545, 35-65.

Silva, K.L., Vasconcellos, D.V., Castro, E.D., Coelho, A.M., Linden, R., and Maia, R.C. (2006). Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Apoptosis* 11, 277-285.

Snijders, A.M., Schmidt, B.L., Fridlyand, J., Dekker, N., Pinkel, D., Jordan, R.C., and Albertson, D.G. (2005). Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 24, 4232-4242.

Son, Y.H., Jeong, Y.T., Lee, K.A., Choi, K.H., Kim, S.M., Rhim, B.Y., and Kim, K. (2008). Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 51, 71-77.

- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., *et al.* (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* *410*, 112-116.
- Stanelle, J., and Pützer, B.M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* *12*, 177-185.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., and Pützer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res* *30*, 1859-1867.
- Stanelle, J., Tu-Rapp, H., and Pützer, B.M. (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ* *12*, 347-357.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* *412*, 157-169.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* *5*, 401-409.
- Suh, D.S., Yoon, M.S., Choi, K.U., and Kim, J.Y. (2008). Significance of E2F-1 overexpression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* *18*, 492-498.
- Sun, L.L., Wang, J., Zhao, Z.J., Liu, N., Wang, A.L., Ren, H.Y., Yang, F., Diao, K.X., Fu, W.N., Wan, E.H., *et al.* (2014). Suppressive role of miR-502-5p in breast cancer via downregulation of TRAF2. *Oncol Rep* *31*, 2085-2092.
- Suzuki, T., Yasui, W., Yokozaki, H., Naka, K., Ishikawa, T., and Tahara, E. (1999). Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* *81*, 535-538.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8662-8667.
- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* *26*, 399-422.
- Tai, M.C., Kajino, T., Nakatochi, M., Arima, C., Shimada, Y., Suzuki, M., Miyoshi, H., Yatabe, Y., Yanagisawa, K., and Takahashi, T. (2015). miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis* *36*, 1464-1473.
- Tanimoto, T., Tsuda, H., Imazeki, N., Ohno, Y., Imoto, I., Inazawa, J., and Matsubara, O. (2005). Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* *224*, 141-151.
- Tashiro, E., Minato, Y., Maruki, H., Asagiri, M., and Imoto, M. (2003). Regulation of FGF receptor-2 expression by transcription factor E2F-1. *Oncogene* *22*, 5630-5635.
- Tchoghandjian, A., Jennewein, C., Eckhardt, I., Rajalingam, K., and Fulda, S. (2013). Identification of non-canonical NF- $\kappa$ B signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells. *Cell Death Dis* *4*, e564.
- Tenbaum, S.P., Papaioannou, M., Reeb, C.A., Goeman, F., Escher, N., Kob, R., von Eggeling, F., Melle, C., and Baniahmad, A. (2007). Alien inhibits E2F1 gene expression and cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1447-1454.

Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., *et al.* (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* **43**, 432-448.

Teplyuk, N.M., Uhlmann, E.J., Wong, A.H., Karmali, P., Basu, M., Gabriely, G., Jain, A., Wang, Y., Chiocca, E.A., Stephens, R., *et al.* (2015). MicroRNA-10b inhibition reduces E2F1-mediated transcription and miR-15/16 activity in glioblastoma. *Oncotarget* **6**, 3770-3783.

Thomas, G.S., Zhang, L., Blackwell, K., and Habelhah, H. (2009). Phosphorylation of TRAF2 within its RING domain inhibits stress-induced cell death by promoting IKK and suppressing JNK activation. *Cancer Res* **69**, 3665-3672.

Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khatri, D.B., Protopopov, A., You, M.J., Aguirre, A.J., *et al.* (2005). High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9625-9630.

Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P., and Macleod, K.F. (2007). BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* **27**, 6229-6242.

Tseng, P.H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A., and Karin, M. (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* **11**, 70-75.

Tyagi, S., and Herr, W. (2009). E2F1 mediates DNA damage and apoptosis through HCF-1 and the MLL family of histone methyltransferases. *EMBO J* **28**, 3185-3195.

Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L., and Vaux, D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4974-4978.

Vallat, L., Magdelénat, H., Merle-Béral, H., Masdehors, P., Potocki de Montalk, G., Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T.F., and Delic, J. (2003). The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* **101**, 4598-4606.

Van Den Broeck, A., Nissou, D., Brambilla, E., Eymin, B., and Gazzeri, S. (2012). Activation of a Tip60/E2F1/ERCC1 network in human lung adenocarcinoma cells exposed to cisplatin. *Carcinogenesis* **33**, 320-325.

Vandel, L., and Kouzarides, T. (1999). Residues phosphorylated by TFIIH are required for E2F-1 degradation during S-phase. *EMBO J* **18**, 4280-4291.

Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., *et al.* (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681.

Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., and Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **283**, 24295-24299.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-297.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.

Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chunduru, S.K., *et al.* (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF $\alpha$ . *J Cell Biol* *182*, 171-184.

Vince, J.E., Wong, W.W., Gentle, I., Lawlor, K.E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., *et al.* (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* *36*, 215-227.

Vorburger, S.A., Pataer, A., Yoshida, K., Barber, G.N., Xia, W., Chiao, P., Ellis, L.M., Hung, M.C., Swisher, S.G., and Hunt, K.K. (2002). Role for the double-stranded RNA activated protein kinase PKR in E2F-1-induced apoptosis. *Oncogene* *21*, 6278-6288.

Vu, N.T., Park, M.A., Shultz, M.D., Bulut, G.B., Ladd, A.C., and Chalfant, C.E. (2016). Caspase-9b Interacts Directly with cIAP1 to Drive Agonist-Independent Activation of NF- $\kappa$ B and Lung Tumorigenesis. *Cancer Res* *76*, 2977-2989.

Wang, B., Hsu, S.H., Wang, X., Kutay, H., Bid, H.K., Yu, J., Ganju, R.K., Jacob, S.T., Yuneva, M., and Ghoshal, K. (2014). Reciprocal regulation of microRNA-122 and c-Myc in hepatocellular cancer: role of E2F1 and transcription factor dimerization partner 2. *Hepatology* *59*, 555-566.

Wang, B., Ma, A., Zhang, L., Jin, W.L., Qian, Y., Xu, G., Qiu, B., Yang, Z., Liu, Y., and Xia, Q. (2015). POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nature communications* *6*, 8704.

Wang, C., Rauscher, F.J., Cress, W.D., and Chen, J. (2007). Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *J Biol Chem* *282*, 29902-29909.

Weber, R.G., Sommer, C., Albert, F.K., Kiessling, M., and Cremer, T. (1996). Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* *74*, 108-119.

Welsh, K., Milutinovic, S., Ardecky, R.J., Gonzalez-Lopez, M., Ganji, S.R., Teriete, P., Finlay, D., Riedl, S., Matsuzawa, S., Pinilla, C., *et al.* (2016). Characterization of Potent SMAC Mimetics that Sensitize Cancer Cells to TNF Family-Induced Apoptosis. *PLoS One* *11*, e0161952.

Wilting, S.M., de Wilde, J., Meijer, C.J., Berkhof, J., Yi, Y., van Wieringen, W.N., Braakhuis, B.J., Meijer, G.A., Ylstra, B., Snijders, P.J., *et al.* (2008). Integrated genomic and transcriptional profiling identifies chromosomal loci with altered gene expression in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *47*, 890-905.

Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* *2*, 11.

Wu, C.J., Conze, D.B., Li, X., Ying, S.X., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2005). TNF- $\alpha$  induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* *24*, 1886-1898.

Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* *408*, 1008-1012.

Wu, H., Li, W., Zhang, M., Zhu, S., Zhang, D., and Wang, X. (2016). Inhibitory roles of miR-320 in osteosarcoma via regulating E2F1. *J Cancer Res Ther* *12*, 68-71.

Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., *et al.* (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* *414*, 457-462.



- Xie, Q., Bai, Y., Wu, J., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Mei, P., and Yuan, Z. (2011). Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death. *J Recept Signal Transduct Res* 31, 139-146.
- Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G., and Wu, M. (2006). Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res* 34, 2046-2055.
- Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H.T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. (2007). c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol Cell* 28, 914-922.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14, 8420-8431.
- Yang, C., Davis, J.L., Zeng, R., Vora, P., Su, X., Collins, L.I., Vangveravong, S., Mach, R.H., Piwnica-Worms, D., Weilbaecher, K.N., *et al.* (2013). Antagonism of inhibitor of apoptosis proteins increases bone metastasis via unexpected osteoclast activation. *Cancer Discov* 3, 212-223.
- Yang, G., Zhang, R., Chen, X., Mu, Y., Ai, J., Shi, C., Liu, Y., Sun, L., Rainov, N.G., Li, H., *et al.* (2011a). MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status. *J Mol Med (Berl)* 89, 1037-1050.
- Yang, L., Lin, C., Liu, W., Zhang, J., Ohgi, K.A., Grinstein, J.D., Dorrestein, P.C., and Rosenfeld, M.G. (2011b). ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* 147, 773-788.
- Yang, X.H., Shiotani, B., Classon, M., and Zou, L. (2008). Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* 22, 1147-1152.
- Yasui, W., Yokozaki, H., Fujimoto, J., Naka, K., Kuniyasu, H., and Tahara, E. (2000). Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 35 *Suppl* 12, 111-115.
- Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol* 18, 579-586.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 755-764.
- Yu, W., Chan-On, W., Teo, M., Ong, C.K., Cutcutache, I., Allen, G.E., Wong, B., Myint, S.S., Lim, K.H., Voorhoeve, P.M., *et al.* (2011). First somatic mutation of E2F1 in a critical DNA binding residue discovered in well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum. *Genome Biol* 12, R96.
- Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G., *et al.* (2004). Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* 203, 744-753.
- Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., *et al.* (2008). Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9, 1371-1378.

Zauli, G., Voltan, R., di lasio, M.G., Bosco, R., Melloni, E., Sana, M.E., and Secchiero, P. (2011). miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clin Cancer Res* 17, 2712-2724.

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., *et al.* (2006). Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125, 1253-1267.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336.

Zhang, S.Y., Liu, S.C., Al-Saleem, L.F., Holloran, D., Babb, J., Guo, X., and Klein-Szanto, A.J. (2000). E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 395-401.

Zhang, W., Ji, W., Liu, X., Ouyang, G., and Xiao, W. (2014). ELL inhibits E2F1 transcriptional activity by enhancing E2F1 deacetylation via recruitment of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 34, 765-775.

Zhang, Y., Woodford, N., Xia, X., and Hamburger, A.W. (2003). Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 31, 2168-2177.

Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* 24, 7238-7247.

Zheng, S., Moehlenbrink, J., Lu, Y.C., Zalmas, L.P., Sagum, C.A., Carr, S., McGouran, J.F., Alexander, L., Fedorov, O., Munro, S., *et al.* (2013). Arginine methylation-dependent reader-writer interplay governs growth control by E2F-1. *Molecular cell* 52, 37-51.

Zhou, A.Y., Shen, R.R., Kim, E., Lock, Y.J., Xu, M., Chen, Z.J., and Hahn, W.C. (2013). IKK $\epsilon$ -mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell Rep* 3, 724-733.

Zhu, J.W., Field, S.J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R.D., Greenberg, M., Orkin, S.H., and DeGregori, J. (2001). E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 21, 8547-8564.

Zhuang, M., Guan, S., Wang, H., Burlingame, A.L., and Wells, J.A. (2013). Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator. *Mol Cell* 49, 273-282.

# Annexe

## VII] Annexe:

### 1) Matériel et méthode

#### a) Culture cellulaire et traitements :

Les cellules humaines de cancer du col de l'utérus (HeLa), d'ostéosarcome (U2OS) et les fibroblastes embryonnaires de souris immortalisés par l'antigène grand T du SV40 (MEF WT ; MEF cIAP1<sup>-/-</sup> ou MEF cIAP1<sup>-/-</sup>cIAP2<sup>-/-</sup> restaurées ou non) sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Dominique Dutscher, Amérique du Sud) ou dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Dominique Dutscher, Amérique du Sud) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher, Amérique du Sud) à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité.

Les lignées MEF cIAP1<sup>-/-</sup> ou MEF cIAP1<sup>-/-</sup>cIAP2<sup>-/-</sup> restaurées avec cIAP1 ou l'un de ses mutants sont sélectionnées par ajout de puromycine 2,8µg/ml.

Les cellules sont traitées :

- i. 24h avec du PYR41 (Calbiochem, Merck, Allemagne) de 10 à 35µM,
- ii. 24h avec de l'AMI-I (Enzo Life Sciences, France) de 0,1 à 100µM,
- iii. De 2h à 16h avec de la cycloheximide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) 100µg/ml,
- iv. 16h avec du MG132 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) 1 à 5µM,
- v. 16h avec du GDC0152 (Selleckmed, Euromedex, Souffelweyersheim, France) à 1µM,
- vi. 6h avec de l'étoposide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) de 10 à 20µM.

#### b) Construction plasmidique et transfection d'ARN interférents :

Les plasmides utilisés sont les suivant : pCI-vide, pCI-cIAP1, pCI-H588A, pCMV-βGal, pGL3-promoteur humain-CCNE (Cartier et al., 2011b); pcDNA3.1-6His-ubiquitine WT, les mutants pcDNA3.1-6His-ubiquitine-K11only, pcDNA3.1-6His-ubiquitine-K48only, pcDNA3.1-6His-ubiquitine-K63only dans lesquels les lysines sont mutées en arginines à l'exception des lysines 11, 48 et 63 respectivement, pCMV-HA-E2F1 WT et pCMV-HA-E2F1-K117/120/125R (Marzio et al., 2000a) ; pCMV-3HA et pCMV-3HA-K185R ; Les mutants Flag-E2F1 contenant aucune lysine ou seulement la lysine 89 (K1), les lysines 89 et 137 (K2), les lysines 89,137, 161 et 164 (K4) ou les mutants possédant les lysines 117, 120 et 125 (cluster 1), les lysines 182, 183 et 185 (cluster 2) et les lysines 226, 287, 289 et 310 (cluster 3) mutées en arginines ; pcDNA3-myc-skp2 (Addgene #19947); pCS2-HA-cdh1 (Addgene #11596).

Le mutant pCl-clAP1-F616A a été obtenu par mutagenèse dirigée via le kit « *GENEART® Site-Directed Mutagenesis System* » (Invitrogen, Life Technologies, Californie, USA) en utilisant les amorces suivantes :

Sens : 5'-CAA-GGG-TAC-TGT-TCG-TAC-AGC-TCT-CTC-ATA-ATC-GAC-CCG-3'

Anti-sens : 5'-CGG-GTC-GAT-TAT-GAG-AGA-GCT-GTA-CGA-ACA-GTA-CCC-TTG-3'

Les mutants pCMV-3HA-E2F1-K89R, pCMV-3HA-E2F1-K137R, pCMV-3HA-E2F1-K161/164, pCMV-3HA-E2F1-K181-183R, pCMV-3HA-E2F1-K266R, pCMV-3HA-E2F1-K287-289R et pCMV-3HA-E2F1-K310R ont été obtenus par mutagenèse à partir du plasmide pCMV-3HA-E2F1 (GenScript, New Jersey, USA).

Les différents plasmides sont transfectés à l'aide de l'agent de transfection « *JetPEI* » selon les recommandations du fournisseur (Polyplus transfection, Ozyme, France).

Les ARN interférents dirigés contre clAP1, Rb, la cycline A sont produits par Qiagen et ceux dirigés contre PRMT1 et PMRT5 sont produits par Ambion (Life Technologies).

Les ARN interférents sont transfectés à l'aide de l'agent de transfection « *Lipofectamine® RNAiMax reagent* » (Fischer Scientific).

### c) Test de transactivation :

Les cellules sont transfectées avec 500ng de pGL3-promoteur humain-CCNE, 50ng de plasmide rapporteur pCMV-βGal et 500ng de pCl-clAP1 ou de l'un des mutants de clAP1, et/ ou 100ng de pCMV-HA-E2F1.

Les cellules sont récupérées 48h après transfection et l'activité luciférase est analysée à l'aide du kit « *Luciferase Assay System* » (Promega, Madison, WI) et du luminomètre EnVision (PerkinElmer, France).

Les résultats sont normalisés à l'aide du kit « *β-galactosidase Enzyme Assay System* » (Promega, Madison, WI).

#### d) Extrait cellulaire et immuno-blotting :

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (NaCl 150mM, NP40 1%, Sodium Deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, Tris pH7,5 50mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases).

Les extraits cellulaires pour étudier la phosphorylation de Rb sont réalisés grâce à un tampon de lyse particulier contenant : 20mM Tris pH7,5 ; 150mM NaCl; 1 mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton X100; 2,5mM Sodium pyrophosphate; 1mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM de sodium orthovanadate; cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

Les protéines sont séparées par électrophorèse puis transférées par champs électrique sur une membrane PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*, GE Healthcare Life Sciences, Royaume-Uni).

Les membranes sont incubées avec les anticorps suivant :

- Fournisseur « *Santa Cruz Biotechnology* » : anti-E2F1 (C20, lapin polyclonal), anti-HSC70 (souris), anti-PRMT5 (A-11, souris monoclonal), anti-Rb (lapin polyclonal),
- Fournisseur « *R&D system* » : anti-clAP1 (chèvre polyclonal), anti-pan-clAP1 (Clone #315301, souris monoclonal),
- Fournisseur « *Upstate, Milipore* » : anti-PRMT1 (lapin polyclonal),
- Fournisseur « *Sigma* » : anti- $\beta$ -actine (souris monoclonal), anti- $\alpha$ -tubuline (Clone AA13, souris monoclonal),
- Fournisseur « *Enzo Life Science* » : anti-ubiquitine totale couplé à la HRP reconnaissant les monoubiquitinylation et polyubiquitinylation (souris), anti-ubiquitine type K63 (souris monoclonal),
- Fournisseur « *Biologend* » : anti-HA.11 (souris),
- Fournisseur « *BD Biosciences* » : anti-cycline A (souris),
- Fournisseur « *Cell Signaling* » : anti-Myc (souris).

La mesure de la chimi-luminescence est réalisée après ajout d'ECL (Clarity<sup>TM</sup> western ECL substrate, BioRad, France) à l'aide d'un Chemidoc (BioRad, France).

### e) Test d'ubiquitylation :

- *Cobalt pull-down* : les protéines ubiquitylées provenant d'un lysat cellulaire de HeLa préalablement transfectées avec 6His-ubiquitine, HA-E2F1 et cIAP1, sont immobilisées sur billes de cobalt (Talon Metal Affinity Resin, #635501, Clontech) reconnaissant l'étiquette « His ». Le profil d'ubiquitylation d'E2F1 est ensuite analysé par immuno-blotting à l'aide d'un anticorps anti-HA.
- *In vitro Assay* : la protéine de fusion GST-E2F1 est produite dans des bactéries compétentes E.Coli BL21. Cette protéine est ensuite immobilisée sur des billes glutathione-sépharoses (GE Healthcare, France) et incubée à 37°C pendant une heure en présence de 100nM d'enzyme E1 (UBE1), 1,5µg d'enzyme de conjugaison E2 (Ubc H5a/UBE2D1) et 0,2mM d'ubiquitine recombinante humaine (Boston, Biochem) dans un tampon de réaction contenant du Tris pH8 75mM, du DTT 2mM, du MgCl<sub>2</sub> 5mM et de l'ATP 4mM. Après élution dans du laemmli, le profil d'ubiquitylation d'E2F1 est ensuite analysé par immuno-blotting.
- *Immunoprécipitation* : les cellules sont transfectées avec 5µg des plasmides codant pour l'ubiquitine WT ou un mutant d'ubiquitine, E2F1 ou un mutant d'E2F1, cIAP1 ou l'un de ses mutants. Elles sont ensuite traitées au MG132 1µM pendant 16h avant la lyse. Au bout de 48h de transfection, les cellules sont lysées 30 minutes sur glace dans un tampon contenant : 150 mM de NaCl, 50mM Tris HCl pH 7,4, 20mM EDTA, 0,5% NP40, 1mM DTT, 5mM NEM (N-Ethylmaleimide) (Sigma-Aldrich) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le facteur de transcription E2F1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-E2F1 ou anti-HA et des billes agaroses A/G+ (Sigma) ou billes G+ (Calbiochem, Millipore). Après élution dans du laemmli, le profil d'ubiquitylation d'E2F1 est ensuite analysé par immuno-blotting.

