



*Université de Strasbourg
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : *Sciences du Vivant*
Spécialité : *Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie*

par

Benjamin HERQUEL

Etude du co-répresseur des récepteurs nucléaires TIF1 α : Du contrôle transcriptionnel à la suppression de tumeurs.

Soutenue publiquement le 17 Septembre 2010

Membres du jury :

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| Directeur de thèse : | Dr. Irwin DAVIDSON |
| Rapporteur externe : | Dr. Christine PERRET |
| Rapporteur externe : | Dr. Didier TROUCHE |
| Examineur : | Dr. Cécile ROCHETTE-EGLY |
| Membre invité : | Dr. Florence CAMMAS |

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury Christine PERRET, Cécile ROCHETTE-EGLY et Didier TROUCHE pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

A l'heure du bilan de ces quatre années passées dans son laboratoire, mes pensées vont évidemment vers Régine LOSSON, mon directeur de thèse initial, qui nous a quittés au mois de février dernier. Régine m'a permis de travailler sur un projet fascinant, son projet qu'elle portait à bouts de bras depuis quinze ans avec une énergie hors du commun. Ce qui caractérisait Régine avant tout était une ardeur au travail qui n'a cessé de m'impressionner et un profond sens de l'abnégation. En tant que formatrice, elle m'a fait réaliser au long de ces années ce qu'une réelle minutie au travail pouvait signifier.

Si elle a toujours su m'apporter un soutien indéfectible, l'importance de Florence CAMMAS ne s'est révélée que plus grande ces derniers mois. Je la remercie d'avoir toujours été présente pour distiller les bons conseils, ceux qui nous dirigeaient dans la bonne voie aussi bien dans la façon de mener un projet que d'aborder un protocole. En plus de cela, Florence se singularise par un sens de l'humour qui contribue à l'ambiance chaleureuse qui régnait au labo.

Je remercie Irwin DAVIDSON pour avoir bien voulu prendre la responsabilité d'être mon directeur de thèse. En très peu de temps, Irwin a su reprendre des thématiques qui lui étaient étrangères et ses conseils toujours judicieux m'ont redonné l'impulsion dont j'avais besoin.

Mes remerciements vont aux nombreux membres passés et présents de l'équipe LOSSON : Marielle, Céline, Mariam, Raphaël et Johan, vous avez tous contribué à faire de ce labo un endroit où il fait bon vivre. Thierry LEROUGE mérite une mention spéciale pour nous avoir toujours soulagés de l'aspect « clonage », ainsi que pour avoir été d'un calme olympien qui était particulièrement appréciable au quotidien. Je suis profondément redevable à Margharita CERVINO pour avoir réalisé un nombre incalculable de génotypages à mon intention, ceci avec une grande rigueur au travail. Je remercie particulièrement Khalid OUARARHNI avec qui une excellente entente et un intérêt commun pour notre thématique ont donné lieu à une émulation fructueuse. Enfin, je salue celui que l'on nomme « l'Arménien » (il se reconnaîtra) pour m'avoir pris en charge et formé au début de ma thèse, ainsi que pour avoir alimenté ces années en discussions aussi bien scientifiques que politiquement incorrectes.

Ce n'est pas par hasard si je termine cette thèse sous la coupe de l'équipe DAVIDSON puisque j'ai toujours entretenu de très bons rapports avec ses membres : Emilie, Laurence,

Dominique, les deux Isabelle, Gabrielle, Ataillah, Daniel, Manu, Junior et Igor dont les conseils méthodologiques valent de l'or.

L'IGBMC, en tant que grand centre de recherche, possède le notable avantage de compter de nombreux services communs qui nous aident énormément au quotidien. Je remercie en particulier le service de cytométrie de flux, le service culture cellulaire, le service de microscopie et le service anticorps monoclonaux.

L'équipe LOSSON ne serait pas ce qu'elle a été sans une collaboration suivie avec l'équipe du professeur Manuel MARK. Je tiens à exprimer ma gratitude envers Micha IGNAT, Olivia WENDLING et Marius TELETIN dont les talents en matière d'histopathologie nous ont considérablement aidés, ainsi que le professeur Manuel MARK dont l'avis a constamment compté dans nos travaux.

Je salue bien bas les hommes les plus classes du monde, Nicolas Levy a.k.a. « l'encyclopédie » a.k.a. « c'est difficile de mélanger un Mojito », Benoît Maillot a.k.a. « Peter » a.k.a. « le suisse », et Amin Choukrallah a.k.a. « Steven » a.k.a. « la minorité ethnique ». Merci à Tiphaine de parvenir à canaliser « le suisse » dans ses moments de court-circuit.

Une thèse ne serait pas complète si elle ne donnait pas lieu à des moments de détente dans un lieu approprié, comme (par exemple, au hasard) l'Excalibur dont je remercie Marco, le fier patron. Special thanks to mes fidèles comparses Edge, Rat, Elrickh, Manue, Woods, Foussa, Tankovitch, Spook, Nicokihn, Steph, les Tognazzi, Haarth, Disintegrate, Ju., Pticon, Bill Leeb, Alpoh, Ramiramou, Po, Véro, Ghyslaine et Hervé, Laurence et Patrick, Mkhno, Oges, Caro, Manowawa, Ctuhluh, Sturm, les Fischer, Lily et Paul, Kamys, Aurélie B. Vous représentez.

Je remercie mes parents de m'avoir soutenu pendant toutes ces années et de m'avoir donné la possibilité d'étudier dans les meilleures conditions. Si la phrase « sans vous, rien de tout ça n'aurait été possible » est particulièrement éculée, elle est pourtant tout à fait appropriée à cette occasion.

Je salue au passage l'ensemble de ma grande famille, notamment ceux qui ont une petite idée de ce à quoi je viens d'occuper mes derniers mois, Georges et Mathieu, ainsi que mon grand-père Robert qui a probablement été la seule personne à lire mon mémoire de Master 2 avec autant d'attention (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase* en était effectivement le mot le plus long).

Enfin, je remercie Cécile pour son support constant pendant toutes ces années. Cette thèse lui est dédiée.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Liste des Figures et tableaux | 7 |
| Liste des figures | 7 |
| Liste des tableaux | 8 |
| Liste des abréviations et acronymes | 9 |
| Introduction | 13 |
| I. Généralités sur la transcription..... | 13 |
| II. Les récepteurs nucléaires | 14 |
| 1. Découverte | 15 |
| 2. Structure des récepteurs nucléaires | 17 |
| a. Le motif de liaison à l'ADN : DBD (<i>DNA Binding Domain</i>) | 17 |
| b. Le domaine de liaison du ligand : LBD (<i>Ligand Binding Domain</i>)..... | 18 |
| c. La fonction d'activation AF-1 (<i>Activation Function -I</i>) | 19 |
| d. Les domaines D et F..... | 19 |
| 3. Mécanisme de transactivation par les RN | 19 |
| a. Reconnaissance et action du ligand..... | 19 |
| b. Sélection de l'élément de réponse HRE..... | 21 |
| c. Hétérodimérisation des récepteurs non-stéroïdiens..... | 21 |
| d. Modifications post-traductionnelles..... | 22 |
| III. Les co-facteurs des récepteurs nucléaires | 23 |
| 1. Découverte | 23 |
| 2. Mécanistique | 23 |
| a. En absence d'hormone | 23 |
| b. En présence d'hormone | 24 |
| c. Cofacteurs impliqués dans la répression ligand-dépendante..... | 26 |
| d. Modèle d'activation cyclique de la transcription RN-dépendante | 27 |
| IV. Régulation de la structure chromatinienne..... | 28 |
| 1. La chromatine | 28 |
| a. Le nucléosome..... | 28 |
| b. Structure de la chromatine..... | 28 |
| c. Modifications des histones | 30 |
| i. Acétylation des histones..... | 31 |
| ii. Méthylation des histones..... | 33 |
| iii. Autres modifications | 35 |
| d. Mécanistique de la décondensation chromatinienne | 36 |
| 2. Remodelage ATP-dépendant de la chromatine | 37 |
| 3. Méthylation de l'ADN | 40 |
| 4. Euchromatine / hétérochromatine | 41 |
| V. Les éléments répétés..... | 43 |
| 1. Découverte des éléments répétés | 43 |
| 2. Classification générale | 44 |
| a. Les rétrotransposons non-LTR | 45 |
| b. Les rétrotransposons à LTR | 47 |
| 1. Un sous-type de rétrovirus endogène : les VL30 | 49 |
| VI. La famille des co-facteurs TIF1 | 52 |
| 1. Caractéristiques communes des protéines TIF1 | 52 |
| a. Structure modulaire | 52 |
| i. Le domaine RBCC | 53 |
| ii. Le PHD <i>finger</i> -bromodomaine | 53 |
| iii. La région centrale | 54 |

| | |
|--|-----------|
| b. Activité de répression intrinsèque | 54 |
| c. Identité/similarité des protéines TIF1 | 55 |
| 2. Fonctions spécifiques des différents TIF1 | 56 |
| a. Les orthologues Bonus et Moonshine | 56 |
| b. TIF1 β | 56 |
| i. Identification | 56 |
| ii. Co-répresseur universel des KRAB-ZFP | 57 |
| iii. Mécanismes de régulation transcriptionnelle..... | 58 |
| iv. Rôles physiologiques | 59 |
| c. TIF1 γ | 63 |
| d. TIF1 δ | 64 |
| e. TIF1 α | 64 |
| i. Identification | 64 |
| ii. Mécanismes de régulation transcriptionnelle..... | 65 |
| iii. Fonctions physiologiques..... | 66 |
| VII. Hépatocarcinogénèse..... | 68 |
| 1. Caractéristiques des cellules tumorales..... | 68 |
| 2. Le carcinome hépatocellulaire | 69 |
| a. Etiologie | 69 |
| b. Pathogénèse moléculaire | 70 |
| c. Modèles murins | 73 |
| 3. Voie de l'acide rétinoïque dans la cancérogénèse..... | 75 |
| Projet de thèse : | 78 |
| Partie I : La perte du gène Trim24 (Tif1alpha) confère une activité oncogénique au récepteur de l'acide rétinoïque alpha | 79 |
| Partie II : Interactions fonctionnelles entre TRIM24, TRIM28 et TRIM33 dans la répression du carcinome hépatocellulaire..... | 80 |
| Publication | 81 |
| Partie III : Les protéines TIF1 répriment la transcription des rétrotransposons VL30 pour réguler l'expression de gènes avoisinants | 81 |
| Discussion et perspectives | 82 |
| I. Caractérisation des protéines de la famille TIF1 comme suppresseurs de tumeur dans le foie..... | 82 |
| 1. Dérégulation du cycle cellulaire chez les hépatocytes <i>TIF1α^{-/-}</i> | 83 |
| 2. Implication de TIF1α dans le maintien de la quiescence | 84 |
| 3. Pathogénèse moléculaire..... | 85 |
| a. La voie de l'acide rétinoïque | 85 |
| b. Autres voies dérégulées..... | 85 |
| 4. Spécificité pour le foie | 86 |
| 5. Un modèle valide pour l'homme ? | 87 |
| II. Interactions entre les protéines TIF1 | 88 |
| 1. Purification d'un complexe comprenant les différents TIF1 | 88 |
| 2. Interactions fonctionnelles entre les TIF1..... | 90 |
| III. Les TIF1 dans la répression des éléments transposables..... | 92 |
| 1. Mécanismes de l'inhibition des éléments répétés par les co-facteurs TIF1 | 92 |
| a. Dépendance à l'acide rétinoïque..... | 92 |
| b. Interaction fonctionnelle entre les membres de la famille TIF1 | 93 |
| 2. Impact des rétrotransposons VL30 sur le transcriptome..... | 94 |
| a. Les rétrotransposons VL30 comme promoteurs alternatifs..... | 94 |
| b. Dérégulation de territoires chromatiniens..... | 94 |
| c. Etude globale des dérégulations VL30-dépendantes..... | 95 |

| | |
|--|------------|
| Bibliographie..... | 97 |
| Annexes | 122 |
| Revue I : Trim24 (Tif1 alpha) : Un frein essentiel à l'induction de la transcription par l'acide rétinoïque qui inhibe le cancer du foie..... | 122 |

Liste des Figures et tableaux

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure 1 : Les trois catégories de facteurs participant à l'initiation de la transcription. | 14 |
| Figure 2 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires. | 17 |
| Figure 3 : Structure tridimensionnelle du DBD. | 18 |
| Figure 4 : Changements conformationnels du LBD lors de la fixation du ligand. | 20 |
| Figure 5 : Fixation des RN sur leur élément de réponse. | 21 |
| Figure 6 : Complexes associés à un dimère RAR/RXR en l'absence de ligand. | 24 |
| Figure 7 : Complexes associés à un dimère RAR/RXR en présence de ligand. | 25 |
| Figure 8 : Modèle d'action des complexes TRAP/DRIP. | 26 |
| Figure 9 : Recrutement séquentiel et ordonné des différentes protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires. | 27 |
| Figure 10 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine. | 29 |
| Figure 11 : Le co-activateur ATP-dépendant SWI/SNF catalyse l'éviction des nucléosomes et facilite le recrutement de la PolII. | 38 |
| Figure 12 : Observation en microscopie des différents territoires chromatinien. | 41 |
| Figure 13 : Structure des rétrotransposons à ARN. | 45 |
| Figure 14 : Cycle de réplication du rétrotransposon Ty1. | 48 |
| Figure 15 : Structure des rétrotransposons VL30. | 49 |
| Figure 16 : Structure modulaire des protéines TIF1 et structure tertiaire du tandem PHD <i>finger</i> /bromodomaine. | 52 |
| Figure 17 : Fonction de répression intrinsèque des TIF1. | 55 |
| Figure 18 : Schématisation de la structure en domaines des facteurs de transcription KRAB-ZFP. | 57 |
| Figure 19 : Modèle de recrutement des complexes de remodelage de la chromatine associés à TIF1 β | 59 |
| Figure 20 : TIF1 β est indispensable à l'embryogenèse précoce. | 60 |
| Figure 21 : TIF1 β est indispensable à la spermatogenèse. | 61 |
| Figure 22 : L'interaction des protéines HP1 et TIF1 β est nécessaire à la différenciation terminale des cellules F9 en endoderme pariétal. | 62 |
| Figure 23 : Protéines de fusion oncogéniques impliquant TIF1 α | 67 |
| Figure 24 : Les différentes étapes du développement du CHC humain. | 71 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Liste des 48 récepteurs nucléaires humains | 16 |
| Tableau 2 : Les différentes modifications des histones et leurs conséquences fonctionnelles. | 31 |
| Tableau 3 : Les différentes familles d'enzymes responsables de l'acétylation des histones.. | 32 |
| Tableau 4 : Les différentes enzymes responsables de la méthylation des lysines sur les histones..... | 33 |
| Tableau 5 : Les différentes enzymes responsables de la méthylation des arginines sur les histones..... | 34 |
| Tableau 6 : Les différentes enzymes responsables de la déméthylation des histones. | 34 |
| Tableau 7 : Les différentes familles de co-facteurs ATP-dépendants. | 38 |
| Tableau 8 : Les différentes enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN..... | 41 |
| Tableau 9 : Proportion d'éléments répétés dans les génomes humain et murin. | 43 |
| Tableau 10 : L'expression des rétrotransposons VL30 peut être induite par différents facteurs. | 50 |
| Tableau 11 : Identité/similarité des protéines TIF1. | 56 |
| Tableau 12 : Principaux facteurs étiologiques initiateurs de l'hépatocarcinogénèse..... | 70 |
| Tableau 13 : Principales altérations génétiques retrouvées dans les CHC humains..... | 72 |
| Tableau 14 : Cas de sur-expressions chez la souris entraînant le développement spontané de CHC..... | 74 |
| Tableau 15 : Souris génétiquement invalidées développant spontanément des CHC. | 75 |

Liste des abréviations et acronymes

A

ADNc : Acide désoxyribonucléique codant
ADP : Adénosyl disphosphate
AF : *Activation function*
AFB1 : Aflatoxine B1
Afp : *Alpha-foetoprotein*
AIB1 : *Amplified in Breast cancer*
Anx7 : *Annexin A7*
AOX : Acyl Co-A oxidase
APAK : *ATM and p53-associated KZNF protein*
APC : *Adenomatous polyposis coli*
APL : *Acute promyelocytic leukemia*
RA : Acide Rétinoïque
AR : *Androgen receptor*
ARF : *Alternate Reading Frame*
ARN : Acide ribonucléique
ARNc : ARN non-codant
ATAC : *ADA2A-containing complex*
ATM : *Ataxia-Telangiectasia Mutated*
ATP : Adénosyl triphosphate
AXIN : *Axis inhibitor*

B

βFTZ-F1 : *βFushi TaraZu Factor 1*
BLAST : *Basic Local Alignment and Search Tool*
B-myc : *Brain expressed MYeloCytomatosis oncogene*
B-RAF : *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
BRCA2 : *Breast Cancer 2*
BRE : *TFIIB recognition element*

C

C/EBP : *CCAAT/Enhancer Binding Protein*
cAMP : *cyclic Adenosin monophosphate*
CAR : *Constitutive androstane receptor*
CARM1 : *Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1*
CAT : *Chloramphénicol AcétylTransférase*
CBP : *CREB Binding Protein*
CHC : *Carcinome hépatocellulaire*
CHD : *Chromodomain Helicase DNA-binding protein*
ChIP : *Chromatin immunoprecipitation*
CHO : *Chinese hamster ovary*

CHRAC : *Chromatin remodeling and assembly complex*
C-myc : *Myelocytomatosis oncogene*
CoREST : *Corepressor element Transcription*
CoRNRbox : *Corepressor nuclear receptor box*
COUP-TF : *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor*
CRH : *Corticotropin-releasing hormone*
Cx32 : *Connexin 32*

D

DAX-1 : *Dosage-specific sex reversal Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome, gene 1*
DBD : *DNA binding domain*
DEN : *Diéthyl nitrosamine*
DIRS : *Dictyostelium intermediate repeat sequence*
DLC1 : *Deleted in liver cancer 1*
DMN : *Diméthyl nitrosamine*
DNMT : *DNA MéthylTransférase*
Dot1L : *Disrupter Of Telomere silencing protein 1- Like*
DPE : *Downstream promoter element*
DR : *Direct repeat*
DRIP : *vitamin D Receptor Interacting Protein*

E

E2F : *E2F transcription factor 1*
EAR2 : *ErbA2-related gene-2*
EGF : *Epidermal growth factor*
EGFR : *Epidermal growth factor receptor*
EHMT : *Euchromatic Histone Methyl Transferase*
ELF : *E74-like factor*
ENV : *Enveloppe*
ER : *Estrogen receptor*
ERR : *Estrogen receptor-related*
ERV : *Endogenous retrovirus*
ES : *Embryonic stem cell*
EXT1 : *Exostosin 1*
EZH : *Enhancer of Zest Homologue*

F

FGF : *Fibroblast growth factor*
FGFR : *Fibroblast growth factor receptor*

FXR : *Farnesoid receptor*

G

GAG : *glycosaminoglycans*

GCN5 : *General control non-derepressible-5*

GCNF : *Germ cell nuclear factor*

GLP : *Glucagon-like peptide*

GNAT : *Gcn5-N-acetyltransferase-related*

GNMT : *Glycine-N-methyltransferase*

GPC3 : *Glypican-3*

GPS2 : *G protein Pathway Suppressor 2*

GR : *Glucocorticoid receptor*

GRIP1 : *Glucocorticoid receptor interacting protein 1*

GS : *Glutathione synthetase*

GST : *Glutathione transférase*

GTF : *Facteur général de la transcription*

H

HA : *Hemagglutinine*

HAT : *Histone acétyl-transférase*

HBO1 : *Histone Acetyltransferase Binding to ORC-1*

HBV : *Hepatitis-B virus*

HCV : *Hepatitis-C virus*

HDA1 : *Histone deacetylase 1*

HDAC : *Histone désacetylase*

HGF : *Hepatocyte growth factor*

HIV : *Human immunodeficiency virus*

HMT : *Histone méthyl-transférase*

HNF4 : *Human nuclear factor 4*

HP1 : *Heterochromatin protein 1*

HRE : *Hormone response element*

HSP : *Heat shock protein*

I

IGc2 : *Immunoglobulin-like C2-Type domain*

IGF : *Insulin-like growth factor*

IGFBP : *Insulin-like growth factor binding protein*

IGFR : *Insulin-like growth factor receptor*

INO 80 : *Inositol 80*

Inr : *Initiateur*

IR : *Inverted repeat*

ISWI : *Imitation of switch*

J

JARID : *Jumonji AT-rich interactive domain*

JHDM : *JmjC-containing histone demethylase*

JmjC : *Jumonji C*

JMJD : *Jumonji-domain containing*

JPB1 : *Janus kinase-binding protein-1*

K

KAP-1 : *KRAB-ZFP associated protein 1*

kB : *Kilobases*

KDM : *Lysine (K) DeMethylase*

Kid-1 : *Kidney ischemia and developmental regulated gene 1*

KRAB-ZFP : *Krüppel associated box-zinc finger protein*

KRIP-1 : *KRAB-A interacting protein 1*

L

LBD : *Ligand binding domain*

LBP : *Ligand binding pocket*

Lcn13 : *Lipocalin 13*

LCOR : *Ligand-dependent corepressor*

LINE : *Long Interspersed element*

LRH1 : *Liver receptor homologous protein 1*

LSD1 : *Lysine specific demethylase 1*

LTR : *Long terminal repeat*

LXR : *Liver X receptor*

M

MART : *Mono-ADP-ribosylTransferase*

Mat1a : *Methionine adenosyltransferase 1a*

MBD : *Methyl-CpG-binding domain*

MDM2 : *Mouse double minute chromosome 2*

Mdr2 : *Multidrug resistance protein 2*

MeCP2 : *Methyl CpG binding protein 2*

MEF : *Mouse embryonic fibroblast*

MET : *MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine) HOS Transforming gene*

miRNA : *microRNA*

MLH1 : *MutL homolog 1*

MLL : *Mixed lineage leukemia*

MMP : *Matrix metalloproteinase*

MOF : *Males-absent On the First protein*

MoMLV : *Moloney murine leukemia virus*

MOZ : *Monocytic leukemia zinc-finger protein*

MR : Mineralocorticoid receptor
MTA1 : Metastasis-associated protein 1
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MYST : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60

N

NAD+ : Nicotinamide adénine dinucléotide
N-CoR : Nuclear coreceptor
NEMO : NF-Kappa-B essential modulator
NGFI-B : NGF-induced factor-B
NLS : Nuclear localization signal
NOR1 : Neuron-derived orphan receptor 1
NRbox : Nuclear receptor
Nrf1 : Nuclear respiratory factor 1
NSD1 : Nuclear receptor binding SET domain protein 1
NuA4 : Nucleosome acetyltransferase of histone H4
NuRD : Nucleosome remodeling and deacetylating
NURR1 : Nur-related factor 1

O

ORF : Open Reading Frame

P

PADI : Peptidyl arginine deiminase 4
PARP : Poly-ADP-ribosyltransferase
PBS : Primer binding site
PCAF : p300/CBP associated factor complex
pCIP : p300/CBP-integrator associated protein
PDGF : Platelet derived growth factor
PE : Endoderme pariétal
PHD : Plant homeodomain
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIC : Pre-initiation complex
PML : Promyelocytic leukemia
PNR : Photoreceptor-specific nuclear receptor
PolII : ARN-polymerase II
PP : Polypurine
PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor
PR : Progesterone receptor
PRAME : Preferentially expressed antigen in melanoma
pRB : Retinoblastoma

PRC : Polycomb repressive complex
PRDM : PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing protein
PRE : Endoderme primitif
PRMT : Protein arginine methyltransferase
PSF : Proline/glutamine-rich splicing factor
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PTM : Post-translational modifications
PXR : Pregnane X receptor

R

Rab23 : Ras-like GTPase 23
RAC3 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3
RAR : Retinoic acid receptor
Ras : Rat Sarcoma viral oncogene homologue
RBCC : RING finger, B boxes, Coiled Coil
RD : Repression Domain
REA : Repressor of estrogen receptor activity
RET : Rearranged during transfection
Rev-Erb : Reverse ErbA
RING : Really interesting new gene
RIP140 : Nuclear receptor interacting protein of 140kDa
RIZ : Retinoblastoma protein-Interacting Zinc finger gene
RN : Récepteur nucléaire
RNaseq : RNA sequencing
ROR : RAR-related orphan receptor
RSC : Remodel the structure of chromatin
RSF : Remodeling and spacing factor
Rtt109 : Ty1 transposition gene product 109
RXR : Retinoid X receptor

S

SAGA : Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex
SAM : S-Adenosyl-Methionine
SANT : Swi3/Ada2/NCoR/TFIIID
Sas : Something About Silencing
SET : Su(var)3-9, Enhancer of zest, Trithorax
SETDB1 : SET domain bifurcated 1
SETMAR : SET domain and mariner transposase fusion gene-containing protein
SF1 : Steroidogenic factor 1

SFRP1 : *Secreted frizzled-related protein1*
SHP : *Short heterodimeric partner*
Sin3 : *Yeast switch independent 3*
SINE : *Short interspersed element*
SIRT : *SIRTuines*
SMAD : *Sma / Mothers against decapentaplegic*
SMRT : *Silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors*
SMYD : *SET and MYND domain-containing protein*
SOCS : *Suppressor of cytokine signaling proteins*
SRC : *Steroid receptor coactivator*
STAGA : *SPT3-TAF9-GCN5L Acetylase*
SUMO : *Small ubiquitin like modifier*
SUV39H : *Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*
SUV4-20H : *Suppressor of variegation 4-20 homologue*
SV40 : *Simian virus 40*
SWI-SNF : *Mating type switching-Sucrose non fermentator*
SWR1 : *SWI2/Snf2 related ATPase 1*

T

TAF : *TBP associated factor*
TAK1 : *TGF-beta activated kinase 1*
TAM : *Tamoxifène*
TAP : *Tandem affinity purification*
TBL1 : *Transducin beta-like protein 1*
TERC : *Telomerase RNA component*
TERT : *Telomerase reverse transcriptase*
TFTC : *TBP-free TAF containing complex*
TGF : *Transforming growth factor*
TIF : *Transcription intermediary factor*
TIP60 : *Tat interactive protein*
TLL : *Tailless*
TM : *Transmembrane*
Tob : *transducer of ERBB2*
TPA : *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*

TPRT : *Target primed reverse transcription*
TR2-4 : *Testis receptor 2-4*
TR : *Thyroid hormone receptor*
TRAC : *Thyroid-hormone and Retinoic acid receptor Associated Corepressors*
TRAM1 : *Thyroid hormone receptor activator molecule 1*
TRAP : *Thyroid hormone Receptor Associated Protein*
TRIM : *Tripartite Motif*
tRNA : *ARN de transfert*
TSA : *Trichostatine A*
TSD : *Target site duplication*
TSS : *TIF1 signature sequence*
Txnip : *Thioredoxin-interacting protein*

U

UAS : *Upstream activating sequence*
UTX/Y : *Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, X/Y chromosome*

V

VDR : *Vitamin D3 receptor*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VL30 : *Virus-like 30S*
VP16 : *Herpes simplex virus protein 16*

W

WCRF : *Williams syndrome transcription factor chromatin remodeling factor*
WD40 : *Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every 40 residues*
WDR5 : *WD40 repeat protein 5*
Wnt : *Wingless*

X


XPC : *Xeroderma pigmentosum complementation group C*


Introduction

I. Généralités sur la transcription

L'un des aspects fondamentaux de la biologie consiste à comprendre comment sont déterminés les différents types cellulaires au cours de l'embryogenèse à partir d'une cellule unique. Puisque toutes les cellules d'un organisme possèdent le même patrimoine génétique (à de rares exceptions près), l'expression de leurs gènes doit être modulée de manière spécifique. Ce niveau de contrôle, qui implique des modifications du taux d'expression des gènes sans altération de leur séquence, est appelé « épigénétique ». Le profil d'expression des gènes détermine l'identité et les caractéristiques propres de chaque type cellulaire. La perte de cette identité fonctionnelle est la cause du développement de nombreuses pathologies, notamment de cancers (Keppler et Archer, 2008a et b).

L'expression des gènes est régulée principalement au niveau de l'initiation de la transcription, étape limitante à laquelle participent trois catégories de facteurs (Roeder, 2005 ; Sikorski et Buratowski, 2009 ; **figure 1**) :

 **La machinerie de transcription de base :** Constituée de l'ARN-polymérase II (PolII) et des facteurs généraux de la transcription (GTF : *General Transcription Factor*), elle constitue l'unité minimale nécessaire à l'initiation de la transcription. Elle se fixe préférentiellement au niveau des promoteurs, régions positionnées en amont des gènes et rassemblant plusieurs courtes séquences d'ADN caractéristiques. Parmi celles-ci, on trouve la boîte TATA, l'initiateur (Inr), l'élément promoteur aval (DPE : *Downstream Promoter Element*), l'élément de réponse à TFIIB (BRE : *TFIIB Response Element*) ainsi que les îlots de dinucléotides CpG (Thomas et Chiang, 2006 ; Juven-Gershon et Kadonaga, 2010). La présence de ces éléments permet de former le complexe de pré-initiation (PIC : *Pre-Initiation Complex*) spécifiquement sur le promoteur, et de déterminer l'orientation de la transcription.

 **Les facteurs de transcription séquence-spécifiques :** Ces protéines se lient à des séquences d'ADN qui leur sont propres, appelées « éléments régulateurs en cis » ou « éléments de réponse », situés soit à proximité, soit à distance des gènes. Leur fonction consiste à activer ou réprimer la transcription des groupes de gènes placés sous leur contrôle (Levine et Davidson, 2005 ; Weake et Workman, 2010). Parmi ces facteurs, nous nous intéressons en particulier à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN, voir partie II).

✚ **Les co-facteurs** : Encore appelés facteurs intermédiaires de transcription (TIF : *Transcription Intermediary Factors*), ils interagissent avec les facteurs de transcription séquence-spécifiques et potentialisent leur action en facilitant ou en inhibant l'initiation de la transcription par différents processus que nous détaillerons en partie III.

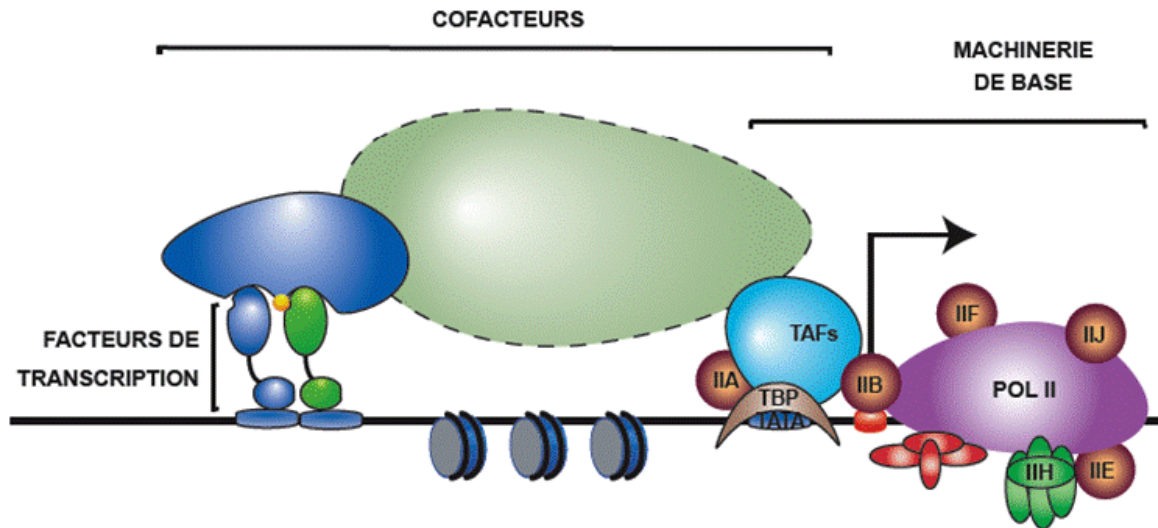


Figure 1 : Les trois catégories de facteurs participant à l'initiation de la transcription.