### f) GST-pull Down :

- *Production des constructions GST* : les constructions pGEX-6p3 codant pour cIAP1 ou l'un de ses mutants sont pré-amplifiées 16h dans 10mL de LB supplémenté d'ampicilline. Les bactéries sont ensuite amplifiées dans 100mL de LB supplémenté d'ampicilline jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600nm comprise entre 0,8 et 1.

La production des protéines d'intérêts est stimulée par ajout d'IPTG 100mM (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 16h à 30°C sous agitation. La culture bactérienne est ensuite centrifugée puis reprise dans du PBS froid 1X pour être ensuite soniquée (amplitude 20%, 3 fois 15 secondes avec intervalles de 15 secondes).

Pour finir les cellules sont lysées 30 minutes à 4°C sur roue dans du Triton X100 1%. Après centrifugation le lysat protéique est conservé à -80°C.

- *Production de la protéine HA-E2F1 recombinante* : utilisation du kit « *TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System* » (Promega, USA) et des recommandations données par le fournisseur.

- *Préparation d'un lysat cellulaire exprimant la protéine d'intérêt* : les cellules HeLa sont transfectées ou non avec un plasmide codant pour RIP1 ou Smac. Pour l'étude de la caspase 7, les cellules ont été traitées avec de l'étoposide. Elles sont ensuite lysées dans un tampon contenant : 50mM Tris pH7,4 ; 1% NP40 ; 200mM NaCl ; 5mM EDTA ; 5% glycérol ; 2mM DTT ; cocktail d'inhibiteurs de protéases.

- *GST Pull down* : Le lysat contenant les protéines fusionnées à la GST sont incubées à 4°C en présence de billes Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) pendant 2h sur roue dans du PBS 1X.

Pour les expériences avec les peptides (synthétisés chez GeneCust, Europe, Smac N7 : AVPIAQK ; peptide 1 : SGPARGR ; peptide 2 : VKSPGEKS ; peptide 3 : AACVLKV ; peptide 4 : VLKVQKR ; peptide 5 : AKKSKNH) ceux-ci sont ajoutés 30 minutes avant la fin de l'incubation des billes avec la protéine fusionnée à la GST.

Après trois lavages dans du PBS 1X froid, les protéines de fusion immobilisées sur les billes glutathion-sépharoses sont incubées avec la protéine HA-E2F1 recombinante ou un lysat exprimant la protéine d'intérêt.

Après élution dans du laemmli, l'interaction est ensuite analysée par immuno-blotting.

### **g) Test de prolifération cellulaire :**

Les cellules U2OS sont transfectées avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 ou pCMV-3HA-E2F1-K161/164. Vingt-quatre heures après transfection les cellules sont implantées dans une plaque 6 puits (20 000 cellules/puits). Six jours plus tard, les cellules sont fixées dans de l'éthanol 100% puis colorées avec du cristal violet.

Le cristal violet est élué avec de l'acide acétique 33% et la densité optique à 620nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (UVM 340, Biochrom, Cambourne, UK).



## h) Purification des ARN, Reverse Transcription et qPCR :

Les ARN totaux sont isolés par l'ajout de Trizol selon les recommandations du fournisseur (*TRizol Reagent*®, Invitrogen). L'ADNc est produit à partir d'1µg d'ARN par l'utilisation du kit « *iScript cDNA synthesis* » (BioRad) selon les recommandations du fournisseur.

La PCR quantitative est réalisée dans les appareils « *7500 Fast thermocycler* » ou « *StepOne plus system* » (Applied Biosystem) via la technique de détection utilisant la « SYBR Green ».

Les amorces utilisées sont les suivantes : **Promoteur TP73 sens** : 5'-TGA-GCC-ATG-AAG-ATG-TGC-GAG-3', **Anti-sens** : 5'-GCT-GCT-TAT-GGT-CTG-ATG-CTT-ATG-3' ; **Promoteur APAF1 sens** : GGA-GAC-CCT-AGG-ACG-ACA-A, **Anti-sens** : CAG-TGA-AGC-AAC-GAG-GAT-GC ; **Promoteur CCNE sens** : CC-ATC-GGC-CAT-CTT-CCT-GGC-TC, **Anti-sens** : TCA-GGC-CGC-GGG-CCC-AGT-A ; **CCNE sens** : GCC-AGC-CTT-GGG-ACA-ATA-ATG, **Anti-sens** : CTT-GCA-CGT-TGA-GTT-TGG-GT ; **P73 sens** : GAC-GAG-GAC-ACG-TAC-TAC-CTT, **Anti-sens** : CTG-CCG-ATA-GGA-GTC-CAC-CA ; **APAF1 sens** : TCA-CTG-CAG-ATT-TTC-ACC-AGA, **Anti-sens** : CCT-CTC-ATT\_TGC-TGA-TGT-CG ; **HPRT sens** : GGA-CAG-GAC-TGA-ACG-TCT-TGC, **Anti-sens** : CTT-GAG-CAC-ACA-GAG GGC-TACA.

## i) Immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) :

Les cellules HeLa sont transfectées avec les plasmides pCMV-3HA-E2F1 ou pCMV-3HA-E2F1-K161/164. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont fixées dans du formaldéhyde 1%. La chromatine est isolée par digestion à la nucléase micrococcale. Dix pourcents du lysat est conservé comme lysat cellulaire, le restant est dilué et utilisé pour l'immunoprécipitation d'E2F1 à l'aide d'un anticorps dirigé contre E2F1 (un anticorps anti lapin est utilisé comme contrôle Igg). Le lysat et les anticorps sont incubés 16h à 4°C.

L'éluion de l'ADN est réalisée à l'aide du kit « *PIERCE™ Agarose Chip Kit* » (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

L'association de la protéine d'intérêt avec la chromatine est étudiée par qPCR (voir protocole précédent).

#### **j) Analyse du cycle cellulaire :**

Les cellules U2OS sont transfectées avec un ARN interférent contrôle (20 ou 50 $\mu$ M) ou dirigé contre la cycline A (20 $\mu$ M) ou la protéine Rb (50 $\mu$ M). Les différentes phases du cycle cellulaire sont analysées par l'utilisation du kit « *BrdU Flow kit* » (BD Bioscience) 48h après transfection selon les recommandations du fournisseur. Le cytomètre utilisé est le « BD FACS Canto II flow cytometer » et le logiciel utilisé pour traiter les données est « *flowing software 2* ».

#### **k) Création des lignées MEF *clAP1*<sup>-/-</sup>*clAP2*<sup>-/-</sup> restaurées avec les différents mutants de *clAP1* :**

Les cellules Phoenix Ampho ont été transfectées avec les plasmides rétroviraux suivant : pMSCV-*clAP1* $\Delta\alpha$ 1BIR3, pMSCV-*clAP1* $\Delta$ BIR1 et pMSCV-*clAP1* $\Delta$ BIR2. Vingt-quatre heures après transfection, la production de virus est stimulée par ajout de sodium butyrate 10mM pendant 8h.

Les virus sont récupérés le lendemain.

Les MEF *clAP1*<sup>-/-</sup>*clAP2*<sup>-/-</sup> sont mises en contact avec du milieu contenant les virus et du polybrène 10 $\mu$ g/ml pendant 8h.

Les cellules sont ensuite mises sous sélection puromycine (2,8 $\mu$ g/ml).

#### **l) Expérimentation *in vivo* sur la souris Nude :**

Les souris Nude (NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu) (JANVIER LABS, le Genest-Saint-Isle, France) sont hébergées dans la plateforme zootechnique de l'Université de Bourgogne (zone conventionnelle). Les différentes souris sont identifiées à l'aide d'un système de puce électronique.

Le jour de l'injection, les souris sont anesthésiées par ajout d'isofurane afin de permettre l'injection d'un million de cellules par voie cutanée ou par intraveineuse.

La croissance tumorale est évaluée par mesure de la largeur et de la longueur à l'aide d'un pied à coulisse. Tandis que pour l'évaluation de la formation de nodules, les souris sont sacrifiées après anesthésie afin de récupérer les poumons.

#### **m) Test statistique :**

Les tests statistiques utilisés sont le test t de Student ou le test de Mann-Whitney Wilcoxon.

## 2) Article :

### **E2F1 stabilization and activation involves cIAP1-mediated K63-poly-ubiquitination**

Valérie Glorian\*<sup>1,2</sup>, Jennifer Allègre\*<sup>1,2</sup>, Jean Berthelet\*<sup>1,2</sup>, Baptiste Dumetier<sup>1,2</sup>, Pierre-Marie Boutanquoi<sup>1,2</sup>, Nathalie Droin<sup>5</sup>, Cémile Kayaci<sup>1,2</sup>, Jessy Cartier<sup>1,2,4</sup>, Simon Gemble<sup>1,2</sup>, Guillaume Marcion<sup>1,2</sup>, Daniel Gonzalez<sup>1,2,3</sup>, Romain Boidot<sup>1,2,3</sup>, Carmen Garrido<sup>1,2</sup>, Eric Solary<sup>5,6</sup> and Laurence DUBREZ<sup>1,2</sup>

*\*These authors contributed equally to this work*

From :

<sup>1</sup> Université de Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), LNC UMR1231, 21000 Dijon, France

<sup>3</sup> Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon France.

<sup>4</sup> present address: Endocrinology Unit, University/BHF Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

<sup>5</sup> Inserm U1170, Gustave Roussy, 94804 Villejuif, France

<sup>6</sup> Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

Corresponding author: Laurence Dubrez, Inserm LNC UMR1231, Faculty of Medicine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon cedex, France. E-mail: [ldubrez@u-bourgogne.fr](mailto:ldubrez@u-bourgogne.fr); Tel: (33) 380 393 356; Fax: (33) 380 393 434

Running title: cIAP1 mediates K63-ubiquitination of E2F1.

Keywords: cellular Inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1), E2 factor 1 (E2F1), transcriptional regulation, Ubiquitination.

Final character count (including references and figure legends): 60 753

## Abstract

The E2F transcription factor 1 is subtly regulated along the cell cycle progression and in response to DNA-damage by post-translational modifications. Here, we demonstrated that the E3-ubiquitin ligase cellular Inhibitor of Apoptosis 1 (cIAP1) stabilizes E2F1 protein and promotes the conjugation of K63-ubiquitin chains on lysine 161/164 cluster. Mutation of these lysine residues completely abrogates the binding of E2F1 to *CCNE*, *TP73* and *APAF1* promoters, its capacity to stimulate transcriptional activation of these genes and its ability to control cell proliferation. A cIAP1-dependent K63-ubiquitination and stabilization of E2F1 is observed in response to etoposide-induced DNA damage and in the S phase of cell cycle, as revealed by cyclin-A silencing. The E2F1<sup>K161/164R</sup> mutant is resistant to these modifications. cIAP1-mediated ubiquitination of E2F1 is decreased by inhibiting the arginine-methyl transferase prmt-1 and prmt-5. Our results reveal an additional level of regulation of the stabilization and activation of E2F1 by a non-degradative K63-poly-ubiquitination and demonstrate a new function for the E3-ubiquitin ligase cIAP1.

## Introduction

The E2 factor (E2F) protein family consists of eight transcription factors (E2F1-8) that are essential regulators of cell proliferation, cell differentiation, DNA damage response, cell death and cell senescence. Their foremost functions are in cell cycle regulation as they participate in the dynamic expression of molecules driving cell cycle progression. E2F1 is the most extensively studied member of this family. The protein expression is increased in many human cancers such as hepatocarcinomas, digestive adenocarcinomas and ovarian cancers, and its downregulation in p53- and RB- compromised cancer cells can trigger their senescence(Laine and Westermarck, 2014). Further understanding of E2F1 expression regulation would help to develop strategies targeting this protein in cancer cells.

The expression and activity of E2F1 are regulated through post-translational modifications and association with different regulatory factors. The transcriptional activity of the protein is repressed by binding to the hypo-phosphorylated form of the pocket protein pRb (retinoblastoma protein) (Munro et al., 2012). In the late G1 phase of cell cycle, the phosphorylation of Rb by cyclin/cdk complexes releases the transcription factor, which in turn activates the expression of genes required for G1-S phase transition and DNA replication (Munro et al., 2012). E2F1 is subsequently degraded in late S and G2 phases by the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Bertoli et al., 2013). A genotoxic stress can also induce the stabilization and activation of E2F1 that, in this situation, promotes cell death rather than cell proliferation (Biswas and Johnson, 2012).

The turnover and activity of E2F1 are regulated by a number of post-translational modifications including phosphorylation, acetylation, methylation, neddylation, sumoylation and ubiquitination (Biswas and Johnson, 2012; Munro et al., 2012).

Ubiquitination consists of a multistep enzymatic process the aim of which is to conjugate ubiquitin molecules on a lysine of target proteins. This process is mediated by a cascade reaction involving an ubiquitin-activating enzyme (E1), an ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and an E3-ubiquitin ligase enzyme or E3-ubiquitin ligase enzymatic complex. The free N-terminus of ubiquitin or each of its seven lysine residues can act as an acceptor site for ubiquitin. At least 8 types of ubiquitin chains can be formed depending on the ubiquitin acceptor residue. The nature of the ubiquitin chain defines the functional consequences of target protein ubiquitination. For example, Lys48 (K48) or Lys11 (K11)-linked chains promote the protein degradation by the proteasome, whereas Lys63 (K63)-assembled chains favour the protein recruitment in signalling platforms (Erpapazoglou et al., 2014). E2F1 is ubiquitinated by the SCF<sup>Skp2</sup> [Skp2 (S phase kinase binding protein 2)-CDC53 (Cullin)-F-box] E3-ligase complex in late S and G2 phase of cell cycle (Marti et al., 1999a) and by APC/C<sup>Cdc20</sup> (Anaphase-promoting complex/cyclosome) in early mitosis (Peart et al., 2010). In addition, in early G1, the APC/C<sup>Cdh1</sup> E3-ligase complex promotes the conjugation of the K11-linked ubiquitin chain on E2F1 (Budhavarapu et al., 2012). In all these situations, ubiquitinated E2F1 is delivered to proteasome for degradation. A K63-ubiquitination of E2F1 has also been reported (Mahanic et al., 2015b; Wang et al., 2015a) but the mechanisms and the consequences of this modification remain unexplored.

Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1) is a RING-containing E3-ubiquitin ligase of the IAP (Inhibitor of Apoptosis) family. Thanks to its ability to induce the ubiquitination of signalling molecules, cIAP1 is a very potent regulator of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily and NF- $\kappa$ B transcription factor activating-signalling pathways (Estornes and Bertrand, 2014). Therefore, cIAP1 is an important regulator of immune and inflammatory responses. In undifferentiated healthy cells and in some tumour cells, cIAP1 is expressed in the cell nucleus (Cartier et al., 2011a; Che et al., 2012; Plenchette et al., 2004a; Tanimoto et al., 2005) where it interacts with E2F1 protein (Cartier et al., 2011a). In the present study, we shall demonstrate that cIAP1 induces a K63-ubiquitination of E2F1 on lysine cluster 161 /164, which is preceded by an arginine methylation step. The mutation of both lysine residues completely abolishes the transcriptional activity of E2F1 and its recruitment onto target gene promoters. The cIAP1-dependent K63-ubiquitination is observed in the S phase of the cell cycle, when E2F1 activity is maximal and is required for the stabilization and the activation of E2F1 upon genotoxic stress.

## Results

### 1. **clAP1 stabilizes E2F1 protein expression in an E3 ligase-dependent manner.**

We previously demonstrated that clAP1 interacted with E2F1 transcription factor and could stimulate its transcriptional activity (Cartier et al., 2011a). Here, we show that the capacity of clAP1 to enhance E2F1 activity is associated with a drastic increase in E2F1 protein expression (Figure 1 A-C). Importantly, both properties are conserved when the E3-ligase activity of clAP1 is abolished by H588A mutation within the RING domain of clAP1 but are lost when the clAP1 F616A mutation (Figure 1A) prevents the formation of IAP dimers (Feltham et al., 2011). PYR41, a molecule that blocks the ubiquitination enzymatic reaction by inhibiting E1-ubiquitin enzymes, prevents the clAP1-mediated increase in E2F1 expression and decreases the capacity of clAP1 to stimulate E2F1 in a dose-dependent manner (Figure 1B). Therefore we expressed H588A clAP1 mutant in clAP1-deficient murine embryonic fibroblasts and observed its inability to stimulate E2F1 activity and to increase E2F1 protein level (Figure 1C). Altogether, these results suggest that, in clAP1-expressing cells, the E3-ligase defective H588A clAP1 recruits the endogenous clAP1 to enhance E2F1 protein level and to stimulate its activity in an E3-ligase dependent manner. Interestingly, the expression of clAP1 F616A induces a weak decrease in E2F1 expression (Figure 1A & Supplementary Figure 1A). Treatment of cells with the proteasome inhibitor MG132 stabilizes the expression of both E2F1 and clAP1 and completely masks the effect of clAP1 and the F616A clAP1 mutant on E2F1 expression (supplementary Figure 1A), suggesting a stabilization of E2F1 by clAP1 and a proteasome-mediated degradation of E2F1 in the presence of the clAP1-F616A mutant that could acts as a dominant negative form. We confirmed the capacity of clAP1 to stabilize E2F1 protein expression by analysing the expression of E2F1 in the presence of the protein translation inhibitor cycloheximide (Figure 1D).

A downregulation of clAP1 by using siRNA slightly decreases endogenous E2F1 level in U2OS (Figure 1E) and HeLa cells (Figure 1F, supplementary Figure 1B) and sensitizes E2F1 to Skp2 or Cdh1 E3 ubiquitin ligase-mediated degradation (Figure 1F). Proteasome inhibitor MG132 prevents the cdh1-mediated down-regulation of E2F1 (Supplementary Figure 1B). We also observed a weak downregulation of E2F1 in cells treated with GDC-0152, an IAP antagonist known to induce a very quick degradation of clAP1 (Figure 1E). Overall, our data demonstrate that clAP1, in a dimer form, induces an E3-ubiquitin ligase dependent stabilization of E2F1.

## 2. **cIAP1 induces K63-ubiquitination of E2F1 on clustered lysine residue 161 and 164.**

An *in vitro* ubiquitination assay by using recombinant proteins demonstrates that cIAP1 can directly promote the poly-ubiquitination of E2F1 (Figure 2A). When overexpressed in HeLa cells, cIAP1 induces the poly-ubiquitination of E2F1, as demonstrated by pulling-down ubiquitinated proteins by using tandem ubiquitin binding entities (TUBEs), which was abolished by mutating the F616 dimerisation site (Figure 2B & Supplementary Figure 2A). By using ubiquitin mutants in which all lysine residues except K11, or K48, or K63 residues were mutated into arginine residues, we demonstrated that cIAP1 can promote the conjugation of K11, K48 or K63 poly-ubiquitin chains (Figure 2C & Supplementary Figure 2A) on E2F1. The capacity of cIAP1 to promote K63-ubiquitination of E2F1 was confirmed by using K63-linkage-specific TUBEs (Figure 2B). An analysis of the ubiquitin profile of E2F1 in HeLa cells revealed a very strong content of K11-ubiquitinated E2F1, a lower K48-ubiquitinated E2F1 and a very low K63-ubiquitinated form of E2F1 at basal, and overexpression of cIAP1 promoted the accumulation of the K11- and K63-polyubiquitinated forms and decreased the K48-ubiquitinated form of E2F1 (Figure 2D). We then confirmed the capacity of cIAP1 to induce the accumulation of the K63-ubiquitinated form of E2F1 by using a K63-linkage specific anti-ubiquitin antibody (Figure 2E).

E2F1 protein contains 14 lysine residues, which are all potential acceptors for ubiquitin chains (Figure 2F). We constructed E2F1 mutants in which each lysine residue was replaced by an arginine residue and analysed the capacity of cIAP1 to stimulate the transcriptional activity of these E2F1 mutants using a gene reporter assay (Figure 2G). We did not observe any correlation between the level of expression of E2F1 and its transcriptional activity. As already reported (Marzio et al., 2000b), mutation of the lysine cluster 117/120/125, which is an acetylation site, strongly increased E2F1 transactivation activity (Figure 2G). The ability of cIAP1 to promote wt E2F1 activity was retained by E2F1 mutants, except the K161R/164R mutant for which cIAP1 was completely inactive and the K185R whose strong basal transactivation activity was weakly enhanced by cIAP1 (Figure 2G).

The ubiquitination assays revealed that cIAP1 fails to promote the ubiquitination of the K161R/K164R E2F1 mutant (Figure 2H, supplementary Figure 2B), even though it can still bind the protein, as demonstrated by co-immunoprecipitation (Figure 2I). Curiously, the K161/164R E2F1 mutant was strongly expressed and ubiquitinated at the basal state (Figure 2H & Supplementary figure 2B). Lastly, cIAP1 bound and promoted the accumulation of the ubiquitinated K185R E2F1 mutant as efficiently as the E2F1 wt (Supplementary Figure 2C). Altogether, our results argued in favour of cIAP1 inducing ubiquitination of E2F1 on clustered lysine residues 161 and 164 within the DNA-binding domain.

### **3. The E2F1 lysine cluster 161/164 is required for E2F1 transcriptional activity.**

Mutations of the lysine cluster 1 (Kcl1: K117/K120/K125), lysine cluster 2 (Kcl2: K182/K183/K185) and/or lysine cluster 3 (Kcl3: K226/K287/K289/K310) conserve 70 to 85 % of E2F1 transcriptional activity measured with the wildtype protein (Figure 3A). Remarkably, an additional double mutation of K161R/K164R dramatically disrupts the E2F1 transcriptional activity (Figure 3A). As observed above, the constructs that contain K161R/K164R mutation are strongly expressed compared to their control counterparts (Figure 3A). E2F1 constructs that contain no (K0), only one (K89) or only 2 (K89 and K137) lysine residues have a very weak transcriptional activity and the presence of K161 and K164 is sufficient to restore 75% of the E2F1 transcriptional activity (Figure 3B), further demonstrating the importance of these 2 residues. Because HeLa cells express E6 and E7 proteins from HPV (human papillomaviruses) that could affect the activity of E2F1, we used U2OS cells for functional analysis. The concomitant K161R and K164R mutations completely abolished the capacity of E2F1 to induce *CCNE*, *TP73* and *APAF1* mRNA expression (Figure 3D) and to bind the corresponding gene promoters (Figure 3E), even though the double mutation of K161/164 did not alter the capacity of E2F1 to bind its co-factor DP1 that is required for the binding of transcription factor to DNA (Figure 3F). We subsequently expressed E2F1 wild type and its K161R/K164R E2F1 double mutant in U2OS cells and measured cells proliferation by using crystal violet staining (Figure 3G). E2F1 overexpression was found to significantly slow down cell proliferation while the mutant did not. Overall, our data suggest that cIAP1-mediated K63-ubiquitination may be required for E2F1 to regulate gene transcription. We then performed a global analysis of E2F1 recruitment on chromatin by a chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) and showed that silencing of cIAP1 drastically decreases the E2F1 enrichment library (supplementary Figure 3) demonstrating the essential role of the cIAP1 E3-ubiquitin ligase.

### **4. DNA damage induces cIAP1-mediated K63-ubiquitination of E2F1.**

We evaluated the role of c-IAP1-mediated ubiquitination of E2F1 in DNA damage-induced stabilization of the protein, which is illustrated here in U2OS cells treated with increasing concentrations of the topoisomerase inhibitor etoposide (Figure 4). Silencing of cIAP1 decreased the basal expression level of E2F1 and abolished the increase in its expression upon exposure to etoposide (Figure 4A). Etoposide treatment induced accumulation of K63-ubiquitinated E2F1 with an ubiquitination profile equivalent to the one observed after cIAP1 overexpression, an effect prevented by cIAP1 silencing (Figure 4B & 4C). The K161R/K164R double mutation inhibited etoposide-induced stabilization (Figure 4D) and K63-ubiquitination (Figure 4E) of E2F1.

Downregulation of cIAP1 by using either siRNA or GDC-0152 prevented etoposide from inducing the expression of the E2F1 target-, DNA damage responsive-gene *tp73* (Figure 4F).



## **5. The importance of Arginine methylation in cIAP1-mediated ubiquitination of E2F1**

The protein stability and activity of E2F1 upon DNA damage is regulated by PRMT-1 dependent arginine methylation (Zheng et al., 2013). Inhibition of PRMT-1 with its specific inhibitor AMI-1 decreased the capacity of cIAP1 to stabilize E2F1 protein expression (Figure 5A), to induce accumulation of poly-ubiquitinated E2F1 (Figure 5B) and to stimulate E2F1 activity in a dose dependent manner (Figure 5C). AMI-1 also decreased etoposide-induced ubiquitination of E2F1 (Figure 5B). Finally, silencing of PRMT1 partially prevented cIAP1-mediated accumulation of ubiquitinated E2F1 (Figure 5D & Supplementary Figure 4). We also observed an inhibition of cIAP1-mediated K63-ubiquitination after silencing of PRMT5 (Figure 5D & Supplementary Figure 4) that promotes arginine methylation in cycling cells (Cho et al., 2012b), suggesting that K63-ubiquitination could also be cell cycle regulated.

## **6. cIAP1-mediated K63-ubiquitination of E2F1 is cell cycle regulated**

The expression and the activity of E2F1 peaks in early S-phase of cell cycle. At the end of the S phase, the cyclin A/cdk2 complex binds to and phosphorylates E2F1, leading to its inactivation and its subsequent degradation. To assess the role of cIAP1-mediated ubiquitination of E2F1 in its accumulation during the S phase, we downregulated cyclin A to block cell cycle progression in late S-G2 (Supplementary Figure 5) and freeze E2F1 in its S-phase, active-state. Silencing of cyclin A induced a strong increase in E2F1 expression (Figure 6A) and revealed a K63-ubiquitination of the transcription factor (Figure 6B). These two events were completely abolished by cIAP1 depletion using siRNAs (Figure 6A & B). The K161R/K164R E2F1 mutant resisted to cyclin A siRNA-induced accumulation (Figure 6C) and K63-ubiquitination (Figure 6D) thus demonstrating the importance of these two lysine residues in the cell cycle-dependent regulation of E2F1 expression level.

In the G1 phase, E2F1 is maintained in an inactive state by binding to Rb and phosphorylation of Rb releases E2F1, allowing E2F1 activation and G1/S phase transition. Overexpression of Rb in HeLa cells, which are Rb-deficient, did not affect the ubiquitination status of E2F1 (Supplementary Figure 5B) and downregulation of Rb in U2OS cells, which express wild-type Rb, decreased S phase (Supplementary Figure 5A) and slightly decreased E2F1 ubiquitination (Supplementary Figure 5C). Conversely, overexpression of cIAP1 in U2OS cells increased the phosphorylation of Rb (Figure 6E).

Actually, an *in vitro* competition experiment indicated that cIAP1 competes with Rb for E2F1 binding (Figure 6F), suggesting that cIAP1 could favour Rb-E2F1 dissociation to promote E2F1 activation (Figure 6G).

#### 4) Discussion

The present report highlights a novel level of regulation of the stability and activity of E2F1 protein by a non-degradative ubiquitination process. The turnover of E2F1 is central in the regulation of its transcriptional activity. E2F1 expression peaks at the end of G1 phase of the cell cycle to promote the activation of genes required for the G1-S phase transition and the initiation of DNA synthesis. The expression of E2F1 also considerably rises in response to DNA damage, contributing to the apoptotic response to such damage. The genotoxic stress-induced stabilization of E2F1 was shown to involve multiple interconnected post-translational modifications, *i.e.* double-strand DNA breaks promote E2F1 phosphorylation on serine residues 31 (Lin et al., 2001b) and 364 (Stevens et al., 2003), its acetylation on lysine cluster 117, 120 and 125 (Ianari et al., 2004; Pediconi et al., 2003), its methylation at Arginine 109 (Zheng et al., 2013), its demethylation on lysine 185 (Kontaki and Talianidis, 2010a) and arginine 111/113 cluster (Zheng et al., 2013) and its deNEDDylation (Aoki et al., 2013). DNA damage was also shown to promote an ubiquitination of E2F1 (Galbiati et al., 2005). Here, we demonstrate an accumulation of K63-ubiquitinated E2F1 in cells treated with etoposide as well as in those locked in the S phase. The K63 ubiquitination occurs on lysine 161/164 residues of E2F1 and requires cIAP1 E3-ubiquitin ligase.

Although other IAPs including cIAP2 and XIAP also behave as E3-ubiquitin ligases, only cIAP1 stimulates E2F1 activity (Cartier et al., 2011a). cIAP1, in a dimer form (Feltham et al., 2010; Nakatani et al., 2013), is able to promote the conjugation of K11, K48 and K63 ubiquitin chains onto protein substrates. cIAP1-mediated K11- and K63- ubiquitination has been involved in several ubiquitin-dependent cell signalling events (Estornes and Bertrand, 2014), e.g. in the regulation of NF- $\kappa$ B activating- and TNFR-signalling pathways. More specifically, cIAP1-driven K11- and K63-ubiquitination of the kinase RIP1 favours the assembly of a cell signalling protein platform that leads to NF- $\kappa$ B activation while preventing the formation of a RIP1-containing complex that induces cell death (Bertrand et al., 2008; de Almagro et al., 2015; Dynek et al., 2010a; Varfolomeev et al., 2008). A role of cIAP1 in transcription regulation has also been described, e.g. cIAP1 promotes K48-linked ubiquitin chain conjugation and degradation of the myc antagonist Max-dimerization protein-1 (Mad-1) (Xu et al., 2007) and the transcription factor CHOP (C/EBP homologue protein) (Qi and Xia, 2012).

Similar functions by other IAPs include the ability of XIAP to favour Wnt-dependent transcription program by mediating the mono-ubiquitination of Groucho (Gro)/TLE transcription co-repressor (Hanson et al., 2012) and the K63-ubiquitination of IFR1 (interferon-regulatory factor 1) by cIAP2 (Harikumar et al., 2014).

As observed for RIP1 (Bertrand et al., 2011), cIAP1 can promote the conjugation of K11, K48 and K63-linkage ubiquitin chains on E2F1. However, it induces the stabilization of K11- and K63-ubiquitinated forms. From our knowledge, the K48-ubiquitination of E2F1 has never been described while its K11-ubiquitination has been associated with proteasomal degradation (Budhavarapu et al., 2012). Additional work will be required to clarify the consequences and cellular context of cIAP1-mediated K11 and K48-ubiquitination.

We cannot also rule out the presence of heterogeneous branched ubiquitin chains as recently reported in NF- $\kappa$ B signaling pathway (Ohtake et al., 2016a). A K63-ubiquitination of E2F1 has recently been observed but the consequences were not clearly defined (Mahanic et al., 2015b; Wang et al., 2015a). K63-linked ubiquitin chains are the second most abundant ubiquitin signal in mammalian cells. K63 ubiquitination of proteins is involved in DNA repair, kinase activation, membrane protein internalization, intracellular vesicular trafficking and signalling protein complex assembly (Erpapazoglou et al., 2014). Our data identified a function for K63-ubiquitination in cell cycle regulation through E2F1 protein stabilization. K63-poly-ubiquitination may counteract the binding of other protein modifiers involved in protein degradation or favour the recruitment of protein chaperones. Accordingly, a downregulation of cIAP1 sensitized E2F1 to *skp2* and *cdh1*-mediated degradation (Figure 1 F) and overexpression of cIAP1 decreased the pool of K48-ubiquitinated E2F1 (Figure 2D). Moreover, the mutation of K161/164, which are target residues for cIAP1-mediated ~~K63~~ ubiquitination, was shown to strongly increased E2F1 NEDDylation (Loftus et al., 2012b), a post-translational modifications that results in a decrease of E2F1 stability. Stabilization of E2F1 requires Prmt-mediated arginine methylation. Whereas Prmt-1 is important for E2F1 stabilization upon DNA damage (Zheng et al., 2013), Prmt-5 promotes arginine methylation in cycling cells (Cho et al., 2012b). Here, we show that downregulation or inhibition of either Prmt-1 or Prmt-5 decreases cIAP1-mediated accumulation of ~~K63~~-ubiquitinated E2F1, demonstrating that arginine methylation is required for E2F1 ubiquitination by cIAP1.

Two main checkpoints control E2F1 activity during the S phase. The first one involves Rb that associates with and represses E2F1 before S phase entry. Rb overexpression does not affect K63-ubiquitination of E2F1. We showed that cIAP1 competes with Rb for E2F1 binding and that cIAP1 overexpression increases the phosphorylation of Rb, suggesting that cIAP1 could favour Rb-E2F1 dissociation to promote E2F1 activation and S phase initiation (Figure 6G). The second checkpoints is at the end of the S phase, when cyclin A:Cdk2 complex binds to and phosphorylates E2F1, leading to the protein inactivation and subsequent degradation by *skp2*-dependent UPS. We identified an additional level of regulation of this checkpoint by demonstrating that cyclin A affects the K63-ubiquitination of E2F1 (Figure 6G).

The cluster of lysine 161 and lysine 164 residues has been shown to be a target of cIAP1-mediated E2F1 ubiquitination. In addition to completely abolishing the S-phase dependent and the DNA-damage-induced accumulation of E2F1, the mutation of K161/K164 cluster also radically affects E2F1 transcriptional activity, *i.e.* its capacity to bind *CCNE*, *TP73* and *APAF1* gene promoters. Consistent with these observations, downregulation of cIAP1 was found to block the etoposide-induced expression of *TP73* and drastically prevents E2F1 recruitment on gene chromatin. These results are in accordance with our previous work showing that silencing of cIAP1 prevented E2F1 recruitment on *CCNE* gene promoter and inhibited E2F1-dependent expression of *CCNE* and *CCNA* genes in cycling cells (Cartier et al., 2011a).

We also showed that cIAP1, which interacts with E2F1 in all phases of the cell cycles, is recruited, along with E2F1, onto E2F binding sites of *CCNE* and *CCNA* promoters during the S phase, when E2F1 activity is maximal (Cartier et al., 2011a). Our current results suggest that E2F1 ubiquitination is key in inducing E2F1 interaction with these target gene promoters, probably through recruitment of transcriptional co-regulators containing ubiquitin binding modules (Rahighi and Dikic, 2012) to form transcriptional complexes. The deubiquitinases (DUB) POH1 and UCH37, both described as a K63-DUB, were shown to regulate E2F1 stability or activity, although with opposite effects (Mahanic et al., 2015b; Wang et al., 2015a). POH1-mediated-deubiquitination appeared to lead to E2F1-stabilization (Wang et al., 2015a) while UCH37-mediated deubiquitination enhanced E2F1 transcriptional activity (Mahanic et al., 2015b). The role of each of these two DUB in removing cIAP1-conjugated K63-ubiquitin chains from E2F1 merits further investigations. Mutation of E2F1 K161/164 does not completely abolish E2F1 K63-ubiquitination profile (Figure 2H) meaning that other lysine residues may be conjugated with K63-ubiquitin chains, a modification that could involve another E3 ligase than cIAP1.

In summary, we identified cIAP1 as an E3-ubiquitin ligase able to promotes the conjugation of K11, K48 and K63-ubiquitin chains on E2F1. cIAP1 induces the stabilization of the transcription factor and allows its recruitment onto target gene promoters.

Regulation of E2F1 activity through cIAP1-mediated K63-ubiquitination was observed both in the S phase of the cell cycle and in response to DNA damage, two situations in which E2F1 transcriptional activity is required, suggesting a general mechanism of E2F1 activity regulation. These results suggest that IAP-targeting molecules could be tested for their ability to overcome E2F1 activity in tumour cells, *e.g.* in an Rb-compromised setting.

## Materials and Methods

### Cell Culture and treatment.

Human Cervical Carcinoma Cell line (HeLa), human Osteosarcoma epithelial cell line (U2OS) and mouse embryonic immortalized (SV40) fibroblasts (MEF) *clAP1<sup>-/-</sup>/clAP2<sup>-/-</sup>* (J. Silke, Melbourne, Australia), were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Dominique Dutscher, South America) or RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Dominique Dutscher) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Dominique Dutscher) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 95% humidity. Cells were treated with 10 or 20 μM Etoposide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 6h, 100μg/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich), 10-35μM PYR-41 (Calbiochem, Merck, Germany) for 24 hrs, 0.1-100μM AMI-I (Enzo Life Sciences, France) for 24 hrs, or 1μM GDC-0152 (Selleckmed, Euromedex, Souffelweyersheim, France). MG132 (Sigma-Aldrich,) was used at 1μM or 5μM overnight.

**Plasmid constructs and siRNA Transfections.** Plasmids used were pCI empty vector, pCI-clAP1, pCI-clAP1-H588A, pCMV-βGal, pCMV-HA-DP1, pGL3 human CCNE promoter (Cartier et al., 2011a); pcDNA3.1-6His-Ub wt, 6His-Ub-K11only, 6His-Ub-K48only and 6His-Ub-K63only mutants in which all K have been mutated into R except the K11, K48 or K63; pCMV-HA-E2F1wt and pCMV-HA-E2F1 K117/120/125R (Marzio et al., 2000b), pCMV-3HA-E2F1 and pCMV-3HA-E2F1-K185R (Kontaki and Talianidis, 2010a); pCMV-Flag-E2F1 wt and mutants that contain no lysine (K0) or only K89 (K1), K89 and K137 (K2), K89, K137, K161 and K164 (K4) or in which K117/120/125(cluster 1), K182/183/185(cluster 2) and/or K226/287/289/310 (cluster 3) have been mutated into R (Aoki et al., 2013); pcDNA3-myc-skp2 (addgene plasmid #19947)(Ohta and Xiong, 2001a); pCS2-HA-cdh1 (addgene plasmid #11596)(Pfleger et al., 2001). The pCI-clAP1-F616A mutant was obtained by site-directed mutagenesis from pCI-clAP1 with GENEART® Site-Directed Mutagenesis system (Invitrogen, Life Technologies, California, USA) by using the following primers: forward (5'-CAA-GGG-TAC-TGT-TCG-TAC-AGC-TCT-CTC-ATA-ATC-GAC-CCG-3'), reverse (5'-CGG-GTC-GAT-TAT-GAG-AGA-GCT-GTA-CGA-ACA-GTA-CCC-TTG-3'). The pCMV-3HA-E2F1 mutants (K89R, K137R, K161/164R, K181-183R, K266R, K287-289R, K310R) were obtained by site-directed mutagenesis from pCMV-3HA-E2F1 (GenScript, New Jersey, USA).

Plasmids constructs were transiently transfected using JetPEI (Polyplus transfection, Ozyme, France). Lipofectamine® RNAimax reagent (Fischer Scientific) was used to transfect siRNAs. RNA oligonucleotides are designed and purchased from Qiagen for clAP1, Rb, cyclin A and control siRNA or Ambion (Life technologies) for PRMT1 and PRMT5 siRNA.

**Gene Reporter Assay.** The transactivation activity of E2F1 was analysed as previously described (Cartier et al., 2011a).

**Cellular extracts and Western Blot analysis.** Cells were lysed in RIPA Buffer (NaCl 150mM, NP40 1%, Deoxycholate Sodium (DOC) 0.5%, SDS 0.1%, Tris pH7.5 50 mM and protease inhibitor cocktail). Proteins were separated on SDS-PAGE and electro-transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, France). Blots were probed with the following antibodies: a rabbit polyclonal anti-E2F1 (C20), a mouse monoclonal anti-HSC70 and a mouse monoclonal anti-PRMT5 (A-11) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), a goat polyclonal anti-cIAP1 from R&D systems; a rabbit polyclonal anti-PRMT1 from Upstate, Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), a mouse anti- $\beta$ -actin (AL978) and a mouse anti- $\alpha$ -tubulin (clone AA13) from Sigma, a monoclonal FK2-HRP-conjugated anti-ubiquitin (mono and poly-ubiquitin chains), a monoclonal HRP-conjugated anti-K63-linkage specific ubiquitin (HWA4C4) from Enzo Life Sciences, a mouse monoclonal anti-HA.11 (Biolegend, San Diego, USA), a mouse anti-cyclin A (BD Biosciences), a mouse anti-Myc, a rabbit anti-Rb and a rabbit anti-phospho-Rb (Ser780 or Ser807/811)(Cell Signaling technology). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Clarity™ western ECL substrate, BioRad, France).

#### **Ubiquitylation Assay.**

For the *in vitro* ubiquitination assay, GST-E2F1 fusion protein was produced in *Escherichia coli* by using the pGEX-E2F1 construct, immobilized on glutathione-sepharose beads (GE Healthcare, France) and incubated at 37°C for 1 h with recombinant cIAP1 (R&D system™ Minnesota, US), 100nM of recombinant human E1 ubiquitin-activating enzyme UBE1 (Boston Biochem), 1.5  $\mu$ g of recombinant human E2 enzyme Ubc H5a/UBE2D1 (Boston Biochem), 0.2 mM of recombinant human ubiquitin and (R&D systems) in a buffer containing 75 mM Tris pH 8.2 mM DTT, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 4mM ATP. Glutathione-sepharose beads were then washed and proteins were eluted in Leammli buffer. E2F1 ubiquitination was revealed using anti-E2F1 antibody immunoblotting.