II. [Les récepteurs nucléaires](#)

Les organismes multicellulaires sont des entités biologiques complexes dont les différents types cellulaires assurent leurs fonctions de manière finement coordonnée. Cette régulation s'opère notamment par la sécrétion de petites molécules appelées hormones, qui constituent des signaux de communication capables d'être intégrés soit par l'organe qui les produit (communication dite « autocrine ») soit par des cibles distantes (communication dite « paracrine »). Le contrôle hormonal est impliqué dans la plupart des aspects de la physiologie, c'est pourquoi ses dysfonctionnements sont à l'origine d'une vaste diversité de pathologies.

Il existe deux types de signalisation en fonction des propriétés des hormones : les hormones hydrophiles peuvent se lier à un récepteur membranaire, la fixation active le récepteur et donne lieu à une cascade de signalisations intracellulaire ; les hormones hydrophobes, quant à elles, diffusent librement au travers des membranes pour atteindre le noyau des cellules. On sait aujourd'hui que les hormones hydrophobes opèrent grâce à la présence de protéines nucléaires capables de les lier avec une haute affinité et d'agir en conséquence sur l'expression de certains gènes. Ces protéines, appelées récepteurs nucléaires

(RN), font partie d'une superfamille de facteurs de transcription séquence-spécifiques dont l'origine phylogénétique remonte à l'émergence des métazoaires (Markov et al., 2008).

1. Découverte

L'implication des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes dans une multitude de processus physiologiques est connue depuis le 19^e siècle (pour revue Evans, 1988 ; Mangelsdorf et al., 1995). Ces petites molécules lipidiques ont été purifiées au début du 20^e siècle (Karrer et al., 1930). Si leur importance dans un certain nombre de pathologies était déjà documentée, il a fallu attendre les années 1960 pour commencer à comprendre leur mode de fonctionnement. Grâce à l'utilisation d'hormones radiomarquées, il fut possible d'isoler les protéines auxquelles elles se lient (Jacobson et al., 1960). En parallèle à ces études, un lien fut établi entre le traitement à l'œstradiol et une augmentation d'activité de la PolIII (Weil et al., 1963). Des travaux consécutifs permirent d'établir une corrélation entre le traitement aux hormones stéroïdiennes et la translocation de leurs protéines réceptrices à l'intérieur du noyau des cellules où elles se fixaient sur la chromatine et induisaient des changements d'expression d'un certain nombre de gènes (Ivarie et O'Farrell, 1978).

Durant les années 1980, ces récepteurs purent être purifiés par des approches biochimiques (Ringold, 1985 ; Yamamoto, 1985). Ces travaux permirent de cloner les séquences d'ADNc correspondant aux récepteurs des glucocorticoïdes (Govindan et al., 1985; Hollenberg et al., 1985 ; Miesfeld et al., 1984 ; Weinberger et al., 1985), des œstrogènes (Green et al., 1986; Krust et al., 1986), de l'hormone thyroïdienne (Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986), de la progestérone (Jeltsch et al., 1986; Loosfelt et al., 1986), des minéralocorticoïdes (Arriza et al., 1987), de la vitamine D (Baker et al., 1988 ; McDonnell et al., 1987), de l'acide rétinoïque (Brand et al., 1988 ; Giguère et al., 1987 ; Krust et al., 1989 ; Petkovich et al., 1987), des androgènes (Chang et al., 1988) ou encore des acides gras (Issemann et Green, 1990).

Par la suite, l'utilisation de sondes à faible stringence permit l'identification des premiers RN « orphelins » (nommés ainsi car ils ne possédaient alors aucun ligand connu) sur la base de leur homologie de séquence avec les RN (Giguère et al., 1988 ; Benoît et al., 2006). Le séquençage du génome humain a permis de compléter cette liste qui comprend 48 RN dont 24 sont considérés comme orphelins (**tableau 1**).

| Nom | Abbréviation | Nomenclature | Ligand |
|---|-------------------|--------------|--|
| <i>Thyroid hormone receptor</i> | TR α | NR1A1 | <i>hormone thyroïdienne T3</i> |
| | TR β | NR1A2 | <i>hormone thyroïdienne T3</i> |
| <i>Retinoic acid receptor</i> | RAR α | NR1B1 | <i>Acide rétinoïque</i> |
| | RAR β | NR1B2 | <i>Acide rétinoïque</i> |
| | RAR γ | NR1B3 | <i>Acide rétinoïque</i> |
| <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> | PPAR α | NR1C1 | <i>Acide gras, leukotriène B4</i> |
| | PPAR β | NR1C2 | <i>Acides gras</i> |
| | PPAR γ | NR1C3 | <i>Acides gras, prostaglandine J2</i> |
| <i>Reverse ErbA</i> | Rev-erbo α | NR1D1 | <i>Orphelin</i> |
| | Rev-erb β | NR1D2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>RAR-related orphan receptor</i> | ROR α | NR1F1 | <i>Orphelin</i> |
| | ROR β | NR1F2 | <i>Orphelin</i> |
| | ROR γ | NR1F3 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Liver X receptor</i> | LXR α | NR1H3 | <i>Oxystérol</i> |
| | LXR β | NR1H2 | <i>Oxystérol</i> |
| <i>Farnesoid receptor</i> | FXR | NR1H4 | <i>Acides biliaires, feraxamine</i> |
| <i>Vitamin D3 receptor</i> | VDR | NR1I1 | <i>Vitamine D3</i> |
| <i>Pregnane X receptor</i> | PXR | NR1I2 | <i>Xénobiotiques</i> |
| <i>Constitutive androstan receptor</i> | CAR | NR1I3 | <i>Xénobiotiques, phénobarbital</i> |
| <i>Human nuclear factor 4</i> | HNF4 α | NR2A1 | <i>Orphelin</i> |
| | HNF4 β | NR2A3 | <i>Orphelin</i> |
| | HNF4 γ | NR2A2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Retinoid X receptor</i> | RXR α | NR2B1 | <i>Acide rétinoïque 9-cis</i> |
| | RXR β | NR2B2 | <i>Acide rétinoïque 9-cis</i> |
| | RXR γ | NR2B3 | <i>Acide rétinoïque 9-cis</i> |
| <i>Testis receptor</i> | TR2 | NR2C1 | <i>Orphelin</i> |
| | TR4 | NR2C2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Tailless</i> | TLL | NR2E2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Photoreceptor-specific nuclear receptor</i> | PNR | NR2E3 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor</i> | COUP-TFI | NR2F1 | <i>Orphelin</i> |
| | COUP-TFII | NR2F2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>ErbA2-related gene-2</i> | EAR2 | NR2F6 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Estrogen receptor</i> | ER α | NR3A1 | <i>Oestradiol-17β, tamoxifène, raloxifène</i> |
| | ER β | NR3A2 | <i>Oestradiol-17β, composés synthétiques</i> |
| <i>Estrogen receptor-related</i> | ERR α | NR3B1 | <i>Orphelin</i> |
| | ERR β | NR3B2 | <i>Orphelin</i> |
| | ERR γ | NR3B3 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Glucocorticoid receptor</i> | GR | NR3C1 | <i>Cortisol, dexaméthasone, RU486</i> |
| <i>Mineralocorticoid receptor</i> | MR | NR3C2 | <i>Aldostérone, spiro lactone</i> |
| <i>Progesterone receptor</i> | PR | NR3C3 | <i>Progestérone, médroxyprogestérone acétate, RU486</i> |
| <i>Androgen receptor</i> | AR | NR3C4 | <i>Testostérone, flutamide</i> |
| <i>NGF-induced factor B</i> | NGFI-B | NR4A1 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Nur-related factor 1</i> | NURR1 | NR4A2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Neuron-derived orphan receptor 1</i> | NOR1 | NR4A3 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Steroidogenic factor 1</i> | SF1 | NR5A1 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Liver receptor homologous protein 1</i> | LRH1 | NR5A2 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Germ cell nuclear factor</i> | GCNF | NR6A1 | <i>Orphelin</i> |
| <i>DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1</i> | DAX-1 | NR0B1 | <i>Orphelin</i> |
| <i>Short heterodimeric partner</i> | SHP | NR0B2 | <i>Orphelin</i> |

Tableau 1 : Liste des 48 récepteurs nucléaires humains

2. Structure des récepteurs nucléaires

L'analyse des séquences peptidiques des RN révèle six régions conservées (nommées A-F ; Krust et al., 1986) correspondant à trois domaines fonctionnels distincts (Huang et al., 2010) (**figure 2**).

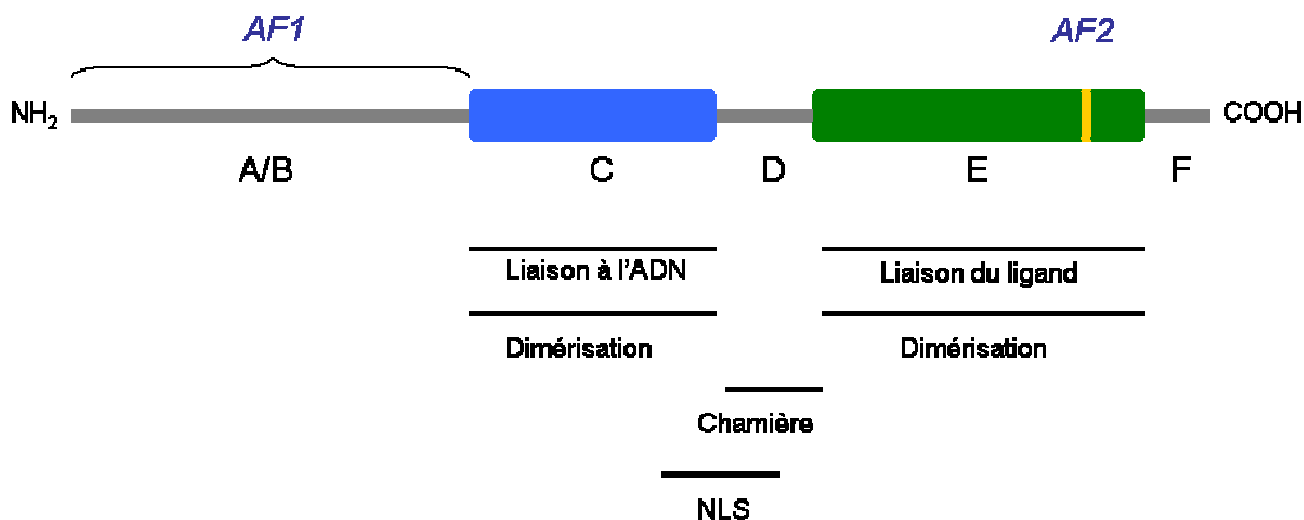


Figure 2 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires. Les différents domaines (A/B, C, D, E et F) sont représentés des extrémités N- à C-terminales (NH₂ et COOH). Les régions C (DBD en bleu) et E (LBD en vert), respectivement impliquées dans la liaison à l'ADN et au ligand, sont conservées dans la superfamille. Les régions A/B, D et F, représentées en gris, sont variables en séquence et en taille. La plupart des RN possèdent deux fonctions de transactivation : AF-1 dans la région N-terminale qui est ligand-indépendante ; AF-2, dans la partie C-terminale du domaine E (en jaune), qui est régulée par le ligand.

a. Le motif de liaison à l'ADN : DBD (DNA Binding Domain)

Situé dans la région C, il est le domaine le plus conservé dans la superfamille des RN excepté pour les récepteurs orphelins DAX1 (*Dosage-specific sex reversal Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome 1* ; Zanaria et al., 1994) et SHP (*Short Heterodimeric Partner* ; Seol et al., 1996) desquels il est absent. Structuré en deux hélices α , deux doigts de zinc riches en cystéines et un domaine carboxy-terminal, il permet la fixation à l'ADN au niveau des éléments de réponse aux hormones (HRE : *Hormone Responsive Element*) (**figure 3**). Il est néanmoins suffisamment variable entre les RN pour assurer leur spécificité d'affinité aux HRE correspondants (Umesono et al., 1989).

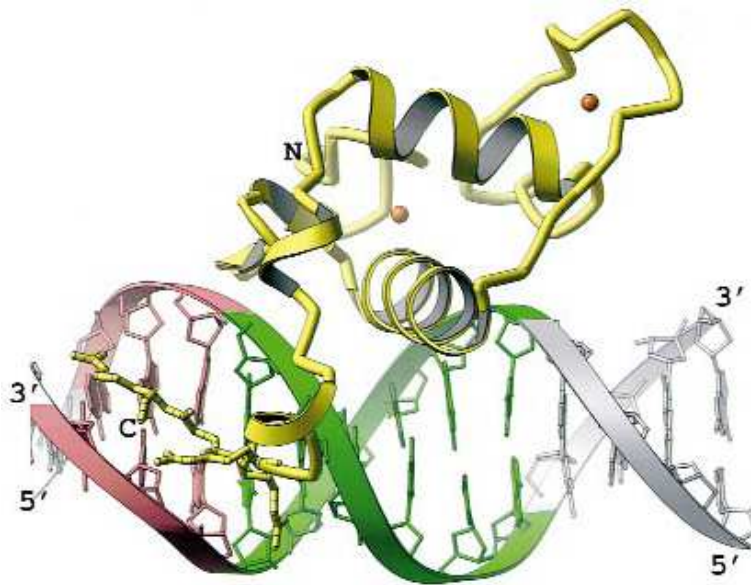


Figure 3 : Structure tridimensionnelle du DBD. Cas du récepteur nucléaire monomérique NGFI-B (d'après Meinke et Sigler, 1999). Les atomes de zinc sont matérialisés par des sphères rouges, l'élément de réponse est figuré en vert.

b. Le domaine de liaison du ligand : LBD (*Ligand Binding Domain*)

Présent chez les 48 RN, le LBD est localisé dans la partie carboxy-terminale. Il est fortement conservé tant au niveau de la séquence (Laudet et al., 1992) qu'au niveau de la structure tridimensionnelle (Wurtz et al., 1996). Il est constitué de plusieurs domaines assurant des fonctions interdépendantes :

- ✚ L'homo- ou hétéro-dimérisation entre RN
- ✚ L'interaction avec les protéines chaperones
- ✚ La liaison du ligand dans la LBP (*Ligand Binding Pocket*) dont la séquence, bien que conservée dans la superfamille des RN, varie suffisamment pour assurer la sélectivité du ligand
- ✚ L'interaction avec les co-facteurs *via* notamment l'hélice 12 qui, par ses changements de conformation au sein du LBD, gouverne la fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand AF-2 (*Activation Function -2*) (voir partie 3.a.)

c. La fonction d'activation AF-1 (*Activation Function -1*)

Elle est située dans la région A/B et se trouve être peu conservée entre les membres de la superfamille des RN, voire absente dans certains cas. Sa structure tridimensionnelle est intrinsèquement désordonnée ce qui rend son élucidation quasiment impossible (Combet et al., 2000). Elle est capable d'activer la transcription indépendamment du ligand dans le contexte d'un récepteur dont le LBD est invalidé (Bocquel et al., 1989 ; Tora et al., 1989). Dans le contexte d'un RN complet, elle peut néanmoins être dépendante de la fixation du ligand dans le LBD (Kumar et Litwack, 2009).

d. Les domaines D et F

La région D, aussi appelée région « charnière » permet une souplesse dans la mobilité des régions C et E. Elle peut être indirectement impliquée dans la liaison à l'ADN (Lee et al., 1993) ou comporter un motif d'adressage nucléaire (NLS : *Nuclear Localization Signal* ; Ylikomi et al., 1992). La région F est variable voire absente selon le RN. Il a été démontré qu'elle pouvait influencer l'activité AF-2 (Montano et al., 1995).

3. Mécanisme de transactivation par les RN

a. Reconnaissance et action du ligand

Le modèle d'activation général des RN est illustré par un récepteur séquestré dans le cytoplasme et lié par des protéines de choc thermique (HSP : *Heat Shock Protein*), qui est transloqué dans le noyau en réponse à la liaison de son ligand pour activer la transcription de ses gènes cibles (Pratt et Toft, 1997 ; Pratt et al., 2004). Ce modèle, permettant aux gènes cibles de passer d'un niveau de transcription « basal » à un niveau activé par l'intervention du RN, est adapté aux récepteurs stéroïdiens (comme *Estrogen Receptor* : ER, *Mineralocorticoid Receptor* : MR, *Glucocorticoid Receptor* : GR, ou *Androgen Receptor* : AR).

En effet, les récepteurs non-stéroïdiens (comme *Thyroid hormone Receptor* : TR ou *Retinoic Acid Receptor* : RAR) sont localisés dans le noyau en l'absence de ligand, liés à l'ADN au niveau de leurs éléments de réponse. Ils sont alors en complexe avec des protéines faisant partie de la classe des co-répresseurs dont l'activité consiste à inhiber la transcription de leurs gènes cibles. Dans ce cas, la liaison du ligand provoque la dissociation de ces

complexes et permet au gène de passer d'un état réprimé à un état activé. Ce modèle doit néanmoins être considéré avec précaution puisqu'il est aujourd'hui connu que les RAR peuvent être trouvés dissociés de l'ADN (Bruck et al., 2009) voire dans le cytoplasme ou en contact avec la membrane cellulaire où ils possèdent différents effets non-génomiques (pour revue Rochette-Egly et Germain, 2009).

L'activation des RN dépend de la fixation du ligand dans la LBP. L'élucidation de la structure du LBD en absence (Bourguet et al., 1995) et en présence de ligand (Wurtz et al., 1996) a révélé le mécanisme dit du « piège à souris » par lequel on décrit le changement de conformation du LBD. Cette modification implique principalement des changements positionnels des hélices 3, 5, 11 et 12 du LBD où l'hélice H12, initialement exposée au solvant, se referme sur la LBP comme un couvercle. Ce mouvement abroge les surfaces d'interaction initiales de la fonction AF-2 pour en créer de nouvelles, permettant ainsi aux RN de changer de partenaires protéiques (**figure 4**).

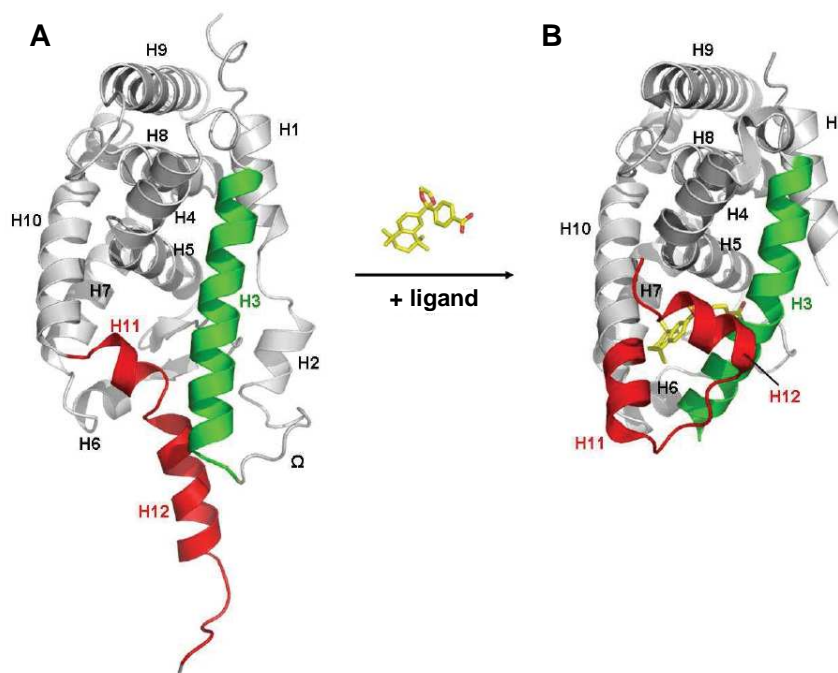


Figure 4 : Changements conformationnels du LBD lors de la fixation du ligand. (A) Forme apo (sans ligand) du LBD de hRXR α (Bourguet et al., 1995) représenté avec les éléments subissant les réarrangements conformationnels majeurs lors de la fixation du ligand en vert (hélice H3) et en rouge (hélice H11 et H12). (B) Forme holo (liée par le ligand, dans ce cas le BMS649) de hRXR α . Les modifications structurales majeures permettent à l'hélice H12 d'être stabilisée en conformation dite active.

b. Sélection de l'élément de réponse HRE

La fixation des RN dans la région régulatrice de leurs gènes cibles dépend d'une courte séquence d'ADN appelée HRE placée à proximité du site d'initiation de la transcription ou à une distance pouvant atteindre plusieurs kB. Les HRE sont dérivés de la séquence RGGTCA (où R est une purine) qui est retrouvée soit en un exemplaire unique, soit en deux exemplaires colinéaires (DR : *Direct Repeat*) ou de direction opposée (IR : *Inverted Repeat*). L'affinité du RN pour un HRE dépend de sa séquence et, dans le cas des répétitions, de leur orientation et de leur espacement (Chambon, 1996). En effet, un hexamère simple n'est affiné que pour un récepteur monomérique, tandis que les IR lient les RN homodimériques en configuration dite « tête à tête » (cas des RN stéroïdiens) et les DR lient les RN hétérodimériques en configuration dite « tête à queue » (cas des RN non-stéroïdiens) (Aranda et Pascual, 2001 ; **figure 5**).

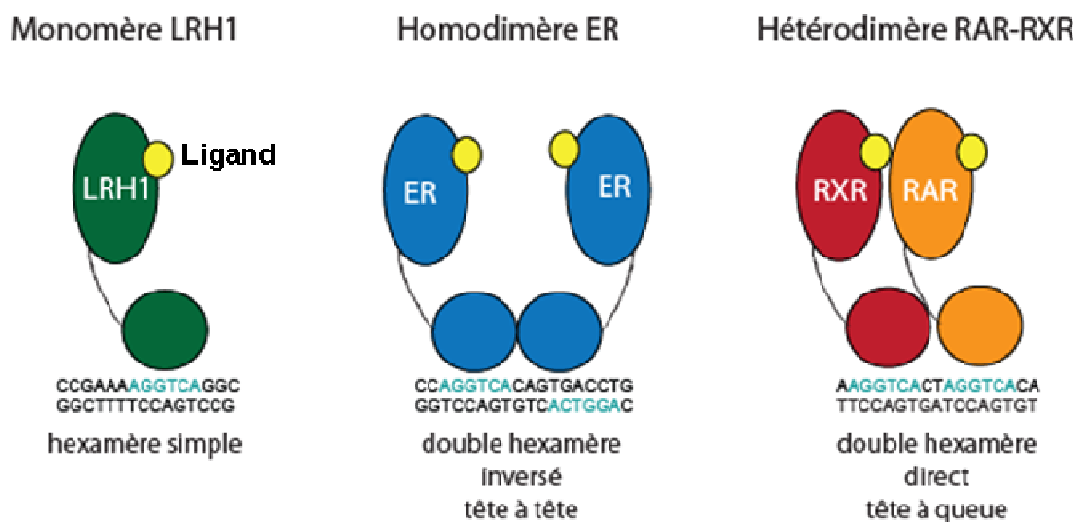


Figure 5 : Fixation des RN sur leur élément de réponse. Ils se fixent sur un élément de réponse hexamérique dans le cas d'un monomère (exemple de LRH1), ou sur des doubles hexamères inversés ou directs, dans le cas, respectivement, d'homodimères ou d'hétérodimères (exemples de ER et RAR/RXR).

c. Hétérodimérisation des récepteurs non-stéroïdiens

Les récepteurs nucléaires non-stéroïdiens fonctionnent au niveau transcriptionnel sous forme d'hétérodimères avec l'une des trois isoformes de RXR (α , β et γ) (Leid et al., 1992), sans affinité préférentielle. Les RXR peuvent aussi exister sous la forme d'homodimères

(Mangelsdorf et al., 1991). Initialement considérés comme des RN orphelins, les RXR ont en réalité une faible affinité pour l'acide rétinoïque tout-trans, et une forte affinité pour son dérivé 9-cis (Mangelsdorf et al., 1992). Ainsi, les hétérodimères formés possèdent potentiellement deux ligands distincts, l'acide rétinoïque 9-cis et le ligand du RN partenaire. Deux types de réponse ont été caractérisés : la réponse dite « permissive » pour laquelle les deux ligands ont un effet indépendant, c'est le cas pour PPAR, LXR, PXR et FXR ; la réponse « non permissive » pour laquelle le RXR ne peut pas activer la transcription malgré la liaison de son ligand lorsque le partenaire d'interaction n'est pas activé. Cette situation, aussi appelée « subordination de RXR », concerne les RAR, TR et VDR. Dans ce second mode de fonctionnement, lorsque le partenaire RAR/TR ou VDR est activé, l'effet de l'acide rétinoïque 9-cis sur RXR est potentialisé, donnant lieu à une réponse synergique (Westin et al., 1998 ; pour revue Germain et al., 2006).

d. Modifications post-traductionnelles

Le ligand n'est pas le seul facteur capable de moduler l'activité des RN. En effet, les RN et leurs co-facteurs sont sujets à une vaste diversité de modifications post-traductionnelles (PTM : *Post Translational Modification*) telles l'ubiquitinylation, la SUMOylation, l'acétylation, la méthylation ou encore la phosphorylation (Baek et Rosenfeld, 2004). En fonction du type de modification et du résidu ciblé, ce processus aboutit à une modulation positive ou négative de l'activité du RN. Ces PTM sont régulées par diverses voies de signalisation qui ajoutent un niveau de complexité au seul contrôle hormonal.

III. Les co-facteurs des récepteurs nucléaires

1. Découverte

Dans le but d'élucider le fonctionnement des récepteurs nucléaires, plusieurs équipes ont été amenées à recourir à la sur-expression par transfection transitoire. Il a ainsi été mis en évidence que la sur-expression d'un RN pouvait inhiber l'activité d'un autre RN (Meyer et al., 1989 ; Tasset et al., 1990), observation qui a engendré la théorie selon laquelle il existerait dans la cellule des facteurs présents en quantité limitantes dont l'utilisation serait commune à plusieurs RN. D'autre part, il a été observé que l'effet d'un même RN pouvait différer d'un promoteur à un autre (Tora et al., 1989), témoignage supplémentaire de l'existence de ces facteurs additionnels, désignés sous le nom de « co-facteurs » ou « facteurs intermédiaires de transcription » (TIF : *Transcription Intermediary Factor*).

Les premiers co-facteurs purent être identifiés par des approches biochimiques (p160 : Halachmi et al., 1994), par *Far-Western blotting* (RIP140 : Cavallès et al., 1994 ; TIF2 : Voegel et al., 1996) et grâce au crible double-hybride dans la levure (SMRT : Chen et Evans, 1995 ; N-CoR : Horlein et al., 1995 ; TIF1 α : Le Douarin et al., 1995 ; Src-1 : Onate et al., 1995 ; Sug1 : Vombaur et al., 1996 ; TIF1 β : Le Douarin et al., 1996).

Plus de deux-cents co-facteurs ont été mis en évidence, capables de réguler la transcription positivement ou négativement. Il est aujourd'hui connu que ces co-facteurs n'agissent pas seuls mais au sein de grands complexes multiprotéiques (Perissi et Rosenfeld, 2005).

2. Mécanistique

a. En absence d'hormone

En absence d'hormone, les RN non-stéroïdiens présentent une conformation du LBD ouverte et sont capables d'interagir avec une classe fonctionnelle de protéines nommées co-répresseurs en vertu de leur capacité intrinsèque à inhiber la transcription. Leur motif d'interaction avec les RN, baptisé *CoRNRbox* (*CoRepressor Nuclear Receptor box*), est constitué de la séquence d'acides aminés LXX I/H IXXX I/L (L est une leucine, I une isoleucine, H une histidine et X un acide aminé quelconque) (Perissi et al., 1999).

Les premiers co-répresseurs de ce type à avoir été mis en évidence sont SMRT (Chen et al., 1995) et N-CoR (Horlein et al., 95) définissant à eux deux la famille TRAC (*Thyroid-hormone and Retinoic acid receptor Associated Corepressors*) en raison de leur forte homologie (45% d'identité ; Privalsky, 2004). Ils interagissent avec RAR et TR lorsque ces RN sont hétérodimérisés avec RXR, et ont pour effet de réprimer la transcription basale. Ils sont en réalité capables d'interagir avec de nombreux RN, y compris des récepteurs stéroïdiens (ER, PR), en particulier lorsque ceux-ci sont liés à un antagoniste.

SMRT et NCoR ne possèdent pas de fonction enzymatique propre, mais peuvent, *via* leurs domaines SANT (Swi3/Ada2/NCoR/TFIID) et RD (Repression Domain) recruter des complexes multiprotéiques dont certaines sous-unités sont des enzymes. Leurs partenaires identifiés à ce jour sont HDAC3 (Histone DeACetylase -3), TBL1 (Transducin Beta-Like protein 1), TBLR1 (Transducin Beta-Like Related protein 1) et GPS2 (G protein Pathway Suppressor 2) (Guenther et al., 2000 ; Li et al., 2000 ; pour revue Perissi et al., 2010 ; **figure 6**).

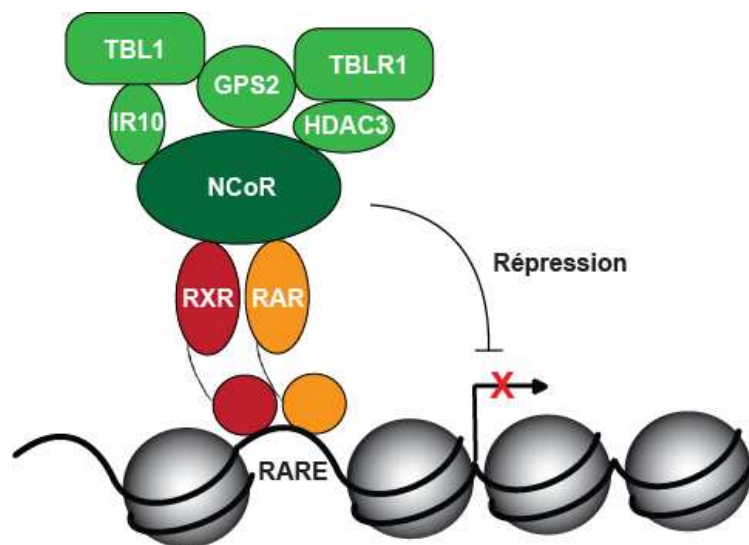


Figure 6 : Complexes associés à un dimère RAR/RXR en l'absence de ligand.

b. En présence d'hormone

La découverte de protéines capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires en présence de leur ligand a posé les bases de la compréhension du mécanisme d'activation de la transcription. L'un des premiers co-activateurs découverts, SRC1 (Onate et al., 1995), fait en réalité partie d'une famille de protéines d'environ 160 kDa (la famille p160) comprenant

plusieurs membres de séquence proche : NCOA1 (SRC1), NCOA2 (TIF2 GRIP1, SRC2) et NCOA3 (SRC3, pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) (Hong et al., 1997 ; Torchia et al., 1997 ; Voegel et al., 1996 ; Yao et al., 1996). Les protéines p160 font figure de prototype de co-activateurs capables d'interagir avec les RN uniquement lorsqu'ils sont liés à leur ligand. La conformation particulière du LBD permet de recruter ces protéines par l'intermédiaire de leur domaine NRbox (*Nuclear Receptor box*) de séquence LXXLL (où L est une Leucine, X un acide aminé quelconque) (Le Douarin et al., 1996a, Heery et al., 1997) qui constitue une hélice α amphipathique capable de s'arrimer au niveau du sillon hydrophobe formé par les hélices 3, 4, 5 et 12 du LBD (Darimont et al., 1998).

Les co-activateurs de la famille p160 fonctionnent en partie grâce à leur domaine à activité histone acétyl-transférase (Chen et al., 1997 ; Spencer et al., 1997). Ils sont aussi capables d'interagir avec d'autres protéines, d'une part les co-activateurs de la famille p300 qui possèdent eux aussi une activité histone acétyl-transférase et sont capables d'interagir avec la machinerie de transcription de base (Chan et Lathangue, 2001), d'autre part des coactivateurs à activité histone méthyl-transférase tels que CARM1 et PRMT1 (Chen et al., 1999), mais aussi des protéines à activité kinasique, ubiquitine-ligase ou ATPasique (telles SWI-SNF : *maiting type SWItching-Sucrose Non Fermentator*) (Perissi et Rosenfeld, 2005 ; Rosenfeld et al., 2006 ; **figure 7**).

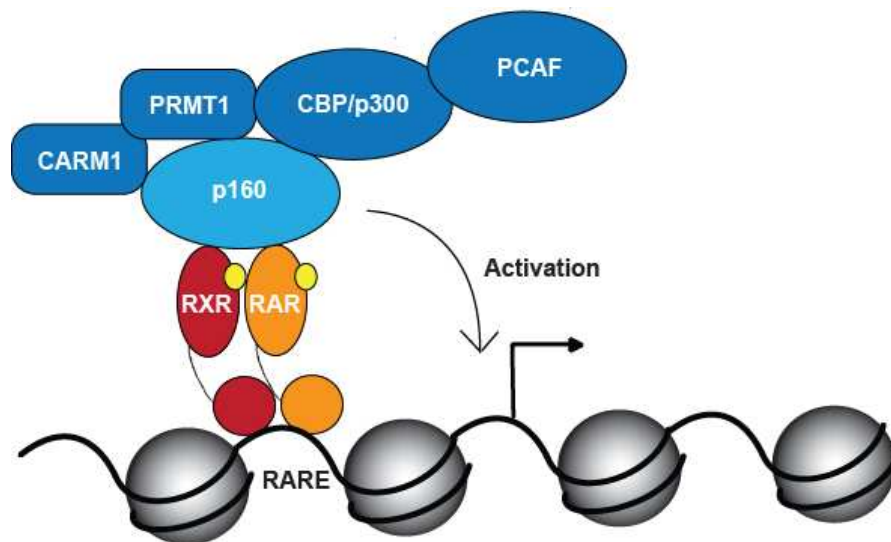


Figure 7 : Complexes associés à un dimère RAR/RXR en présence de ligand.

Parmi les co-facteurs pouvant être recrutés par les RN, une classe particulière est constituée par les homologues du complexe « Mediator » de levure. Chez les mammifères, il en existe plusieurs formes capables d'interagir avec les RN, notamment TRAP (*Thyroid*

hormone Receptor Associated Protein) et DRIP (*vitamin D Receptor Interacting Protein*) (Fondell et al., 1996 ; Rachez et al., 1998). Ces complexes « mediator-like » comprennent de nombreuses sous-unités dont l'utilisation n'est pas restreinte aux RN (Malik et Roeder, 2005). Ils facilitent l'initiation de la transcription en jouant le rôle de pont entre les RN et la PolII, ainsi que les GTF comme TFIIB, TFIID et TFIIE (Baek et al., 2006 ; **figure 8**).

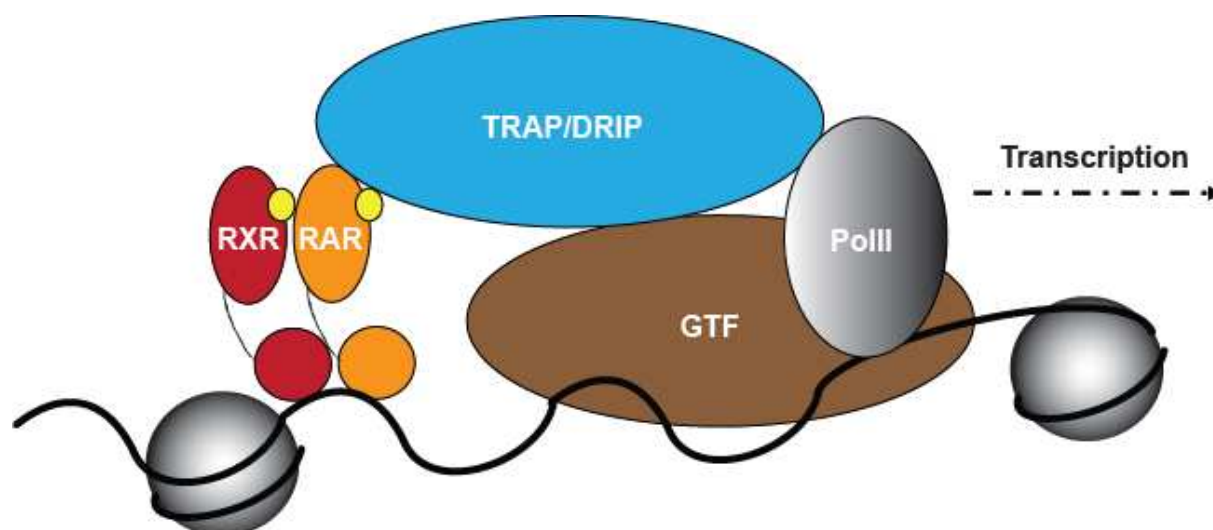


Figure 8 : Modèle d'action des complexes TRAP/DRIP. Les complexes TRAP/DRIP jouent le rôle de pont entre les récepteurs nucléaires, les GTF et la PolII.

c. Cofacteurs impliqués dans la répression ligand-dépendante

Les cofacteurs capables d'interagir avec les RN ligandés n'ont pas toujours un effet activateur sur la transcription. De nombreuses protéines ont été caractérisées comme capables de réprimer la transactivation des RN en présence d'hormone parmi lesquelles TIF1 α (Le Douarin et al., 95), RIP140 (*Receptor Interaction Protein 140*) (Cavailles et al., 1995), LCOR (*Ligand dependant CORepressor*) (Fernandes et al., 2003), PRAME (*PReferentially expressed Antigen in MElanoma*) (Epping et al., 2005), REA (*Repressor of Estrogen Activity*) (Delage-Mourroux et al., 2000), Hairless (Thompson et Bottcher, 1997), MTA1 (Mazumdar et al., 2001) et NSD1 (*NR-binding SET Domain containing protein 1*) (Huang et al., 1998). Ces protéines partagent un certain nombre de caractéristiques communes : Elles possèdent un ou plusieurs motifs NRbox et elles recrutent, entre autres partenaires, des HDAC tout comme les répresseurs des RN non ligandés SMRT et NCoR (Gurevich et al., 2007), à l'exception notable de PRAME qui recrute les protéines du groupe Polycomb (Grewal et Jia, 2007).

d. Modèle d'activation cyclique de la transcription RN-dépendante

L'implication de ces différentes classes de protéines suggère un recrutement interdépendant et ordonné en plusieurs étapes dont la dissection a été réalisée par l'analyse d'expériences de transcription *in vitro* (Dillworth et Chambon, 2001) et de ChIP (Shang et al., 2000 ; Reid et al., 2003 ; Métivier et al., 2003 ; pour revue Perissi et Rosenfeld, 2005). Des cycles de recrutement et dégradation des différents acteurs ont lieu durant l'activation de l'expression des gènes cibles, cycles dont le rythme est régulé de manière prépondérante par l'ubiquitination des différentes protéines impliquées (**figure 8**).

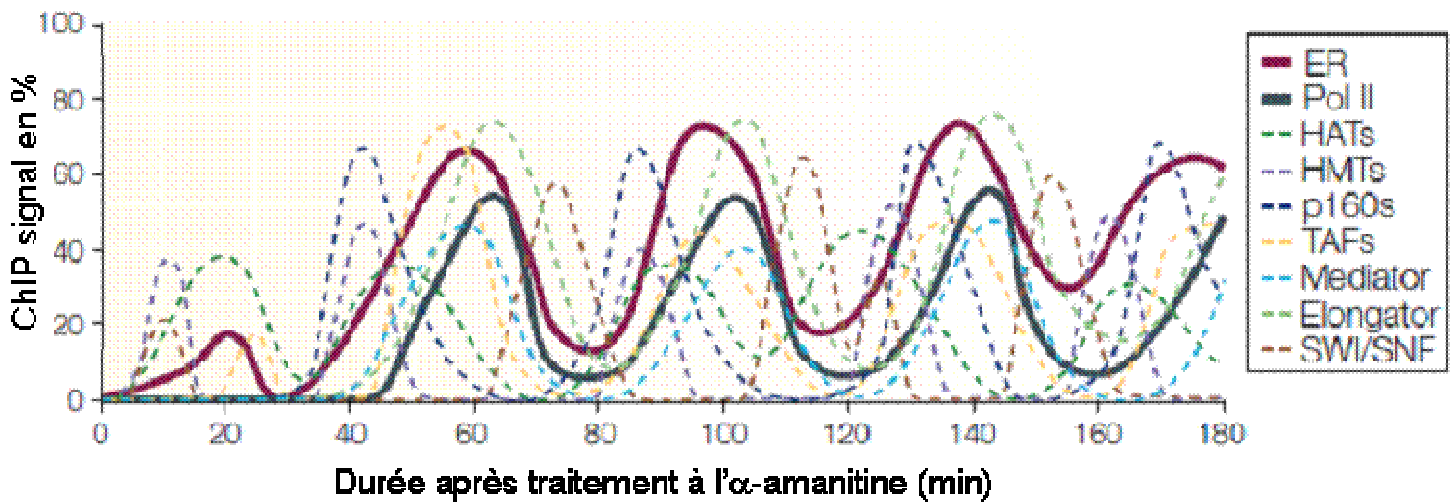


Figure 9 : Recrutement séquentiel et ordonné des différentes protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

IV. Régulation de la structure chromatinienne

1. La chromatine

a. Le nucléosome

L'ADN n'est pas nu au sein du noyau, mais enroulé à raison de 146 paires de bases autour de structures multiprotéiques constituées d'un octamère de protéines basiques nommées « histones » (Kornberg, 1974 ; Kornberg et Lorch, 1999), cet ensemble histones/ADN est appelé « nucléosome ». On distingue plusieurs types d'histones :

✚ **Les histones de la particule cœur**, ou histones « canoniques » (H2A, H2B, H3 et H4), sont de petites protéines basiques d'environ 15 kDa, très conservées en séquence au cours de l'évolution (Malik et Henikoff, 2003). Elles sont formées d'un domaine central *histone-fold* structuré en trois hélices- α reliées entre elles par des boucles flexibles, et d'extrémités N et C-terminales non structurées.

✚ **Les histones de liaison** ou histones « linker » sont peu conservés entre les espèces et présentent des profils d'expression spécifiques au cours du développement et de la différenciation cellulaires (pour revue, Godde et Ura, 2009). La structure de ces histones, dont le prototype majeur est l'histone H1, comprend un domaine central globulaire flanqué de part et d'autre d'une courte région N-terminale et d'une longue région C-terminale basique peu structurée. Du fait de leurs propriétés de pontage inter-nucléosomal, les histones de liaison jouent un rôle important dans l'espacement des unités nucléosomales et dans la topologie et le degré de compaction de l'ADN (Happel et Doenecke, 2009).

✚ **Des variants d'histones** non-alléliques ont été décrits pour chaque type d'histone à l'exception d'H4. Ils présentent des variations de séquence par rapport aux histones canoniques d'où émergent des propriétés biochimiques différentes (Talbert et Henikoff, 2010). Ils sont exprimés tout au long du cycle cellulaire contrairement aux histones canoniques dont l'expression est restreinte à la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de tels variants d'histones permet de moduler l'accès à l'ADN chromatinien.

b. Structure de la chromatine

La structure formée par l'assemblage ADN/histones put être observée par Walther Flemming grâce à l'utilisation de colorants basiques ; elle fut baptisé « chromatine » en vertu

de sa capacité à fixer ces colorants. Au tout début du 20^e siècle, Theodor Boveri remarqua que la chromatine était capable de se condenser en chromosomes lors de la mitose. En 1928, Emil Heitz découvrit que la chromatine pouvait être colorée plus ou moins fortement lors de l'interphase et nomma « euchromatine » les régions faiblement colorées, en opposition à l'« hétérochromatine » qui est fortement colorée. Il émit l'hypothèse selon laquelle les régions fortement colorées étaient plus condensées et pouvaient contenir des gènes non exprimés.

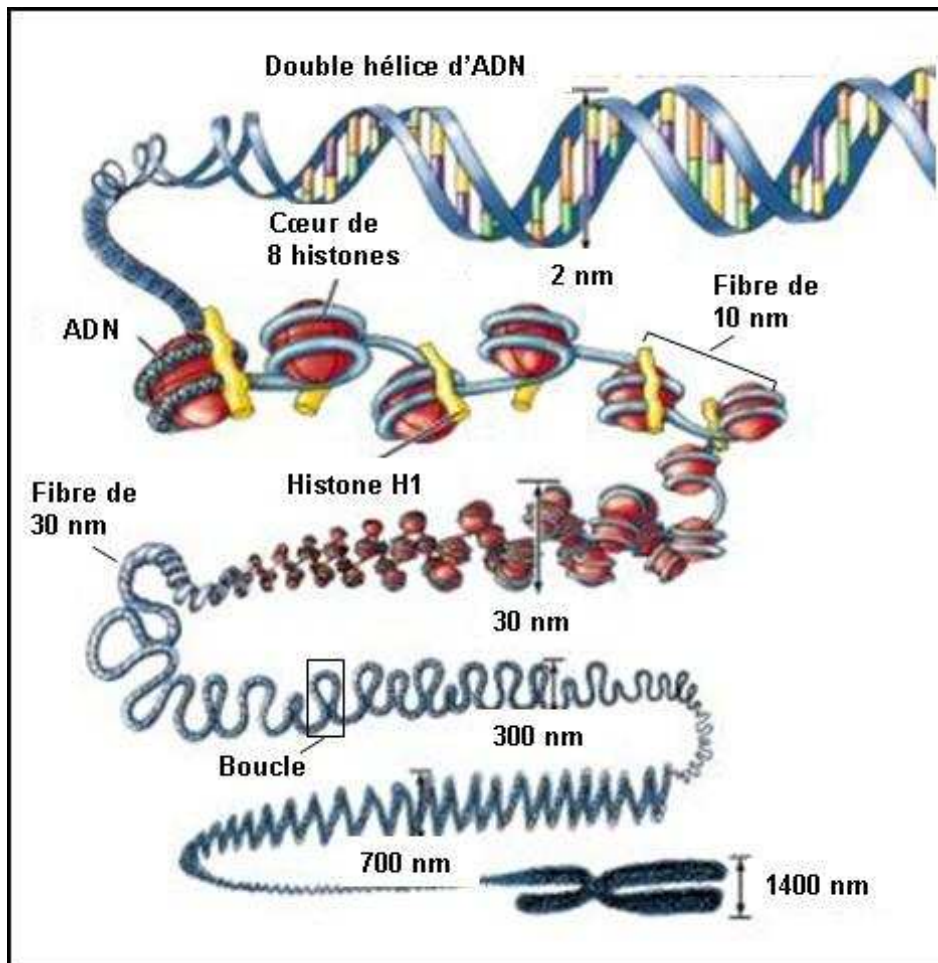


Figure 10 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine. L'observation de la chromatine en microscopie électronique révèle une organisation dite en collier de perles aussi appelée fibre de 10nm (le terme « perles » faisant référence aux nucléosomes ; Oudet et al., 1975). Il existe un niveau de compaction supérieur appelé fibre de 30nm (Marsden et Laemmli, 1979). Cette structure peut subir de nouveaux surenroulements pour donner naissance à des fibres condensées d'une largeur de 100 à 300nm.

c. Modifications des histones

Les travaux d'Ashburner dans les années 70 ont mené à la découverte qu'un traitement aux ecdystéroïdes provoquait la décondensation des chromosomes polytènes de la drosophile (Ashburner, 1974). Une étude consécutive menée sur le gène de l'ovalbumine a montré que le promoteur de ce gène devenait plus sensible à la digestion par la DNase I après induction transcriptionnelle par l'oestradiol (Kaye et al., 1986). Cette hypersensibilité à l'enzyme serait due à la décompaction de l'ADN.

Il est aujourd'hui démontré que les co-facteurs, grâce à diverses activités enzymatiques, agissent sur la structure de la chromatine pour favoriser *in fine* l'accessibilité des GTF. Ce remodelage de la structure chromatinienne dépend de l'action de protéines de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes ainsi que des modifications post-traductionnelles des histones catalysées par les co-facteurs. Les histones sont en effet la cible de nombreuses PTM localisées principalement au niveau de leur queue N-terminale flexible, mais pouvant dans certains cas se retrouver dans le domaine « *histone-fold* » central et les régions carboxy-terminales (Campos et Reinberg, 2009).

Neuf types de modifications ont été décrits : l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la SUMOylation, la biotinylation, l'ADP-ribosylation, la phosphorylation, la cis-trans isomérisation (Keppler et Archer, 2008a et b ; **tableau 2**). Des approches récentes incluant la spectrométrie de masse ne cessent d'accroître l'identification de nouvelles modifications. Le développement de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Orlando et Paro, 1993) permet d'étudier la dynamique de ces modifications dans le génome. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence leur association aussi bien à l'activation qu'à la répression de l'expression des gènes.

| Modification covalente | Résidus modifiés | Rôle dans la transcription | Fonctions régulées |
|--------------------------|--------------------|----------------------------|--|
| Acétylation | H3 (9, 14, 18, 23) | Activation | Transcription, Réparation, Réplication, Condensation |
| Lysine (K) | H4 (5, 8, 13, 16) | Activation | |
| | H2A, H2B | Activation | |
| Phosphorylation | H3 (3, 10, 11, 28) | Activation | Transcription, Réparation, Condensation |
| Sérine/Thréonine (S/T) | H2A, H2B | Activation | |
| Méthylation | H3 (2, 17, 23) | Activation | Transcription |
| Arginine (R) | H4 (3) | Activation | |
| Méthylation | H3 (4, 36, 79) | Activation | Transcription, Réparation |
| Lysine (K) | H3 (9, 27) | Répression | |
| | H4 (20) | Répression | |
| Ubiquitine | H2A (119) | Répression | Transcription, Réparation, Condensation |
| Lysine (K) | H2B (120) | Activation | |
| ADP-ribosylation | H1 | Activation | Transcription Réparation, Réplication |
| Glutamate/Arginine (E/R) | H2B (120) | Activation | |
| SUMOylation | H2A (126) | Répression | Transcription |
| Lysine (K) | H2B (6, 7) | Répression | |
| Citrullination | H3, H4 | Répression | Transcription |
| Arginine (R) | | | |
| Biotinylation | H3, H4, H2A | Répression | Transcription, Réparation, Condensation |
| Lysine (K) | | | |
| Isomérisation | H3 (30, 38) | Activation/Répression | Transcription |
| Proline (P) | | | |

Tableau 2 : Les différentes modifications des histones et leurs conséquences fonctionnelles (adapté de Kouzarides, 2007).

i. Acétylation des histones

L'acétylation au niveau des lysines est généralement corrélée à l'activation transcriptionnelle (Jeppesen et Turner, 1993). Des analyses globales à l'échelle du génome, réalisées à la fois chez la drosophile, la souris et l'homme ont montré que cette modification est particulièrement enrichie au niveau des régions promotrices et des séquences codantes des gènes (Schübeler et al., 2004 ; Bernstein et al., 2005).

Les effecteurs de cette modification sont les protéines du groupe HAT (*Histone Acetyl Transferase*) qui catalysent le transfert d'un groupement acétyl de l'acétyl Co-enzyme A sur les lysines. Les HAT sont divisées en trois familles aux spécificités de substrat différentes dont les deux premières, la famille GNAT/PCAF et la famille MYST agissent spécifiquement sur les histones tandis que la famille p300/CBP possède aussi de nombreuses cibles hors histones. Ces familles sont définies en fonction de leurs domaines structuraux (Hodawadekar et Marmorstein, 2007 ; **tableau 3**).

| Famille | Domaines structuraux | Enzyme | Complexes associés | Substrat | Fonction |
|---------------|--|---------------------|--------------------|-------------------------|--|
| GNAT/ PCAF | bromodomaine | Gcn5 | SAGA, ATAC, TFTC | H3K9, 14, 18, 36 H2B | Co-activateur |
| | | PCAF | STAGA | H3K14 | Co-activateur |
| MYST | chromodomaine | Tip60 | NuA4 | H4K5, 8, 12, 16 | Co-activateur, Réparation de l'ADN, Cycle cellulaire |
| | | Sas2, MOF | SAS | H4K16 | Répression / Compensation de dosage |
| | PHDfinger | Sas3 | NuA3 | H3K14, 23 | Répression / Compensation de dosage |
| | | MOZ | MOZ | H3K14 | Co-activateur |
| | | HBO1 | HBO1 | H3/H4 | Réplication de l'ADN |
| CBP/ p300 | Bromodomaine Motifs riches en Cys/His | CBP, p300 Rtt109 | nombreux | tous histones | Co-activateur, Réplication et réparation |

Tableau 3 : Les différentes familles d'enzymes responsables de l'acétylation des histones.

L'acétylation des histones est contrebalancée par l'activité des HDAC, protéines responsables de répression transcriptionnelle. Elles peuvent être classifiées chez les mammifères en quatre familles en fonction des homologies existant avec leurs orthologues chez la levure (Witt et al., 2009).

✚ La classe I contient des enzymes (HDAC1, 2, 3 et 8) à l'expression ubiquitaire et qui ont une localisation presque exclusivement nucléaire. Les enzymes de cette classe font partie de complexes cruciaux dans la régulation épigénétique : HDAC 1 et 2 exercent leur activité au sein des complexes Sin3, Mi2/NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylating*), CoREST (*CoREpressor element Transcription factor*) et PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*). HDAC3 est quant à elle retrouvée au sein des complexes répresseurs SMRT et N-CoR1 (Haberland et al., 2009).

✚ La classe II contient les enzymes apparentées à la protéine HDA1 de levure (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) qui sont localisées aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Ces enzymes ont souvent des profils d'expression assez restreints (notamment dans le cerveau, le muscle et le cœur) suggérant des fonctions plus spécifiques au cours de la différenciation cellulaire et du développement.

✚ La classe III a été découverte plus récemment et contient les homologues de la protéine Sir2 de la levure. Les enzymes de cette classe ont la particularité de nécessiter du NAD⁺ (*N*icotinamide *A*dénine *D*inucléotide *+*) comme co-enzyme pour désacétyler les histones contrairement aux HDAC dites « classiques » qui utilisent l'ion Zn²⁺. Chez l'homme, on retrouve actuellement sept protéines de ce type, encore appelées SIRTuines (SIRT1 à SIRT7 ; Haigis et Sinclair, 2010).

✚ La classe IV comprend actuellement un seul membre, l'histone désacétylase HDAC11 qui présente certaines homologies avec les enzymes de la classe I et II, mais dont la fonction n'est pas encore déterminée.

ii. Méthylation des histones

La méthylation des histones joue un rôle plus complexe en fonction du résidu ciblé car elle est à la fois associée à la répression de la transcription (méthylation de K9 et K27 de l'histone H3 et de K20 de l'histone H4) ou à un état transcriptionnellement actif de la chromatine (méthylation de K4, K36, K79, R2, R17 et R23 de l'histone H3 et de R3 de l'histone H4).

Les HMT (*Histone MethylTransferase*) sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement méthyle (-CH₃), à partir du cofacteur SAM (*S-Adenosyl-Methionine* ou *AdoMet*), sur un résidu lysine ou arginine. Les arginines peuvent être mono- et di-méthylées par des PRMT (*Protein aRginine MethylTransferase*) alors que les lysines peuvent être mono, di-, et tri-méthylées par des protéines contenant un domaine SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer of zest*, *Trithorax*) ainsi que par la protéine Dot1L (*Disrupter Of Telomere silencing protein 1- Like*). Les HMT spécifiques des lysines ont été classées en plusieurs familles en fonction de similarités de séquence à l'intérieur du domaine SET et de leurs propriétés structurales (Völkel et Angrand, 2007). Les enzymes impliquées dans la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de l'histone H3 (associées à l'activation transcriptionnelle), ainsi que celles impliquées dans la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 et de la lysine 20 de l'histone H4 sont actuellement les mieux caractérisées (**tableau 4**).

| Substrat | Histone méthyltransférase | Fonctions |
|-----------------|--|---|
| H3K4 | SET1, MLL, SET7/9, ASH1L, SMYD3, PRDM9, SETMAR | Activation |
| H3K9 | SUV39h1/2, EHMT1/2, SETDB1, ASH1L, ESET, G9a, GLP, RIZ | Répression, hétérochromatinisation Inactivation du Chr X |
| H3K27 | EZH1/2, EHMT2 | Répression, Inactivation Chr X |
| H3K36 | NSD1, SETD2/HYPB, SETMAR | Elongation transcriptionnelle |
| H3K79 | DOT1L | Activation |
| H4K20 | SUV4-20H1/2, SET8, NSD1, ASH1L | Répression, hétérochromatinisation |

Tableau 4 : Les différentes enzymes responsables de la méthylation des lysines sur les histones.

Les protéines PRMT, capables de méthyler les résidus arginines, sont conservées de la levure à l'homme, chez qui dix PRMT ont été caractérisées dont sept capables de méthyler les histones : PRMT1, PRMT4/CARM1 (*Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1*), PRMT5/JBP1 (*Janus kinase-Binding Protein-1*), PRMT6, PRMT7, PRMT8 et PRMT9 (Pal et Sif, 2007). Ces enzymes ont été regroupées en deux classes distinctes : la classe I qui catalyse

la monométhylation et la diméthylation asymétrique des arginines et la classe II qui catalyse la monométhylation et la diméthylation symétrique des arginines (**tableau 5**).

| PRMT | Classe | Substrat | Fonctions |
|-------------|---------------|--|--|
| PRMT1 | 1 | H4R3 | Activation, réparation de l'ADN |
| PRMT4/CARM1 | 1 | H3R2, R17, R26, R128, R129, R131, R134 | Activation, différenciation, développement, tumorigénèse |
| PRMT5/JPB1 | 2 | H3R8, H4R3 | Répression |
| PRMT6 | 1 | H3R2, R17, R26, R128, | Répression, réparation de l'ADN |
| PRMT7 | 2 | H2A, H4R3 | Empreinte parentale des cellules germinales mâles |
| PRMT8 | 1 | H4R3 | Indéterminés |
| PRMT9 | 2 | H2A, H4 | Indéterminés |

Tableau 5 : Les différentes enzymes responsables de la méthylation des arginines sur les histones.

La méthylation des histones est une modification réversible qui peut être hydrolysée par plusieurs familles de protéines découvertes récemment (pour revue : Mosammaparast et Shi, 2010). La première déméthylase identifiée fut la protéine LSD1 (*Lysine Specific Demethylase 1*) qui déméthyle spécifiquement les lysines 4 et 9 de l'histone H3 lorsqu'elles sont mono- ou di-méthylées par une réaction d'oxydation qui nécessite la flavine comme co-facteur (Shi et al., 2004). Une grande famille de déméthylases, la famille KDM (*Lysine (K) DeMethylase*), contenant le domaine *Jumonji C* (JmjC) a ensuite été caractérisée ; ses membres sont capables d'enlever les trois états de méthylation (mono-, di- et tri-méthylation) des lysines par une réaction d'oxydation nécessitant du fer Fe(II) et de l' α -cétoglutarate (α KG) comme co-facteurs (Tsukada et al., 2006). Les arginines mono-méthylées, quant à elles, peuvent être converties en citrulline par l'enzyme PADI4 (*PeptidylArginine DeIminase 4*) (Wang et al., 2004) mais il a aussi été découvert récemment qu'elles peuvent être déméthylées par l'enzyme JMJD6 contenant le domaine JmjC (Chang et al., 2007) (**tableau 6**).

| Famille | Enzyme | Substrat |
|----------------|------------------------------------|--------------------------|
| PADI | PADI4 | H3R2, R8, R17, R26, H4R3 |
| KDM1 | LSD1 | H3K4me2/1, H3K9me2/1 |
| KDM2 | JHDM1A, JHDM1B | H3K36me2/1, H3K4me3 |
| KDM3 | JMJD1A, JMJD1B, JMJD1C | H3K9me2/1 |
| KDM4 | JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D | H3K9me2/1, H3K36me3/2 |
| KDM5 | JARID1A, JARID1B, JARID1C, JARID1D | H3K4me3/2 |
| KDM6 | UTX, UTY, JMJD3 | H3K27me3/2 |
| JMJD6 | JMJD6 | H3R2, H4R3 |

Tableau 6 : Les différentes enzymes responsables de la déméthylation des histones.

iii. Autres modifications

✚ **La phosphorylation** des histones se produit sur les résidus Sérine (H3S10, H3S28, H2BS10, H2BS14) et Thréonine (H3T3, H3T11). Elle est généralement corrélée à l'activation transcriptionnelle aussi bien chez la levure que chez les mammifères (Lo et al., 2001 ; Metzger et al., 2008) mais joue aussi un rôle important dans le déroulement de la mitose (Fischle et al., 2005 ; Hans et Dimitrov, 2001) et la réparation de l'ADN qui nécessite la déphosphorylation de la thréonine 11 d'H3 (Shimada et al., 2008). Sur H2B, la phosphorylation des sérines 10 et 14 est liée à l'induction de l'apoptose (Ahn et al., 2006).

✚ **L'ubiquitination** des histones joue différents rôles en fonction du résidu ciblé. L'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A chez l'homme est associée à la répression transcriptionnelle par inhibition de l'élongation de la PolII (Zhou et al., 2008), alors que l'ubiquitination de la lysine 120 de l'histone H2B chez l'homme et la levure est associée à l'activation de la transcription (Zhu et al., 2005). D'autre part, l'ubiquitination des histones H3 et H4 est induite au niveau des dommages de l'ADN causés par les ultraviolets et constitue un signal pour le recrutement de la protéine de réparation XPC (Wang et al., 2006).

✚ **L'ADP-ribosylation** consiste en un transfert d'un ou de plusieurs groupements ADP-ribose sur des substrats protéiques, réalisé par des enzymes à activité mono-ADP-ribosyltransférase (MART) ou poly-ADP-ribosyltransférase (PARP). Ils peuvent être éliminés par l'enzyme polyADP-ribose glycohydrolase (Hassa et al., 2006). L'ADP-ribosylation est retrouvée principalement sur les résidus acides glutamiques (E) des histones H1 et H2B ou encore sur l'arginine R33 de l'histone H1 et est souvent associée à l'activation de la transcription.

✚ **La SUMOylation**, qui consiste en l'ajout de la protéine SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), se produit sur les lysines des quatre histones. Cette modification est impliquée dans la répression transcriptionnelle chez l'homme comme chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* car elle est mutuellement exclusive avec l'acétylation ou l'ubiquitination du résidu lysine ciblé (Garcia-Dominguez et Reyes, 2009).

✚ **La biotinylation** des lysines peut avoir lieu sur les histones H3, H4, et H2B ; elle consiste en l'addition d'un groupement biotine, connu aussi sous le nom de vitamine H ou vitamine B7, par des enzymes appelées biotinidases. Cette modification est associée à la répression transcriptionnelle : la biotinylation de la lysine 12 de l'histone H4, par exemple, antagonise l'acétylation du même résidu et est enrichie au niveau de structures chromatinienne inactives (Hassan et Zemleni, 2008).

🚩 **La citrullination** est une réaction de déimination qui convertit des arginines en citrullines au niveau des histones H3 et H4, réalisée par la peptidyl arginine deiminase 4 (PADI4) chez l'homme. Cette modification a un effet antagoniste à la méthylation des arginines et est ainsi associée à la répression transcriptionnelle (Thompson et Fast, 2006).

🚩 **L'isomérisation** des prolines consiste en un changement de conformation des prolines de la forme cis à la forme trans et *vice versa*, qui crée une distorsion sévère de la chaîne polypeptidique. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'isomérisation de la proline 38 de l'histone H3 provoque un changement de conformation des résidus adjacents, et inhibe ainsi la méthylation de la lysine 36 (Nelson et al., 2006).

d. Mécanistique de la décondensation chromatiniene

Pour expliquer comment la structure de la chromatine est modulée par les PTM des histones, deux hypothèses ont été formulées :

🚩 La première théorie, appelée hypothèse électro-statique, stipule que les modifications des histones soient intrinsèquement capables d'influencer la liaison ADN-histone par la neutralisation des charges des résidus de la queue N-terminale (Wolffe et Pruss, 1996). Ce modèle est particulièrement adapté pour décrire la neutralisation de charge provoquée par l'acétylation des résidus lysine. Plusieurs études ont néanmoins démontré que l'effet provoqué ne semble pas altérer les interactions histones/ADN et engendre des effets mineurs sur les propriétés physicochimiques du nucléosome (Libertini et al., 1988). Il existe une variation à cette théorie, illustrée par le phénomène d'« effet extrinsèque » des PTM des histones : Il est connu que l'histone H4 est capable d'interagir avec l'histone H2A d'un nucléosome adjacent uniquement en absence d'acétylation, ainsi la formation de chromatine condensée dépend directement de cette PTM (Zhou et al., 2007).