For the ubiquitination assays, HeLA cells were transfected with 5 $\mu$ g of each plasmid encoding Ubiquitin wt or mutants, HA-E2F1 wt or mutants, cIAP1 wt or mutants. Cells were treated overnight with 1 $\mu$ M MG132 (Sigma) and with the non-selective DUB inhibitors PR619 10 (LifeSensors, Tebu-bio SAS, France) before cell lysis.

Ubiquitinated proteins were pulled-down following the manufacturer instructions by using cobalt beads (Clontech) or by using Flag-conjugated anti-K63 TUBE, Agarose-TUBE and GST-TUBE (Tandem Ubiquitin Binding entities, LifeSensors, Tebu-bio SAS, France) and revealed by using anti-E2F1 antibody. For the analysis of ubiquitination profile of E2F1, 3HA-E2F1 was immunoprecipitated with anti-E2F1 or anti-HA antibody and revealed by using monoclonal FK2-HRP-conjugated anti-ubiquitin (mono and poly-ubiquitin chains) or a monoclonal HRP-conjugated anti-K63-linkage specific ubiquitin (HWA4C4) (Enzo Life Sciences).

**Immunoprecipitation (IP).** Cells ( $10^6$ /conditions) were transfected with plasmids encoding E2F1 wt or K161/164R mutant, cIAP1 wt or DP1. Forty eight hours after transfection, cells were washed with PBS and lysed in IP Lysis buffer (150 mM de NaCl, 50mM Tris HCl pH 7,4, 20mM EDTA, 0,5% NP40, 1mM DTT, 5mM NEM (N-Ethylmaleimide) (Sigma-Aldrich) and protease inhibitors) for 30 min at 4°C. Lysate supernatants were precleaned by using 20µl of Protein A/G+ Agarose beads (Sigma) and incubated (overnight, 4°C) with rabbit polyclonal anti-E2F1 (C20) antibody (Santa Cruz biotechnology), mouse IgG1 purified anti-HA.11 (Biolegend, San Diego, USA), goat polyclonal anti-cIAP1 (R&D systems) or Igg anti-mouse or anti-rabbit antibody. Beads were then washed in IP lysis buffer and denaturated in Laemmli buffer before immunoblot analysis.

**GST-pull down analysis.** GST-pull down analysis was performed as previously described (Marivin et al., 2014)

**RNA Purification, reverse Transcription, Real-time PCR (qPCR).** Total RNAs were isolated using TRIzol Reagent® (Invitrogen). RNA quality was ascertained using a nanospectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, USA). Total RNA (1µg) was reverse- transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. Quantitative Real-time PCR was performed with 7500 Fast thermocycler or StepOne plus system (Applied Biosystem) using SYBR Green detection protocol and the following Primers: TP73 promoter forward: 5'-TGA-GCC-ATG-AAG-ATG-TGC-GAG-3', reverse: 5'-GCT-GCT-TAT-GGT-CTG-ATG-CTT-ATG-3'; APAF1 promoter forward: GGA-GAC-CCT-AGG-ACG-ACA-A; reverse: CAG-TGA-AGC-AAC-GAG-GAT-GC; CCNE promoter forward: CC-ATC-GGC-CAT-CTT-CCT-GGC-TC, reverse: TCA-GGC-CGC-GGG-CCC-AGT-A; CCNE forward: GCC-AGC-CTT-GGG-ACA-ATA-ATG, reverse: CTT-GCA-CGT-TGA-GTT-TGG-GT; P73 forward: GAC-GAG-GAC-ACG-TAC-TAC-CTT, reverse: CTG-CCG-ATA-GGA-GTC-CAC-CA; APAF1 forward: TCA-CTG-CAG-ATT-TTC-ACC-AGA, reverse: CCT-CTC-ATT\_TGC-TGA-TGT-CG; HPRT forward: GGA-CAG-GAC-TGA-ACG-TCT-TGC, reverse: CTT-GAG-CAC-ACA-GAG GGC-TACA.

**Chromatin Immunoprecipitation.** HeLa cells ( $1.5 \times 10^6$ /conditions) were transfected with 5  $\mu$ g of pCMV-3HA E2F1 wt or K161/164R mutant encoding vectors and 10  $\mu$ g of PCI control vector, then protein/DNA complexes were cross-linked with formaldehyde 1%. Chromatin was isolated and digested with micrococcal nuclease. Ten percent of lysate containing the digested chromatin was conserved for input. The remaining lysate is diluted and immunoprecipitated using 5  $\mu$ g of rabbit anti-E2F1 (C-20) or rabbit control IgG (Santa Cruz biotechnology) overnight. Elution and DNA recovery were performed according to recommendation of PIERCE™ Agarose Chip Kit (Thermo Scientific). Specific Chromatin associated with interest protein was analysed by qPCR as described above.

**Cell proliferation.** U2OS cells were transfected with pCMV-3HA E2F1 wt or K161/164R mutant encoding vectors. Twenty-four hours later, transfected 20000 U2OS cells were implanted in 6 well plate for 6 days. Six days later, cells were fixed by ethanol (100%) and stained with crystal violet. Crystal violet staining was eluted with acetic acid (33%) and the optical density at 620nm was measured with a plate reader (UVM 340, Biochrom, Cambourne, UK).

**Cell cycle analysis.** U2OS cells ( $0.65 \times 10^5$ /conditions) were transfected with 20  $\mu$ M of control or cyclin A-siRNA, or 50  $\mu$ M Rb-siRNA. Cell cycle is evaluated by using the BrdU Flow kit (BD Bioscience) 48 hours after transfection according to manufacturer instruction and cell cycle repartition was assessed by BD FACS Canto II flow cytometer using flowing software 2.

**Statistical analysis.** Student's t test or the Mann–Whitney Wilcoxon test was used for statistical analysis.

## Acknowledgments

We thank Dr Plenchette for His-ub mutant constructs, Dr Gotoh, Dr Giacca and Dr Talianidis for E2F1 mutant constructs, Dr Yue Xlong for skp2 and Dr Kieschner for cdh1 constructs, Dr LeRomancer for Prmt antibodies. We thank Olivier Micheau and Catherine Paul for enriching discussions and proof reading of the manuscript. This work was supported by grants from the “Comités de Côte d’Or et de l’Yonne” of the “Ligue Contre le Cancer” (LD), the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC to LD), the European Union and the “Conseil Régional de Bourgogne”, a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021, and fellowships from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” of France (to JA, JB, JC), “Ligue Nationale Contre le Cancer” (VG) and the “Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)(to JB). The authors declare no conflict of interest.



## Conflict of Interest

Authors declare to have no conflict of interest.

## Author contributions

VG and JA performed most of the experiments. JB first identified the ubiquitination of E2F1, conceived and initiated the work. BD, PMB, CK, JC, performed additional western-blot analysis and gene reporter assays. ND performed ChIP-seq analysis. SG performed GST-pull down experiments. GM, DG performed analysis of E2F1 and its mutants, RB brought expertise in ChIP analysis. CG and ES corrected the paper and LD conceived and supervised the project, analysed the data and wrote the paper with input from all authors.

## References

Alonso, M.M., Fueyo, J., Shay, J.W., Aldape, K.D., Jiang, H., Lee, O.H., Johnson, D.G., Xu, J., Kondo, Y., Kanzawa, T., *et al.* (2005). Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst* 97, 1589-1600.

Annicotte, J.S., Blanchet, E., Chavey, C., Iankova, I., Costes, S., Assou, S., Teyssier, J., Dalle, S., Sardet, C., and Fajas, L. (2009). The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol* 11, 1017-1023.

Aoki, I., Higuchi, M., and Gotoh, Y. (2013). NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* 32, 3954-3964.

Bandara, L.R., Lam, E.W., Sørensen, T.S., Zamanian, M., Girling, R., and La Thangue, N.B. (1994). DP-1: a cell cycle-regulated and phosphorylated component of transcription factor DRTF1/E2F which is functionally important for recognition by pRb and the adenovirus E4 orf 6/7 protein. *EMBO J* 13, 3104-3114.

Bashyam, M.D., Bair, R., Kim, Y.H., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Karikari, C.A., Tibshirani, R., Maitra, A., and Pollack, J.R. (2005). Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia* 7, 556-562.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.

Bele, A., Mirza, S., Zhang, Y., Ahmad Mir, R., Lin, S., Kim, J.H., Gurumurthy, C.B., West, W., Qiu, F., Band, H., *et al.* (2015). The cell cycle regulator ecdysoneless cooperates with H-Ras to promote oncogenic transformation of human mammary epithelial cells. *Cell Cycle* 14, 990-1000.

Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22, 161-167.

Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 518-528.

Bertrand, M.J., Doiron, K., Labbé, K., Korneluk, R.G., Barker, P.A., and Saleh, M. (2009). Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* *30*, 789-801.

Bertrand, M.J., Lippens, S., Staes, A., Gilbert, B., Roelandt, R., De Medts, J., Gevaert, K., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2011). cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PLoS One* *6*, e22356.

Bertrand, M.J., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* *30*, 689-700.

Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* *68*, 2521-2528.

Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer research* *72*, 13-17.

Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., *et al.* (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* *417*, 149-160.

Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* *19*, 3704-3713.

Bornstein, B., Gottfried, Y., Edison, N., Shekhtman, A., Lev, T., Glaser, F., and Larisch, S. (2011). ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists. *Apoptosis* *16*, 869-881.

Budhavarapu, V.N., White, E.D., Mahanic, C.S., Chen, L., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2012). Regulation of E2F1 by APC/C Cdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation. *Cell Cycle* *11*, 2030-2038.

Budhidarmo, R., and Day, C.L. (2015). IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* *39*, 80-90.

Cao, Z., Li, X., Li, J., Luo, W., Huang, C., and Chen, J. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) lacking RING domain localizes to the nuclear and promotes cancer cell anchorage-independent growth by targeting the E2F1/Cyclin E axis. *Oncotarget* *5*, 7126-7137.

Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., *et al.* (2011a). Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 26406-26417.

Cartier, J., Berthelet, J., Marivin, A., Gemble, S., Edmond, V., Plenchette, S., Lagrange, B., Hammann, A., Dupoux, A., Delva, L., *et al.* (2011b). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription. *J Biol Chem* *286*, 26406-26417.

Cataldo, A., Cheung, D.G., Balsari, A., Tagliabue, E., Coppola, V., Iorio, M.V., Palmieri, D., and Croce, C.M. (2016). miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response. *Oncotarget* *7*, 786-797.

Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* *20*, 7342-7351.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y., and Datta, P. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* *104*, 769-780.

Chaussepied, M., and Ginsberg, D. (2004). Transcriptional regulation of AKT activation by E2F. *Mol Cell* *16*, 831-837.

Che, X., Yang, D., Zong, H., Wang, J., Li, X., Chen, F., Chen, X., and Song, X. (2012). Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients. *Urol Oncol* *30*, 450-456.

Chen, J., Zhu, F., Weeks, R.L., Biswas, A.K., Guo, R., Li, Y., and Johnson, D.G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* *10*, 1287-1294.

Chen, L., Smith, L., Wang, Z., and Smith, J.B. (2003). Preservation of caspase-3 subunits from degradation contributes to apoptosis evoked by lactacystin: any single lysine or lysine pair of the small subunit is sufficient for ubiquitination. *Mol Pharmacol* *64*, 334-345.

Chen, W., Yang, Y., Chen, B., Lu, P., Zhan, L., Yu, Q., Cao, K., and Li, Q. (2014). MiR-136 targets E2F1 to reverse cisplatin chemosensitivity in glioma cells. *J Neurooncol* *120*, 43-53.

Cheng, L., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Toshkov, I.A., Wang, W., Camps, J., Ried, T., and Nikitin, A.Y. (2010). Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene* *29*, 5700-5711.

Cho, E.C., Zheng, S., Munro, S., Liu, G., Carr, S.M., Moehlenbrink, J., Lu, Y.C., Stimson, L., Khan, O., Konietzny, R., *et al.* (2012a). Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *EMBO J* *31*, 1785-1797.

Cho, E.C., Zheng, S., Munro, S., Liu, G., Carr, S.M., Moehlenbrink, J., Lu, Y.C., Stimson, L., Khan, O., Konietzny, R., *et al.* (2012b). Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *The EMBO journal* *31*, 1785-1797.

Choi, Y.E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C.S., Cohen, G.M., and Bratton, S.B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem* *284*, 12772-12782.

Collart, M.A., Baeuerle, P., and Vassalli, P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* *10*, 1498-1506.

Coller, H.A., Forman, J.J., and Legesse-Miller, A. (2007). "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* *3*, e146.

Creagh, E.M., Murphy, B.M., Duriez, P.J., Duckett, C.S., and Martin, S.J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* *279*, 26906-26914.

Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* *67*, 2168-2174.

Dai, Z., Zhu, W.G., Morrison, C.D., Brena, R.M., Smiraglia, D.J., Raval, A., Wu, Y.Z., Rush, L.J., Ross, P., Molina, J.R., *et al.* (2003). A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet* *12*, 791-801.

- Dar, A.A., Majid, S., de Semir, D., Nosrati, M., Bezrookove, V., and Kashani-Sabet, M. (2011). miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein. *J Biol Chem* 286, 16606-16614.
- de Almagro, M.C., Goncharov, T., Newton, K., and Vucic, D. (2015). Cellular IAP proteins and LUBAC differentially regulate necrosome-associated RIP1 ubiquitination. *Cell death & disease* 6, e1800.
- De Meyer, T., Bijsmans, I.T., Van de Vijver, K.K., Bekaert, S., Oosting, J., Van Criekinge, W., van Engeland, M., and Sieben, N.L. (2009). E2Fs mediate a fundamental cell-cycle deregulation in high-grade serous ovarian carcinomas. *J Pathol* 217, 14-20.
- DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 6, 739-748.
- Denechaud, P.D., Lopez-Mejia, I.C., Giralt, A., Lai, Q., Blanchet, E., Delacuisine, B., Nicolay, B.N., Dyson, N.J., Bonner, C., Pattou, F., *et al.* (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J Clin Invest* 126, 137-150.
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquet, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolonne, N., Chiosis, G., *et al.* (2008). Interaction of heat-shock protein 90 $\beta$  isoform (HSP90 $\beta$ ) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ*.
- Dimova, D.K., and Dyson, N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24, 2810-2826.
- Dogan, T., Harms, G.S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T.K., Alnemri, E.S., Rapp, U.R., and Rajalingam, K. (2008). X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 10, 1447-1455.
- Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J., and McMasters, K.M. (2002). Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 62, 1776-1783.
- Dubrez, L., Berthelet, J., and Glorian, V. (2013). IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 9, 1285-1304.
- Dupoux, A., Cartier, J., Cathelin, S., Filomenko, R., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2009). cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* 113, 175-185.
- Duronio, R.J., and O'Farrell, P.H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin Eis a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* 9, 1456-1468.
- Duronio, R.J., O'Farrell, P.H., Xie, J.E., Brook, A., and Dyson, N. (1995). The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1445-1455.
- Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., *et al.* (2010a). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *The EMBO journal* 29, 4198-4209.
- Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., *et al.* (2010b). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J* 29, 4198-4209.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Ebihara, Y., Miyamoto, M., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Cho, Y., Fukunaga, A., Murakami, S., Uehara, H., Kaneko, H., Hashimoto, H., *et al.* (2004). Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Dis Esophagus* *17*, 150-154.

Eckelman, B.P., Drag, M., Snipas, S.J., and Salvesen, G.S. (2008). The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death Differ* *15*, 920-928.

Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* *281*, 3254-3260.

Edison, N., Reingewertz, T.H., Gottfried, Y., Lev, T., Zuri, D., Maniv, I., Carp, M.J., Shalev, G., Friedler, A., and Larisch, S. (2012). Peptides mimicking the unique ARTS-XIAP binding site promote apoptotic cell death in cultured cancer cells. *Clin Cancer Res* *18*, 2569-2578.

Eletr, Z.M., and Wilkinson, K.D. (2011). An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell Biochem Biophys* *60*, 3-11.

Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist Updat* *13*, 119-131.

Erpapazoglou, Z., Walker, O., and Haguenaer-Tsapis, R. (2014). Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells* *3*, 1027-1088.

Ertosun, M.G., Hapil, F.Z., and Osman Nidai, O. (2016). E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*

Estornes, Y., and Bertrand, M.J. (2014). IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Seminars in cell & developmental biology.*

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2001). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* *20*, 1678-1687.

Fagan, R., Flint, K.J., and Jones, N. (1994). Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* *78*, 799-811.

Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P.D., Shirley, S., Condon, S.M., Chunduru, S.K., McKinlay, M.A., Vaux, D.L., Silke, J., *et al.* (2011). Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *The Journal of biological chemistry* *286*, 17015-17028.

Feltham, R., Moulin, M., Vince, J.E., Mace, P.D., Wong, W.W., Anderton, H., Day, C.L., Vaux, D.L., and Silke, J. (2010). Tumor necrosis factor (TNF) signaling, but not TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)-triggered cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) degradation, requires cIAP1 RING dimerization and E2 binding. *J Biol Chem* *285*, 17525-17536.

Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* *43*, 449-463.

Ferreira, C.G., van der Valk, P., Span, S.W., Jonker, J.M., Postmus, P.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. (2001). Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* *12*, 799-805.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549-561.

Fingas, C.D., Blechacz, B.R., Smoot, R.L., Guicciardi, M.E., Mott, J., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Sirica, A.E., and Gores, G.J. (2010). A smac mimetic reduces TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced invasion and metastasis of cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 52, 550-561.

Fraser, A.G., James, C., Evan, G.I., and Hengartner, M.O. (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* 9, 292-301.

Fujita, Y., Sakakura, C., Shimomura, K., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Aragane, H., Hagiwara, A., Abe, T., Inazawa, J., and Yamagishi, H. (2003). Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Hepatogastroenterology* 50, 1857-1863.

Fulda, S., and Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11, 109-124.

Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4, 930-939.

Galvan, V., Kurakin, A.V., and Bredesen, D.E. (2004). Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Lett* 558, 57-62.

Gamell, C., Gulati, T., Levav-Cohen, Y., Young, R.J., Do, H., Pilling, P., Takano, E., Watkins, N., Fox, S.B., Russell, P., *et al.* (2017). Reduced abundance of the E3 ubiquitin ligase E6AP contributes to decreased expression of the INK4/ARF locus in non-small cell lung cancer. *Sci Signal* 10.

Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Tseng, M.T., Montes de Oca-Luna, R., Zhou, H.S., McMasters, K.M., and Gomez-Gutierrez, J.G. (2012). E2F-1 lacking the transcriptional activity domain induces autophagy. *Cancer Biol Ther* 13, 1091-1101.

Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W.W., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., and Leverkus, M. (2009). Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J Cell Biol* 187, 1037-1054.

Ghari, F., Quirke, A.M., Munro, S., Kawalkowska, J., Picaud, S., McGouran, J., Subramanian, V., Muth, A., Williams, R., Kessler, B., *et al.* (2016). Citrullination-acetylation interplay guides E2F-1 activity during the inflammatory response. *Sci Adv* 2, e1501257.

Goncharov, T., Niessen, K., de Almagro, M.C., Izrael-Tomasevic, A., Fedorova, A.V., Varfolomeev, E., Arnott, D., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., and Vucic, D. (2013). OTUB1 modulates c-IAP1 stability to regulate signalling pathways. *EMBO J* 32, 1103-1114.

Grice, G.L., Lobb, I.T., Weekes, M.P., Gygi, S.P., Antrobus, R., and Nathan, J.A. (2015). The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell Rep* 12, 545-553.

Grzybowska-Izydorczyk, O., Cebula, B., Robak, T., and Smolewski, P. (2010). Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer* 46, 800-810.