🚩 La seconde possibilité, qui prime aujourd'hui, découle de la théorie du code des histones (Turner, 1993 ; Jenuwein et Allis, 2001). Elle propose que les PTM des histones servent de surface de reconnaissance pour des protéines effectrices de la condensation/décondensation de la chromatine. Cette seconde possibilité est étayée par le fait que certains domaines des protéines, en particulier des co-facteurs, sont capables de reconnaître ces modifications (Taverna et al., 2007) :

- **Le bromodomaine** reconnaît les lysines acétylées et est souvent impliqué dans l'activation transcriptionnelle (Dhalluin et al., 1999). Il est retrouvé chez de nombreux

co-activateurs à activité histone acétyltransférase (HAT), tels que les protéines de la famille GNAT et de la famille CBP/p300 chez l'homme, mais aussi chez certains co-répresseurs transcriptionnels (par exemple les co-répresseurs TIF1) et dans certaines histone méthyltransférases (HMT) telles que MLL (*Mixed Lineage Leukemia protein*).

- **Le chromodomaine** des protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et de la protéine Polycomb reconnaissent respectivement les lysines 9 et 27 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (de préférence triméthylées) (Nielsen et al., 2001 ; Müller et al., 2002). Ces protéines impliquées dans la répression sont capables de recruter d'autres répresseurs travaillant en synergie pour établir une structure chromatinienne compacte (Grewal et Jia, 2007).
- **Le domaine Tudor** est capable de reconnaître les arginines et les lysines méthylées à la surface des histones (Kim et al., 2006).
- **Les répétitions WD40** de l'activateur transcriptionnel WDR5 (*WD40 Repeat protein 5*) sont des motifs qui reconnaissent l'arginine 2 et la lysine 4 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (Couture et al., 2006).
- **Le domaine en doigt de zinc de type PHD** est un motif qui reconnaît notamment les lysines méthylées. Ce domaine peut aussi bien être impliqué dans l'activation que dans la répression des gènes en reconnaissant essentiellement la lysine 4 tri-méthylée de l'histone H3 mais également les lysines 9 et 36 tri-méthylées de cette même histone (Taverna et al., 2007).
- **Le domaine 14-3-3** de la famille de protéines 14-3-3 reconnaît spécifiquement la sérine 10 phosphorylée de l'histone H3 (Macdonald et al., 2005).

2. Remodelage ATP-dépendant de la chromatine

Certains co-facteurs font partie d'une famille particulière de protéines à activité ATPasique. Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, ils sont capables de déstabiliser l'interaction histone-ADN et de réorganiser la structure chromatinienne (Saha et al., 2006). Ils sont caractérisés par la présence d'une sous-unité catalytique ATPase et peuvent être classés en quatre familles en fonction de la présence d'autres domaines structuraux caractéristiques : les familles SWI/SNF, ISWI, Mi-2/CHD et INO (**tableau 7**).

| Famille | Complexes | Fonctions |
|----------------|------------------|---|
| SWI/SNF | SWI/SNF | <i>Elongation, Différenciation, Développement</i> |
| ISWI | WCRF, CHRAC, RSF | <i>Activation/Répression Espacement des nucléosomes</i> |
| Mi-2/CHD | Nurd | <i>Répression / Remodelage chromatine</i> |
| INO | SWR1 | <i>Réparation ADN</i> |

Tableau 7 : Les différentes familles de co-facteurs ATP-dépendants.

🚩 **La famille SWI/SNF** (*SWItching/Sucose Non Fermenting*) est caractérisée par la présence d'un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance des lysines acétylées (Reisman et al., 2009). Deux complexes majeurs forment cette famille : le complexe SWI/SNF et le complexe RSC (*Remodel the Structure of Chromatin*), conservés de la levure à l'homme. Ils agissent essentiellement comme des co-activateurs de la transcription en réorganisant la structure des nucléosomes, en particulier en créant des espaces dépourvus de nucléosomes pour augmenter l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription et la formation du PIC. L'implication de SWI/SNF dans l'activation transcriptionnelle de multiples RN, dont RAR, est bien documenté (Flajollet et al., 2007 ; **figure 11**).

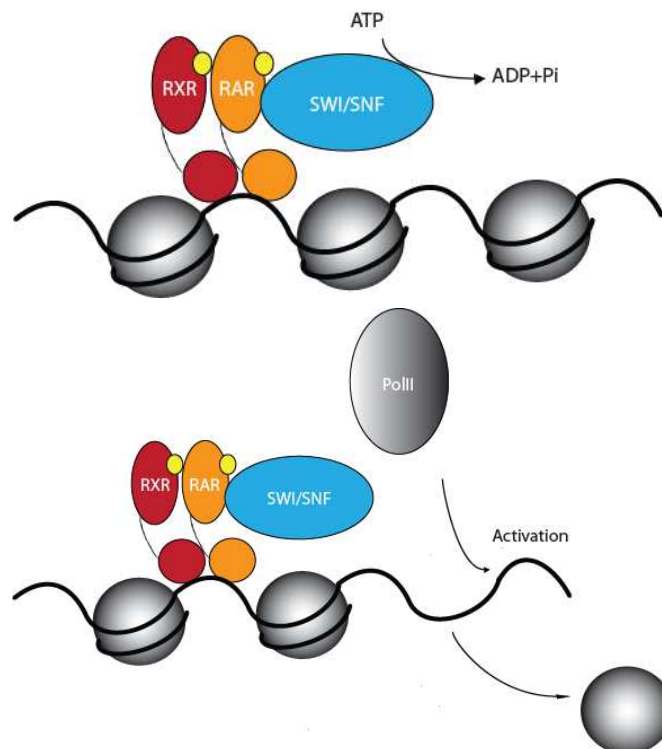


Figure 11 : Le co-activateur ATP-dépendant SWI/SNF catalyse l'éviction des nucléosomes et facilite le recrutement de la PolIII.

🚩 **La famille ISWI** (*Imitation of SWItch*) est caractérisée par la présence, en plus du domaine ATPase, d'un domaine SANT et d'un domaine SLIDE impliqués dans la liaison au niveau des queues des histones et au niveau de l'ADN « linker » respectivement (Grüne et al., 2003). Les complexes ISWI diffèrent des complexes SWI/SNF par leur rôle qui semble globalement restreint à la répression transcriptionnelle. En effet, contrairement à l'action de SWI/SNF qui produit des régions dépourvues de nucléosomes, l'activité d'ISWI résulte en l'espacement régulier de nucléosomes le long de l'ADN (Racki et al., 2008).

🚩 **La famille Mi-2/CHD** se caractérise par la présence de chromodomaines associés en tandem et est le plus souvent impliquée dans la répression transcriptionnelle (Marfella et Imbalzano, 2007). Chez les mammifères, par exemple, le complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation*) possède à la fois l'activité de remodelage de la chromatine et l'activité histone désacétylase (par HDAC1 et HDAC2) associée à la répression (Xue et al., 1998). Ce complexe est aussi formé de protéines capables d'interagir avec les îlots CpG méthylés de l'ADN et pourrait ainsi participer à la répression par méthylation de l'ADN (Wade et al., 1999). Néanmoins, les complexes CHD peuvent être impliqués dans l'activation transcriptionnelle, par exemple l'homologue de Mi-2 chez la drosophile, la protéine CHD1, est localisée principalement au niveau des domaines actifs des chromosomes polytènes (Stokes et al., 1996). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine CHD1 est l'unique membre de la famille Mi-2/CHD et interagit avec des protéines responsables de l'élongation de la transcription (Woodage et al., 1997).

🚩 **La famille INO** se distingue des autres complexes de remodelage de la chromatine par la configuration de son domaine enzymatique ATPase, celui-ci étant divisé en deux sous-domaines. Chez la levure, cette famille est représentée par les complexes INO80 (*INO*sitol 80) et SWR1 (*SWI2/Snf2 Related ATPase 1*) (Morrison et Shen, 2009). Le complexe INO80 est caractérisé par la présence de deux protéines homologues à l'ADN hélicase bactérienne Ruvb, les protéines Rvb1 et Rvb2 qui lui confèrent une activité ADN-hélicase. Conformément à cette observation, un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN lui a été attribué (Wu et al., 2007). Globalement, les complexes de la famille INO sont des régulateurs positifs de la transcription, ils peuvent néanmoins posséder une fonction particulière illustrée par la capacité du complexe SWR1 à réaliser l'échange d'un dimère H2A/H2B avec un dimère H2A.Z/H2B au sein du nucléosome (Mizuguchi et al., 2004).

3. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est l'une des modifications de la chromatine les mieux caractérisées. Chez les mammifères, elle est produite presque exclusivement sur des cytosines localisées en 5' d'une guanine. Ces dinucléotides CpG sont sous-représentés dans le génome humain et sont souvent regroupés au niveau de régions appelées « îlots CpG » (Bogdanovic et Venstra, 2009). Ces îlots recouvrent environ 0.7% du génome humain et contiennent environ 7% des dinucléotides CpG (Fazzari et Greally, 2004) ; plus de la moitié de ces îlots sont localisés à proximité des régions promotrices de gènes. La méthylation de l'ADN est associée à un état réprimé de la chromatine et à l'inhibition de la transcription. Deux mécanismes principaux sont envisagés pour expliquer ce phénomène : (1) la méthylation des cytosines peut empêcher l'association de certains facteurs de transcription au niveau de séquences spécifiques d'ADN (Watt et Molloy, 1988) ou, (2) la reconnaissance des CpG méthylés par des protéines spécifiques (telles les protéines de la famille des MBD) exerce un effet d'inhibition de la transcription. Cette famille, comprenant les protéines MBD1, MBD2, MBD4 et MeCP2 reconnaissent l'ADN méthylé par l'intermédiaire de leur domaine MBD (*Methyl CpG Binding Domain*) et recrutent des complexes co-répresseurs (Bogdanovic et Venstra, 2009).

Les enzymes capables de méthyler l'ADN peuvent être regroupées en deux grandes classes principales :

- **les méthylases de maintenance** impliquées dans le maintien de la méthylation, telles que DNMT1 (*DNA MethylTransferase 1*), copient les motifs méthylés préexistant dans le nouveau brin d'ADN au cours de la réplication (Leonhardt et al., 1992).
- **les méthylases de novo** telles que DNMT3a et DNMT3b méthylent des sites CpG exempts de toute méthylation (Okano et al., 1999) et coopèrent avec DNMT1 pour propager la méthylation au cours de la division cellulaire (Liang et al., 2002).

D'autres méthylases de l'ADN ont été identifiées telles que DNMT2 qui a une faible activité méthyltransférase *in vitro* (Hermann et al., 2003), DNMT3L qui module l'activité de DNMT3a et DNMT3b (Suetake et al., 2004), ainsi que DNMT1o spécifique des oocytes (Howell et al., 2001).

| Méthyltransférase | Fonction | Phénotype mutant |
|--------------------------|---|---------------------------------|
| Dnmt1 | Maintenance de la méthylation | Embryonnaire létal |
| Dnmt1o | Spécifique des oocytes | Perte de l'empreinte maternelle |
| Dnmt2 | Faible activité | Pas de phénotype |
| Dnmt3a, Dnmt3b | Etablissement de la méthylation | Embryonnaire létal |
| Dnmt3L | Pas d'activité catalytique, colocalise avec Dnmt3a et Dnmt3b | Empreinte maternelle anormale |

Tableau 8 : Les différentes enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN.

4. Euchromatine / hétérochromatine

Les modifications précédemment décrites possèdent des distributions spécifiques correspondant aux domaines eu- ou hétérochromatiniens. Comme l'avait proposé Emil Heitz, l'euchromatine est constituée de chromatine décondensée et transcriptionnellement compétente. D'un point de vue moléculaire, elle comprend essentiellement des histones H3 et H4 acétylées, une forte concentration d'H3K4 triméthylée et un ADN peu méthylé. Au contraire, l'hétérochromatine est peu accessible à la machinerie de transcription et se caractérise par une hypoacétylation des histones H3 et H4, une triméthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27 et une triméthylation de l'histone H4 sur la lysine 20. Ces régions sont généralement pauvres en gènes codants et fortement méthylées au niveau des dinucléotides CpG.

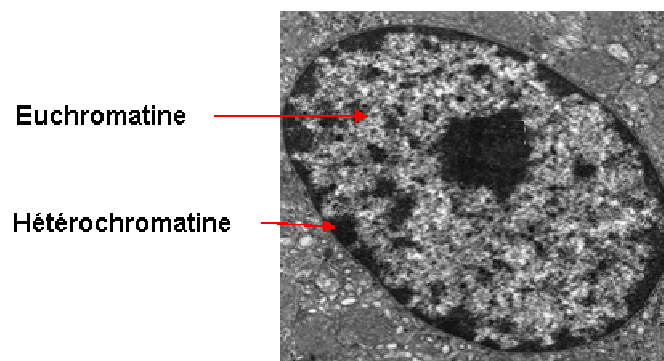


Figure 12 : Observation en microscopie électronique des différents territoires chromatinien.

On peut encore distinguer deux types d'hétérochromatine, l'une dite « facultative » en opposition à l'hétérochromatine « constitutive » (Grewal et Jia, 2007).

🚩 L'hétérochromatine facultative varie d'un type cellulaire à l'autre et se trouve au niveau des gènes dont l'expression est régulée au cours du développement. Elle est caractérisée par la diméthylation de la lysine 9 et la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 ainsi que la monométhylation de la lysine 20 de l'histone H4.

🚩 L'hétérochromatine constitutive est stable et garde ses propriétés à tous les stades du développement et dans tous les tissus. Elle est enrichie en marques épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle : les histones sont spécifiquement méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4 et on observe un enrichissement en protéines HP1. L'hétérochromatine constitutive est formée de nombreuses répétitions de courtes séquences riches en A-T, en particulier des satellites appelés satellites α chez l'homme et satellites γ / majeurs chez la souris (Plohl et al., 2008).

En plus des satellites, les régions hétérochromatiniennes sont particulièrement pourvues en éléments transposables répétés (Martens et al., 2005 ; Mikkelsen et al., 2007). Cette corrélation entre éléments transposables et hétérochromatine est à l'origine de l'hypothèse affirmant que l'hétérochromatine aurait émergé pendant l'évolution dans un but initial de défense contre les transpositions de ces éléments (Yoder et al., 1997). Le corolaire de la présence de marques répressives sur les éléments transposables consiste à penser qu'ils puissent être d'une importance prépondérante dans la structuration de la chromatine (Lunyak, 2008).

V. Les éléments répétés

1. Découverte des éléments répétés

La découverte de séquences d'ADN transposables dans le génome date des travaux menés par Barbara McClintock dans les années 1940. En recourant à l'irradiation par rayons X de plants de maïs, elle fut la première à observer la transposition de fragments d'ADN d'un site à un autre. Pressentant leur importance dans la plasticité du génome, elle les nomma *controlling elements* et proposa qu'ils puissent contribuer aux variations phénotypiques des cellules et des tissus en modulant l'activité des gènes. Néanmoins, ces éléments furent globalement considérés par la communauté scientifique comme de l'ADN « poubelle » (« junk » DNA ; Orgel et Crick, 1980) parasitant le génome et mobilisant sa machinerie interne.

Le séquençage du génome humain (International human genome sequencing consortium, 2001) révèle que l'ADN génomique est constitué d'environ une moitié d'éléments répétés. Si cette proportion est relativement conservée chez les mammifères (Mouse genome sequencing consortium, 2002) (**tableau 9**), elle peut s'avérer plus élevée, culminant à 90% dans le génome du maïs (SanMiguel et al., 1996).

| | <i>Mus Musculus</i> | <i>Homo sapiens</i> |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| LINE | 19,2 | 20,99 |
| SINE | 8,22 | 13,64 |
| Rétrotransposons à LTR | 9,87 | 8,55 |
| Transposons à ADN | 0,88 | 3,03 |
| Satellites | 0,3 | 0,34 |

Tableau 9 : Proportion d'éléments répétés dans les génomes humain et murin exprimée en pourcentage (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001 ; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).

Ces dernières années, l'intérêt de la communauté scientifique pour les éléments répétés n'a cessé de croître : leur importance a été mise en évidence dans les transferts de gènes chez les bactéries (Puopolo et al., 2007), l'étude de leur implication dans les pathologies est un domaine en expansion (Ostertag et Kazazian, 2001), tandis qu'une grande utilité leur est reconnue dans l'étude phylogénétique (Salem et al., 2003) ou en tant que modèles d'étude

pour les rétrovirus avec qui ils partagent une forte homologie de structure et de mode de réplication.

2. Classification générale

Les éléments mobiles, définis comme « séquences d'ADN capables de s'insérer à un nouveau site à partir de leur site d'origine », sont en premier lieu divisés en deux grandes classes (Wicker et al., 2007) :

- Les transposons à ADN, présents dans l'ensemble du Vivant, sont capables de se transposer sans recourir à un intermédiaire ARN. Ils quittent leur site donneur pour un site accepteur, généralement positionné à proximité, par un mécanisme appelé « coupé/collé » par analogie au langage informatique. S'ils prédominent dans les génomes bactériens, leur proportion par rapport aux rétrotransposons a largement diminué au cours de l'évolution, elle est estimée à 3% du génome humain (International human genome sequencing consortium, 2001) et moins de 1% du génome murin (Mouse genome sequencing consortium, 2002). Les transposons à ADN sont considérés comme des fossiles inactifs chez l'homme et la souris.

- Les transposons à ARN (rétrotransposons) sont retrouvés dans les génomes eucaryotes dans des proportions variables (Homme : 45% ; Souris : 37,5%). Leur mode de réplication implique la formation d'un intermédiaire ARN qui est rétrotranscrit et inséré au site accepteur, mécanisme décrit comme « copié-collé », identifié pour la première fois grâce à l'étude de l'élément Ty de levure (Boeke et al., 1985). Parmi les rétrotransposons, certains sont autonomes, c'est-à-dire qu'ils codent pour les protéines nécessaires à leur transposition, et d'autres sont non-autonomes et nécessitent donc l'activité des rétrotransposons autonomes pour leur propre transposition.

Les rétrotransposons peuvent être subdivisés en cinq ordres en fonction de leur mécanisme de transposition, organisation de séquence, phylogénie de la transcriptase inverse et présence et taille de TSD (*Target Site Duplication*) au niveau de leur site d'insertion (Wicker et al., 2007 ; **figure 13**). Nous introduirons brièvement les 4 ordres de rétrotransposons non-LTR, puis détaillerons les rétrotransposons à LTR (Partie VI.4) car ils sont plus particulièrement notre sujet d'étude.

a. Les rétrotransposons non-LTR

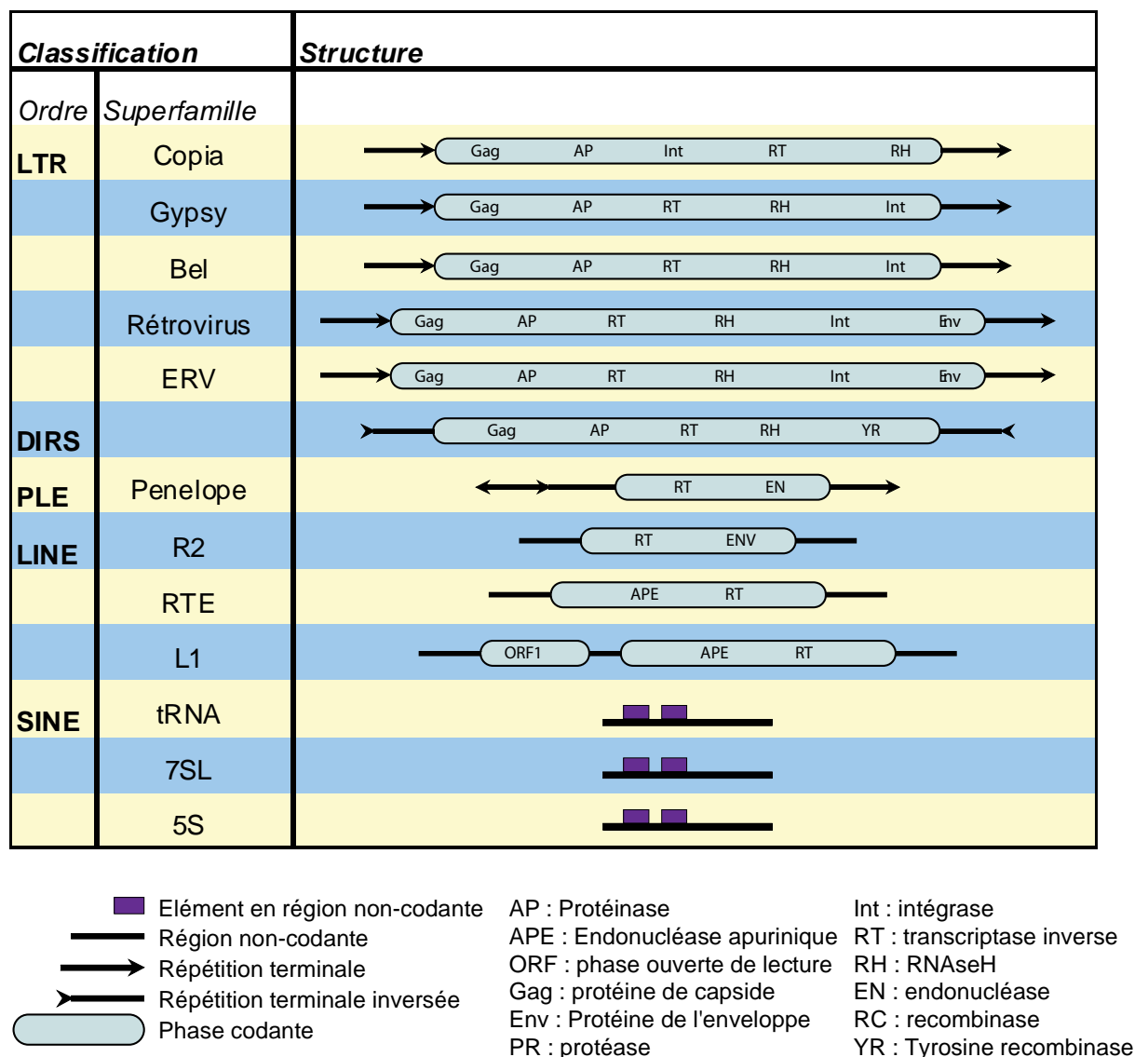


Figure 13 : Structure des rétrotransposons à ARN (adapté de Wicker, 2007).

Les LINE (*Long INterspersed Elements*) sont des rétrotransposons autonomes possédant deux activités enzymatiques : l'endonucléase et la transcriptase inverse (Mathias et al., 1991 ; Feng et al., 1996). Ils peuvent posséder une ou deux ORF (*Open Reading Frame*) dont l'ORF1, lorsqu'elle est présente, code pour une protéine de liaison aux acides nucléiques (Eickbush et Malik, 2002) possédant dans certains cas une homologie avec la protéine virale Gag (Chambeyron et Bucheton, 2005). Après transcription par la PolIII et traduction, les protéines des deux ORF se lient dans le cytoplasme à l'ARN polyadénylé de LINE puis sont transloquées vers le noyau et l'ARN est intégré au site cible par le mécanisme dit de TPRT (*Target Primed Reverse Transcription*) couplant clivage de l'ADN et rétrotranscription

(Kazazian, 2004). Ils forment des TSD variables à leur extrémité 5', vraisemblablement dus à une terminaison prématurée, ce qui introduit un biais dans leur identification (Wicker et al., 2007).

✚ Les SINE (*Short INterspersed Elements*) sont dépourvus de LTR et d'ORF mais possèdent une séquence de polyadénylation en 3', caractéristique d'un ADN rétrotranscrit. Ils sont apparus lors de rétrotranscriptions accidentelles de transcrits PolIII tels les ARNt, l'ARN 7SL et l'ARN 5S (Kramerov et Vassetsky, 2005). Ils possèdent des TSD pouvant mesurer de 5 à 15 nucléotides. Le modèle d'étude le plus utilisé pour les SINE chez l'homme est la séquence Alu, SINE spécifique des primates (Quentin, 1992) qui dérive de l'ARN 7SL. Les rétrotransposons Alu comprennent deux sites promoteurs spécifiques de la PolIII mais sont néanmoins polyadénylés. Il a été démontré pour ce type de SINE qu'ils nécessitent l'activité d'un LINE pour leur transposition (Dewannieux et al., 2003).

✚ Les éléments DIRS (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*) ont été découverts dans le génome de *Dictyostelium discoïdeum* (Cohen et al., 1984) et classifiés dans les rétrotransposons en raison de la présence d'une transcriptase inverse dans leur phase codante (Wicker et al., 2007). Ils sont trouvés dans les génomes des algues vertes, des animaux et des champignons (Goodwin et al., 2004). Très peu d'éléments de ce groupe ont été identifiés et leurs copies sont souvent partielles. Ils possèdent une recombinase à la place de l'intégrase, de ce fait leur intégration ne produit pas de TSD. Leurs extrémités sont atypiques : ce sont soit des répétitions directes fragmentées soit des répétitions directes inversées. Toutes ces caractéristiques font supposer qu'ils transposent par un mécanisme différent des LINE.

✚ Les éléments PLE (*Penelope Like Element*) ont été découverts dans le génome de *Drosophila virilis* (Evgen'ev et al., 1997). Consécutivement à cette étude, les PLE ont été caractérisés dans plus de 50 espèces d'animaux unicellulaires, de champignons et de plantes. Ce groupe d'éléments présente à la fois des caractéristiques de LINE et de rétrotransposon à LTR, en l'occurrence un TSD 5' variable ainsi que des séquences LTR (Arkhipova et al., 2003). Ils diffèrent de ces derniers par plusieurs aspects : L'orientation des LTR peut être directe ou inversée, et leur transcriptase inverse est plus proche des télomérases que des transcriptases inverses des rétrotransposons à LTR et des LINE. D'autre part, la séquence codante de cette transcriptase inverse est remarquable par la présence d'un intron qui contient des codons stop et des décalages de cadre de lecture. Il est possible que cet élément produise deux ARN : un ARN, matrice à la transcription inverse qui conserve l'intron et un ARN épissé, matrice de la traduction. Aucun mécanisme, à ce jour, n'explique cette conservation d'intron.

b. Les rétrotransposons à LTR

Les rétrotransposons à LTR sont historiquement la première classe de rétrotransposons identifiée. De par la présence de séquences LTR à leurs extrémités 5' et 3' ils sont considérés comme phylogénétiquement proches des rétrovirus et partagent leur structure générale et mode de réplication. Une théorie propose que les rétrovirus soient dérivés d'un rétrotransposon à LTR de type Gypsy (Seelamgari et al., 2004). A l'inverse, il est établi que la superfamille ERV (*Endogenous RetroVirus*) de la classe des rétrotransposons à LTR soit issue de l'inactivation d'un rétrovirus infectieux par la mutation du gène *Env* codant pour les protéines de l'enveloppe (Bannert et Kurth, 2004 ; Bannert et Kurth, 2006).

Les rétrotransposons à LTR sont constitués de deux domaines codants (ORF1 et ORF2) encadrés par deux LTR. Selon les éléments, ces deux domaines sont soit fusionnés soit dans des cadres de lecture différents (Neuveglise et al., 2002). Dans ce dernier cas de figure, la traduction fait intervenir une translecture si les deux ORF sont séparées par un codon stop ou un décalage du cadre de lecture (+1) ou (-1), si elles se chevauchent. ORF1 et ORF2 sont analogues aux séquences *Gag* et *Pol* des rétrovirus. Elles codent les protéines nécessaires à la transposition : ORF1 code la protéine de capsid qui possède des domaines de fixation aux acides nucléiques dont le rôle est l'assemblage autour de l'ARN du rétrotransposon pour former la particule pseudo-virale ; ORF2 code une poly-protéine qui est maturée au cours du cycle de réplication en transcriptase inverse couplée à la RNase H, à l'Intégrase et à la Protéase (Eickbush et Malik, 2002). La protéase mature la poly-protéine à l'intérieur de la particule pseudo-virale (**figure 14**).

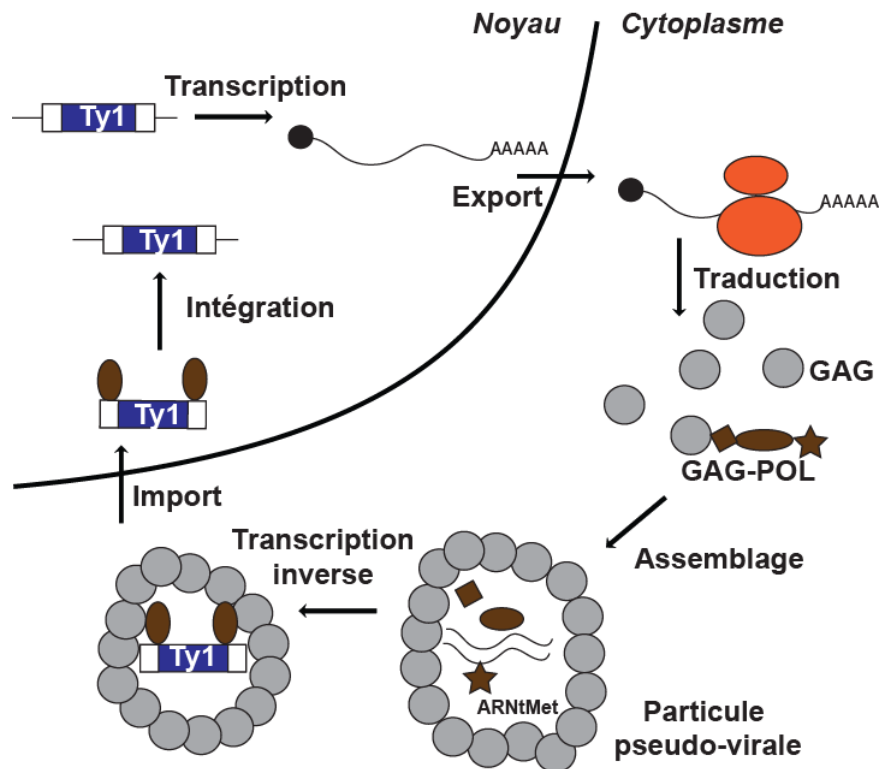


Figure 14 : Cycle de répliation du rétrotransposon Ty1. Le rétrotransposon est transcrit dans le noyau puis coiffé et polyadénylé. Il est ensuite exporté vers le cytoplasme où il est traduit en protéine GAG et en polypeptide de fusion GAG-POL. Les protéines s'assemblent autour de deux ARNm Ty1 et d'un ARNt^{MET}, amorce de la transcription inverse, pour former la particule pseudo-virale. Les protéines sont maturées en transcriptase inverse (étoile), protéase (losange), et intégrase (ovale) puis l'ARN est rétrotranscrit. L'ADNc néosynthétisé et le complexe d'intégration sont ensuite importés dans le noyau où a lieu une nouvelle insertion d'élément Ty1.

Les rétrotransposons à LTR font généralement de 5 à 10 kilobases de long. Une exception est présente dans le génome du pois : l'élément ogre mesure 25 kilobases (Neumann et al., 2003).

Le LTR possède les signaux de démarrage et de terminaison de la transcription (Eickbush et Malik, 2002). Il comporte trois régions, U3, R et U5, dénommées en fonction de leur présence aux extrémités de l'ARNm du rétrotransposon. Leur transcription démarre au début de la région R du LTR5' et se termine à la fin de la région R du LTR3', la région R est ainsi présente aux deux extrémités du transcrit tandis que U5 est uniquement présente en 5' du transcrit, et U3 en 3'. La région R du LTR joue un rôle primordial dans les processus de transcription inverse (Eickbush et Malik, 2002).

Les rétrotransposons à LTR sont classés en 4 sous-groupes en fonction de la phylogénie de leur transcriptase inverse (Wicker et al., 2007). Les groupes Ty1-copia et Ty3-gypsy (aussi appelés *metaviridae* ; Boeke et al., 1999) sont les plus représentés dans les génomes eucaryotes. Le groupe BEL, proche des deux premiers à l'exception de la transcriptase inverse, n'est pas abondant et a été identifié plus récemment. Le groupe des ERV est uniquement trouvé dans le génome des vertébrés.

1. Un sous-type de rétrovirus endogène : les VL30

Le sous-type VL30 (*Virus-Like 30S* ; Duesberg et Scolnick, 1977) a été découvert lors d'expériences d'infection de cellules en culture avec des virions du type MLV (*Murine Leukemia Virus*). En plus de l'ARN attendu de 38S, un ARN de 30S était encapsidé, correspondant à la séquence du VL30 endogène. Des études ultérieures ont démontré que la particule VL30 pouvait être rendue infectieuse uniquement si elle était encapsidée dans un virion hétérologue (Scolnick et al., 1979). L'étude du premier ADNc identifié de VL30 révéla de nombreuses occurrences de codons stop dans les ORF *Gag* et *Pol*, expliquant ce phénomène de dépendance (Adams et al., 1988).

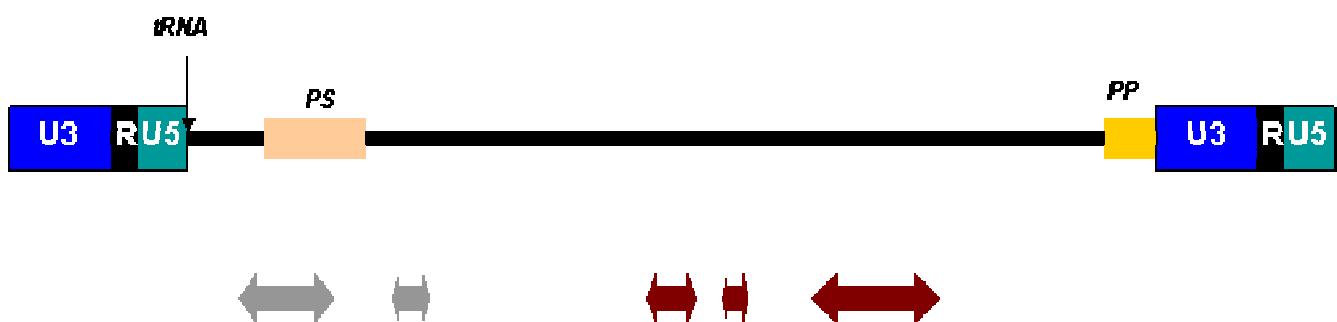


Figure 15 : Structure des rétrotransposons VL30. Les régions LTR sont représentées en bleu (région U3), noir (région R) et vert (région U5). tRNA désigne le site de fixation de l'ARN initiateur de la rétrotranscription ; PS (*Packaging signal*) désigne le signal d'emballage et PP la séquence polypurine nécessaire à la transposition. Les flèches représentent les zones de forte homologie avec les gènes *Gag* (gris) et *Pol* (marron) du MoMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Adapté de French et Norton, 1997).

Le type VL30 est apparu il y a environ dix millions d'années avec l'embranchement des muridés au sein duquel il fut très actif, donnant lieu à de nombreuses copies très variables en séquence (Itin et al., 1983). Bien qu'ayant peu de similarités avec les rétrovirus et

rétrotransposons connus, il s'apparente sur de courtes séquences aux MoMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Giri 1983). Une autre homologie avec le MoMLV consiste en la présence de courtes séquences inversées à la limite LTR-ADN génomique. Certaines études avaient estimé leur nombre à 150-200 copies, l'annotation du génome permet actuellement d'en trouver 449 copies, dont un peu plus de 40% correspondent à des LTR isolés (voir publication partie III), issus d'évènements de recombinaison entre les deux LTR d'un VL30 complet (Rotman et al., 1984). Ils sont distribués sur tous les chromosomes sans préférence marquée.

Les ERV de type VL30 peuvent être subdivisés en quatre sous-groupes sur la base d'homologies de leur séquence U3. Celle-ci est particulièrement variable en comparaison du reste de la séquence, elle possède en effet différents éléments de réponse dont la conséquence est l'expression différentielle de ces 4 sous-groupes en fonction du type cellulaire considéré (Nilsson et Bohm, 1994). Cette diversité d'éléments de réponse a pour corolaire la capacité des VL30 à être induits par différents facteurs, domaine exploré par de nombreux laboratoires dont les résultats sont résumés en **tableau 10**.

| Stimulus | Type cellulaire | Référence |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Transformation par N-ras | <i>Fibroblastes</i> | (Eaton et al., 1990) |
| Sérum | <i>Fibroblastes</i> | (Eaton et al., 1990) |
| Transformation par Ha-ras | <i>Fibroblastes / Kératinocytes</i> | (Owen et al., 1990) |
| Transformation par SV40 | <i>Fibroblastes</i> | Nilsson et al., 1995) |
| EGF | <i>Fibroblastes / Kératinocytes</i> | (Lenormand et al., 1992) |
| Erythropoïétine | <i>Progéniteur érythroïde</i> | (Park et al., 1993) |
| TPA | <i>Fibroblastes / Kératinocytes</i> | (Lenormand et al., 1992) |
| cAMP | <i>Fibroblastes</i> | (Rodland et al., 1993) |
| Hormone lutéinisante | <i>Stéroïdogénique</i> | (Schiff et al., 1991) |
| Hormone adrénocorticotropine | <i>Stéroïdogénique</i> | (Bohm et al., 1993) |
| Glucocorticoïde | <i>Lymphocytes T</i> | (Harrigan et al., 1989) |
| Acide rétinoïque | <i>Kératinocytes</i> | (Choucdhuri et al., 1993) |
| Radiation ionisante | <i>Nombreux types</i> | (Panozzo et al., 1991) |
| Stress anoxique | <i>Fibroblastes</i> | (Estes et al., 1995) |
| 5'-azacytidine | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| p53 | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| Eostradiol | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| Progestérone | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| Dexaméthasone | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| C2-céramide | <i>Fibroblastes</i> | (Tzaravas et al., 2003) |
| Vanadium | <i>Fibroblastes</i> | (Noutsopoulos et al., 2007) |
| TSA | <i>Fibroblastes</i> | (Brunmeir et al., 2010) |

Tableau 10 : L'expression des rétrotransposons VL30 peut être induite par différents facteurs.

De nombreuses études ont tenté d'établir un parallèle entre dérégulation de l'expression des VL30 et phénotypes tumoraux. Les VL30 sont, comme de nombreux autres éléments répétés (Taruscio et Mantovani, 2004 ; Ruprecht et al., 2008), sur-exprimés dans différents tissus cancéreux en particulier à cause de leur capacité à être induits par l'oncogène Ras (Eaton et al., 1990). Ils peuvent participer à l'acquisition du phénotype tumoral par différents mécanismes : L'insertion aléatoire de tels éléments transposables peut modifier l'expression de suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes ou produire une altération de leur séquence codante ; d'autre part les LTR peuvent jouer le rôle de promoteurs alternatifs en raison de leur contenu en éléments de réponse (Cohen et al., 2009). Un exemple concernant les VL30 est leur tendance à s'insérer naturellement à proximité de l'oncogène Ras, conduisant à sa sur-expression (Norton, 1984 ; Firulli, 1993). De plus, certaines études indiquent que les VL30 peuvent interagir directement avec le régulateur transcriptionnel PSF, qui est notamment un répresseur du gène *IGF1* ainsi que de l'oncogène *Rab23* (Song et al., 2004). Cette liaison empêche PSF de réprimer ces gènes et induirait *in fine* la prolifération cellulaire (Wang et al., 2009).

Actuellement, de nombreuses équipes étudient les mécanismes permettant aux cellules de réprimer l'expression des éléments répétés. Au cours de ma thèse, j'ai été amené à identifier un complexe de régulation transcriptionnelle nécessaire à la restriction des rétrotransposons de type VL30 (voir publication partie III). En particulier, les VL30 peuvent être réprimés par les protéines de la famille TIF1.

VI. La famille des co-facteurs TIF1

Mon travail de thèse trouve son origine dans l'étude du co-répresseur ligand-dépendant TIF1 α qui fut parmi les premiers co-facteurs des RN à être identifiés (Le Douarin et al., 1995). TIF1 α est le membre fondateur d'une famille de protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine, famille qui compte 4 membres chez la souris et l'homme : TIF1 α (Le Douarin et al., 1995), TIF1 β (Friedman et al., 1996 ; Kim et al., 1996 ; Le Douarin et al., 1996a ; Moosmann et al., 1996), TIF1 γ (Venturini et al., 1999) et TIF1 δ (Khetchoumian et al., 2004), auxquels s'ajoutent trois orthologues : Bonus chez la drosophile (Beckstead et al., 2001), Ectodermine chez le Xénope (Dupont et al., 2005) et Moonshine chez le poisson zèbre (Ransom et al., 2004).

1. Caractéristiques communes des protéines TIF1

a. Structure modulaire

Les protéines TIF1 ont une structure modulaire conservée dans laquelle on distingue trois régions (**figure 16**).

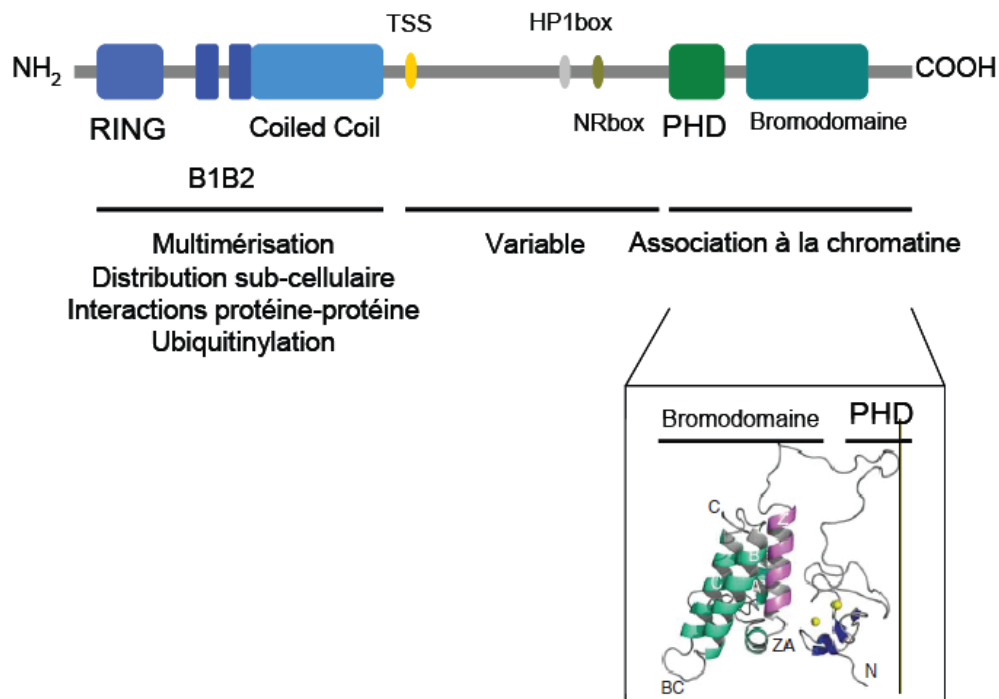


Figure 16 : Structure modulaire des protéines TIF1 et structure tertiaire du tandem PHD*finger*/bromodomaine. Les hélices α sont en vert, sauf l'hélice ZA hydrophobe en violet. Les feuillets β du PHD*finger* sont en bleu. Structure tertiaire adaptée de Zeng et al. (2008).

i. Le domaine RBCC

Situé dans la région N-terminale, le domaine RBCC (*RING finger*, *B-boxes*, *Coiled Coil*) contient un motif en doigt de zinc de type *RINGfinger* (*Really Interesting New Gene*), deux domaines en doigt de zinc appelés *Bboxes* et un domaine de dimérisation de type *coiled-coil*. Récemment rebaptisé TRIM (*TRIPartite Motif*) (Reymond et al., 2001), le domaine RBCC est présent dans une centaine de protéines.

Les protéines de la famille TRIM possèdent un profil de localisation subcellulaire spécifique, il a donc été proposé qu'elles puissent définir des compartiments cellulaires, aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Reymond et al., 2001). Un exemple illustrant cette assertion est celui des protéines PML (*ProMyelocytic Leukaemia*) dont le marquage définit les *PMLbodies* (Batty et al., 2009). D'autre part, il est démontré que ce domaine est responsable d'interactions entre protéines : les TIF1 sont capables d'homo/hétéro-oligomérisation en particulier *via* le *coiled-coil* (Peng et al., 2000 ; Peng et al., 2002).

Contenu dans le domaine TRIM, le domaine *RINGfinger* est d'un intérêt tout particulier puisqu'il est fréquemment présent chez les protéines à activité E3-ligase (Deshaies et Joazeiro, 2009). Plusieurs protéines à domaine TRIM ont une activité E3-ligase bien caractérisée (Meroni et Diez-Roux, 2005). Les E3-ligases ont la capacité de lier un partenaire qui leur est spécifique et de lui transférer un ou plusieurs résidus ubiquitine. Si la conséquence de cette liaison, dans le cas de la polyubiquitination, est la dégradation de la protéine cible, ce processus peut aussi moduler son activité de diverses manières dans le cas de la monoubiquitination ou de la SUMOylation. Pour certains TIF1, l'activité E3-ligase est démontrée :

- TIF1 γ possède une activité monoubiquitine–ligase dirigée contre la protéine SMAD4 (Dupont et al., 2005 ; Dupont 2009).
- TIF1 α et Bonus font partie des nombreuses E3-ligases capables de dégrader p53 (Allton et al., 2009).

ii. Le PHD*finger*-bromodomaine

Le PHD*finger* et le bromodomaine sont deux motifs fréquemment retrouvés associés en tandem dans des protéines impliquées dans la régulation chromatinienne (Aasland et al., 1995 ; Sanchez et Zhou, 2009).

Le *PHDfinger* est présent dans les protéines du groupe Polycomb et Trithorax, impliquées respectivement dans le maintien des états réprimés et actifs de la chromatine après les divisions cellulaires (Schwartz et Pirrotta, 2008). C'est un domaine d'environ 60 acides aminés replié en motif à doigt de zinc de type C4HC3 grâce à la coordination de deux atomes de zinc (Capili et al., 2001), qui peut dans certains cas être impliqué dans la liaison des phosphoinositides (Gozani et al., 2003) ; le rôle de cette interaction est à ce jour inconnu. Il est aussi capable de lier la lysine 4 de l'histone H3 lorsqu'elle est triméthylée (Shi et al., 2006 ; Pena et al., 2006 ; Li et al., 2006).

Le bromodomaine est un motif constitué d'environ 110 acides aminés replié en quatre hélices α amphipathiques. Il est retrouvé dans de nombreuses acétyl-transférases ainsi que dans certains facteurs de remodelage ATP-dépendants (Jeanmougin et al., 1997 ; Mujtaba et al., 2007). Il est capable de lier les lysines 16 et 19 acétylées de l'histone H4 (Dhalluin et al., 1999) et coopère ainsi avec le *PHDfinger* dans la liaison des histones (Ragvin et al., 2004). Néanmoins, le rôle de ces motifs caractérisant la partie C-terminale des TIF1 n'est vraisemblablement pas limité à la reconnaissance des histones puisqu'il a été démontré que le *PHDfinger* de TIF1 β peut jouer le rôle d'auto ubiquitine-ligase (Ivanov et al., 2007 ; Zeng et al., 2008).

iii. La région centrale

En aval du RBCC se trouve une séquence de 25 acides aminés uniquement retrouvée dans les protéines TIF1, baptisée par conséquent TSS (*TIF1 Signature Sequence*) pour laquelle aucune fonction n'a été identifiée (Venturini et al., 1999). Hormis ce motif, la région centrale est peu conservée entre les TIF1. Elle contient cependant le motif d'interaction aux HP1 (*HP1box* ; pentapeptide PXVXL où P est une proline, V une valine, L une leucine et X un acide aminé quelconque) pour TIF1 α , β et δ , le motif d'interaction aux RN dans le cas de TIF1 α et de Bonus, ou encore un motif d'interaction avec les SMAD pour TIF1 γ .

b. Activité de répression intrinsèque

Des expériences de transfection transitoire utilisant des fusions des différents TIF1 avec le DBD du transactivateur de levure Gal4 ont mis en évidence leur capacité de répression de la transcription sur un promoteur hétérologue (Le Douarin et al., 1996a ; Moosmann et al., 1996 ; Venturini et al., 1999 ; Beckstead et al., 2001 ; Khetchoumian et al., 2004).

L'inhibition de cette fonction par un traitement à la trichostatine A, un inhibiteur des HDAC, indique qu'elle s'exerce vraisemblablement par la désacétylation d'histones (Nielsen et al., 1999 ; **figure 17**).

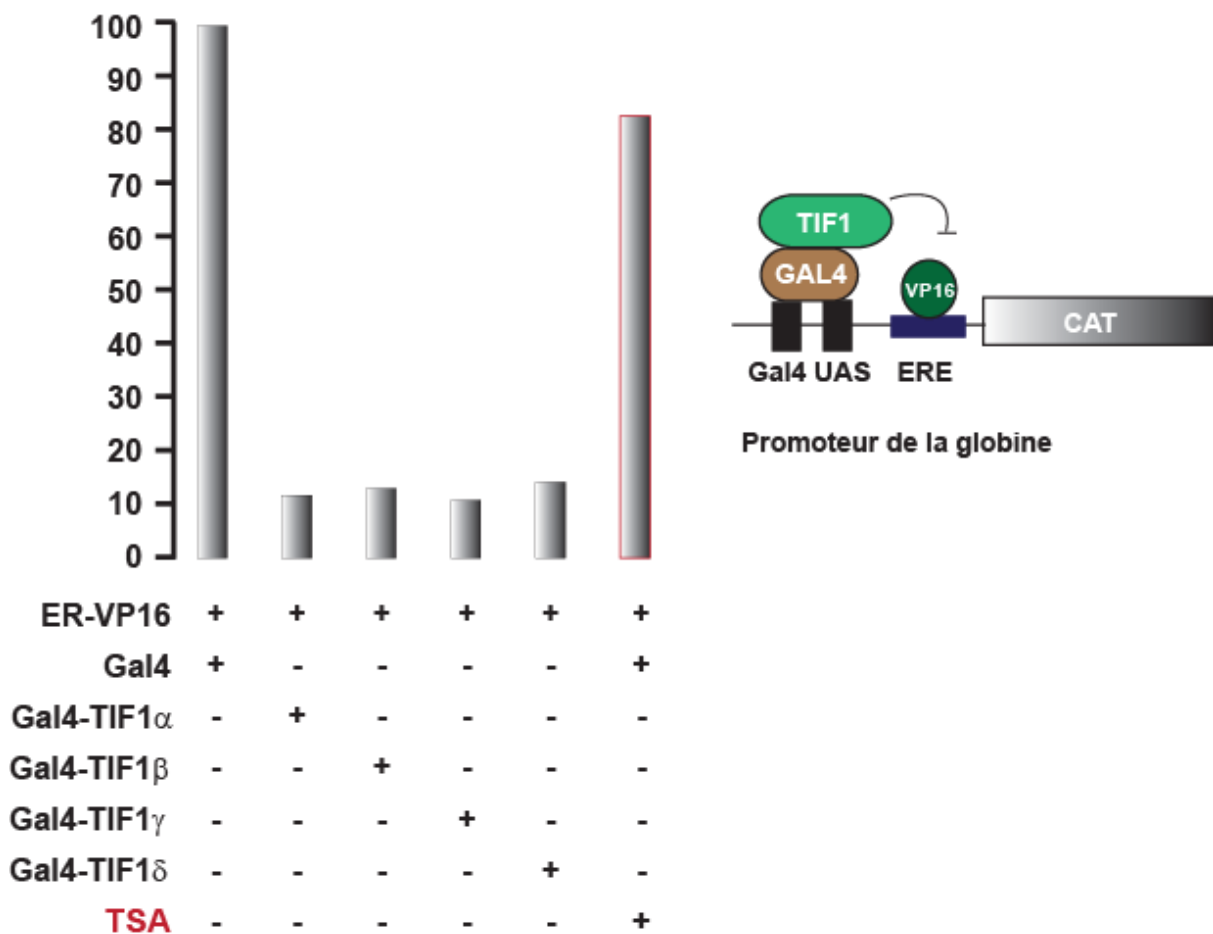


Figure 17 : Fonction de répression intrinsèque des TIF1. TSA : Trichostatine A, inhibiteur des histone désacétylases. UAS : *Upstream Activating Sequence*.

c. Identité/similarité des protéines TIF1

Les protéines TIF1 possèdent une identité peptidique de 30 à 50% entre les membres, les séquences le plus fortement similaires étant TIF1 α et TIF1 γ (54% ; **tableau 11**). Malgré leurs caractéristiques communes, les protéines TIF1 se singularisent par des fonctions spécifiques, illustrées par de nombreuses études.

| | TIF1 β | TIF1 γ | TIF1 δ |
|---------------|--------------|---------------|---------------|
| TIF1 α | 32/54 | 54/69 | 35/56 |
| TIF1 β | | 33/56 | 39/50 |
| TIF1 γ | | | 37/57 |

Tableau 11 : Identité/similarité des protéines TIF1 exprimés en pourcentage de la séquence peptidique.

2. Fonctions spécifiques des différents TIF1

a. Les orthologues Bonus et Moonshine

Bonus est l'unique orthologue des protéines TIF1 chez la drosophile (Beckstead et al., 2001). Il interagit par l'intermédiaire de sa NRbox avec β FTZ-F1 (*β Fushi TaraZu Factor 1*), l'orthologue du récepteur nucléaire LRH1 (*Liver Receptor Homolog 1*). Bonus est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de β FTZ-F1 et il exerce des fonctions importantes au cours du développement et de la métamorphose de la drosophile (développement de la tête, formation des ailes, des pattes et des yeux) (Beckstead et al., 2001).

Moonshine est l'orthologue de TIF1 γ chez le poisson zèbre et a été identifié par un crible génétique visant à identifier les protéines importantes pour l'hématopoïèse (Ransom et al., 1996). Corroborant son rôle dans l'hématopoïèse, des mutations au niveau du gène *moonshine* ont été identifiées comme provoquant des défauts de différenciation des cellules érythroïdes ainsi qu'une aplasie sévère des globules rouges (Ransom et al., 1996).

b. TIF1 β

i. Identification

TIF1 β , encore appelé KAP-1 (*KRAB-ZFP Associated Protein 1*), KRIP-1 (*KRAB-A Interacting Protein 1*) ou TRIM28, a été identifié par des cribles double-hybride en utilisant comme appât la protéine HP1 α (Le Douarin et al., 1996), ou le domaine KRAB A (*KRüppel-Associated Box A*) des facteurs de transcription KID-1 (*Kidney Ischemia and Developmentary regulated gene 1*) (Kim et al., 1996) et KOX1 (Moosmann et al., 1996).

ii. Co-répresseur universel des KRAB-ZFP

La famille des facteurs de transcription à domaine KRAB (Bellefroid et al., 1991 ; Thiesen et al., 1991) possède 423 membres identifiés grâce au séquençage du génome humain, et constitue donc la plus grande famille de régulateurs transcriptionnels chez les mammifères (Huntley et al., 2006). Ces protéines sont caractérisées par la présence dans leur partie carboxy-terminale d'un domaine de liaison à l'ADN constitué de 4 à plus de 30 motifs en doigt de zinc de type C2H2, ainsi que d'un domaine KRAB dans leur partie N-terminale (Bellefroid et al., 1991). Le domaine KRAB est constitué d'une région de 50 à 70 acides aminés qui peut être divisée en deux parties (**figure 18**) : Le domaine « KRAB A » est très conservé parmi les membres de la famille et est nécessaire et suffisant à l'activité de répression transcriptionnelle (Abrink et al., 2001). Le domaine « KRAB B » est plus variable et parfois absent dans certaines sous-familles. Il n'a pas d'activité intrinsèque, mais potentialise l'activité de répression du domaine « KRAB A » (Vissing et al., 1995). Il existe une sous-famille possédant un domaine additionnel dénommé « KRAB C », qui ne participe pas à l'activité de répression du domaine « KRAB A » mais favorise l'interaction avec TIF1 β (Looman et al., 2003). À ce jour, la plupart des protéines à domaine KRAB testées interagissent avec TIF1 β , à l'exception des KRAB-ZFP à domaine SCAN-KRAB (Itokawa et al., 2009). Aucun autre membre de la famille TIF1 n'est capable d'une telle interaction (Friedman et al., 1996 ; Kim et al., 1996 ; Moosmann et al., 1996 ; Urrutia, 2003 ; Khetchoumian et al., 2004).

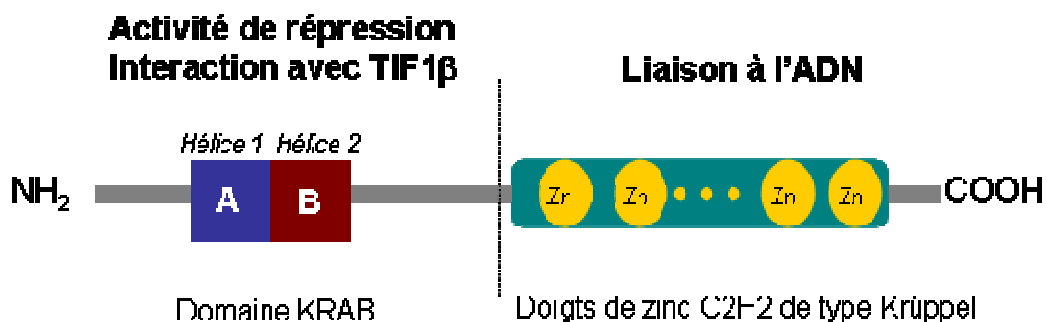


Figure 18 : Schématisation de la structure en domaines des facteurs de transcription KRAB-ZFP.

iii. Mécanismes de régulation transcriptionnelle

🚩 **Interaction avec les protéines HP1.** L'interaction entre TIF1 β et les HP1 a été mise en évidence par des cribles double-hybride (Le Douarin et al., 1996), puis confirmée *in vitro* et *in vivo* par co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères (Nielsen et al., 1999 ; Ryan et al., 1999). Elle est strictement dépendante du motif *HP1box* présent dans la partie centrale de TIF1 β et est requise pour son activité de répression (Nielsen et al., 1999 ; Ryan et al., 1999). La délétion du motif *HP1box* conduit en effet à une forte diminution de l'activité répressive intrinsèque de TIF1 β , aussi bien au niveau d'un gène rapporteur (Nielsen et al., 1999) que dans le cadre d'un complexe TIF1 β /KRAB-ZFP (Ryan et al., 1999). D'autre part, une mutation ponctuelle qui inactive l'*HP1box* de TIF1 β abroge sa capacité à se relocaliser au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique durant la différenciation des cellules F9 (Cammass et al., 2002).

🚩 **Recrutement de complexes répresseurs.** Plusieurs études récentes ont identifié les différents complexes interagissant avec TIF1 β et participant à la répression dépendante des KRAB-ZFP. Il a été mis en évidence que TIF1 β fait partie de deux complexes de remodelage de la chromatine à activité histone désacétylase : le complexe NuRD (*N*ucleosomal *R*emodeling and histone *D*eacetylase) en interagissant avec la sous-unité Mi-2 α (Schultz et al., 2001), et le complexe N-CoR1 (Underhill et al., 2000). TIF1 β est également capable d'interagir avec l'histone méthyltransférase SETDB1 spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz et al., 2002), par l'intermédiaire de son domaine PHD*finger*/Bromodomaine. Le recrutement de SETDB1 et du complexe NuRD nécessite la SUMOylation du bromodomaine par le PHD*finger* adjacent de TIF1 β (Ivanov et al., 2007 ; Zeng et al., 2008). L'ensemble de ces données confèrent à TIF1 β un rôle potentiel de « plate-forme » moléculaire pour le recrutement à l'ADN de molécules impliquées dans la formation de structures condensées, transcriptionnellement inactives de type hétérochromatine. Le modèle suivant a ainsi été proposé (**figure 19**) : les KRAB-ZFP reconnaissent leurs séquences cibles et recrutent TIF1 β , entraînant le recrutement des protéines HP1 et des complexes répresseurs dont les activités enzymatiques vont conduire à la désacétylation des histones et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Un nouveau site de liaison est ainsi créé pour les protéines HP1 permettant la propagation de la répression de proche en proche sur plusieurs dizaines de kilobases (Groner

et al., 2010). L'interaction entre TIF1 β et les HP1 permet ainsi la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur des gènes cibles et/ou le recrutement des gènes cibles au niveau des compartiments d'hétérochromatine constitutive (Schultz et al., 2001 ; Schultz et al., 2002 ; Cammas et al., 2002 ; Riclet et al., 2009). Des études réalisées grâce à un système rapporteur intégré ont apporté des éléments en faveur de ce modèle et ont permis de démontrer que l'ensemble de ces événements permet une répression stable pendant plusieurs générations (Ayyanathan et al., 2003 ; Sripathy et al., 2006).

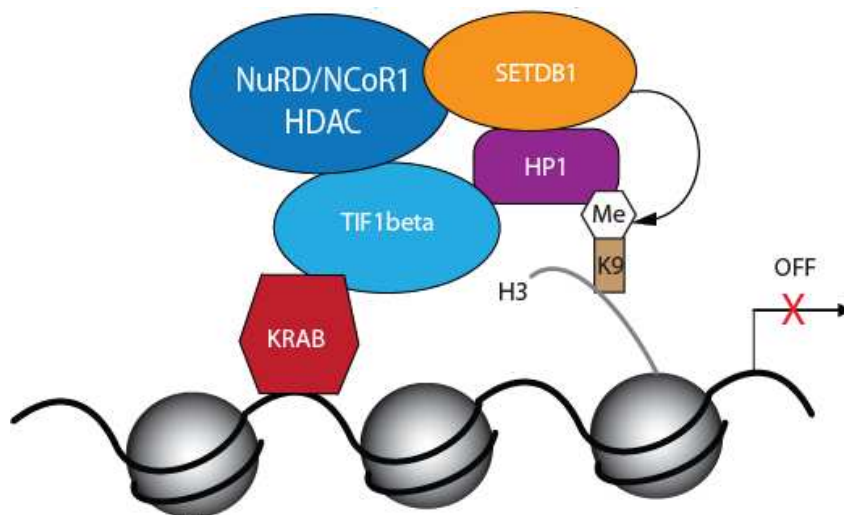


Figure 19 : Modèle de recrutement des complexes de remodelage de la chromatine associés à TIF1 β .

✚ **Rôle dans la co-activation.** TIF1 β pourrait jouer le rôle de co-activateur dans le contexte de son interaction avec certains RN. En effet, il augmente la trans-activation de GR de façon dépendante du ligand (Chang et al., 1998). Une interaction entre TIF1 β et le RN orphelin NGFI-B/Nur77 a été récemment décrite (Rambaud et al., 2009). Dans ce complexe particulier, TIF1 β serait capable de co-activer la transcription de la voie de signalisation de la CRH (*Corticotropin-Releasing Hormone*) d'une manière indépendante de SRC2, le second co-activateur impliqué dans cette voie. TIF1 β peut aussi co-activer des voies indépendantes des RN, il fonctionne notamment dans un complexe activateur de C/EBP β qui est requis pour la différenciation du lignage monocytique en macrophages (Rooney et Calame, 2001).

iv. Rôles physiologiques

■ **L'embryogenèse** : La mutation nulle du gène codant pour TIF1 β chez la souris conduit à la mortalité embryonnaire précoce. Les embryons *TIF1 β ^{-/-}* manifestent un retard de développement à partir du stade E5,5 (5,5 jours de développement embryonnaire), ne parviennent pas à effectuer la gastrulation et meurent avant le stade E8,5 sans avoir induit le mésoderme (Cammass et al., 2000).