- Gu, Y., Cheng, Y., Song, Y., Zhang, Z., Deng, M., Wang, C., Zheng, G., and He, Z. (2014). MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1. *PLoS One* *9*, e102602.
- Guo, R., Chen, J., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2011). GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res* *39*, 1390-1397.
- Guo, X., Guo, L., Ji, J., Zhang, J., Chen, X., Cai, Q., Li, J., Gu, Q., Liu, B., Zhu, Z., *et al.* (2010). miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* *398*, 1-6.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P.C., Zvelebil, M., Bujnicki, J.M., *et al.* (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* *10*, 1309-1317.
- Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* *10*, 561-574.
- Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. (2006). Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes Dev* *20*, 613-623.
- Han, S., Park, K., Bae, B.N., Kim, K.H., Kim, H.J., Kim, Y.D., and Kim, H.Y. (2003). E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* *82*, 11-16.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hanson, A.J., Wallace, H.A., Freeman, T.J., Beauchamp, R.D., Lee, L.A., and Lee, E. (2012). XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling. *Molecular cell* *45*, 619-628.
- Hao, H., Chen, C., Rao, X.M., Gomez-Gutierrez, J.G., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2012). E2F-1 and E2Ftr-mediated apoptosis: the role of DREAM and HRK. *J Cell Mol Med* *16*, 605-615.
- Hao, H., Dong, Y.B., Bowling, M.T., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2006). Alteration of gene expression in melanoma cells following combined treatment with E2F-1 and doxorubicin. *Anticancer Res* *26*, 1947-1956.
- Hao, H., Zhou, H.S., and McMasters, K.M. (2009). Chemosensitization of tumor cells: inactivation of nuclear factor-kappa B associated with chemosensitivity in melanoma cells after combination treatment with E2F-1 and doxorubicin. *Methods Mol Biol* *542*, 301-313.
- Harikumar, K.B., Yester, J.W., Surace, M.J., Oyeniran, C., Price, M.M., Huang, W.C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Yamada, A., Kong, X., *et al.* (2014). K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nature immunology* *15*, 231-238.
- Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun* *302*, 635-645.
- Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* *83*, 1253-1262.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., *et al.* (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 278, 38699-38706.

Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* 12, 377-383.

Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279, 8627-8634.

Hershko, T., Korotayev, K., Polager, S., and Ginsberg, D. (2006). E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 and Wip1. *J Biol Chem* 281, 31309-31316.

Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S., Khanna, K.K., Dittmar, G., and Scheidereit, C. (2010). A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 40, 63-74.

Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., and Bensi, G. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13, 6231-6240.

Hu, S., and Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278, 10055-10060.

Huang, C.L., Liu, D., Nakano, J., Yokomise, H., Ueno, M., Kadota, K., and Wada, H. (2007). E2F1 overexpression correlates with thymidylate synthase and survivin gene expressions and tumor proliferation in non small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 6938-6946.

Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T., and Yuan, Z.M. (1997). Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase. *Cancer Res* 57, 3640-3643.

Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszkowski, D.G., and Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104, 781-790.

Höffner, M., Wirbelauer, C., Humar, B., and Krek, W. (1999). Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* 27, 491-495.

Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 279, 30830-30835.

Iglesias, M., Yen, K., Gaiotti, D., Hildesheim, A., Stoler, M.H., and Woodworth, C.D. (1998). Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. *Oncogene* 17, 1195-1205.

Imai, M.A., Oda, Y., Oda, M., Nakanishi, I., and Kawahara, E. (2004). Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 320-326.

Imoto, I., Tsuda, H., Hirasawa, A., Miura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., and Inazawa, J. (2002). Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* 62, 4860-4866.



Imoto, I., Yang, Z.Q., Pimkhaokham, A., Tsuda, H., Shimada, Y., Imamura, M., Ohki, M., and Inazawa, J. (2001). Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* *61*, 6629-6634.

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* *407*, 645-648.

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J.R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* *21*, 4684-4699.

Ivanova, I.A., Vespa, A., and Dagnino, L. (2007). A novel mechanism of E2F1 regulation via nucleocytoplasmic shuttling: determinants of nuclear import and export. *Cell Cycle* *6*, 2186-2195.

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* *10*, 429-439.

Jang, K.W., Lee, K.H., Kim, S.H., Jin, T., Choi, E.Y., Jeon, H.J., Kim, E., Han, Y.S., and Chung, J.H. (2011). Ubiquitin ligase CHIP induces TRAF2 proteasomal degradation and NF- $\kappa$ B inactivation to regulate breast cancer cell invasion. *J Cell Biochem* *112*, 3612-3620.

Kang, H.B., Kim, Y.E., Kwon, H.J., Sok, D.E., and Lee, Y. (2007). Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev* *16*, 615-623.

Kearney, C.J., Sheridan, C., Cullen, S.P., Tynan, G.A., Logue, S.E., Afonina, I.S., Vucic, D., Lavelle, E.C., and Martin, S.J. (2013). Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonists regulate spontaneous and tumor necrosis factor (TNF)-induced proinflammatory cytokine and chemokine production. *J Biol Chem* *288*, 4878-4890.

Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* *12*, 131-144.

Kim, J.H., Gurumurthy, C.B., Naramura, M., Zhang, Y., Dudley, A.T., Doglio, L., Band, H., and Band, V. (2009). Role of mammalian Ecdysoless in cell cycle regulation. *J Biol Chem* *284*, 26402-26410.

Kim, J.W., Choi, E.J., and Joe, C.O. (2000). Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by proapoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* *19*, 4491-4499.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 550-563.

Kontaki, H., and Talianidis, I. (2010a). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Molecular cell* *39*, 152-160.

Kontaki, H., and Talianidis, I. (2010b). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell* *39*, 152-160.

Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* *45*, 219-228.

Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., *et al.* (2003). Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4914-4925.

Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., and Livingston, D.M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-172.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.

Kurakin, A., and Bredesen, D.E. (2007). An unconventional IAP-binding motif revealed by target-assisted iterative screening (TAIS) of the BIR3-clAP1 domain. *J Mol Recognit* 20, 39-50.

Labbé, K., McIntire, C.R., Doiron, K., Leblanc, P.M., and Saleh, M. (2011). Cellular inhibitors of apoptosis proteins clAP1 and clAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* 35, 897-907.

Laine, A., and Westermarck, J. (2014). Molecular pathways: harnessing E2F1 regulation for prosenescence therapy in p53-defective cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 3644-3650.

Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-9141.

Lee, J.S., Leem, S.H., Lee, S.Y., Kim, S.C., Park, E.S., Kim, S.B., Kim, S.K., Kim, Y.J., Kim, W.J., and Chu, I.S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J Clin Oncol* 28, 2660-2667.

Lee, K.H., Chen, Y.L., Yeh, S.D., Hsiao, M., Lin, J.T., Goan, Y.G., and Lu, P.J. (2009). MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. *Oncogene* 28, 3360-3370.

Lee, S., Challa-Malladi, M., Bratton, S.B., and Wright, C.W. (2014). Nuclear factor-kB-inducing kinase (NIK) contains an amino-terminal inhibitor of apoptosis (IAP)-binding motif (IBM) that potentiates NIK degradation by cellular IAP1 (c-IAP1). *J Biol Chem* 289, 30680-30689.

Lees, J.A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., and Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 7813-7825.

Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.Z., Kornacker, K., Liu, C.G., *et al.* (2008). Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell* 14, 62-75.

Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.

Lieman, J.H., Worley, L.A., and Harbour, J.W. (2005). Loss of Rb-E2F repression results in caspase-8-mediated apoptosis through inactivation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 280, 10484-10490.

Lin, R.J., Lin, Y.C., and Yu, A.L. (2010). miR-149\* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog* 49, 719-727.

- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001a). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001b). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes & development* 15, 1833-1844.
- Liu, S.S., Tsang, B.K., Cheung, A.N., Xue, W.C., Cheng, D.K., Ng, T.Y., Wong, L.C., and Ngan, H.Y. (2001). Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 37, 1104-1110.
- Loftus, S.J., Liu, G., Carr, S.M., Munro, S., and La Thangue, N.B. (2012a). NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO Rep* 13, 811-818.
- Loftus, S.J., Liu, G., Carr, S.M., Munro, S., and La Thangue, N.B. (2012b). NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO reports* 13, 811-818.
- Lopez, J., John, S.W., Tenev, T., Rautureau, G.J., Hinds, M.G., Francalanci, F., Wilson, R., Broemer, M., Santoro, M.M., Day, C.L., *et al.* (2011). CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol Cell* 42, 569-583.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., and Chen, H.W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24, 5157-5171.
- Ma, O., Cai, W.W., Zender, L., Dayaram, T., Shen, J., Herron, A.J., Lowe, S.W., Man, T.K., Lau, C.C., and Donehower, L.A. (2009). MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res* 69, 2559-2567.
- Mace, P.D., Smits, C., Vaux, D.L., Silke, J., and Day, C.L. (2010). Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J Mol Biol* 400, 8-15.
- Mahanic, C.S., Budhavarapu, V., Graves, J.D., Li, G., and Lin, W.C. (2015a). Regulation of E2 promoter binding factor 1 (E2F1) transcriptional activity through a deubiquitinating enzyme, UCH37. *J Biol Chem* 290, 26508-26522.
- Mahanic, C.S., Budhavarapu, V., Graves, J.D., Li, G., and Lin, W.C. (2015b). Regulation of E2 promoter binding factor 1 (E2F1) transcriptional activity through a deubiquitinating enzyme, UCH37. *The Journal of biological chemistry* 290, 26508-26522.
- Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T.W., Lacasse, E.C., Waring, J., *et al.* (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11778-11783.
- Mannava, S., Omilian, A.R., Wawrzyniak, J.A., Fink, E.E., Zhuang, D., Miecznikowski, J.C., Marshall, J.R., Soengas, M.S., Sears, R.C., Morrison, C.D., *et al.* (2012). PP2A-B56 $\alpha$  controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells. *Oncogene* 31, 1484-1492.
- Marivin, A., Berthelet, J., Cartier, J., Paul, C., Gemble, S., Morizot, A., Boireau, W., Saleh, M., Bertoglio, J., Solary, E., *et al.* (2014). cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation. *Oncogene* 33, 5534-5545.
- Martelli, F., and Livingston, D.M. (1999). Regulation of endogenous E2F1 stability by the retinoblastoma family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2858-2863.

- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999a). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF/SKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nature cell biology* *1*, 14-19.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999b). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF/SKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* *1*, 14-19.
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeier, C., Sørensen, T.S., La Thangue, N.B., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* *375*, 691-694.
- Martínez-Balbás, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* *19*, 662-671.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000a). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* *275*, 10887-10892.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000b). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *The Journal of biological chemistry* *275*, 10887-10892.
- Mega, S., Miyamoto, M., Ebihara, Y., Takahashi, R., Hase, R., Li, L., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Uehara, H., Kaneko, H., *et al.* (2005). Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated with characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* *18*, 109-113.
- Meng, R.D., Phillips, P., and El-Deiry, W.S. (1999). p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int J Oncol* *14*, 5-14.
- Meyer, H.J., and Rape, M. (2014). Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell* *157*, 910-921.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- Midorikawa, Y., Makuuchi, M., Tang, W., and Aburatani, H. (2007). Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J Gastroenterol* *13*, 1487-1492.
- Milton, A., Luoto, K., Ingram, L., Munro, S., Logan, N., Graham, A.L., Brummelkamp, T.R., Hijmans, E.M., Bernards, R., and La Thangue, N.B. (2006). A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene* *25*, 3212-3218.
- Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., and Yasuda, H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem* *137*, 125-132.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* *3*, 552-558.
- Moulin, M., Anderton, H., Voss, A.K., Thomas, T., Wong, W.W., Bankovacki, A., Feltham, R., Chau, D., Cook, W.D., Silke, J., *et al.* (2012). IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *EMBO J* *31*, 1679-1691.
- Mudryj, M., Hiebert, S.W., and Nevins, J.R. (1990). A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J* *9*, 2179-2184.
- Munro, S., Carr, S.M., and La Thangue, N.B. (2012). Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* *31*, 4343-4352.

Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S.W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

Nakatani, Y., Kleffmann, T., Linke, K., Condon, S.M., Hinds, M.G., and Day, C.L. (2013). Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. *The Biochemical journal* 450, 629-638.

Narayan, G., and Murty, V.V. (2010). Integrative genomic approaches in cervical cancer: implications for molecular pathogenesis. *Future Oncol* 6, 1643-1652.

Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N., Goulet, A.C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., *et al.* (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther* 5, 407-412.

Nevins, J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.

Niu, J., Chen, T., Han, L., Wang, P., Li, N., and Tong, T. (2011). Transcriptional activation of the senescence regulator Lsh by E2F1. *Mech Ageing Dev* 132, 180-186.

Novy, M., Pohn, R., Andorfer, P., Novy-Weiland, T., Galos, B., Schwarzmayr, L., and Rotheneder, H. (2005). EAPP, a novel E2F binding protein that modulates E2F-dependent transcription. *Mol Biol Cell* 16, 2181-2190.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.

Oberoi, T.K., Dogan, T., Hocking, J.C., Scholz, R.P., Mooz, J., Anderson, C.L., Karreman, C., Meyer zu Heringdorf, D., Schmidt, G., Ruonala, M., *et al.* (2012). IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J* 31, 14-28.

Ofengeim, D., and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 727-736.

Ohta, T., and Xiong, Y. (2001a). Phosphorylation- and Skp1-independent in vitro ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases. *Cancer research* 61, 1347-1353.

Ohta, T., and Xiong, Y. (2001b). Phosphorylation- and Skp1-independent in vitro ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases. *Cancer Res* 61, 1347-1353.

Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016a). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-kappaB Signaling. *Molecular cell* 64, 251-266.

Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016b). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-κB Signaling. *Mol Cell* 64, 251-266.

Palaiologou, M., Koskinas, J., Karanikolas, M., Fatourou, E., and Tiniakos, D.G. (2012). E2F-1 is overexpressed and pro-apoptotic in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 460, 439-446.

Park, S.M., Yoon, J.B., and Lee, T.H. (2004). Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *FEBS Lett* 566, 151-156.

Peart, M.J., Poyurovsky, M.V., Kass, E.M., Urist, M., Verschuren, E.W., Summers, M.K., Jackson, P.K., and Prives, C. (2010). APC/C(Cdc20) targets E2F1 for degradation in prometaphase. *Cell Cycle* 9, 3956-3964.

Pediconi, N., Guerrieri, F., Vossio, S., Bruno, T., Belloni, L., Schinzari, V., Scisciani, C., Fanciulli, M., and Levrero, M. (2009). hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 29, 1989-1998.

Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., *et al.* (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5, 552-558.

Peng, J., Dong, W., Chen, L., Zou, T., Qi, Y., and Liu, Y. (2007). Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation. *Mol Cell Biochem* 294, 45-54.

Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M., *et al.* (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13, 272-286.

Pfleger, C.M., Lee, E., and Kirschner, M.W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes & development* 15, 2396-2407.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* 4, 771-781.

Pickering, M.T., Stadler, B.M., and Kowalik, T.F. (2009). miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. *Oncogene* 28, 140-145.

Pillai, S., Kovacs, M., and Chellappan, S. (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor receptors by Rb and E2F1: role of acetylation. *Cancer Res* 70, 4931-4940.

Plenchette, S., Cathelin, S., Rebe, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.H., Padua, R.A., *et al.* (2004a). Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* 104, 2035-2043.

Plenchette, S., Cathelin, S., Rébé, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.H., Padua, R.A., *et al.* (2004b). Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* 104, 2035-2043.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2008). E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 18, 528-535.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21, 437-446.

- Polager, S., Ofir, M., and Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 27, 4860-4864.
- Ponnelle, T., Chapusot, C., Martin, L., Bonithon-Kopp, C., Bouvier, A.M., Plenchette, S., Rageot, D., Faivre, J., Solary, E., and Piard, F. (2003). Subcellular expression of c-IAP1 and c-IAP2 in colorectal cancers: relationships with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract* 199, 723-731.
- Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol Cell Oncol* 2, e970480.
- Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer Zada, A.A., Müller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 1768-1778.
- Pützer, B.M., and Engelmann, D. (2013). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends Mol Med* 19, 89-98.
- Qi, S., Mogi, S., Tsuda, H., Tanaka, Y., Kozaki, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hasegawa, S., and Omura, K. (2008). Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37, 1047-1053.
- Qi, Y., and Xia, P. (2012). Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) plays a critical role in beta-cell survival under endoplasmic reticulum stress: promoting ubiquitination and degradation of C/EBP homologous protein (CHOP). *The Journal of biological chemistry* 287, 32236-32245.
- Rahighi, S., and Dikic, I. (2012). Selectivity of the ubiquitin-binding modules. *FEBS letters* 586, 2705-2710.
- Real, S., Espada, L., Espinet, C., Santidrián, A.F., and Tauler, A. (2010). Study of the in vivo phosphorylation of E2F1 on Ser403. *Biochim Biophys Acta* 1803, 912-918.
- Reardon, D.A., Michalkiewicz, E., Boyett, J.M., Sublett, J.E., Entrekina, R.E., Ragsdale, S.T., Valentine, M.B., Behm, F.G., Li, H., Heideman, R.L., *et al.* (1997). Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57, 4042-4047.
- Reimer, D., Sadr, S., Wiedemair, A., Goebel, G., Concin, N., Hofstetter, G., Marth, C., and Zeimet, A.G. (2006). Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 270-281.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256.
- Revenko, A.S., Kalashnikova, E.V., Gemo, A.T., Zou, J.X., and Chen, H.W. (2010). Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark. *Mol Cell Biol* 30, 5260-5272.
- Riedl, S.J., Rensatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104, 791-800.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2002). E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 5308-5318.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925.

Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 13, 260-272.

Samuel, T., Welsh, K., Lober, T., Togo, S.H., Zapata, J.M., and Reed, J.C. (2006). Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J Biol Chem* 281, 1080-1090.

Sansal, I., Dupont, E., Toru, D., Evrard, C., and Rouget, P. (2000). NPDC-1, a regulator of neural cell proliferation and differentiation, interacts with E2F-1, reduces its binding to DNA and modulates its transcriptional activity. *Oncogene* 19, 5000-5009.

Sarhan, R.A., Aboelenein, H.R., Sourour, S.K., Fawzy, I.O., Salah, S., and Abdelaziz, A.I. (2015). Targeting E2F1 and c-Myc expression by microRNA-17-5p represses interferon-stimulated gene MxA in peripheral blood mononuclear cells of pediatric systemic lupus erythematosus patients. *Discov Med* 19, 419-425.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.

Schayek, H., Bentov, I., Rotem, I., Pasmanik-Chor, M., Ginsberg, D., Plymate, S.R., and Werner, H. (2010). Transcription factor E2F1 is a potent transactivator of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) gene. *Growth Horm IGF Res* 20, 68-72.

Sharma, A., Yeow, W.S., Ertel, A., Coleman, I., Clegg, N., Thangavel, C., Morrissey, C., Zhang, X., Comstock, C.E., Witkiewicz, A.K., *et al.* (2010). The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* 120, 4478-4492.

Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E.W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 327, 1135-1139.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P.G., Day, C.L., Pakusch, M., Huang, D.C., and Vaux, D.L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16182-16187.

Silke, J., and Vucic, D. (2014). IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol* 545, 35-65.

Silva, K.L., Vasconcellos, D.V., Castro, E.D., Coelho, A.M., Linden, R., and Maia, R.C. (2006). Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Apoptosis* 11, 277-285.

Snijders, A.M., Schmidt, B.L., Fridlyand, J., Dekker, N., Pinkel, D., Jordan, R.C., and Albertson, D.G. (2005). Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 24, 4232-4242.

Son, Y.H., Jeong, Y.T., Lee, K.A., Choi, K.H., Kim, S.M., Rhim, B.Y., and Kim, K. (2008). Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 51, 71-77.



- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., *et al.* (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* *410*, 112-116.
- Stanelle, J., and Pützer, B.M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* *12*, 177-185.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., and Pützer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res* *30*, 1859-1867.
- Stanelle, J., Tu-Rapp, H., and Pützer, B.M. (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ* *12*, 347-357.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* *412*, 157-169.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* *5*, 401-409.
- Suh, D.S., Yoon, M.S., Choi, K.U., and Kim, J.Y. (2008). Significance of E2F-1 overexpression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* *18*, 492-498.
- Sun, L.L., Wang, J., Zhao, Z.J., Liu, N., Wang, A.L., Ren, H.Y., Yang, F., Diao, K.X., Fu, W.N., Wan, E.H., *et al.* (2014). Suppressive role of miR-502-5p in breast cancer via downregulation of TRAF2. *Oncol Rep* *31*, 2085-2092.
- Suzuki, T., Yasui, W., Yokozaki, H., Naka, K., Ishikawa, T., and Tahara, E. (1999). Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* *81*, 535-538.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8662-8667.
- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* *26*, 399-422.
- Tai, M.C., Kajino, T., Nakatochi, M., Arima, C., Shimada, Y., Suzuki, M., Miyoshi, H., Yatabe, Y., Yanagisawa, K., and Takahashi, T. (2015). miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis* *36*, 1464-1473.
- Tanimoto, T., Tsuda, H., Imazeki, N., Ohno, Y., Imoto, I., Inazawa, J., and Matsubara, O. (2005). Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* *224*, 141-151.
- Tashiro, E., Minato, Y., Maruki, H., Asagiri, M., and Imoto, M. (2003). Regulation of FGF receptor-2 expression by transcription factor E2F-1. *Oncogene* *22*, 5630-5635.
- Tchoghandjian, A., Jennewein, C., Eckhardt, I., Rajalingam, K., and Fulda, S. (2013). Identification of non-canonical NF- $\kappa$ B signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells. *Cell Death Dis* *4*, e564.
- Tenbaum, S.P., Papaioannou, M., Reeb, C.A., Goeman, F., Escher, N., Kob, R., von Eggeling, F., Melle, C., and Baniahmad, A. (2007). Alien inhibits E2F1 gene expression and cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1447-1454.

Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., *et al.* (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* **43**, 432-448.

Teplyuk, N.M., Uhlmann, E.J., Wong, A.H., Karmali, P., Basu, M., Gabriely, G., Jain, A., Wang, Y., Chiocca, E.A., Stephens, R., *et al.* (2015). MicroRNA-10b inhibition reduces E2F1-mediated transcription and miR-15/16 activity in glioblastoma. *Oncotarget* **6**, 3770-3783.

Thomas, G.S., Zhang, L., Blackwell, K., and Habelhah, H. (2009). Phosphorylation of TRAF2 within its RING domain inhibits stress-induced cell death by promoting IKK and suppressing JNK activation. *Cancer Res* **69**, 3665-3672.

Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khatri, D.B., Protopopov, A., You, M.J., Aguirre, A.J., *et al.* (2005). High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9625-9630.

Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P., and Macleod, K.F. (2007). BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* **27**, 6229-6242.

Tseng, P.H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A., and Karin, M. (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* **11**, 70-75.

Tyagi, S., and Herr, W. (2009). E2F1 mediates DNA damage and apoptosis through HCF-1 and the MLL family of histone methyltransferases. *EMBO J* **28**, 3185-3195.

Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L., and Vaux, D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4974-4978.

Vallat, L., Magdelénat, H., Merle-Béral, H., Masdehors, P., Potocki de Montalk, G., Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T.F., and Delic, J. (2003). The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* **101**, 4598-4606.

Van Den Broeck, A., Nissou, D., Brambilla, E., Eymin, B., and Gazzeri, S. (2012). Activation of a Tip60/E2F1/ERCC1 network in human lung adenocarcinoma cells exposed to cisplatin. *Carcinogenesis* **33**, 320-325.

Vandel, L., and Kouzarides, T. (1999). Residues phosphorylated by TFIIH are required for E2F-1 degradation during S-phase. *EMBO J* **18**, 4280-4291.

Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., *et al.* (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681.

Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., and Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **283**, 24295-24299.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-297.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.

- Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chunduru, S.K., *et al.* (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF $\alpha$ . *J Cell Biol* *182*, 171-184.
- Vince, J.E., Wong, W.W., Gentle, I., Lawlor, K.E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., *et al.* (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* *36*, 215-227.
- Vorburger, S.A., Pataer, A., Yoshida, K., Barber, G.N., Xia, W., Chiao, P., Ellis, L.M., Hung, M.C., Swisher, S.G., and Hunt, K.K. (2002). Role for the double-stranded RNA activated protein kinase PKR in E2F-1-induced apoptosis. *Oncogene* *21*, 6278-6288.
- Vu, N.T., Park, M.A., Shultz, M.D., Bulut, G.B., Ladd, A.C., and Chalfant, C.E. (2016). Caspase-9b Interacts Directly with cIAP1 to Drive Agonist-Independent Activation of NF- $\kappa$ B and Lung Tumorigenesis. *Cancer Res* *76*, 2977-2989.
- Wang, B., Hsu, S.H., Wang, X., Kutay, H., Bid, H.K., Yu, J., Ganju, R.K., Jacob, S.T., Yuneva, M., and Ghoshal, K. (2014). Reciprocal regulation of microRNA-122 and c-Myc in hepatocellular cancer: role of E2F1 and transcription factor dimerization partner 2. *Hepatology* *59*, 555-566.
- Wang, B., Ma, A., Zhang, L., Jin, W.L., Qian, Y., Xu, G., Qiu, B., Yang, Z., Liu, Y., and Xia, Q. (2015a). POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nature communications* *6*, 8704.
- Wang, B., Ma, A., Zhang, L., Jin, W.L., Qian, Y., Xu, G., Qiu, B., Yang, Z., Liu, Y., and Xia, Q. (2015b). POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nat Commun* *6*, 8704.
- Wang, C., Rauscher, F.J., Cress, W.D., and Chen, J. (2007). Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *J Biol Chem* *282*, 29902-29909.
- Weber, R.G., Sommer, C., Albert, F.K., Kiessling, M., and Cremer, T. (1996). Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* *74*, 108-119.
- Welsh, K., Milutinovic, S., Ardecky, R.J., Gonzalez-Lopez, M., Ganji, S.R., Teriete, P., Finlay, D., Riedl, S., Matsuzawa, S., Pinilla, C., *et al.* (2016). Characterization of Potent SMAC Mimetics that Sensitize Cancer Cells to TNF Family-Induced Apoptosis. *PLoS One* *11*, e0161952.
- Wilting, S.M., de Wilde, J., Meijer, C.J., Berkhof, J., Yi, Y., van Wieringen, W.N., Braakhuis, B.J., Meijer, G.A., Ylstra, B., Snijders, P.J., *et al.* (2008). Integrated genomic and transcriptional profiling identifies chromosomal loci with altered gene expression in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *47*, 890-905.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* *2*, 11.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, X., Ying, S.X., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2005). TNF- $\alpha$  induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* *24*, 1886-1898.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* *408*, 1008-1012.
- Wu, H., Li, W., Zhang, M., Zhu, S., Zhang, D., and Wang, X. (2016). Inhibitory roles of miR-320 in osteosarcoma via regulating E2F1. *J Cancer Res Ther* *12*, 68-71.

Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., *et al.* (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414, 457-462.

Xie, Q., Bai, Y., Wu, J., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Mei, P., and Yuan, Z. (2011). Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death. *J Recept Signal Transduct Res* 31, 139-146.

Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G., and Wu, M. (2006). Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res* 34, 2046-2055.

Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H.T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. (2007). c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol Cell* 28, 914-922.

Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14, 8420-8431.

Yang, C., Davis, J.L., Zeng, R., Vora, P., Su, X., Collins, L.I., Vangveravong, S., Mach, R.H., Piwnica-Worms, D., Weilbaecher, K.N., *et al.* (2013). Antagonism of inhibitor of apoptosis proteins increases bone metastasis via unexpected osteoclast activation. *Cancer Discov* 3, 212-223.

Yang, G., Zhang, R., Chen, X., Mu, Y., Ai, J., Shi, C., Liu, Y., Sun, L., Rainov, N.G., Li, H., *et al.* (2011a). MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status. *J Mol Med (Berl)* 89, 1037-1050.

Yang, L., Lin, C., Liu, W., Zhang, J., Ohgi, K.A., Grinstein, J.D., Dorrestein, P.C., and Rosenfeld, M.G. (2011b). ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* 147, 773-788.

Yang, X.H., Shiotani, B., Classon, M., and Zou, L. (2008). Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* 22, 1147-1152.

Yasui, W., Yokozaki, H., Fujimoto, J., Naka, K., Kuniyasu, H., and Tahara, E. (2000). Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 35 Suppl 12, 111-115.

Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol* 18, 579-586.

Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 755-764.

Yu, W., Chan-On, W., Teo, M., Ong, C.K., Cutcutache, I., Allen, G.E., Wong, B., Myint, S.S., Lim, K.H., Voorhoeve, P.M., *et al.* (2011). First somatic mutation of E2F1 in a critical DNA binding residue discovered in well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum. *Genome Biol* 12, R96.

Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G., *et al.* (2004). Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* 203, 744-753.

Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., *et al.* (2008). Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a

regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9, 1371-1378.

Zauli, G., Voltan, R., di lasio, M.G., Bosco, R., Melloni, E., Sana, M.E., and Secchiero, P. (2011). miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clin Cancer Res* 17, 2712-2724.

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., *et al.* (2006). Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125, 1253-1267.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336.

Zhang, S.Y., Liu, S.C., Al-Saleem, L.F., Holloran, D., Babb, J., Guo, X., and Klein-Szanto, A.J. (2000). E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 395-401.

Zhang, W., Ji, W., Liu, X., Ouyang, G., and Xiao, W. (2014). ELL inhibits E2F1 transcriptional activity by enhancing E2F1 deacetylation via recruitment of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 34, 765-775.

Zhang, Y., Woodford, N., Xia, X., and Hamburger, A.W. (2003). Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 31, 2168-2177.

Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* 24, 7238-7247.

Zheng, S., Moehlenbrink, J., Lu, Y.C., Zalmas, L.P., Sagum, C.A., Carr, S., McGouran, J.F., Alexander, L., Fedorov, O., Munro, S., *et al.* (2013). Arginine methylation-dependent reader-writer interplay governs growth control by E2F-1. *Molecular cell* 52, 37-51.

Zhou, A.Y., Shen, R.R., Kim, E., Lock, Y.J., Xu, M., Chen, Z.J., and Hahn, W.C. (2013). IKKε-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell Rep* 3, 724-733.

Zhu, J.W., Field, S.J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R.D., Greenberg, M., Orkin, S.H., and DeGregori, J. (2001). E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 21, 8547-8564.

Zhuang, M., Guan, S., Wang, H., Burlingame, A.L., and Wells, J.A. (2013). Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator. *Mol Cell* 49, 273-282.

Figure Legends

**Figure 1: cIAP1 stabilizes and stimulates E2F1 in an E3-ubiquitin ligase activity-dependent manner.**

**A-C.** E2F1 activity and expression in HeLa cells (A&B) or in cIAP1<sup>-/-</sup>/cIAP2<sup>-/-</sup> MEFs (C) transfected with CCNE promoter-Firefly luciferase reporter plasmid, pCMV-3HA-E2F1, along with empty vector (Vector), cIAP1, cIAP1-H588A (devoid of E3 ubiquitin-ligase activity) or cIAP1-F616A (lacking dimerization capacity) mutant encoding vector. HeLa cells were treated for 24 hours with PYR-41 10-35  $\mu$ M before analysis (B). Upper panels: E2F1 transcriptional activity was assessed in gene luciferase experiments. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by E2F1 alone. Mean  $\pm$  S.D. of at least 3 independent experiments. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . Lower panels: The expression of the constructs was analysed by a western blot analysis.  $\beta$ -actin or HSC70 are used as loading control. \*: unspecific bands. **D.** CHX chase experiment. The expression of indicated transgenes was induced for 48 hrs, and cells were treated with CHX 100 $\mu$ g/mL and E2F1 and cIAP1 expression were analysed by western blotting.  $\beta$ -actin is used as loading control. E2F1 expression has been quantified by using Image J software (Right panel). One representative experiment is shown. **E.** Western blot analysis of E2F1 and cIAP1 in U2OS cells in which cIAP1 has been downregulated by either a cIAP1 siRNA or by treating cells with the IAP antagonist GDC-0152. UT: untreated cells. **F.** Western blot analysis of E2F1 and cIAP1 in HeLa cells transfected with indicated constructs in the presence of control or cIAP1 siRNA.  $\beta$ -actin was used as loading control. E2F1 and  $\beta$ -actin expression have been quantified by using Image J software (Right panel). Mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments.

**Figure 2: cIAP1 induced K63-ubiquitination of E2F1 on lysine 161/164.** **A.** *In vitro* ubiquitination assay of GST-E2F1 fusion protein immobilised on glutathione sepharose and incubated with ubiquitin, E1 and E2 recombinant proteins with or without recombinant cIAP1. **B.** Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1, His-Ubiquitin encoding vectors, with an empty vector or cIAP1 or cIAP1 F616A (F/A) mutant constructs. Ubiquitinated proteins were pulled-down by using non selective or K63-TUBEs and Ubiquitinated E2F1 is revealed by using an anti-E2F1 antibody. **C.** Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1, His-tagged ubiquitin wt or ubiquitin mutants containing only the K11, K48 or K63 constructs, in the presence of empty or cIAP1 encoding plasmids. Ubiquitinated proteins were pulled-down by using cobalt beads and ubiquitinated E2F1 is revealed by using an anti-E2F1 antibody. **D & E.** Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa cells co-transfected with pCMV-3HA-E2F1 and His-tagged ubiquitin wt or ubiquitin mutant containing only the K11, or K48 or K63 (D) constructs, in the presence of empty or cIAP1 encoding construct. E2F1 was immunoprecipitated using anti-HA (D) or anti-E2F1 (E) antibody and ubiquitinated E2F1 was revealed by using anti-poly-ubiquitin chain antibody (FK2)(D) or K63-specific ubiquitin chain antibody (K63-Ub) (E). The expression of the transgenes was checked by a western blot analysis.  $\beta$ -actin or HSC70 was used as loading control. **F.** Schematic representation of E2F1 protein structure indicating the Lysines. A: cyclin A:CDK2 binding domain; DBD: DNA Binding Domain, dimer: Dimerization domain; MB: marked box; Rb: Rb binding domain.

**G.** Gene luciferase experiments performed in HeLa cells transfected with CCNE promoter-Firefly luciferase reporter plasmid, pCMV-HA (vector), HA-tagged-E2F1 (one single or 3HA) or HA-E2F1 mutants in which indicated K have been mutated into R along with empty vector (vector) or cIAP1 encoding vector. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by E2F1. Mean  $\pm$  S.D. of at least 3 independent experiments. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . The expression of the E2F1 constructs was checked by a western blot analysis (upper panel).  $\beta$ -actin is used as loading control. **H** Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1 wt or K161/164R mutant (K/R), His-Ubiquitin, with an empty vector or cIAP1 or cIAP1 F616A (F/A) mutant constructs. Ubiquitinated proteins were pulled-down by K63-specific TUBEs and Ubiquitinated E2F1 is revealed by using an anti-E2F1 antibody. **I.** Immunoprecipitation analysis of the interaction of cIAP1 with E2F1 wt or K161/164R mutant (K/R). HeLa cells were transfected with 3HA-E2F1 encoding constructs and cIAP1. cIAP1 or E2F1 were immunoprecipitated using anti-cIAP1 or anti-HA antibody and cIAP1-E2F1 interaction was revealed by a western blot analysis. KO: cell lysate from cIAP1<sup>-/-</sup> KO MEFs was used to check non-specific reactivity of the antibody.

**Figure 3: Cluster Lysine 161 and 164 are important for E2F1 activity. A&B.** Gene luciferase experiments performed in HeLa cells transfected with CCNE promoter-Firefly luciferase reporter plasmid and pCMV-3HA-E2F1 wt or E2F1 mutants constructs in which indicated K have been mutated into R (A) or (B) K0 (=mutation of every K into R), K1 (=mutation of every K into R except K89), K2 (=mutation of every K into R except K89 and K137) or K4 (=mutation of every K into R except K89, K137, K161, K164). Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as % of activity measured with E2F1 wt. Mean  $\pm$  S.D. of at least 3 independent experiments. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . The expression of the constructs was checked by a western blot analysis (upper panel).  $\beta$ -actin was used as loading control. **C-E.** U2OS cells were transfected for 48H with empty pCMV-3HA vector (V), pCMV-3HA-E2F1 or pCM-3HA E2F1 K161/164R mutant. (C) Western blot analysis of E2F1 or E2F1 K161/164R mutant, 48 hours after transfection.  $\beta$ -actin was used as loading control. (D) Relative expression of *ccne*, *tp73* and *apaf1* mRNA as measured by RT-qPCR 48 hrs after transfection. Results were normalized to *hprt* mRNA and expressed relative to cells transfected with empty vector. Mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (E) Chromatin immunoprecipitation experiments were performed using an anti-E2F1 or an irrelevant antibody (IgG). The levels of E2F1-associated genomic DNA region encompassing E2F1 binding site of *Cyclin E (CCNE)*, *TP73* or *APAF1* promoter were quantified by qPCR. Results were normalized to input and the recruitment with irrelevant antibody, and expressed as relative recruitment compared to cells transfected with empty vector. **F.** Immunoprecipitation analysis of the interaction of DP1 with E2F1 wt or K161/164R mutant (K/R). HeLa cells were transfected with 3HA-E2F1 encoding constructs and HA-DP1 encoding vector. E2F1 were immunoprecipitated using an anti-E2F1 antibody and DP1-E2F1 interaction was revealed by a western blot analysis by using anti-HA antibody.

**G.** Proliferation of U2OS cells transfected for 48H with empty vector, E2F1 or E2F1 K161/164R mutant, as analysed by crystal violet staining. Mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ .

**Figure 4: cIAP1 is required for DNA-damage-induced stabilization of E2F1.** **A.** Western blot analysis of E2F1 and cIAP1 in U2OS cells transfected with control or cIAP1-siRNA and treated with indicated concentration of etoposide for 6 hrs.  $\beta$ -actin was used as loading control. **B.** Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa cells transfected with cIAP1 siRNA or cIAP1 encoding construct and with 3HA-E2F1 and His-tagged ubiquitin wt. When indicated, cells were treated for 6 hrs with 10 $\mu$ M etoposide. E2F1 was immunoprecipitated using anti-HA antibody and ubiquitin revealed using K63-specific ubiquitin chain antibody (K63-Ub). The expression of the transgenes and the efficiency of siRNA were checked by a western blot analysis (input).  $\beta$ -actin was used as loading control. **C.** Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with control of cIAP1 siRNA and with 3HA-E2F1 and His-tagged ubiquitin wt. When indicated, cells were treated for 6 hrs with 10 $\mu$ M etoposide. Ubiquitinated proteins were pulled-down by K63-specific TUBEs and ubiquitinated E2F1 is revealed by using E2F1 antibody. **D.** Western blot analysis of E2F1 in U2OS cells transfected with 3HA-E2F1 or 3HA-E2F1-K161/164R mutant and treated with indicated concentration of etoposide for 6 hrs.  $\beta$ -actin was used as loading control. **E.** Ubiquitination of E2F1 in HeLa cells transfected with pCMV-3HA-E2F1 or pCMV-3HA-E2F1 K161/164R (indicated K/R), and with His-tagged ubiquitin wt, and then treated for 6 hours with 10 $\mu$ M etoposide. E2F1 was immunoprecipitated using anti-HA antibody and ubiquitin revealed using K63-specific ubiquitin chain antibody (K63-Ub). The level of expression of E2F1 constructs has been adjusted in order to get equivalent ubiquitin level in both untreated samples. **F.** U2OS cells were transfected with cIAP1 siRNA or treated with 17nM GDC-0152 for 1 hour, and then treated with 10 $\mu$ M etoposide for 48 hours. *tp73* mRNA expression was measured by RT-qPCR. UT: untreated cells. Results were normalized to *hprt* mRNA and expressed relatively to control untreated cells. Mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