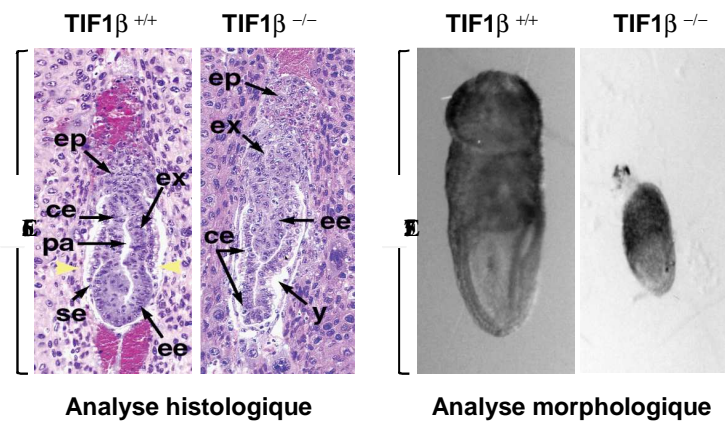


Figure 20 : TIF1 β est indispensable à l'embryogenèse précoce (d'après Cammass et al., 2000).

■ **La spermatogenèse** : TIF1 β est exprimé dans les spermatides rondes, les spermatides en cours d'élongation, les cellules de Sertoli et les spermatocytes en association préférentielle avec les structures hétérochromatiniennes de ces cellules. L'invalidation conditionnelle de TIF1 β dans la lignée germinale mâle entraîne la dégénérescence des tubes séminifères et la disparition totale des cellules germinales (Weber et al., 2002).

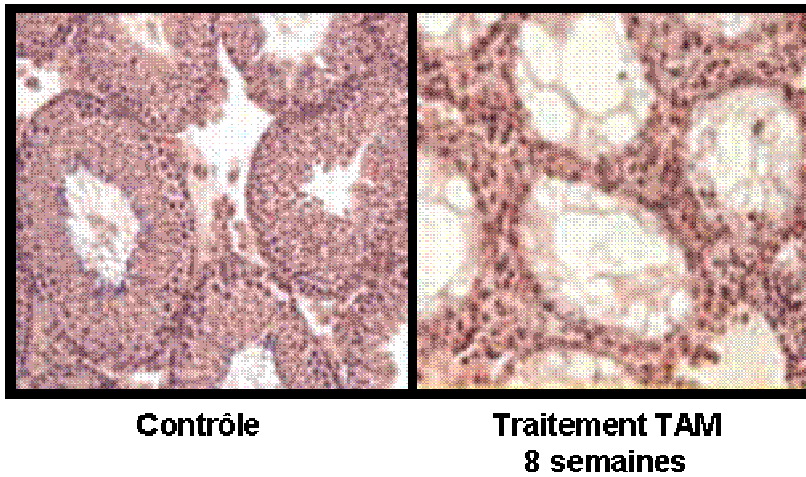


Figure 21 : TIF1 β est indispensable à la spermatogénèse. Après 8 semaines de traitement au tamoxifène (Tam), l'excision de TIF1 β dans la lignée germinale mâle conduit à la dégénérescence de l'épithélium séminifère (d'après Weber et al., 2002).

■ **La différenciation :** Les cellules F9 de carcinome embryonnaire sont des cellules pluripotentes capables de se différencier en cellules de l'endoderme primitif après un traitement à l'acide rétinoïque ou en cellules de l'endoderme pariétal après un co-traitement à l'acide rétinoïque et à l'AMP cyclique. Lors de la différenciation en endoderme primitif, TIF1 β est soumis à une redistribution subnucléaire de l'euchromatine vers l'hétérochromatine péricentromérique qui n'a pas lieu lorsque TIF1 β porte une mutation invalidante de l'*HP1box* (Cammass et al., 2002). Cette mutation empêche également la différenciation des cellules d'endoderme primitif en endoderme pariétal (Cammass et al., 2004).

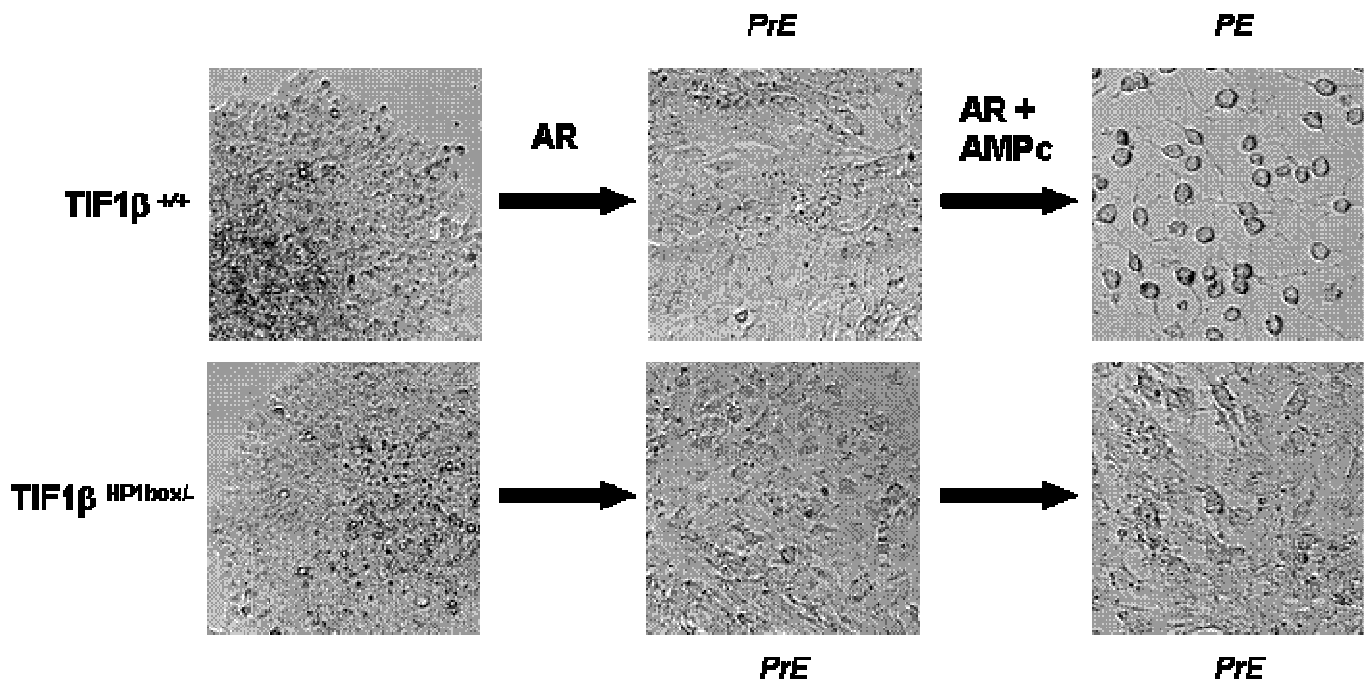


Figure 22 : L'interaction des protéines HP1 et TIF1 β est nécessaire à la différenciation terminale des cellules F9 en endoderme pariétal (PE) (d'après Cammas et al., 2004 ; PrE : endoderme primitif).

🚩 **La réponse comportementale :** L'inactivation totale du gène codant pour TIF1 β dans les neurones de souris adultes provoque un phénotype d'hyperanxiété et de perte de mémoire spatiale et temporelle en réponse au stress (Jakobsson et al., 2008). TIF1 β et les KRAB-ZFP pourraient ainsi être impliquées dans le contrôle épigénétique de l'expression de gènes au niveau de l'hippocampe et conditionner la réponse comportementale aux stress ainsi que les capacités cognitives.

🚩 **L'apoptose :** TIF1 β , par l'intermédiaire de son motif *coiled-coil*, est capable d'interagir avec l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (*Mouse Double Minute chromosome 2*) (Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2007). Cette liaison stimule la formation d'un complexe p53-Mdm2-TIF1 β -HDAC1 et favorise ainsi la désacétylation de p53, étape nécessaire à son ubiquitination et sa dégradation. Une autre étude a montré que p53 peut être réprimé par un mécanisme similaire, grâce à une interaction entre TIF1 β et la KRAB-ZFP APAK (*ATM and P53-Associated KZNF protein*) (Tian et al., 2009). La protéine APAK réprime p53 en recrutant de façon similaire un complexe TIF1 β -HDAC1 favorable à la désacétylation de p53. Ce mécanisme permet de réprimer p53 et de protéger les cellules de son effet pro-apoptotique. Il peut être contrebalancé grâce à un mécanisme impliquant la phosphorylation de APAK et de TIF1 β par la kinase ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) qui induit leur dissociation de p53 et l'induction de l'apoptose (Tian et al., 2009).

✚ **La restriction provirale :** TIF1 β joue le rôle de répresseur épigénétique des rétrovirus aussi bien dans les cellules souches embryonnaires que dans les cellules de carcinome embryonnaire (Wolf et Goff, 2007 ; Wolf et al., 2008). TIF1 β reconnaît la région PBS (*Primer Binding Site*) située dans le LTR des rétrovirus MoMLV (*MOloney Murine Leukemia Virus*) et réprime leur transcription en fonctionnant notamment avec la KRAB-ZFP809, les protéines HP1 et vraisemblablement le complexe NuRD (Wolf et Goff, 2009). L'équipe du Dr. Didier Trono a récemment étendu l'effet de TIF1 β à la restriction des rétrotransposons dans les cellules ES et l'embryon (Rowe et al., 2010), où TIF1 β semble réprimer en particulier la classe des ERV. D'un point de vue mécanistique, cette répression repose essentiellement sur le recrutement de SETDB1 et la triméthylation de la lysine 9 sur l'histone H3 (Matsui et al., 2010). Il semble donc que TIF1 β possède un effet relativement pléiotropique sur les structures de type LTR et puisse aussi jouer un rôle dans la défense aux rétrovirus.

c. TIF1 γ

TIF1 γ (aussi connu sous le nom de TRIM33 ou Ectodermin) a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules HepG2 par hybridation avec un fragment d'ADNc de TIF1 α (Venturini et al., 1999). Il possède, comme les autres membres de la famille, une capacité de répression intrinsèque mais n'interagit ni avec les récepteurs nucléaires, ni avec les KRABZFP et les protéines HP1 (Venturini et al., 1999). Il joue par contre un rôle essentiel dans la voie de signalisation du TGF- β . Il est ainsi requis pour différents processus dépendants de cette voie comme la formation de l'ectoderme chez l'embryon de xénope (Dupont et al., 2005), l'embryogenèse chez les mammifères (Morsut et al., 2010) ou encore la différenciation des cellules érythroïdes (He et al., 2006). La perte de TIF1 γ coopère avec l'activation de K-Ras dans le développement de cancers du pancréas, phénotype similaire à celui obtenu par délétion de SMAD4 (Vincent et al., 2009). Deux théories sont proposées pour expliquer le rôle de TIF1 γ dans la voie TGF- β :

- TIF1 γ interagirait avec SMAD4 et serait capable de le monoubiquitinyler (Dupont et al., 2005-2009).
- TIF1 γ serait un interactant du complexe SMAD2-3, tout comme SMAD4, et leur présence serait mutuellement exclusive. TIF1 γ et SMAD4 auraient des rôles

distincts au sein de la voie TGF- β , menant respectivement à la différenciation et à l'arrêt de la prolifération (He et al., 2006).

d. TIF1 δ

TIF1 δ (TRIM66) a été découvert au laboratoire par une analyse bioinformatique de banques de données utilisant l'algorithme BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment and *S*earch *T*ool) (Khetchoumian et al., 2004). Il présente toutes les caractéristiques structurales des protéines TIF1 et possède une activité de répression intrinsèque dépendante de la désacétylation des histones. Il possède un motif *HP1box* fonctionnel mais ne peut pas se lier aux RN ni aux KRAB-ZFP. Le patron d'expression de TIF1 δ est restreint, il semble n'être qu'exprimé dans les testicules au niveau des spermatides en cours d'élongation (Khetchoumian et al., 2004). TIF1 δ pourrait ainsi jouer un rôle dans l'extinction des gènes au cours des phases post-meïotiques de la spermatogénèse. Néanmoins, il pourrait partager la fonction de TIF1 β dans la restriction provirale puisqu'il a été identifié lors d'un criblage visant à identifier les protéines jouant un rôle dans la restriction du HIV (*H*uman *I*mmunodeficiency *V*irus) par siRNA systématique (König et al., 2008).

e. TIF1 α

i. Identification

TIF1 α (TRIM24 selon la nomenclature officielle) a été cloné par complémentation fonctionnelle dans la levure, sur la base de sa capacité à stimuler l'activité AF-2 du récepteur nucléaire RXR γ (Le Douarin et al., 1995). Il a ensuite été démontré interagir avec la structure holo de tous les récepteurs nucléaires testés (RAR, ER, RXR, PPAR, PR, VDR, LRH1). Ces

interactions ont été détectées *in vitro* (GST-pulldown), dans la levure (double-hybride) ou dans les cellules de mammifères (colocalisation). Elles requièrent l'intégrité de la NRbox de TIF1 α et de la fonction AF-2 des récepteurs nucléaires (Le Douarin et al., 1996a), dépendent strictement de la présence de ligand et sont bloquées par les antagonistes des RN (Le Douarin et al., 1995 ; vom Baur et al., 1996).

ii. Mécanismes de régulation transcriptionnelle

L'utilisation d'anticorps couplés aux grains d'or en microscopie électronique a permis de localiser TIF1 α essentiellement dans l'euchromatine (Remboutsika et al., 1999), ce qui repose vraisemblablement sur la présence des motifs bromodomaine et PHDfinger dans sa partie C-terminale, motifs capables de lier des PTM d'histones associées à l'euchromatine.

TIF1 α est aussi bien capable d'activer et d'inhiber la transcription, son activité semblant dépendre du contexte cellulaire. A l'origine de sa découverte, l'effet de TIF1 α sur les récepteurs nucléaires dans la levure est celui d'un co-activateur (Le Douarin et al., 1995). Les équipes de Pier Paolo Pandolfi et, en collaboration avec la nôtre, de Mickael Stallcup ont également décrit un effet activateur de transcription pour TIF1 α dans des expériences de transfections transitoires de cellules de mammifères (Teyssier et al., 2006 ; Zhong et al., 1999). Dans ces systèmes *ex vivo*, il a été proposé que TIF1 α puisse servir de plate-forme permettant aux co-activateurs SRC1 et CARM1 d'être efficacement recrutés (Teyssier et al., 2006).

Dans les cellules de singes Cos-1, de Hamster CHO (*Chinese Hamster Ovary*) et d'hépatocarcinome humain HepG2, la surexpression de TIF1 α réduit fortement la transactivation ligand-dépendante de RXR α , ER ou RAR (Le Douarin et al., 1996 ; Le Douarin et al., 1995 ; Khetchoumian et al., 2007). En accord avec ce rôle de co-répresseur des RN, il a été démontré que la fonction de répression intrinsèque de TIF1 α est supprimée en présence d'un inhibiteur des histones désacétylases, suggérant une interaction entre TIF1 α et les HDAC (Nielsen et al., 1999). D'autre part, un crible double-hybride visant à identifier les partenaires protéiques de TIF1 α a mis en évidence une interaction avec les protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Le Douarin et al., 1996a). Ces protéines chromatiniennes non-histones reconnaissent spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3 lorsqu'elle est méthylée grâce à leur chromodomaine (Bannister et al., 2001) et sont connues pour jouer un rôle dans l'établissement de structures chromatiniennes silencieuses. Cependant, la délétion du domaine

d'interaction de TIF1 α avec les HP1 n'a aucun impact sur sa fonction de répression intrinsèque *in vitro* (Nielsen et al., 1999).

iii. Fonctions physiologiques

TIF1 α est exprimé de façon quasiment ubiquitaire, avec notamment un fort taux d'expression dans le système nerveux central embryonnaire et dans les testicules. Les lignées cellulaires à caractère toti- ou pluripotent comme les cellules F9 de carcinome embryonnaire ou les cellules souches embryonnaires ES (*Embryonic Stem cells*) sont particulièrement riches en transcrits TIF1 α (Le Douarin et al., 1995 ; Niederreither et al., 1999 ; Remboutsika et al., 1999 ; Zhong et al., 1999). TIF1 α possède un effet de modulateur de l'expression de gènes durant la première vague d'activation de la transcription du zygote (Torres-Padilla et Zernicka-Goetz, 2006).

TIF1 α est impliqué dans plusieurs cas de protéines de fusion oncogéniques. Cette fusion implique généralement la région RBCC de TIF1 α et le domaine catalytique de protéines kinases. Le RBCC a ainsi été trouvé fusionné à la tyrosine kinase RET (*REarranged during Transfection*) dans certains cas de cancer de la thyroïde des « enfants de Tchernobyl » (Klugbauer et Rabes, 1999) ; à FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) suite à deux translocations différentes dans le syndrome myéloprolifératif (Belloni et al., 2005) ; et à B-RAF dans le cas d'un hépatocarcinome murin (Miki et al., 1991) (**figure 23**). Cette fusion entre TIF1 α et B-RAF, baptisée « oncogène T18 », se comporte comme un dominant négatif délocalisant TIF1 α dans le cytoplasme par multimérisation (Zhong et al., 1999). De plus, le locus 7q32-34 correspondant à TIF1 α a été trouvé endommagé dans des cas de leucémie lymphoblastique aiguë (Strefford et al., 2007) et de carcinome métastatique de la muqueuse buccale (Liu et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère un rôle potentiel de suppresseur de tumeur pour TIF1 α .

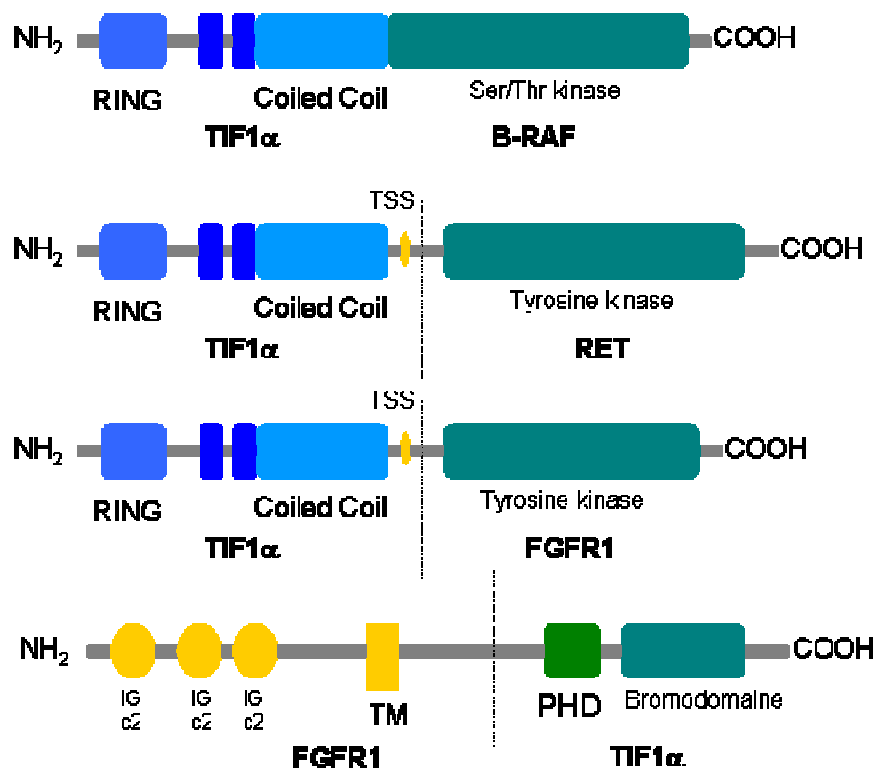


Figure 23 : Protéines de fusion oncogéniques impliquant TIF1 α . IGc2 : Immunoglobulin-like C2-Type domain TM : Domaine transmembranaire.

Au laboratoire, les souris invalidées pour TIF1 α ont été générées (Khetchoumian et al., 2007). Ces souris sont viables et fertiles mais développent des calcifications artérielles semblables au syndrome de Mönckeberg chez l'homme (Ignat et al., 2008). Ce phénotype a été démontré dépendre de l'activité répressive de TIF1 α sur le récepteur nucléaire VDR.

D'autre part, ces souris développent des CHC (Carcinome Hépatocellulaire) avec une pénétrance complète (Khetchoumian et al., 2007). Ce phénotype est dépendant de RAR α puisqu'il est totalement supprimé par l'inactivation d'un seul allèle de ce RN. Ces résultats mettent en évidence un antagonisme fonctionnel entre TIF1 α et RAR α et établissent pour la première fois une surexpression de la voie de l'acide rétinoïque comme oncogénique pour le foie (Khetchoumian et al., 07).

VII. [Hépatocarcinogénèse](#)

1. Caractéristiques des cellules tumorales

Le cancer est un processus multi-étapes consistant en l'accumulation d'altérations du transcriptome, aussi bien au niveau de la séquence des gènes qu'au niveau épigénétique. Ces altérations conduisent progressivement à la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, selon des étapes communes à tous les types de cancer (Hanahan et Weinberg, 2000) :

(1) l'auto-suffisance en signaux de croissance. Une cellule saine est dépendante de la présence de facteurs de croissance extracellulaires pour entrer en prolifération. Ces facteurs de croissance peuvent être des molécules circulantes, des composants de la matrice extracellulaire ou des molécules d'adhésion intercellulaires. Les cellules tumorales ont une dépendance réduite vis-à-vis de ces signaux, état qu'elles atteignent par différents processus : la production de leurs propres signaux de croissance crée une boucle de stimulation autocrine *de novo* ; la sur-expression ou des mutations activantes de leurs récepteurs membranaires induisent une hypersensibilité aux signaux extracellulaires ; une activation anormale des effecteurs intracellulaires de la signalisation induit leur prolifération indépendamment de la présence de signaux extracellulaires.

(2) l'insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance. Ces signaux favorisent l'entrée en quiescence des cellules (phase G0 du cycle cellulaire) ou bien dans un état post-mitotique correspondant à une étape particulière de différenciation. On retrouve dans les cancers de nombreuses altérations des voies de signalisation qui gouvernent l'activité des régulateurs du cycle cellulaire.

(3) l'inhibition de l'apoptose. La capacité d'une tumeur à croître implique non seulement un taux de prolifération anormal des cellules, mais aussi une faible mortalité. Celle-ci dépend de la réponse immunitaire de l'hôte et du processus d'apoptose. L'apoptose est déclenchée en cas de dommage à l'ADN, d'activation anormale de certaines voies de signalisation par des oncogène, et de certains stress externes comme l'insuffisance en facteur de croissance, l'hypoxie, ou encore par le système de régulation de l'homéostasie tissulaire dit « inhibition de contact ».

(4) le potentiel prolifératif infini. Hormis les cellules embryonnaires ou germinales, toutes les cellules d'un individu ont un potentiel répliatif limité provenant de la perte progressive des télomères. Lorsqu'un télomère devient trop court, il active les voies de réponse aux

dommages à l'ADN et la mort cellulaire par apoptose. La réactivation de la télomérase, enzyme responsable du maintien de la longueur des télomères, est retrouvée dans une majorité de cancers.

(5) la promotion de l'angiogenèse. Les cellules cancéreuses, de même que les cellules saines, sont dépendantes de la disponibilité d'oxygène et de nutriments. Les tumeurs constituent un milieu intrinsèquement hypoxique, il existe donc une pression de sélection les poussant à sécréter des facteurs angiogéniques stimulant l'établissement d'une vascularisation.

(6) l'invasion des tissus et la capacité métastatique. Les métastases sont à l'origine de 90% des morts par cancer. Une cellule tumorale devient métastatique lorsqu'elle perd ses attaches intercellulaires et peut ainsi coloniser un site distant *via* la circulation sanguine. Cette capacité fait intervenir notamment les molécules d'adhésion cellule-cellule, les intégrines et les protéases extracellulaires.

Une septième capacité favorise l'acquisition des 6 autres : **(7) l'instabilité génique et génomique.** Elle consiste en gains ou pertes de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes à des taux plus importants que dans une cellule normale. Les altérations chromosomiques peuvent être numériques (aneuploïdie) ou structurales (translocations, amplifications, insertions, délétions). Par conséquent, le caryotype d'une cellule tumorale est souvent différent du caryotype des cellules normales adjacentes. Les cassures chromosomiques peuvent avoir différentes origines, notamment dues aux dommages à l'ADN causés par les radiations ultraviolet, les radiations ionisantes, certains mutagènes, les mésappariements au cours de la mitose, ou encore le blocage de la fourche de réplication.

2. Le carcinome hépatocellulaire

a. Etiologie

Le foie est sujet à différents néoplasmes, parmi lesquels le carcinome hépatocellulaire (CHC), l'hépatoblastome, l'haemangiosarcome et le cholangiocarcinome. Le CHC est le plus fréquent avec 83% des cancers du foie, c'est le cinquième type de tumeur le plus commun au monde (Feo et al., 2006). Les facteurs étiologiques et les altérations cellulaires conduisant au CHC sont relativement bien connus. En revanche, les mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogenèse restent relativement obscurs, ce qui entraîne de grandes difficultés quant à son traitement. De ce fait, le CHC cause plus de 600 000 morts par an, ce qui le

positionne au troisième rang des cancers les plus mortels. Bien que 80% des nouveaux cas soient diagnostiqués en Asie orientale et en Afrique sub-Saharienne, l'incidence et le taux de mortalité ont doublé en Europe et aux Etats-Unis pendant les quatre dernières décennies et sont supposés doubler encore lors des 10 ou 20 prochaines années (El-Serag, 2004).

Les facteurs étiologiques causant le CHC chez l'humain sont (**tableau 12**) :

- Les infections aux virus des hépatites B et C. Elles sont la cause du plus grand nombre de cas et ont un pronostic très négatif (Cantarini et al., 2006). La simple insertion du génome viral dans la séquence de l'ADN cellulaire est en soi mutagène et les protéines produites par le virus altèrent le fonctionnement de suppresseurs de tumeurs comme p53 ou pRB (*RetinoBlastoma*) (Thorgeirsson et Grisham, 2002).
- Les différentes causes entraînant des cirrhoses hépatiques, comme une surconsommation d'alcool.
- La présence de toxines telles que les aflatoxines dans l'alimentation.
- Le contact avec des produits chimiques comme le diéthylnitrosamine (DEN), le tetrachlorocarbone (CCl4) ou la griséofulvine.

| | Facteurs à risque | Implications |
|-------------------------|-----------------------------------|---|
| Facteurs majeurs | Virus de l'hépatite B (HBV) | <i>Induit l'hépatite et la cirrhose</i> |
| | Virus de l'hépatite C (HCV) | <i>Induit l'hépatite et la cirrhose</i> |
| | Aflatoxines | <i>Agent génotoxique et cytotoxique</i> |
| | Consommation d'alcool | <i>Induit la cirrhose alcoolique</i> |
| Facteurs mineurs | Tabac | <i>Induit des dommages à l'ADN</i> |
| | Eau polluée | <i>Stimulent la prolifération hépatocytaire</i> |
| | Contraceptifs oraux | <i>Stimulent la prolifération hépatocytaire</i> |
| | Stéroïdes androgènes anabolisants | <i>Stimulent la prolifération hépatocytaire</i> |

Tableau 12 : Principaux facteurs étiologiques initiateurs de l'hépatocarcinogénèse.

b. Pathogénèse moléculaire

Les événements moléculaires initiaux menant à la transformation cellulaire dans le foie ne sont encore que très partiellement connus. Chez l'humain, il est en effet difficile de disposer de banques de tissus correspondant à des stades précoces de la maladie puisque celle-ci est peu détectable. Si la quantification de l'expression du gène *Afp* (*Alpha-foetoprotéine*) dans le plasma sanguin a depuis longtemps été utilisé, de forts taux ne sont pas caractéristiques des stades précoces de la maladie. De meilleurs résultats ont été récemment obtenus dans la détection des étapes précoces du CHC en utilisant des anticorps contre

HSP70, GS (*Glutamine synthetase*) et GPC3 (*Glypican-3*) (International consensus group for hepatocellular neoplasias, 2009).

Les lésions précoces consistent en différents types de *foci* d'altération cellulaire qui donnent naissance à des nodules (cellules comprenant des multinucléations et du pléomorphisme nucléaire). Pour une taille inférieure à 1mm, on distingue les foci dysplastiques à cellules larges et à petite cellules, ces derniers étant considérés comme les précurseurs directs du CHC (Desmet, 2009). Les nodules dysplastiques d'une taille comprise entre 1mm et 1cm sont considérés comme pré-cancéreux, les plus agressifs étant les nodules à haut grade de dysplasie, composés de plus petites cellules que les nodules à faible grade de dysplasie. Ils sont composés de petites cellules ayant un ratio noyau/cytoplasme élevé et ont tendance à contenir des inclusions basophiles (Desmet, 2009).

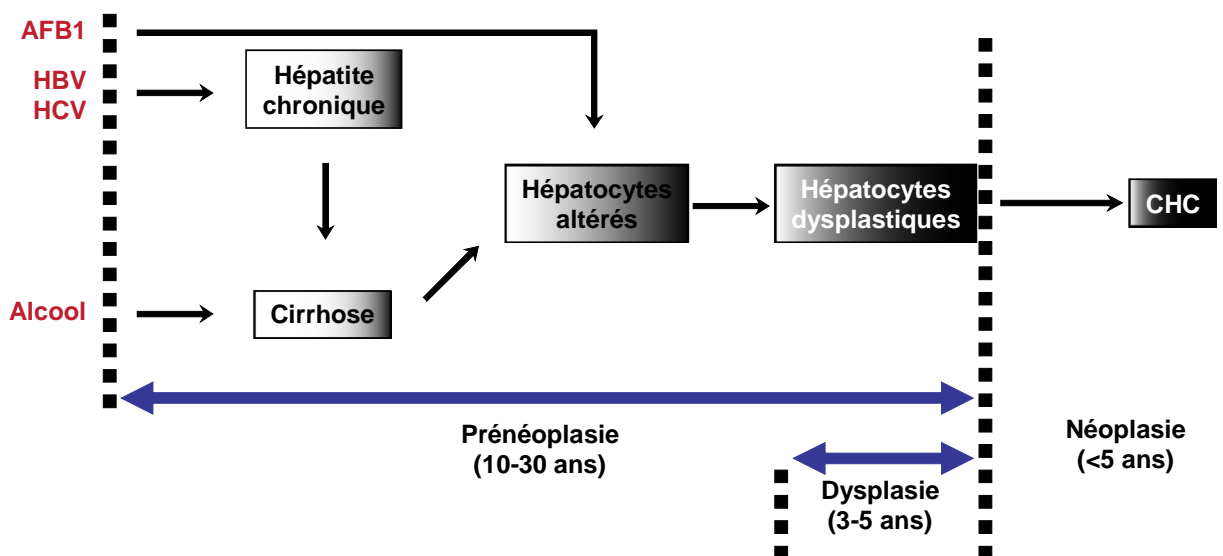


Figure 24 : Les différentes étapes du développement du CHC humain (adapté de Thorgeirsson et Grisham, 2002 ; Wong et Ng, 2008)

Les voies de signalisation impliquées dans le CHC ont été mises en évidence par diverses stratégies incluant des études globales de transcriptomes, de mutations géniques et de méthylation des promoteurs (pour revue, Minguez et al., 2009). Ces études n'ont cependant pas montré une signature transcriptionnelle claire et ont établi que le CHC est un type de cancer très hétérogène (Laurent-Puig et Zucman-Rossi, 2006 ; Thorgeirsson et Grisham, 2002 ; Wong et Ng, 2008 ; Zucman-Rossi et Laurent-Puig, 2007) (**tableau 13**).

| Gène | Fonction | Type d'altération |
|-----------------------------------|---|---|
| Angiopoietin-2 | Angiogenèse | Sur-expression |
| APC | Régulation de la voie Wnt | Mutation |
| AXIN1 | Régulation de la voie Wnt | Mutation / Perte de copies |
| β-catenin | Régulation de la voie Wnt | Mutation |
| BRCA2 | Réparation de l'ADN | Perte de copies |
| C-myc | Prolifération cellulaire et survie | Sur-expression / Gain de copies |
| Cyclin D1 | Prolifération | Gain de copies |
| DLC1 | Prolifération cellulaire et survie | Perte d'hétérozygotie |
| E2F4 | Prolifération cellulaire | Mutation |
| E-caderin | Adhésion cellulaire | Perte de copies / Répression épigénétique / Perte d'hétérozygotie |
| EGFR | Prolifération cellulaire et survie | Sur-expression |
| EXT1 | Différenciation | Perte d'hétérozygotie |
| FGF3 | Prolifération | Gain de copies |
| FGF4 | Prolifération | Gain de copies |
| Frizzled-7 | Différenciation, prolifération et survie | Sur-expression |
| HGF | Prolifération cellulaire et métastase | Sur-expression |
| IGF2R | Prolifération cellulaire et survie | Perte d'hétérozygotie / Mutation / Perte de copies |
| IGFBP-3 | Régulateur de la voie IGF | Répression épigénétique |
| IGF-I | Prolifération cellulaire et survie | Sur-expression |
| IGF-II | Prolifération cellulaire et survie | Sur-expression |
| K-RAS | Transduction de signal | Mutation |
| miRNA122 | Dégradation cycline G1 | Sur-expression |
| MLH1 | Réparation de l'ADN | Perte d'hétérozygotie |
| MMP-14 | Métastase | Sur-expression |
| MMP-9 | Métastase | Sur-expression |
| Osteopontin | Métastase | Sur-expression |
| p14ARF | Stabilisation de p53 | Répression épigénétique |
| P16INK4a | Régulateur du cycle cellulaire | Mutation / Perte d'hétérozygotie / Répression épigénétique |
| p53 | Cycle cellulaire, apoptose, réparation de l'ADN | Mutation / Perte d'hétérozygotie / Perte de copies |
| p73 | Inhibiteur du cycle cellulaire | Perte d'hétérozygotie / Perte de copies |
| PDGF | Angiogenèse | Sur-expression |
| PIK3CA | Transduction de signal | Mutation |
| PTEN | Régulation de la voie PI3K | Mutation / Perte de copies |
| RASSF1 | Apoptose | Répression épigénétique |
| Rb1 | Inhibiteur du cycle cellulaire | Mutation / Perte d'hétérozygotie / Perte de copies |
| SFRP1 | Régulation de la voie Wnt | Répression épigénétique |
| SMAD1 | Différenciation, prolifération et survie | Perte copies |
| SOCS3 | Régulateur négatif de la voie des cytokines | Répression épigénétique |
| Sonic Hedgehog | Différenciation, prolifération et survie | Sur-expression |
| Survivin | Anti-apoptose | Sur-expression |
| TCF1 | Différenciation cellulaire | Mutation |
| TERT / TERC | Maintenance de la longueur des télomères | Réactivation |
| TGF-α | Prolifération cellulaire et survie | Sur-expression |
| VEGFA | Angiogenèse | Gain de copies |
| VEGFR | Angiogenèse | Sur-expression |

Tableau 13 : Principales altérations génétiques retrouvées dans les CHC humains.

Parmi ces facteurs, on remarque une surreprésentation de gènes liés aux voies de signalisation des facteurs de croissance HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*), TGF α (*Transforming Growth Factor α*), et Wnt (*Wingless Integration site*) (Breuhahn et al., 2006 ; Thorgeirsson et Grisham, 2002). Leur activation peut se produire à différents niveaux, mais des tendances se dégagent clairement en fonction des voies : la voie IGF est dérégulée en particulier par une quantité excessive de ligand, la voie HGF dépend principalement de la sur-expression et sur-activation de son récepteur MET tandis que la voie

Wnt est généralement dérégulée au niveau de composants de la signalisation intracellulaire. La voie Wnt/ β -caténine est très fréquemment activée dans les CHC bien différenciés, c'est à dire précoces (Bengochea et al., 2008), le plus souvent *via* des mutations dans les gènes *CTNNB1* ou *AXIN1*.

De nombreuses études ont démontré que les différentes étapes de la carcinogenèse hépatique corrént avec l'inactivation de certains suppresseurs de tumeur comme p53, pRb, et les inhibiteurs de CDK (*Cyclin-dependent kinase*) p21, p27 et p16 (Martin et Dufour, 2008). Leur inhibition peut se produire par perte d'hétérozygotie, mutation ou extinction par méthylation du promoteur. Ils peuvent aussi être dérégulés en amont par la voie TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), qui est fréquemment inhibée dans les phases précoces du CHC, et activée dans les phases tardives où elle promeut le potentiel métastatique de la tumeur (Dooley et al., 2009). p53 est le suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans l'ensemble des cancers. Dans le cas du CHC, il est généralement associé à la progression de la maladie et non pas à son initiation.

Un autre point de contrôle crucial pour l'hépatocarcinogenèse est la voie oncogénique PI3K/Akt/mTOR qui promeut notamment la survie cellulaire. Le suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) est le régulateur négatif de cette voie que l'on trouve fréquemment sous-exprimé ou muté dans les cancers, y compris dans de nombreux cas d'HCC précoces.

c. Modèles murins

La souris fournit un excellent modèle pour l'hépatocarcinogenèse humaine puisque la cancérisation du foie s'y produit de façon similaire en terme d'évolution morphologique et possède des points communs dans sa pathogenèse moléculaire (Lee et al., 2005). Il existe trois types de protocoles pour induire l'hépatocarcinogenèse chez la souris (Newell et al., 2008).

🚩 **L'administration de composés chimiques** : Les composés les plus utilisés comprennent le DEN (DiEthyl Nitrosamine), le DMN (DiMéthyl Nitrosamine) ou le CCl₄. DEN et DMN possèdent un pouvoir génotoxique causé par la formation d'adduits sur l'ADN, tandis que CCl₄ est un puissant cytotoxique. D'un point de vue histologique, ils reproduisent la situation de cirrhose chez l'homme en induisant l'apparition d'un environnement fibrotique dans le foie. Un traitement au DEN, par exemple, induit l'apparition de *foci* d'hépatocytes altérés et finalement d'hépatocarcinomes après 20-100 semaines en fonction de la durée du traitement et du nombre d'injections.

🚩 **La xénogreffe** : L'implantation de cellules transformées chez la souris immunodéprimée provoque la cancérisation dans le foie. Ce protocole permet d'induire rapidement un CHC ainsi que de mesurer le développement de la tumeur dès son origine. Néanmoins la xénogreffe ne reproduit pas le micro-environnement tumoral, ce dont témoignent un certain nombre de différences histologiques. D'autre part, il est crucial de tester un grand nombre de lignées différentes, de fortes variations ont été observées en fonction de la dérive subie par les cellules pendant la phase de culture *in vitro*.

🚩 **L'ingénierie génétique** permet de valider l'importance des potentiels suppresseurs de tumeur et oncogènes détectés chez l'homme, et de disposer de modèles reproductibles d'induction de l'hépatocarcinogénèse (pour revue Lee et al., 2005 ; Zender et al., 2010). Les lignées de souris ainsi obtenues diffèrent les unes des autres et ne récapitulent pas toutes les événements moléculaires sous-tendant l'hépatocarcinogénèse humaine, néanmoins certaines semblent constituer de bons modèles (Lee et al., 2004 ; Thorgeirsson et al., 2006).

| Transgénèse | Gène | Référence |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| Hépatocytes | Cycline D1 | Deane et al., 2001 |
| Hépatocytes | PML-RAR α | David et al., 1997 |
| Hépatocytes | C-myc | Santonio-Rugiu et al., 1996 |
| Hépatocytes | Met | Wang et al., 2001 |
| Hépatocytes | EGF | Tonjes et al., 1995 |
| Hépatocytes | HGF | Sakata et al., 1996 |
| Hépatocytes | E2F1 | Conner et al., 2000 |
| Muscle squelettique | FGF19 | Nicholes et al., 2002 |
| Foie / Tissus connectif / Glandes sébacées | IGF2 | Rogler et al., 1994 |
| Multiplés tissus | TGF-α | Jhappan et al., 1990 |

Tableau 14 : Cas de sur-expressions chez la souris entraînant le développement spontané de CHC.

| Invalidation | Génotype | Processus affecté | Référence |
|--------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Totale | AOX1-/- | Métabolisme | Fan et al., 1998 |
| Totale | Cx32-/- | Jonctions étanches | Temme et al., 1997 |
| Totale | Tob1-/-* | Cycle cellulaire | Yoshida et al., 2003 |
| Totale | Lkb1+/- | Croissance cellulaire | Nakau et al., 2002 |
| Totale | Anx7 +/-* | Instabilité génomique | Srivastava et al., 2003 |
| Totale | Mdr2-/- | Transport | Mauad et al., 1994 |
| Totale | GNMT-/- | Stress oxydatif | Martinez-Chantar et al., 2008 |
| Totale | Mat1a-/- | Stress oxydatif | Martinez-Chantar et al., 2002 |
| Totale | Txnip-/- | Inconnu | Sheth et al., 2006 |
| Totale | Elf+/- | Prolifération | Kitisin et al., 2007 |
| Hépatocytes | NEMO | Réponse immunitaire | Luedde et al., 2007 |
| Hépatocytes | Nrf1-/- | Stress oxydatif | Xu et al., 2005 |
| Hépatocytes | PTEN-/- | Stress oxydatif | Horie et al., 2004 |
| Hépatocytes | APC-/- | Prolifération | Colnot et al., 2004 |
| Hépatocytes | DICER-/- | Maturation des miRNA | Sekine et al., 2009 |
| Hépatocytes | TAK1-/- | Réponse immunitaire | Bettermann et al., 2010 |

Tableau 15 : Souris génétiquement invalidées développant spontanément des CHC.
*** indique les cas où des tumeurs ont été observées dans d'autres organes.**

La plupart des invalidations conduisant au CHC ne provoquent pas de tumeurs dans d'autres organes, soulignant le caractère singulier du foie quant à la carcinogenèse. Ces gènes jouent principalement des rôles dans le contrôle du cycle cellulaire et le stress oxydatif.

Parmi les voies que l'on retrouve dérégulées dans le CHC humain, seules certaines ont été validées comme suffisantes pour provoquer l'hépatocarcinogenèse chez la souris. Ainsi les voies des facteurs de croissance peuvent, lorsqu'elles sont sur-activées par un excès de production de ligand, provoquer l'oncogenèse hépatique. D'autre part, les suppresseurs de tumeur dont l'invalidation conduit au CHC murin comprennent notamment des régulateurs négatifs des voies PI3K/Akt (*PTEN*^{-/-}) et Wnt/ β -caténine (*APC*^{-/-}) ce qui appuie la possibilité qu'elles puissent constituer d'excellentes cibles pour le développement de composés pharmacologiques en vue de soigner l'hépatocarcinogenèse humaine.

3. Voie de l'acide rétinolique dans la cancérogenèse

L'acide rétinolique est le métabolite actif de la vitamine A (rétinol). Il est ingéré sous forme de provitamines A telles le β -carotène, provenant de notre alimentation (Goodman et Huang, 1965). Ces provitamines sont alors métabolisées dans les entérocytes de l'intestin en rétinyl-esters qui vont ensuite gagner la circulation sanguine associés au chylomicron et être stockés dans les cellules stellaires hépatiques. Le foie joue un rôle central dans le métabolisme de la vitamine A (Blomhoff et Blomhoff, 2006). Il peut stocker, mobiliser, activer et

cataboliser les rétinoïdes. Les rétinyl-esters stockés dans les cellules stellaires et/ou présents dans les hépatocytes peuvent être transformés en rétinol et circuler dans le plasma. Étant de nature hydrophobe, le rétinol nécessite l'association au transporteur RBP (*Retinol Binding Protein*) pour gagner ses cellules cibles (Kawaguchi et al., 2007), dans lesquelles il va pouvoir être métabolisé en acide rétinoïque, principalement sous les formes tout-trans et 9-cis qui constituent les ligands des RAR et RXR.

Les agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque (acide rétinoïque et dérivés pharmacologiques) sont connus pour inhiber la prolifération et induire la différenciation de nombreux types cellulaires (Rochette-Egly et Chambon, 2001). Ils sont par conséquent très utilisés dans le traitement et la prévention de multiples cancers (Altucci et al., 2007 ; Soprano et al., 2004), en particulier dans le cas de la Leucémie Promyélocytaire Aigüe (APL). Dans 98% des cas, cette maladie fait intervenir une protéine de fusion entre PML (*ProMyelocytic Leukaemia*) et RAR α , suite à une translocation chromosomique. L'expression de la protéine de fusion PML-RAR α rend le récepteur insensible au ligand car il est constitutivement lié aux complexes co-répresseurs. La transcription de gènes cibles importants pour la différenciation des promyélocytes est donc réprimée, ce qui entraîne leur prolifération incontrôlée. Le traitement des patients à l'acide rétinoïque induit la dissociation forcée des co-répresseurs et aboutit à la différenciation terminale des promyélocytes leucogémiques en granulocytes, dont la durée de vie n'excède pas quelques jours (de The et al., 1990 ; Huang et al., 1988).

Contrairement à ce que laisse supposer son effet dans d'autres tissus, l'acide rétinoïque a un effet mitogénique sur les hépatocytes de rats et de souris (Columbano et Shinozuka, 1996 ; Ohmura et al., 1996). Il a d'autre part été montré lors d'une étude visant à identifier des molécules à effet préventif du cancer du foie dans un modèle d'hépatocarcinogénèse induite chimiquement, que les acides rétinoïques « tout trans » et 13-cis augmentaient de façon significative l'incidence des tumeurs (Di Bisceglie et al., 2005 ; McCormick et al., 1990).

De manière analogue, alors que RAR β joue le rôle de suppresseur de tumeur et est fréquemment muté dans les stades précoces de la cancérogénèse (Alvarez et al., 2007), il est impliqué en tant qu'oncogène dans l'hépatocarcinogénèse. En effet il a été originellement découvert dans le cadre d'une protéine de fusion avec la protéine pre-S1 du virus de l'hépatite B dans un cas d'hépatocarcinome (Dejean et al., 1986). Il a alors été proposé que l'expression aberrante de RAR β due à la proximité du promoteur viral pourrait jouer un rôle dans le processus de tumorigénèse hépatique (de The et al., 1987 ; Dejean and de The, 1990). Appuyant cette théorie, il a été démontré que la sur-expression de RAR β entraîne des lésions hépatiques, stimulant l'hépatocarcinogénèse (Garcia et al., 1993). Un rapport récent est à

corrélés avec cet effet potentiellement oncogénique attribué à RAR β : il est en effet décrit que RAR γ pourrait avoir un rôle promoteur de l'hépatocarcinogénèse (Yan et al., 2010). Nos données obtenues grâce aux souris *TIF1 α ^{-/-}* décrivent une situation analogue. L'inactivation d'un allèle de *Rar α* chez ces souris suffit à restaurer un phénotype hépatique normal, démontrant le rôle de proto-oncogène que RAR α assume dans le foie (Khetchoumian et al., 2007).

Projet de thèse :

Mon projet de thèse a visé à progresser dans la caractérisation du rôle de TIF1 α dans la suppression de tumeur dans le foie, ainsi que dans la compréhension des mécanismes par lesquels il module l'expression de ses gènes cibles.

Nous avons abordé le premier aspect par l'utilisation de systèmes *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons développé un moyen de sur-exprimer TIF1 α transitoirement dans des lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes murins et humains. Nous avons d'autre part généré deux lignées de souris permettant une inactivation conditionnelle de TIF1 α . La première lignée a permis d'exciser TIF1 α spécifiquement dans les hépatocytes grâce au transgène *Alb-Cre*, la seconde a rendu possible son inactivation contrôlée dans le temps par la présence d'un transgène *Alb-CreER^{T2}* codant pour une protéine de fusion activable par traitement au tamoxifène. Ces modèles nous ont permis d'étudier les effets cellulaire-autonomes de TIF1 α aussi bien dans la période post-natale que dans les hépatocytes matures.

Des expériences de purification des complexes liés à TIF1 α dans les cellules HeLa ont mis en évidence les interactions physiques des trois TIF1 (α , β et γ). Nous avons pu étudier la validité fonctionnelle de ces complexes dans le cadre de l'hépatocarcinogenèse grâce à des lignées de souris comportant un transgène *Alb-Cre* et des allèles « floxées » pour les différents TIF1.

L'identification des gènes cibles de TIF1 α dans les hépatocytes nous a permis d'étudier par quels mécanismes TIF1 α module leur transcription. Nous avons ainsi identifié le rôle de TIF1 α dans le contrôle de l'expression des rétrotransposons VL30, et avons mis en évidence l'effet indirect que cette répression engendre sur les gènes placés à proximité de ces éléments transposables.

Résultats

Publication

Partie I : La perte du gène Trim24 (Tif1alpha) confère une activité oncogénique au récepteur de l'acide rétinoïque alpha

Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R.

Nature Genetics (2007)

Volume 39 : pages 1500-1506

Loss of *Trim24* (*Tif1 α*) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha

Konstantin Khetchoumian^{1,3}, Marius Teletin¹, Johan Tisserand¹, Manuel Mark¹, Benjamin Herquel¹, Mihaela Ignat^{1,3}, Jessica Zucman-Rossi², Florence Cammas¹, Thierry Lerouge¹, Christelle Thibault¹, Daniel Metzger¹, Pierre Chambon¹ & Régine Losson¹

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major cause of death worldwide. Here, we provide evidence that the ligand-dependent nuclear receptor co-regulator Trim24 (also known as Tif1 α) functions in mice as a liver-specific tumor suppressor. In *Trim24*-null mice, hepatocytes fail to execute proper cell cycle withdrawal during the neonatal-to-adult transition and continue to cycle in adult livers, becoming prone to a continuum of cellular alterations that progress toward metastatic HCC. Using pharmacological approaches, we show that inhibition of retinoic acid signaling markedly reduces hepatocyte proliferation in *Trim24*^{-/-} mice. We further show that deletion of a single retinoic acid receptor alpha (*Rara*) allele in a *Trim24*-null background suppresses HCC development and restores wild-type expression of retinoic acid-responsive genes in the liver, thus demonstrating that in this genetic background *Rara* expresses an oncogenic activity correlating with a dysregulation of the retinoic acid signaling pathway. Our results not only provide genetic evidence that *Trim24* and *Rara* co-regulate hepatocarcinogenesis in an antagonistic manner but also suggest that aberrant activation of *Rara* is deleterious to liver homeostasis.

Alterations in the expression or activity of specific retinoic acid receptors (RARA, RARB and RARG) have been linked to diverse types of cancer¹. RARs are retinoic acid-dependent transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily². Like other nuclear receptors, they control transcription by recruiting different co-regulator complexes³. The tripartite-motif protein TRIM24 (formerly known as TIF1 α)⁴ was among the first co-regulators identified as interacting with nuclear receptors⁴, and it has been shown to modulate their transcriptional activity either positively or negatively in a ligand-dependent fashion^{5–8}. To ascertain the role of TRIM24 *in vivo*, we generated *Trim24*-deficient mice by targeted gene deletion (Supplementary Fig. 1 online). Intercrosses of *Trim24*^{+/-} heterozygous

mice resulted in viable offspring at mendelian ratios (Supplementary Table 1 and Supplementary Table 3 online). Up to 2 months postpartum (month 2), homozygous mutants showed no obvious abnormalities in major organs and were fertile. Protein blot analysis confirmed the absence of Trim24 protein in these mutants (Supplementary Fig. 1f). Therefore, *Trim24* is not essential for development, growth or reproduction in mice.

To determine whether ablation of *Trim24* affects the adult life of mice, we monitored a large cohort of *Trim24*-deficient mice ($n > 100$) for a long-term time period. No macroscopic change in lung, pancreas, spleen, intestine, kidney, heart, testis and uterus was seen in *Trim24*^{-/-} mutants. In contrast, hepatic tumors (>2 mm in diameter; Fig. 1a) were detected at necropsy in 80% (33 of 41) of male and 69% (33 of 48) of female *Trim24*^{-/-} mice between months 9 and 29, as compared to only 4% (2 of 54) of age-matched control *Trim24*^{+/+} mice (Supplementary Fig. 2a online), indicating that the *Trim24* homozygous mutation predisposes to spontaneous liver tumor formation. Tumor predisposition was observed in both isogenic 129/Sv and hybrid (C57BL/6 \times 129/Sv) genetic backgrounds (Supplementary Fig. 2b).

We examined the effect of *Trim24* deficiency on liver histology. As early as month 3, *Trim24*^{-/-} livers contained abnormal hypertrophic hepatocytes with enlarged nuclei (Fig. 2a). DNA content quantification by flow cytometry revealed a ploidy higher than 4N in less than 5% of wild-type (WT) littermate liver cells, whereas ~15% and 4% of *Trim24*^{-/-} mutant hepatocytes were 8N and 16N, respectively (Fig. 2b,c). At month 7 and month 8, we detected clear-cell foci of altered hepatocytes (FCA) in 13% (2 of 15) of *Trim24*^{-/-} mutants (Fig. 1b). Thereafter, hepatocellular adenomas (HCA) compressing the nontumoral parenchyma (Fig. 1c) were seen in 53% (8 of 15) of month 9 *Trim24*^{-/-} mice. Around month 12, 20% (2 of 10) *Trim24*^{-/-} mutants showed locally invasive hepatocellular carcinoma (Fig. 1d). HCC were observed in 41% (16 of 39) of the month 13–19 *Trim24*^{-/-} mice and in 80% (20 of 25) of the month 19–29 group.

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Department of Functional Genomics, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U596, Université Louis Pasteur (ULP), Collège de France, BP 10142, F-67404 Illkirch-Cedex, France. ²INSERM U674 Institut Universitaire d'Hématologie, Centre d'étude du polymorphisme humain (CEPH), F-75010 Paris, France. ³Present addresses: Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut de recherches cliniques, Montréal Québec, Canada H2W 1R7 (K.K.) and INSERM U701 Institut de Recherches contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD), F-67000 Strasbourg, France (M.I.). Correspondence should be addressed to R.L. (losson@igbmc.u-strasbg.fr).

Received 19 June; accepted 12 September; published online 18 November 2007; doi:10.1038/ng.2007.15

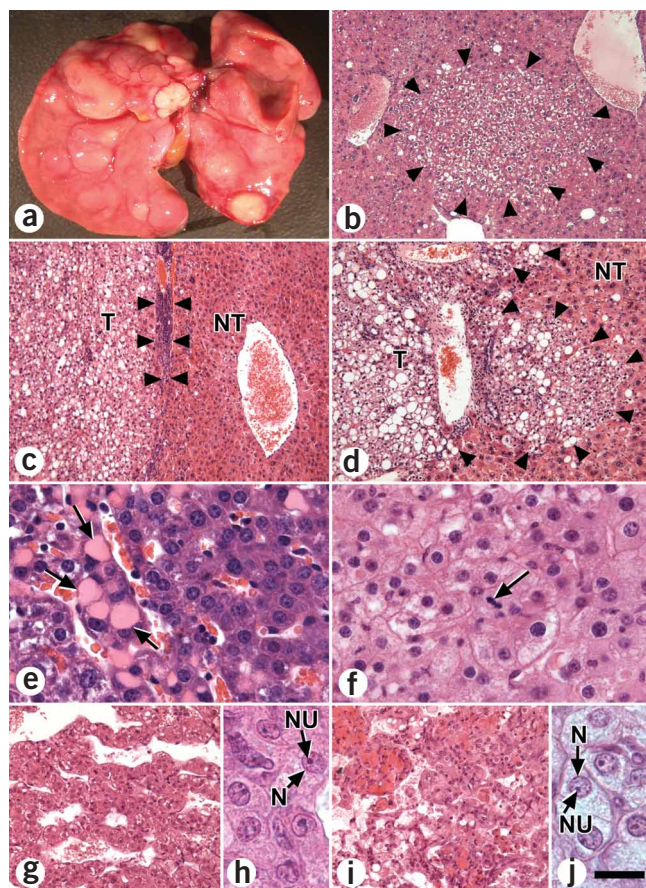


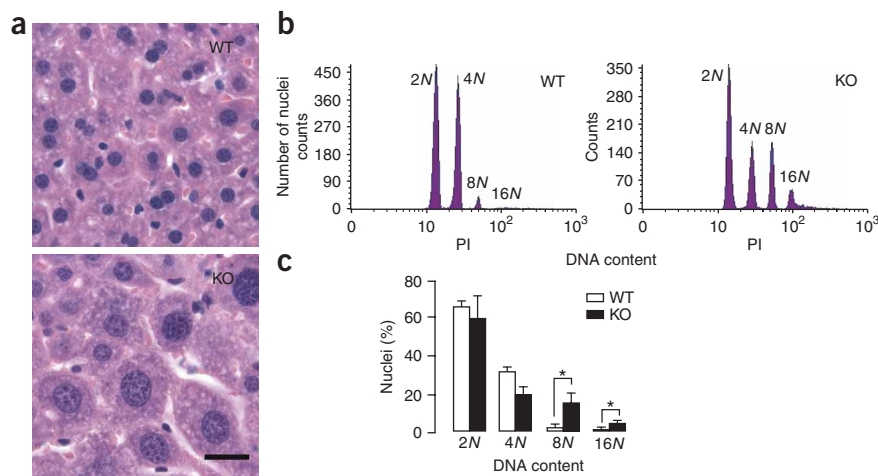
Figure 1 Spontaneous liver tumor formation and lung metastasis in *Trim24*^{-/-} mice. (a) Representative macroscopic view of a 19-month-old *Trim24*^{-/-} liver showing multiple tumor nodules, which were histologically classified as HCA and/or HCC. (b–j) Hematoxylin and eosin stain. Representative microscopic view of preneoplastic (b) and neoplastic (c–j) lesions observed in *Trim24*^{-/-} mice at 7 months (b) and 15 months (c–j) of age. (b) Clear-cell focus of cellular alteration (FCA). The boundary of the focus is marked by arrowheads. Note that there is no compression of the surrounding hepatic parenchyma. (c) HCA consisting of vacuolated cells. The tumor (T) is well circumscribed and causes distinct compression of the surrounding nontumoral (NT) parenchyma (arrowheads). (d) HCC with vacuolated cells. Note extensive invasion of the adjacent parenchyma (arrowheads). (e) Trabecular HCC composed of basophilic cells with occasional eosinophilic cytoplasmic inclusions (arrows). Note that in contrast to normal trabecula, which consist of only one row of hepatocytes, tumoral trabecula have an uneven thickness varying between one and four cell rows. (f) Solid HCC consisting of large eosinophilic cells with occasional mitotic figures (arrow) developed in the same liver as in e. (g–j) Trabecular HCC (g,h) and its lung metastasis (i,j) showing similar histological patterns (g,i) and cytological features (eosinophilic cytoplasm, round nuclei (N) and prominent nucleoli (NU); h and j). Scale bar: 160 μ m (b–d,g,i), 30 μ m (e,f), 12 μ m (h,j).

Two patterns of HCC were observed: trabecular, with well-differentiated cells (Fig. 1e), and solid, with poorly differentiated cells (Fig. 1f). Notably, HCC lung metastases were found in two *TIF1 α* ^{-/-} mice (Fig. 1g–j), thus proving the malignancy of these tumors.

Uncontrolled hepatocellular proliferation is considered a prerequisite for neoplastic transformation⁹. We therefore examined livers of *Trim24*-deficient mice for proliferation before tumor onset (<30 weeks postpartum). We first established by protein blot assay the presence of Trim24 in wild-type livers from embryonic day 17.5 (E17.5) to adulthood (week 14) (Supplementary Fig. 3a online), and demonstrated by immunohistochemistry that Trim24 was expressed

in virtually all hepatocytes and nonparenchymal cells at weeks 1 and 14 (Supplementary Fig. 3b,c). To assess the effect of *Trim24* deficiency on hepatocellular proliferation, we measured the percentage of hepatocytes in S phase using 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. Significantly more BrdU-positive cells were observed throughout the liver in *Trim24*^{-/-} mutant than in control mice at week 14 (Fig. 3a,b), indicating that hepatocellular proliferation precedes tumor development. These results prompted us to examine the effect of *Trim24* inactivation during the transition from proliferating neonatal to quiescent adult hepatocytes, which normally takes place by the end of week 1 (ref. 10). Therefore, livers from week 1 mice were analyzed for expression of Ki67, a protein that is present in cycling but not G0 cells¹¹. No significant difference ($P > 0.05$) was observed in the percentages of Ki67-positive cells between livers from week 1 *Trim24*^{-/-} and *Trim24*^{+/+} mice (Fig. 3d). We also determined the number of mitotic cells using an antibody against phosphorylated histone H3 and found no difference between WT and mutant livers at week 1 (data not shown), indicating that neonatal liver proliferation is unaltered in *Trim24*^{-/-} mutants. From week 3 to week 5, a progressive decrease in hepatocyte proliferation characterizing the entry into quiescence was observed in both WT and mutant livers (Fig. 3d). However, relative to the controls, *Trim24*^{-/-} mutants showed a two- to threefold increase in the number

Figure 2 *Trim24* deficiency results in increased hepatocyte ploidy. (a) Histological analysis of liver sections from 14-week-old wild-type (WT) and *Trim24*^{-/-} (KO) mice. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Scale bar, 20 μ m. (b) Representative histograms of the DNA content distribution of liver cell nuclei from 14-week-old WT and *Trim24*^{-/-} (KO) mice. Isolated nuclei were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. The numbers of stained nuclei are plotted against the DNA ploidy. (c) Quantitative analysis of the DNA content of isolated liver nuclei. The percentage of nuclei with the indicated DNA content (2–16N) was calculated by scoring the number of events at each ploidy level from the nuclei number versus DNA content histogram of each animal. Shown are means ($n = 3$) \pm s.d. * $P < 0.05$.



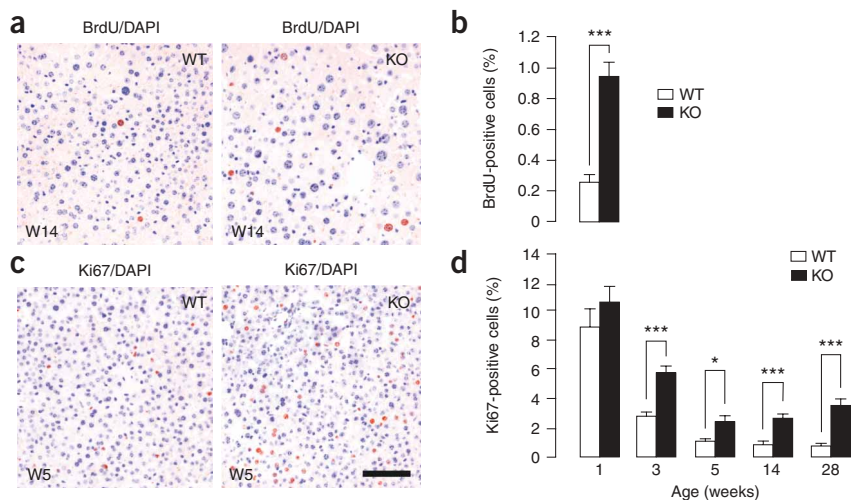


Figure 3 *Trim24* deficiency leads to increased proliferation in postnatal hepatocytes. **(a)** Immunohistochemistry of BrdU-positive hepatocytes from week 14 (W14) wild-type (WT) and *Trim24*^{-/-} (KO) mice. BrdU (50 mg/kg body weight) was administered through two intraperitoneal injections 4 h and 2 h before being killed. The pictures correspond to computer-generated bright-field superimpositions of the immunohistochemical signals (red false color) and of the DAPI nuclear counterstain (blue false color). **(b)** Quantification of BrdU incorporation. The percentage of BrdU-positive cells in each section was calculated from the number of BrdU-positive cells compared with the total number of liver cells in five random fields. **(c)** Ki67 immunohistochemistry staining of liver sections prepared from week 5 (W5) WT and *Trim24*^{-/-} (KO) mice. **(d)** Quantification of Ki67-positive cells in postnatal developing (week 1–5) and adult livers (week 14 and week 28). Means ($n = 3$) \pm s.d. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0005$. Scale bar, 80 μ m (**a,c**).

of Ki67-positive hepatocytes at each time point (Fig. 3c,d). This increase was statistically highly significant ($P < 0.005$) and persisted throughout adulthood (Fig. 3d). Thus, in the absence of *Trim24*, hepatocytes fail to execute proper cell cycle exit during neonatal-to-adult transition, thereby leading to a continuous proliferative process.

compared to WT mouse embryonic fibroblast (MEF) cell lines (Supplementary Fig. 5a online). Moreover, as determined by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, we found that, upon retinoic acid induction, *Trim24* was recruited to the RAREs of *Cyp26a1* in FLAG-tagged *Trim24* (F-*Trim24*)-expressing HepG2 cells

We next investigated whether increasing *Trim24* expression would influence proliferation in HCC cells. To this purpose, we designed a dual expression vector, pEGFP/*Trim24*, that allows simultaneous expression of *Trim24* and enhanced green fluorescent protein (EGFP) from a bicistronic mRNA (Supplementary Methods online). Mouse and human HCC cells were transfected with this vector and sorted by flow cytometry to isolate EGFP-expressing cells. Forced expression of *Trim24* in these cells resulted in marked inhibition of cell growth (Fig. 4a,b and Supplementary Fig. 4 online) and significantly reduced the number of BrdU-positive cells by blocking cell cycle progression from G0/G1 to S (Fig. 4c,d), thus indicating that *Trim24* has an antiproliferative activity against HCC cells *in vitro*. Notably, this property of *Trim24* was preserved in anchorage-independent growth, a hallmark of cell transformation (Fig. 4e,f).