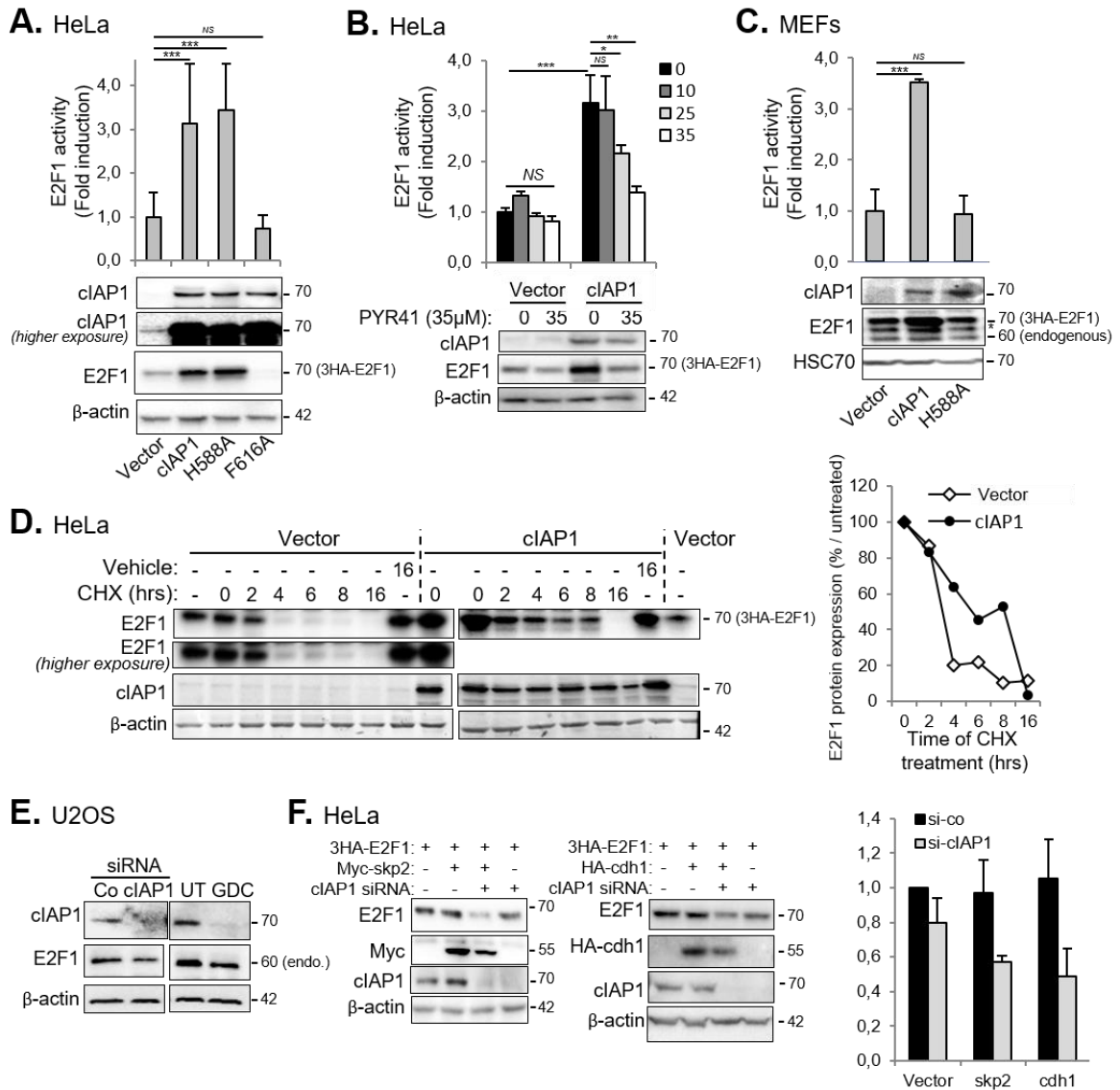
**Figure 5: PRMT-mediated Arginine methylation of E2F1 is required for ubiquitination of E2F1 by cIAP1.** **A.** Western blot analysis of E2F1 and cIAP1 in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1 and cIAP1-encoding constructs, and treated for 24 hours with 100  $\mu$ M PRMT inhibitor AMI-1.  $\beta$ -actin was used as loading control. **B.** Ubiquitination of E2F1 in HeLa transfected with pCMV-3HA-E2F1, pCI-cIAP1, and with His-tagged ubiquitin wt, and then treated for 16 hours with 50 $\mu$ M AMI-1  $\pm$  10 $\mu$ M etoposide for 6hrs. E2F1 was immunoprecipitated using anti-E2F1 antibody and ubiquitin revealed using pan anti-ubiquitin antibody (FK2). The expression of the transgene is checked by western-blot.  $\beta$ -actin was used as loading control. **C.** E2F1 transcriptional activity as measured by using a gene-reporter luciferase assay performed in HeLa cells transfected as in A in the presence of CCNE promoter-Firefly luciferase reporter plasmid and treated with increasing concentration of AMI-1 for 24hrs. Results are expressed as average  $\pm$  SD from at least three experiments.



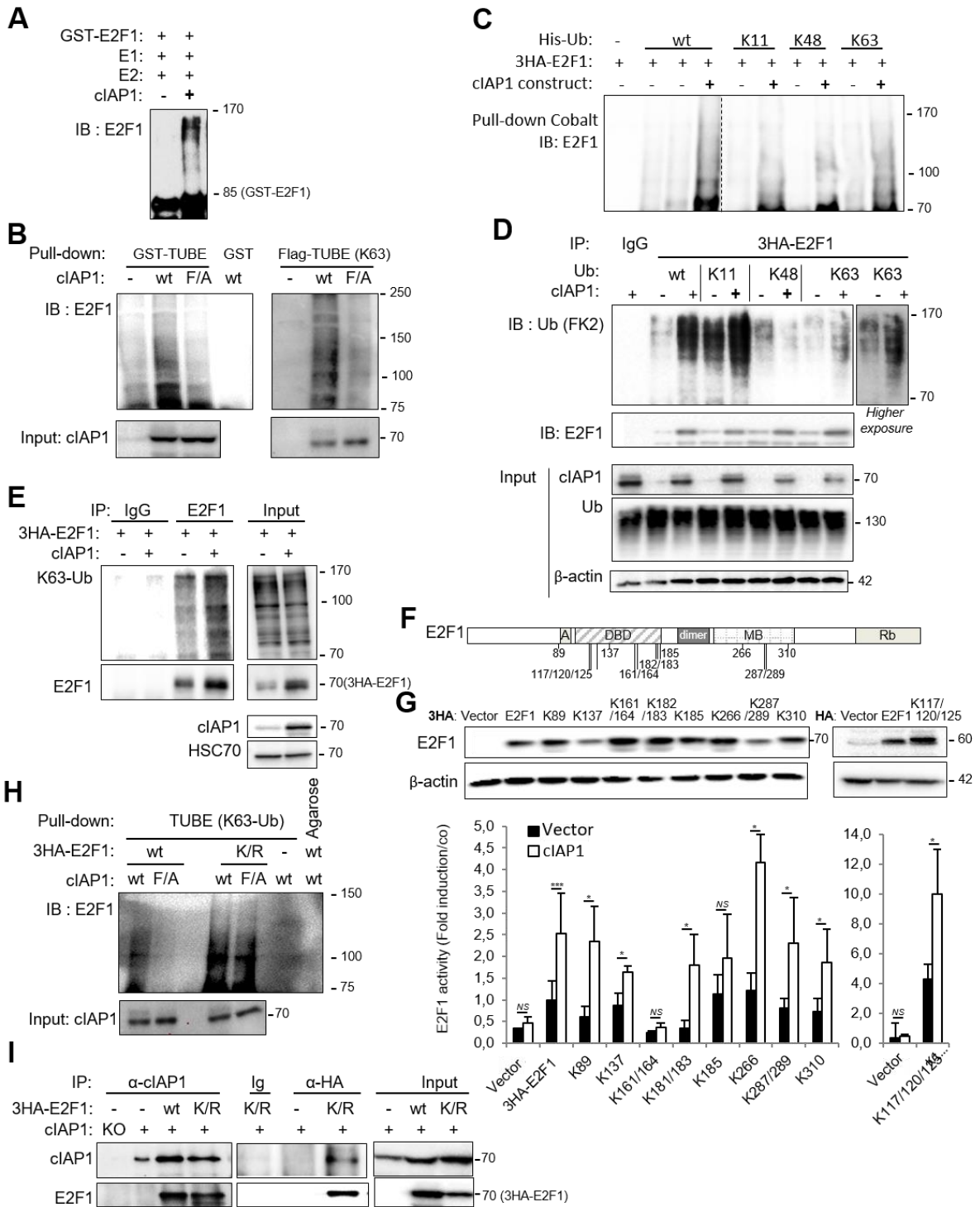
Statistical analysis performed using student's test. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.1$ , NS  $p > 0.1$ . **D.** Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa transfected with Prmt1 or Prmt5-siRNA and pCMV-3HA-E2F1, pCI-clAP1, and with His-tagged ubiquitin wt. E2F1 was immunoprecipitated using anti-E2F1 antibody and ubiquitin revealed using pan anti-ubiquitin antibody (FK2). The expression of the transgene and the efficiency of siRNA were checked by western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as loading control.

**Figure 6: clAP1-mediated K63-ubiquitination of E2F1 is cell cycle-regulated.** **A.** Western blot analysis of E2F1, cyclin A and clAP1 in U2OS cells transfected with cyclinA siRNA  $\pm$  clAP1 siRNA. HSC70 was used as loading control. **B.** Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa cells co-transfected with cyclin A si-RNA  $\pm$  clAP1 siRNA, then 24 hours later with pCMV-3HA-E2F1 and His-tagged ubiquitin wt. E2F1 was immunoprecipitated using anti-E2F1 antibody and ubiquitin revealed using K63-specific ubiquitin chain antibody (K63-Ub). The expression of the transgenes was checked by a western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as loading control. **C.** Western blot analysis of the expression of 3HA-E2F1 wt or K161/164R mutant and cyclin A in HeLa cells transfected with cyclinA siRNA.  $\beta$ -actin was used as loading control. **D.** Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa cells co-transfected with cyclin A siRNA, then 24 hours later with pCMV-3HA-E2F1 or the K161/164R mutant and His-tagged K63-only-ubiquitin. E2F1 was immunoprecipitated using anti-E2F1 antibody and ubiquitin revealed using anti-poly-ubiquitin chain antibody (FK2). The expression of the transgenes was checked by a western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as loading control. The level of expression of E2F1 constructs has been adjusted in order to get equivalent ubiquitin level in both samples transfected with control siRNA. **E.** Western blot analysis of clAP1 E2F1, cyclin E, Rb, phospho (S780, S807/811) Rb in U2OS cells transfected with clAP1 encoding construct. HSC70 was used as loading control. **F.** GST-pull down analysis of the interaction of GST-E2F1 with Rb in the presence of increasing quantity of clAP1. **G.** Schematic representation of the regulation of E2F1 by clAP1. In the G1 phase of cell cycle, E2F1 is complexed to Rb. In the S phase, E2F1 is first methylated on Arginine residue par PRMT, then K63-ubiquitinated by clAP1 on K161/164, leading to stabilization and activation of the protein. In the late S, cyclin A inhibits K63-ubiquitination of E2F1, binds to and phosphorylates E2F1 and promotes ubiquitin proteasome system (UPS)-mediated degradation.

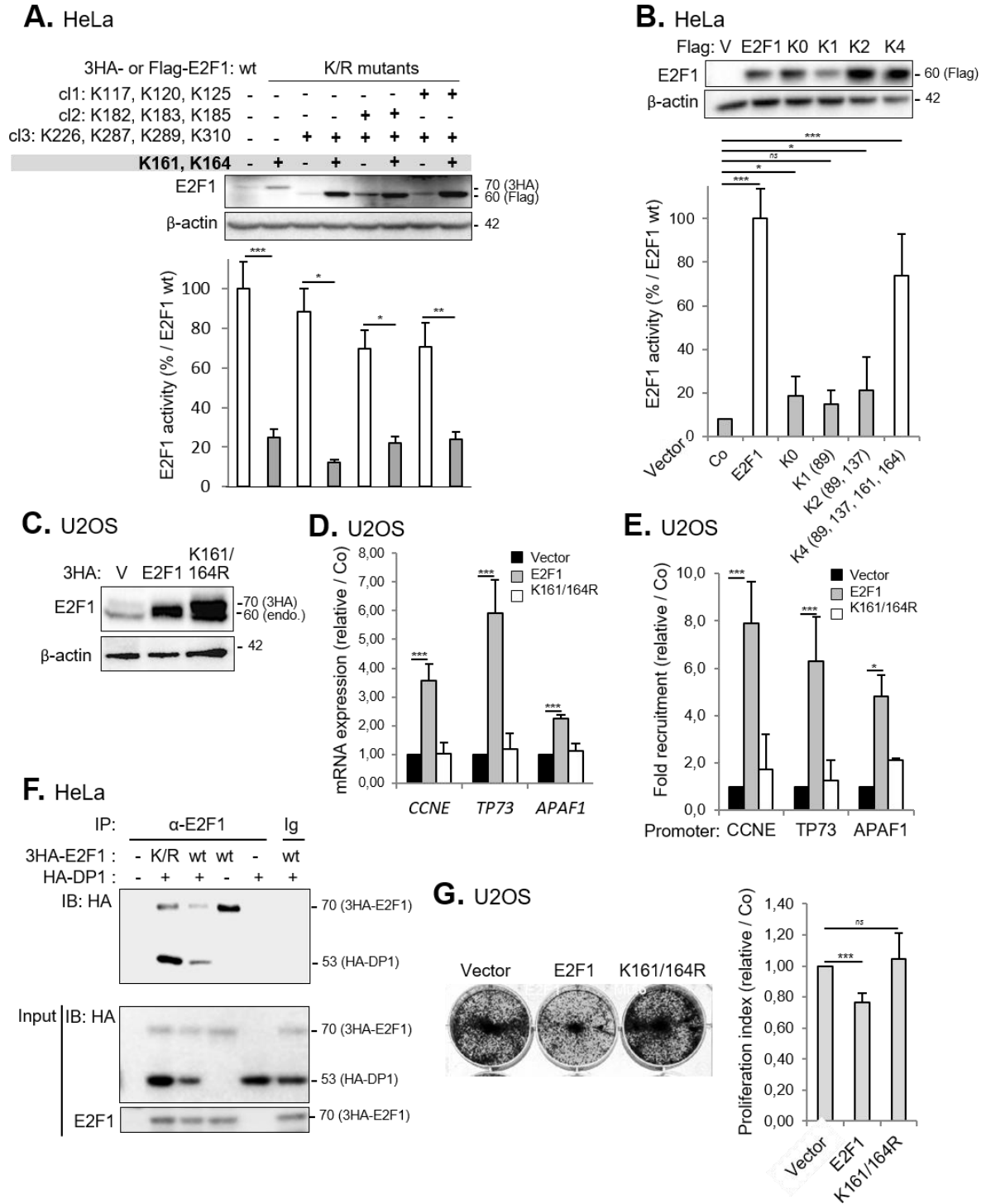
**FIGURE 1**



**FIGURE 2**

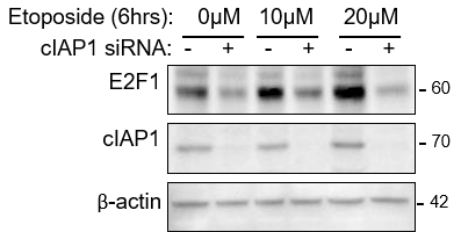


**FIGURE 3**

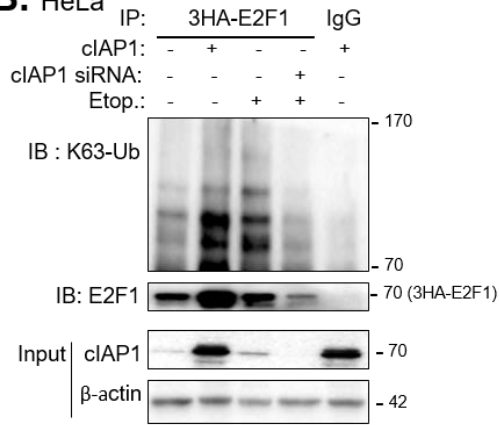


**FIGURE 4**

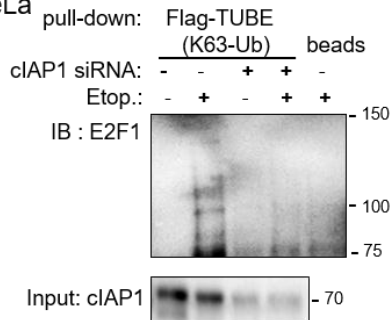
**A. U2OS**



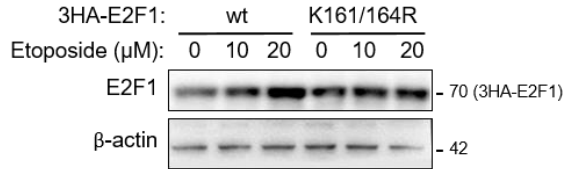
**B. HeLa**



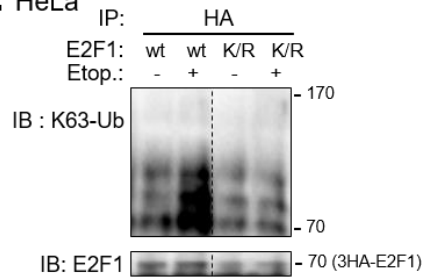
**C. HeLa**



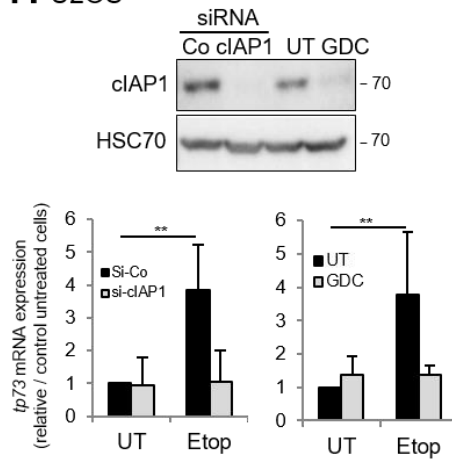
**D. U2OS**



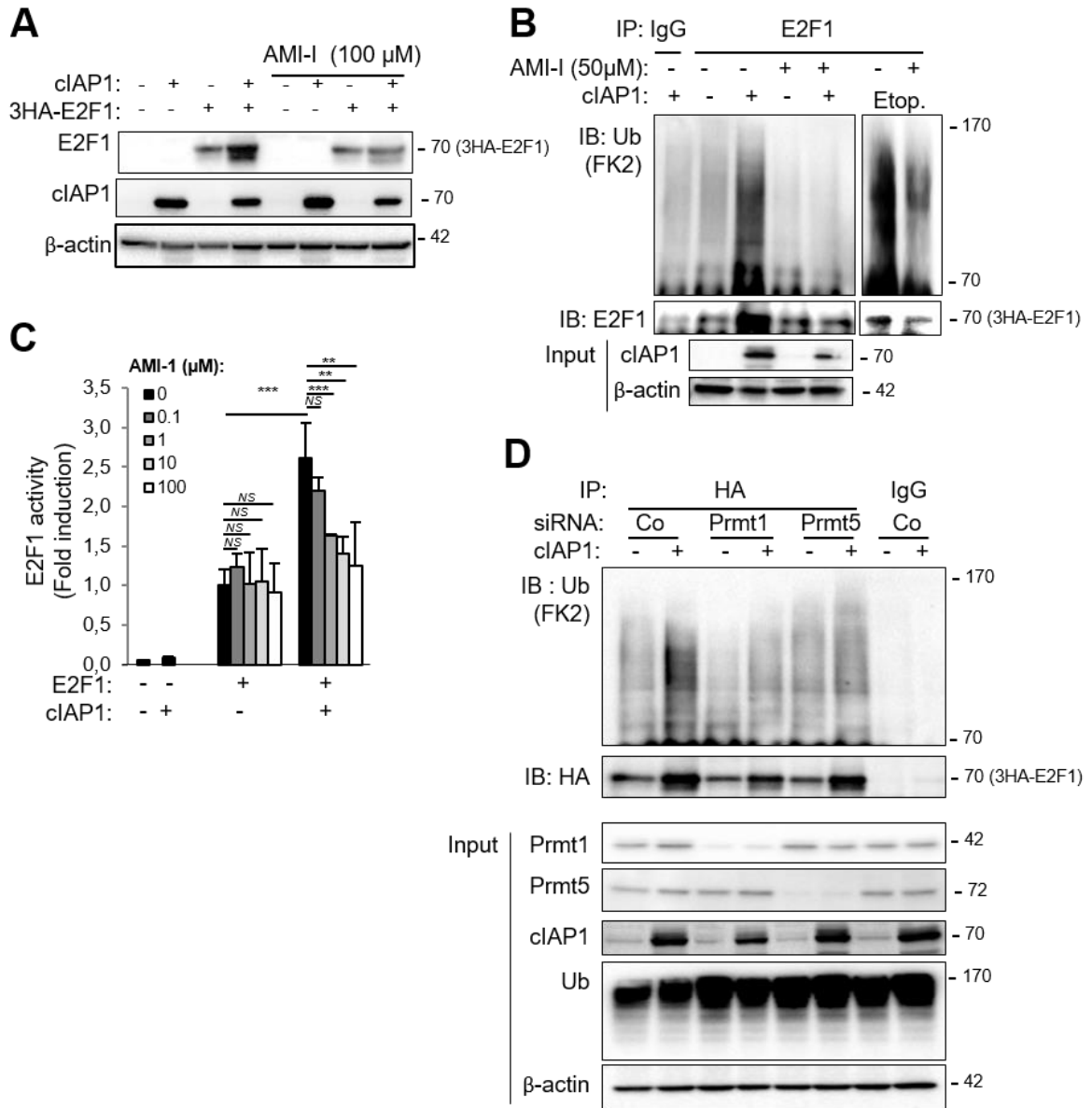
**E. HeLa**



**F. U2OS**

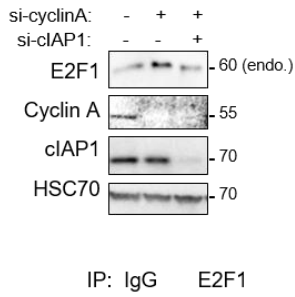


**FIGURE 5**

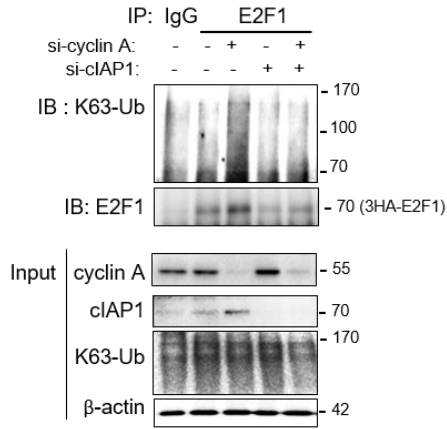


**FIGURE 6**

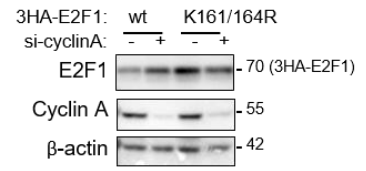
**A. U2OS**



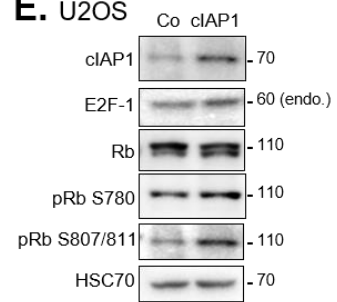
**B. HeLa**



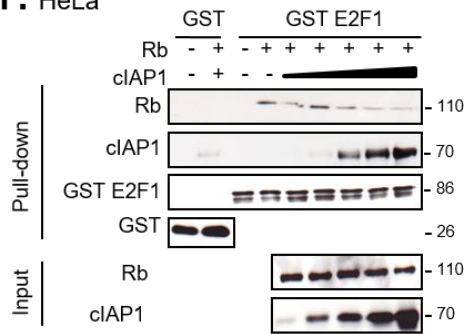
**C. HeLa**



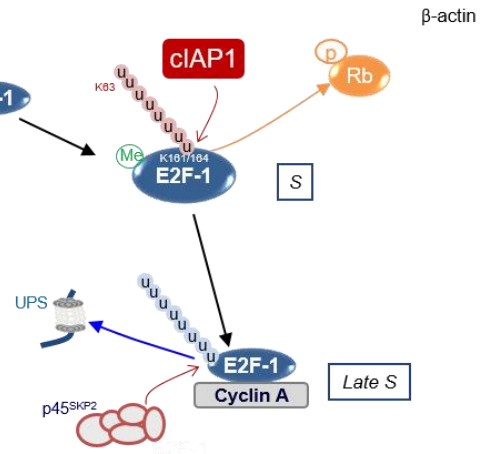
**E. U2OS**



**F. HeLa**



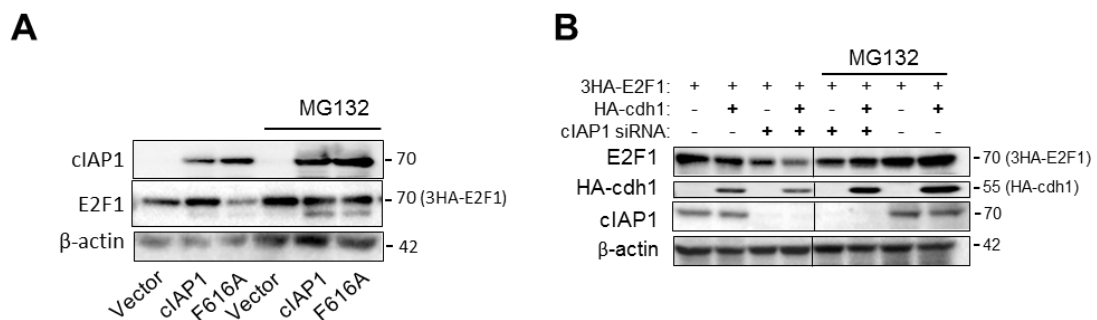
**G**



## Supplementary material and methods

**ChIP-seq analysis.** Enriched DNA from ChIP and Input DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3' end, ligated with indexed paired-end adaptors (NEXTflex, Bio Scientific) using the Bravo Platform (Agilent), size-selected after 4 cycles of PCR with AMPure XP beads (Beckman Coulter) and amplified by PCR for 10 cycles more. Library quality was assessed by bioanalyzer using High Sensitivity chip.

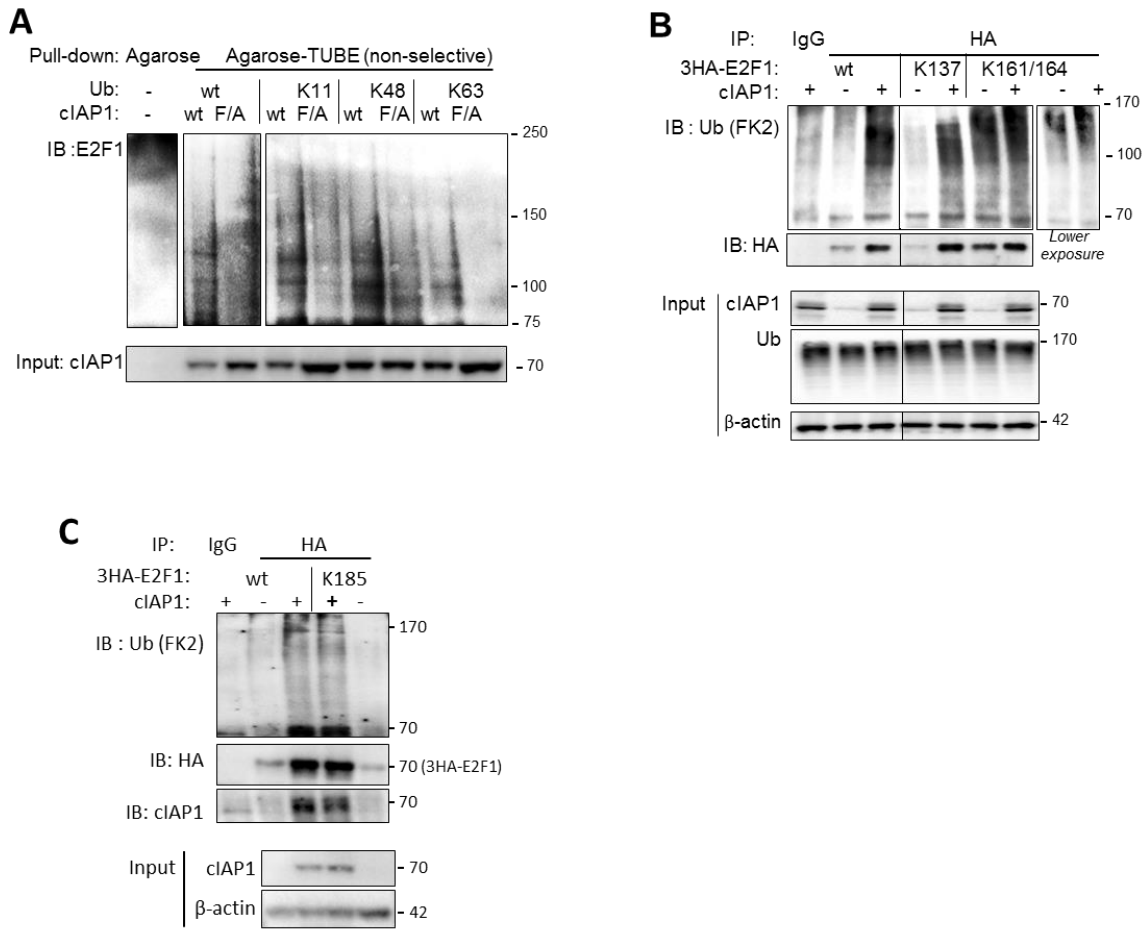
### Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1:** **A.** Western blot analysis of cIAP1 or 3HA-E2F1 expression in HeLa cells transfected with pCMV-3HA-E2F1 with empty vector (Vector), cIAP1 or cIAP1-F616A mutant (dimerization defective mutant) encoding vector, treated or not with MG132 5μM overnight. **B.** Western blot analysis of cIAP1, 3HA-E2F1 and HA-cdh1 expression in HeLa cells transfected with pCMV-3HA-E2F1 with or without HA-cdh1 in the presence of control or cIAP1 siRNA, treated or not with MG132 5μM overnight. HA-cdh1 is detected by using an anti-HA antibody and E2F1 by an anti-E2F1 antibody.



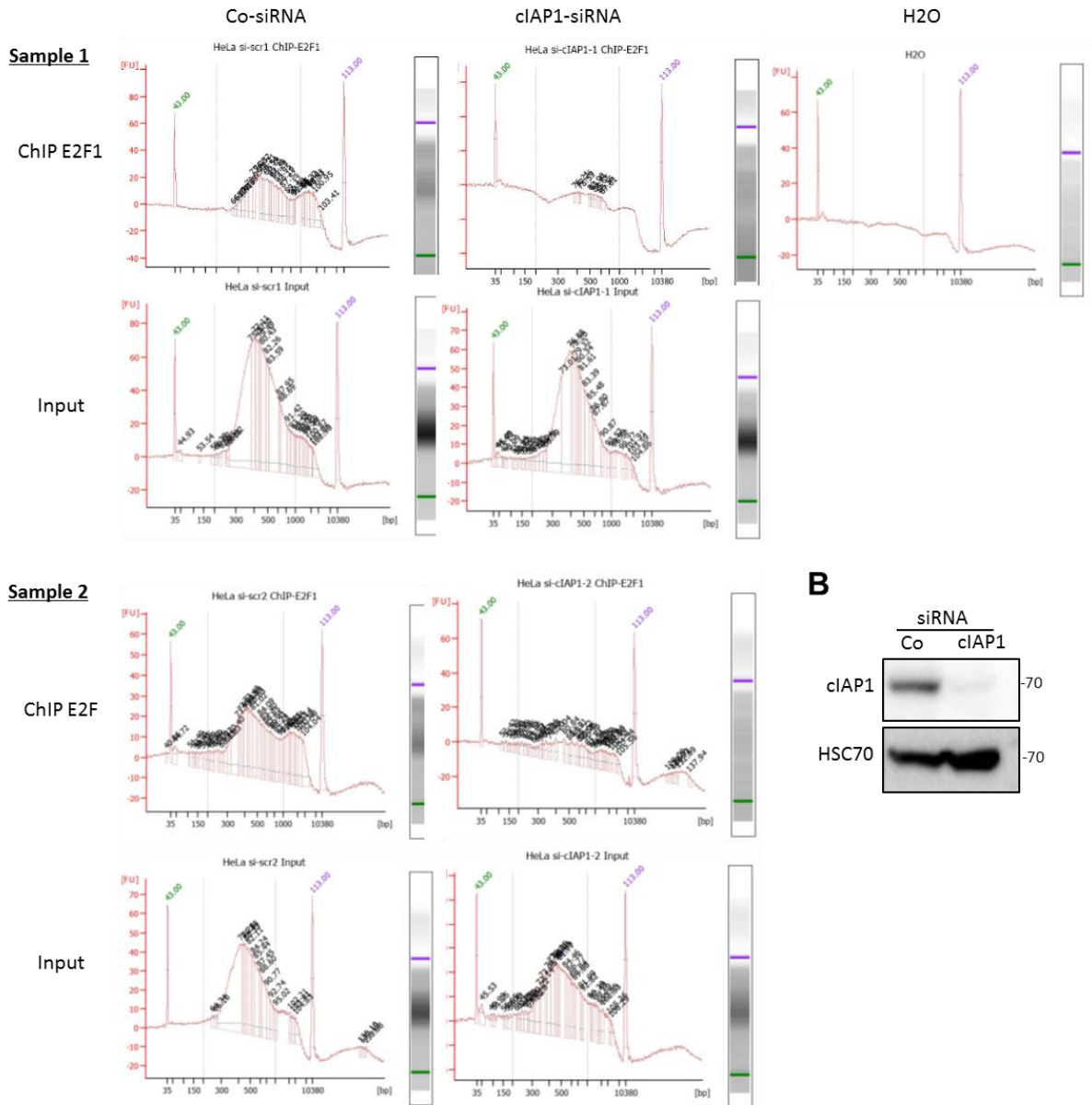
## Supplementary Figure 2



**Supplementary Figure 2:** A. Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1, His-tagged ubiquitin wt or ubiquitin mutants containing only the K11, K48 or K63 constructs, in the presence of cIAP1 or F616A (F/A) encoding plasmids. Ubiquitinated proteins were pulled-down by using non selective ubiquitin agarose-TUBEs and ubiquitinated E2F1 is revealed by using E2F1 antibody. B&C. Ubiquitination profile of E2F1 in HeLa cells co-transfected with pCMV-3HA-E2F1 wt, K137R, K161/164R (B) or K185R (C) mutant, and His-tagged ubiquitin in the presence or absence of cIAP1 encoding vector. E2F1 was immunoprecipitated using anti-HA antibody and ubiquitin revealed using anti-poly-ubiquitin chain antibody (FK2). The expression of the transgenes was checked by a western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as loading control.

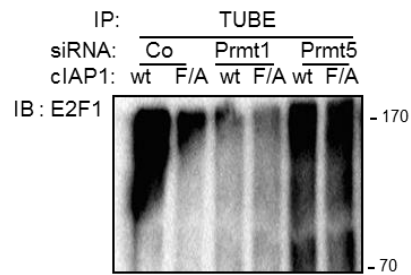
### Supplementary Figure 3

**A**



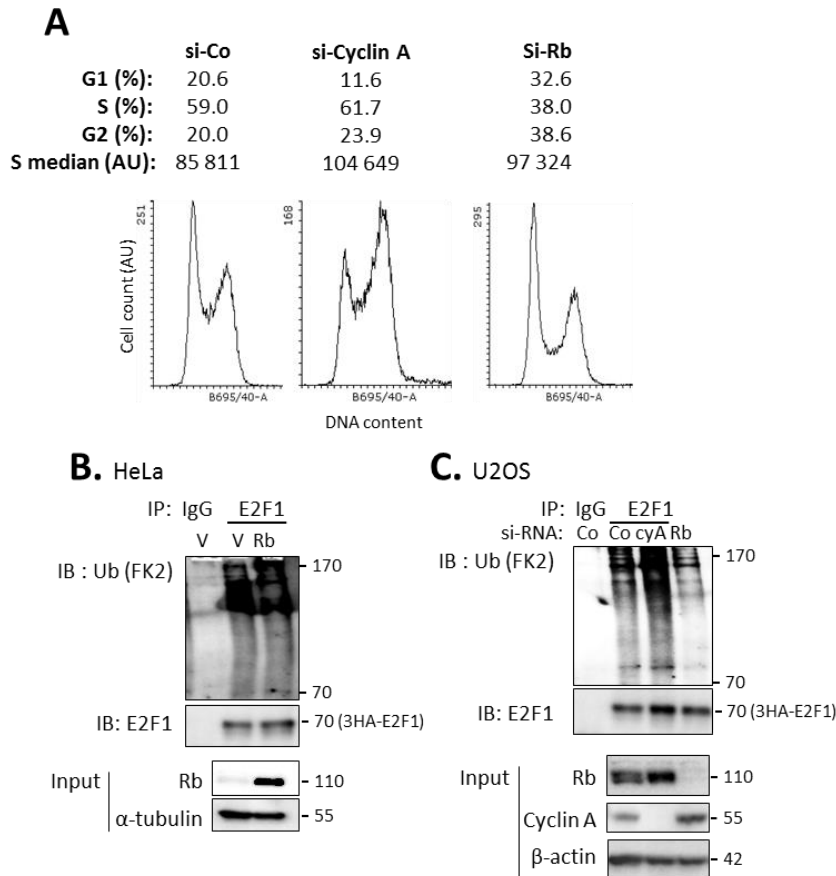
**Supplementary Figure 3:** Enriched DNA from ChIP and Input DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3'end, ligated with indexed paired-end adaptors (NEXTflex, Bioo Scientific) using the Bravo Platform (Agilent), size-selected after 4 cycles of PCR with AMPure XP beads (Beckman Coulter) and amplified by PCR for 10 cycles more. The efficiency of siRNA was checked by a Western Blot analysis (B)

## Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4:** Ubiquitination assay performed in HeLa cells transfected with 3HA-E2F1, His-tagged ubiquitin wt, in the presence of cIAP1 or F616A (F/A) encoding plasmids and Prmt1 or prmt5 siRNA. Ubiquitinated proteins were pulled-down by using non selective ubiquitin agarose-TUBEs and ubiquitinated E2F1 is revealed by using E2F1 antibody.

## Supplementary Figure 5



**Supplementary Figure 5: A.** Cell cycle analysis of U2OS cells 48 hours after transfection with co, cyclin A or Rb siRNA. The percentage of cells in cell cycle phase and the median of cell in S phase are indicated (upper) **B-C.** Influence of Rb on E2F1 ubiquitination. HeLa cells were co-transfected with Rb-encoding vector (B) or U2OS cells with cyclin A or Rb siRNA (C), and with pCMV-3HA-E2F1 and His-tagged ubiquitin wt. E2F1 was immunoprecipitated using anti-E2F1 antibody and ubiquitin revealed using anti-poly-ubiquitin chain antibody (FK2). The expression of the transgenes and the efficiency of siRNA were checked by a western blot analysis (lower panels).  $\beta$ -actin or  $\alpha$ -tubulin was used as loading control.

## **Résumé :**

clAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis 1*) possède une activité E3-ubiquitine ligase et présente des propriétés oncogéniques. Récemment, notre équipe a montré que clAP1 pouvait réguler l'activité du facteur de transcription E2F1. L'objectif de mon travail de thèse était d'approfondir les mécanismes de cette régulation et d'évaluer l'importance de la coopération clAP1-E2F1 dans l'activité oncogénique de clAP1.

J'ai démontré une interaction d'E2F1 avec la poche hydrophobe du domaine BIR3 de clAP1. J'ai par ailleurs démontré l'importance de la première hélice  $\alpha$  de ce domaine pour l'interaction de clAP1 avec E2F1 et avec les autres protéines partenaires de clAP1 capables de lier la poche hydrophobe du domaine BIR3.

De plus, j'ai participé au travail montrant pour la première fois une régulation d'E2F1 par une ubiquitinylation non dégradative. clAP1 permet la conjugaison de chaînes d'ubiquitines de type K63 sur les lysines 161 et 164 d'E2F1. Cette modification post-traductionnelle est indispensable à la stabilisation de la protéine lors d'un stress génotoxique et elle permet le recrutement du facteur de transcription sur les promoteurs des gènes cibles.

Enfin, l'analyse des propriétés oncogéniques de clAP1 n'ont pas permis, à ce jour, d'évaluer l'importance de la coopération clAP1-E2F1. Cependant, nous avons montré l'importance du domaine BIR1 pour les propriétés oncogéniques de clAP1 (domaine nécessaire à l'interaction de clAP1 avec l'adaptateur moléculaire TRAF2).

**Mots clés :** clAP1, E2F1, ubiquitinylation, IBM.

## **Abstract:**

The cellular inhibitor of Apoptosis 1 (clAP1) behaves as an E3 ubiquitin ligase and has oncogenic properties. Previously, our team has shown that clAP1 can regulate the E2F1 transcription factor activity. My research project has been focused on deepening our current knowledge on this interaction. Firstly, we characterized the E2F1-clAP1 interaction, then we analyzed the regulation of E2F1 by clAP1 and finally assessed the importance of the clAP1-E2F1 interaction for the oncogenic properties of clAP1.

I have demonstrated a interaction of E2F1 with the hydrophobic pocket of the BIR3 domain of clAP1. Moreover, I highlighted that the alpha 1 helix of the BIR3 domain is mandatory for the stability of this pocket. Moreover, we discovered an ubiquitination on lysine 161 and 164 of E2F1 by clAP1. This ubiquitination is essential for the stability and transcriptional activity of E2F1. Finally, it appears that the clAP1 BIR1 domain that is required for the interaction with TRAF2 is involved in its oncogenic properties.

**Keys words:** clAP1, E2F1, ubiquitination, IAP-Binding-Motif.