Trim24 has previously been shown to inhibit retinoic acid-dependent transcription from a retinoic acid-responsive element (RARE) in transient reporter assays^{4,7}. In support of this finding, we observed a considerably enhanced retinoic acid induction of well-established target genes such as *Cyp26a1*, *Tgm2*, *Rbp1* and *Stra6* in *Trim24*-null com-

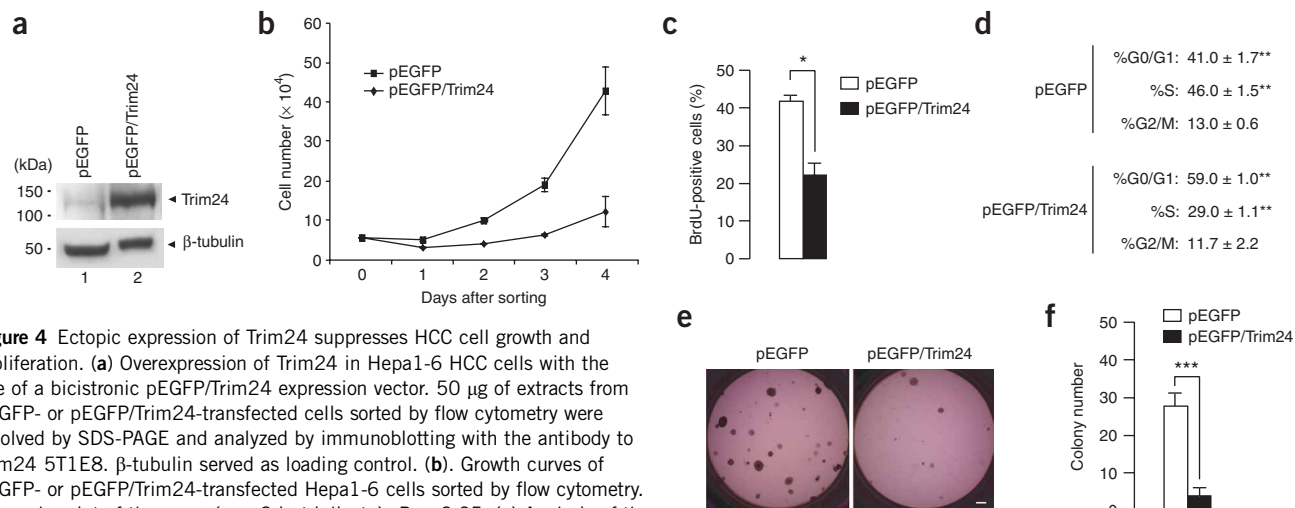


Figure 4 Ectopic expression of *Trim24* suppresses HCC cell growth and proliferation. **(a)** Overexpression of *Trim24* in Hepa1-6 HCC cells with the use of a bicistronic pEGFP/*Trim24* expression vector. 50 μ g of extracts from pEGFP- or pEGFP/*Trim24*-transfected cells sorted by flow cytometry were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the antibody to *Trim24* 5T1E8. β -tubulin served as loading control. **(b)** Growth curves of pEGFP- or pEGFP/*Trim24*-transfected Hepa1-6 cells sorted by flow cytometry. For each point of the curve ($n = 3$ in triplicate), $P < 0.05$. **(c)** Analysis of the effects of *Trim24* overexpression on cell proliferation. pEGFP- and pEGFP/*Trim24*-transfected cells sorted by flow cytometry were analyzed by BrdU incorporation 48 h later. The percentages of BrdU-positive cells were counted. Each bar represents the mean \pm s.d. of four points. $P < 0.05$. **(d)** Flow cytometry analysis of the cell cycle stage at which *Trim24*-expressing cells are arrested. The DNA content of 30,000 EGFP-positive cells transfected with pEGFP or pEGFP/*Trim24* was measured after propidium iodide staining. Values represent the mean (\pm s.d.) of five independent experiments. $P < 0.005$. **(e,f)** *Trim24* inhibits soft agar colony formation. An equal number of pEGFP- or pEGFP/*Trim24*-transfected Hepa1-6 cells sorted by flow cytometry were plated onto soft agar for determination of anchorage-independent growth. **(e)** Representative areas from triplicate experiments are presented. Visible colonies (>0.1 mm in diameter) were counted after crystal violet staining. **(f)** The mean value \pm s.d. of three independent experiments is shown. $P < 0.0005$ (*t*-test for **b–d** and **f**).

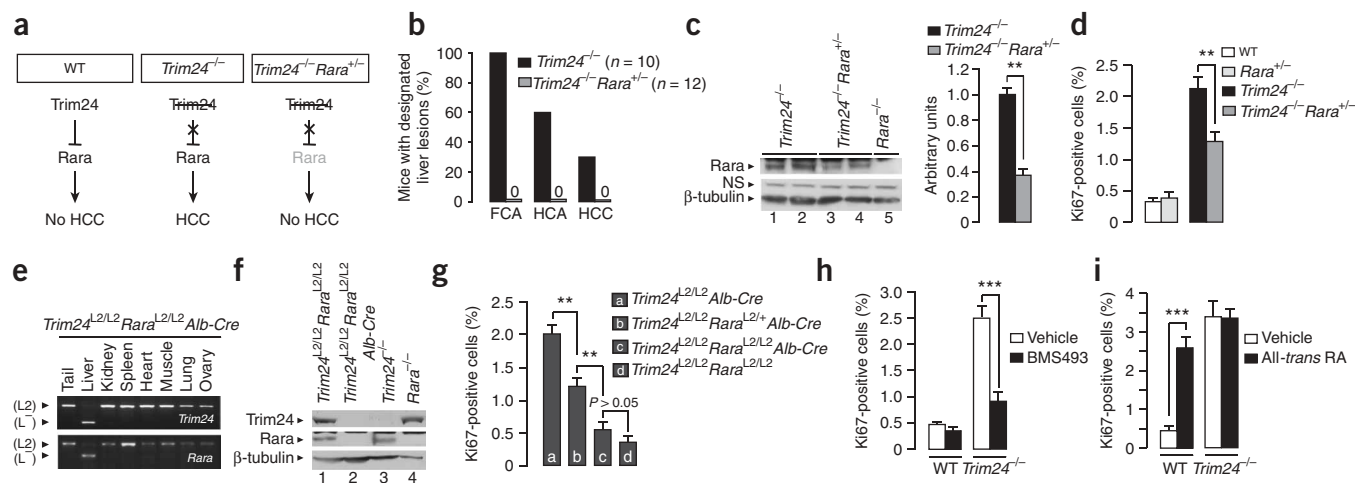


Figure 5 *Rara* shows oncogenic activity in *Trim24*-deficient livers. **(a)** Hypothetical scheme of the opposing effects of *Trim24* and *Rara* on liver cancer. **(b)** Rescue of hepatocellular dysplasia and neoplasia by *Rara* haploinsufficiency in *Trim24*^{-/-} mice. Graph shows percentages of mice developing dysplastic (FCA) or neoplastic (HCA and HCC) lesions between months 12 and 15. **(c)** *Rara* expression levels in *Trim24*^{-/-} versus *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} livers. Left, anti-*Rara* immunoblotting. Nonspecific band (NS) and β -tubulin immunoblotting used as loading controls. Right, relative densitometric values from three protein blots. **(d)** *Rara* haploinsufficiency reduces hepatocyte proliferation increase resulting from *Trim24* deficiency. Graph shows Ki67-positive cells relative to total liver cell numbers in five random fields from week 14 mice of the indicated genotypes ($n = 4$). **(e-f)** Hepatocyte-selective ablation of *Trim24* and *Rara*. **(e)** Efficiency and selectivity of *Trim24* and *Rara* liver gene disruptions as indicated by PCR genomic DNA **(e)** and protein blot **(f)** analysis of week 14 mice. **(g)** Hepatocyte-specific loss of *Trim24* causes increased cell proliferation, which is suppressed upon simultaneous loss of *Rara*. Graph shows quantification of Ki67-positive cells in week 14 mice, as in **(d)**. **(h, i)** The pan-RAR antagonist BMS493 **(h)** reduces the proliferation index in *Trim24*-deficient livers, whereas all-*trans* retinoic acid **(i)** increases this index in WT livers. WT and *Trim24*^{-/-} littermates at week 14 were given single intragastric doses of BMS493, retinoic acid or vehicles. Graph shows percentages of Ki67-positive hepatocytes after 48 h treatment ($n = 3$). ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.

(Supplementary Fig. 5b). In this liver-derived cell line, *Trim24* was also found to exert a repressing activity on its own, when tethered to a heterologous DNA binding domain (Supplementary Fig. 5c), and to function as a direct repressor of *Rara*-mediated transactivation on a RARE-responsive reporter (Supplementary Fig. 5d).

Taking the above results together with recent evidence linking RAR signaling upregulation to liver cancer¹²⁻¹⁴, we investigated whether decreasing *Rara* gene dosage in *Trim24*-deficient mice could decrease hepatocarcinogenesis (Fig. 5a). To this purpose, we analyzed *Trim24*^{-/-} and *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} littermates (at least ten mice per genotype) derived from *Trim24*^{+/-}*Rara*^{+/-} intercrosses between months 12 and 15. Liver tumors were grossly evident in 70% (7 of 10) of *Trim24*^{-/-} mutants. In contrast, none of the *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} (0 of 12) mutants showed liver dysplasia or tumor by gross or histological examination (Fig. 5b). As expected, *Rara* protein concentrations showed a twofold decrease in *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} as compared to *Trim24*^{-/-} livers (Fig. 5c). These results show that *Rara* haploinsufficiency suppresses tumor development in *Trim24*^{-/-} mutants.

As hepatocellular proliferation precedes tumor development in *Trim24*^{-/-} mutants, we next determined whether reduction in *Rara* dosage would affect proliferation in livers from week 14 *Trim24*^{-/-} mutants. Upon Ki67 staining, we consistently observed a reduction (~40%) in the number of proliferating cells in *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} mutants as compared to *Trim24*^{-/-} littermates (Fig. 5d), whereas there was no difference in the proliferative indexes of WT versus *Rara*^{+/-} livers. This indicates that *Rara* contributes to the inappropriate proliferation resulting from *Trim24* deficiency. To extend these findings, we investigated the effect of deleting *Trim24* alone or in combination with *Rara* solely in hepatocytes. To this end, we generated mice harboring alleles of *Trim24* (*Trim24*^{L2/L2}) and *Rara* (*Rara*^{L2/L2}) flanked by *loxP* sites (floxed) and crossed them with *Alb-Cre* transgenic mice expressing Cre exclusively in postpartum

liver hepatocytes¹⁵. Using tissue samples from week 14 *Trim24*^{L2/L2}*Rara*^{L2/L2}*Alb-Cre* mice, we confirmed at the DNA and protein levels that mice carried hepatocyte-specific knockouts of *Trim24* and *Rara* (Fig. 5e,f). Knockout (single and double) and WT livers were subsequently analyzed by Ki67 staining. Similarly to what was observed in livers from mice carrying the germline deletion of *Trim24*, *Trim24*-knockout hepatocytes showed a marked increase in proliferation (Fig. 5g). This elevated proliferation was significantly reduced in *Trim24*^{L2/L2}*Rara*^{L2/L2}*Alb-Cre* livers and was further diminished in *Trim24* *Rara* double-knockout livers (Fig. 5g). Collectively, these data provide compelling evidence for cell-autonomous roles of *Trim24* and *Rara* in hepatocyte proliferation and demonstrate that the gene dosage of *Rara* in *Trim24*-deficient hepatocytes is instrumental to the ability of these cells to proliferate.

Given these findings, we examined the proliferative phenotype of *Trim24*-deficient livers under conditions in which retinoic acid signaling was severely impaired. We conducted pharmacological studies on week 14 WT and *Trim24*^{-/-} mice treated with a single dose of the pan-RAR antagonist BMS493¹⁶ (10 mg/kg) for 48 h. A marked reduction in the number of proliferating cells was observed in livers of BMS-treated mutants as compared to vehicle-treated controls, whereas there was no notable difference in the proliferative index between untreated and treated WT livers (Fig. 5h). Conversely, treatment with a single dose of all-*trans* retinoic acid (200 mg/kg) induced strong proliferation in livers of WT but not knockout mice (Fig. 5i). These results confirm that retinoic acid has mitogenic activity on WT liver cells¹² and indicate that the proliferative phenotype of *Trim24*-deficient mice is dependent on RAR activation, and therefore could be due to a specific deregulation of the retinoic acid signaling pathway.

We next carried out a microarray experiment comparing the expression profiles of HCCs from *Trim24* mutants ($n = 5$) to those

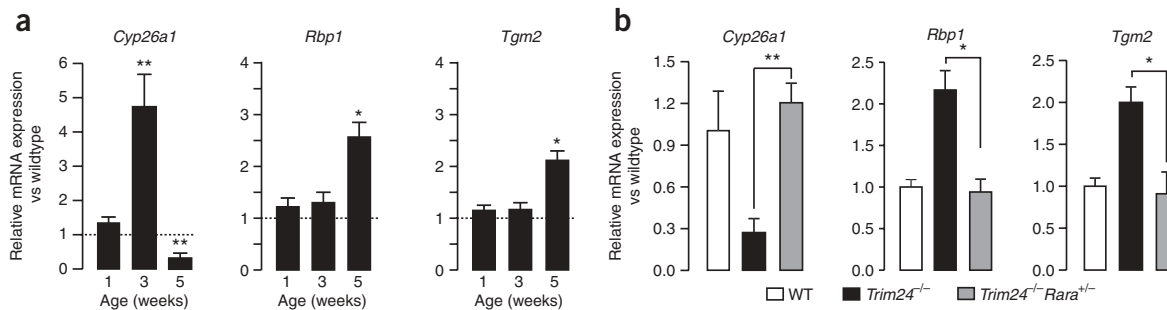


Figure 6 *Trim24* acting through *Rara* is required for the proper expression of specific retinoic acid-responsive genes in the liver during postnatal development. (a) *Cyp26a1*, *Rbp1* and *Tgm2* are deregulated in postnatal livers of *Trim24*-deficient mice. Total RNA was extracted from livers of wild-type (WT) and *Trim24*^{-/-} littermates ($n = 4$) at various postnatal ages (weeks 1–5) and subjected to real-time RT-PCR. Expression of the indicated genes was analyzed in triplicate together with that of *Hprt*, and results are presented as expression relative to *Hprt* for the wild-type and mutant, with expression of each gene for the wild-type samples arbitrarily set equal to 1 (indicated by the horizontal dot line). (b) *Rara* haplodeficiency rescues the inappropriate expression of *Cyp26a1*, *Rbp1* and *Tgm2* resulting from *Trim24* deficiency in week 5 livers. Real-time RT-PCR assays were carried out as in a with RNA from livers of W5 WT, *Trim24*^{-/-} and *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} mice ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

from normal livers of WT littermates (Supplementary Methods). Among genes deregulated more than twofold in the HCC samples ($P \leq 0.05$), we identified aberrant expression of a considerable number of retinoic acid signaling pathway components and downstream responders (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 6 online), the majority of which were upregulated. We next focused on those previously identified as direct retinoic acid target genes ('category 3' in Supplementary Table 2)¹⁷ and examined their expression before tumor onset. Notably, *Cyp26a1*, *Rbp1* and *Tgm2* were significantly deregulated in postnatal developing livers of *Trim24*^{-/-} mutants (Fig. 6a), thereby suggesting that deregulation of these genes is among the early events resulting from *Trim24* deficiency. *Cyp26a1* (encoding a retinoic acid-metabolizing enzyme) was upregulated more than fourfold in *Trim24*-deficient livers at week 3, before subsequently being downregulated, as compared to age-matched WT littermates (Fig. 6a). This relative downregulation reflects a true decrease in *Cyp26a1* mRNA levels in mutant livers but also an increased expression of *Cyp26a1* in WT livers from week 3 to week 5 (Supplementary Fig. 7 online), indicating that (i) *Cyp26a1* may be part of a feedback mechanism that normally limits retinoic acid signaling in WT liver during neonatal-to-adult transition and (ii) this mechanism would be altered in *Trim24*-deficient livers. In agreement with the idea that enhanced retinoic acid signaling occurs, livers lacking *Trim24* also showed a smaller, but significant (about twofold), increase in cellular retinol binding protein 1 (*Rbp1*) and tissue transglutaminase 2 (*Tgm2*) mRNA levels at week 5 (Fig. 6a). Notably, no significant change in *Cyp26a1*, *Rbp1* and *Tgm2* mRNA levels was observed in livers of week 5 *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-} mutants as compared to age-matched WT controls (Fig. 6b), indicating that their deregulation in the absence of *Trim24* is correlated with *Rara* activity. Together, these data demonstrate that *Trim24* acting through *Rara* controls the expression of specific retinoic acid-responsive genes in the postnatal developing liver. In accordance with our genetic and pharmacological studies, they also point to a retinoic acid signaling pathway dysregulation as a mechanism that may contribute to the cancer-prone phenotype of *Trim24*-deficient hepatocytes.

In the present report, we identify *Trim24* as a potent liver-specific tumor suppressor in mice and provide direct genetic proof that *Trim24* and *Rara* act in opposition to each other in liver cancer. The discovery that, in *Trim24*^{-/-} mice, *Rara* expression is

instrumental to the development of HCC represents the first evidence that *Rara* can function as an oncogene *in vivo*. This result provides a possible explanation for the selective pressure to overexpress *RARA* in human HCC¹⁴ and emphasizes the need to carefully evaluate the use of *RARA* agonists in cancer therapy¹⁸.

METHODS

Animals and gene targeting. The mouse *Trim24* gene was targeted by homologous recombination in embryonic stem cells using the targeting vector p*Trim24*^{L2/NL}, in which a *loxP* site was introduced into intron 3 and a floxed PGK/TK-Neo selection cassette inserted into intron 4 (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Methods). This targeting vector was designed with the expectation that upon homologous recombination and subsequent Cre recombinase-mediated excision, exon 4 of *Trim24* along with the selection cassette would be deleted, thereby causing a frameshift mutation with a premature termination codon (Supplementary Fig. 1b). Correctly targeted embryonic stem cell clones (Supplementary Fig. 1c,d) were used to generate chimeric mice, which were crossed with CMV-cre deleter mice to produce heterozygous *Trim24*^{+/-} mice. Matings between these heterozygous mice yielded homozygous *Trim24*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 1e). To generate compound mutant mice with a single allele of *Rara* deleted in the *Trim24*^{-/-} mutant background, we crossed *Trim24*^{-/-} mice with *Rara*^{+/-} mice (see Acknowledgments). The resulting *Trim24*^{+/-}*Rara*^{+/-} mice were generated in the hybrid (C57BL/6 (60%) × 129/Sv (40%)) genetic background. These double heterozygous *Trim24*^{+/-}*Rara*^{+/-} mice were intercrossed to generate *Trim24*^{-/-}, *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-}, *Rara*^{+/-} and wild-type mice. *Rara* genotyping was conducted as previously described¹⁹. To generate hepatocyte-specific mutant mice, we first intercrossed mice harboring floxed alleles of *Trim24* (*Trim24*^{L2/NL}) and *Rara* (*Rara*^{L2/NL}; ref. 20) to generate double-heterozygous *Trim24*^{L2/+}*Rara*^{L2/+} mice. These mice were then crossed with *Alb-Cre* transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of a rat albumin (*Alb*) promoter-enhancer¹⁵. *Trim24*^{L2/+}*Rara*^{L2/+} and *Trim24*^{L2/+}*Rara*^{L2/+}*Alb-Cre* litters were selected and intercrossed to generate *Trim24*^{L2/L2}*Rara*^{L2/L2}, *Trim24*^{L2/L2}*Rara*^{L2/+}*Alb-Cre* and *Trim24*^{L2/L2}*Rara*^{L2/L2}*Alb-Cre* animals. All animal procedures were approved by the French Ministry of Agriculture (agreement B67-218-5) according to guidelines in compliance with the European legislation on care and use of laboratory animals.

Macroscopic and histopathological analysis. At least ten mice from each group were killed at the indicated times, and autopsies were carried out according to Eumorphia European comprehensive first-line phenotyping protocols. We recorded body and liver weights and scored visible tumor nodules (those larger than 2 mm in diameter). After being fixed in buffered formaldehyde, liver samples (including visible tumors and apparently nontumoral parenchyma) were paraffin embedded, serially sectioned at 5 μ m and stained

with hematoxylin and eosin (H&E). Lesions were classified into foci of cellular alterations (FCA), hepatocellular adenomas (HCA) and carcinomas (HCC), according to established criteria²¹.

Ligand treatment. At 14 weeks of age, WT and *Trim24*^{-/-} offspring were treated by oral gavage with a single dose of all-*trans* retinoic acid (Sigma) dissolved in ethanol and diluted in sunflower oil (200 mg/kg body weight), with BMS493 (Bristol-Myers Squibb) dissolved in dimethylsulfoxide and diluted in sunflower oil (1:4 v/v) (10 mg/kg body weight), or with vehicles. Three animals per experimental and control group were killed 48 h after the gavage and analyzed for hepatocyte proliferation by Ki67 labeling.

Liver BrdU and Ki67 labeling. Cell proliferation assays using BrdU incorporation and detection of the Ki67 antigen were carried out according to standard operating procedures (see URLs section below). We determined the mean proportion (\pm s.d.) of BrdU- and Ki67-positive cells from five randomly chosen fields per section and three sections per liver from 3–4 distinct animals of each genotype, and we analyzed statistical significance using Student's *t*-tests.

Measurement of DNA ploidy by flow cytometry. We homogenized livers in a solution containing 0.25 M sucrose, 3 mM CaCl₂ and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) using a Kontes pestle, and then centrifuged the homogenate at 100g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in a solution containing 2.2 M sucrose and 3 mM CaCl₂. We loaded the suspension onto a 6-ml sucrose gradient and centrifuged at 20,000 rpm for 1 h at 4 °C using a VTi65.2 rotor (Beckman). The nuclei in the resulting pellet were resuspended in PBS, washed with PBS twice, and finally resuspended in PI staining buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X100, 50 µg/ml propidium iodide) and kept at 4 °C in the dark for 12 h. Nuclei were examined on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson). We evaluated DNA content with CellQuest software (Becton Dickinson). Results are expressed as mean ($n = 3$) \pm s.d. Statistical analysis was carried out using the Wilcoxon test.

Liver protein extraction and immunoblotting. Whole cell extracts were prepared as described²². Protein concentration was determined with protein Assay Reagent (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were loaded and separated by SDS-PAGE, using 8% or 12% reducing gels. Protein blotting was carried out as previously described²². Monoclonal antibody to Trim24/Tif1 α 5T1E8 (ref. 4; 1:1,000), polyclonal antibody to Rara RP115 (ref. 19; 1:500), monoclonal antibody to β -tubulin ITUB1A2 (1:1,000; see Acknowledgments) or monoclonal antibody to β -actin AC-15 (1:5,000; Sigma) were used as primary antibodies, and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG (1:5,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used as secondary antibodies. Detection was carried out using the ECL chemiluminescence technique (Amersham), and protein bands were revealed by autoradiography. The bands were imaged by the Chemi-Genius² Bio Imaging System (Syngene) using GeneSnap and were subjected to densitometric analysis via GeneTools software (Syngene).

Cell culture, transfection and analysis. All cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine at 37 °C in 5% CO₂. Mouse (Hepa1-6) and human (HepG2) hepatocarcinoma cells (European Collection of Cell Cultures) were transfected using Effectene (Qiagen) according to manufacturer's recommendations. EGFP-expressing cells were sorted 24 h after transfection with a FACS DiVa cytometer (FACS Vantage s.e.m. DiVa, Becton Dickinson) using excitation at 488 nm and detection at 525 nm. Growth curves, colony formation in soft agar, BrdU incorporation and cell profiles were monitored with cells originating from the most fluorescent third of the EGFP-positive populations.

To establish growth curves, 5×10^4 sorted cells were seeded per well in six-well plates. Cells were counted daily in a Mallassez cell counter. Data were determined by mean of triplicate experiments. For detection of Trim24, cells were washed twice with PBS, collected and suspended in ice-cold lysis buffer (EBC: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 170 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50 mM NaF, 10% glycerol containing 1 mM PMSF and a protease inhibitor mixture of aprotinin, leupeptin, chymostatin and pepstatin at 2.5 µg/ml each) for 20 min at 4 °C. Intact cells and debris were removed by centrifugation at 10,000g for

15 min at 4 °C, and supernatants were collected. 50 µg of whole-cell lysates were subjected to 8% SDS-PAGE and analyzed by protein blotting as described²². For BrdU incorporation, cells grown on coverslips were incubated with 40 µM BrdU (Sigma) for 1 h at 37 °C, washed once with PBS, and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS (pH 7.5) for 10 min at room temperature. Cells were then permeabilized twice with 0.1% Triton X-100 (PBS-Tx) for 10 min, washed in PBS, and incubated with monoclonal antibody to BrdU (1:500; Roche) for 1 h at 37 °C in PBS containing 5 mg/ml BSA, 0.5% NP-40, 20 mM MgCl₂, and 0.02 U/µl DNase (Roche). After two PBS-Tx washes for 5 min each, cells were incubated with Cy3-coupled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:500 in PBS at 37 °C for 1 h, and finally washed twice for 5 min each time with PBS. Cells were counter-stained with Hoechst 33258 (5 µg/ml) for 20 s, and coverslips were mounted in PBS 5% propyl gallate 80% glycerol. The percentages of BrdU-positive cells were determined by counting 100–200 nuclei. The data represent the means (\pm s.d.) of four separate experiments. For FACS analysis, cells were recovered with 0.375% trypsin and fixed for 24 h in ice-cold 70% ethanol. After a PBS wash, cells were incubated at room temperature for 30 min in PBS containing 50 µg/ml RNase A (Sigma) and 50 µg/ml propidium iodide and were analyzed on the FACSCalibur flow cytometer using the ModFit software (Becton Dickinson). The data represent the means (\pm s.d.) of five independent experiments. For soft agar assays, cells (1×10^3) were resuspended in 75 µl of complete medium containing 0.35% low-melt agar. The cell mixture was then seeded on a solidified (0.7% low-melt agar) basal layer (50 µl) in 96-well plates. Three weeks after seeding, colonies were stained with 0.005% crystal violet, representative views from triplicate experiments were photographed, and the average number of colonies per well (> 100 µm in diameter) was determined.

URLs. Cell proliferation assay protocols, <http://empress.har.mrc.ac.uk/browser/>.

Accession codes. National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus: Expression data from this study have been deposited with accession number GSE9012.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

This letter is dedicated to the memory of Bertrand Le Douarin on the ninth anniversary of his premature death. He discovered and carried out the first molecular characterization of TIF1 α . We thank M. Cervino, X. Belin, J.-V. Fougerolle, L. Walsh and E. Alexandre for technical help. We also thank all the common facilities of the IGBMC and, in particular, C. Ebel and J. Barths for assistance in FACS analysis, D. Dembélé for help with statistical analyses, N. Ghyselinck for providing Rara mutant mice, C. Suzi and P. Reczek (Bristol-Myers Squibb) for the gift of BMS493, M. Oulad-Abdelghani for the gift of antibody to β -tubulin ITUB1A2 and P. Kastner and P. Germain for helpful discussions. This work was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Agence Nationale de la Recherche, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Collège de France. Special thanks to R.P. Vashakidze from Volzhsky Orgsynthese for the financial support of K.K. K.K. was also supported by the French Ministère de la Recherche et des Technologies, the Ligue Nationale contre le Cancer and the Armenian Foundation Boghos Noubar Pacha (Belgium). M.I. was supported by a Charcot fellowship from the French Ministère des Affaires étrangères.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.K. created and analyzed all knock-out mice. M.T. and M.I. performed the quantification and histopathological assessment of mouse tumor and proliferation phenotypes under supervision of M.M. J.T. carried out microarray, qRT-PCR and ChIP experiments. B.H. worked on the analysis of Trim24 on cell models under supervision of K.K. J.Z.-R. contributed to Trim24 expression analysis. T.L. and C.T. provided technical assistance with plasmid construction and microarray work, respectively. P.C., F.C. and D.M. provided project supervision. R.L. provided the general concept, design of study, supervision and manuscript writing.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics>
Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

1. Soprano, D.R., Quin, P. & Soprano, K.J. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 201–221 (2004).

2. Mark, M., Ghyselinck, N.B. & Chambon, P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 451–480 (2006).
3. Rosenfeld, M.G. & Glass, C.K. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 36865–36868 (2001).
4. Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J.-M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. & Losson, R. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**, 2020–2033 (1995).
5. Zhong, S. *et al.* A RA-dependent, tumor-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RAR α and T18 oncoproteins. *Nat. Genet.* **23**, 287–295 (1999).
6. Teyssier, C., Ou, C.-Y., Khetchoumian, K., Losson, R. & Stallcup, M.R. TIF1 α mediates physical interaction and functional synergy between the CARM1 and GRIP1 nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1276–1286 (2006).
7. Venturini, L. *et al.* TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* **18**, 1209–1217 (1999).
8. Le Douarin, B. *et al.* A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 6701–6715 (1996).
9. Fausto, N. Mouse liver tumorigenesis: models, mechanisms, and relevance to human disease. *Semin. Liver Dis.* **19**, 243–252 (1999).
10. Wu, H. *et al.* Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell-cycle progression, postnatal liver development, and regeneration. *Genes Dev.* **10**, 245–260 (1996).
11. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322 (2000).
12. Ledda-Columbano, G.M. *et al.* Induction of hepatocyte proliferation by retinoic acid. *Carcinogenesis* **25**, 2061–2066 (2004).
13. Di Bisceglie, A.M., Osmack, P. & Brunt, E.M. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: use of tamoxifen in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J. Lab. Clin. Med.* **145**, 134–138 (2005).
14. Sano, K., Takayama, T., Murakami, K., Saiki, I. & Makuuchi, M. Overexpression of retinoic acid receptor α in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3679–3683 (2003).
15. Postic, C. *et al.* Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315 (1999).
16. Germain, P. *et al.* International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 712–725 (2006).
17. Balmer, J.E. & Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* **43**, 1773–1808 (2002).
18. Sun, S.-Y. & Lotan, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **41**, 41–55 (2002).
19. Lufkin, T. *et al.* High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7225–7229 (1993).
20. Chapellier, B. *et al.* A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) gene. *Genesis* **32**, 87–90 (2002).
21. Frith, C.H., Ward, J.M. & Turosov, V.S. in *Pathology of Tumors in Laboratory Animals* Vol. 2 (eds. Turosov, V. & Mohr, U.) 223–270 (IARC Scientific, Lyon, France, 1994).
22. Khetchoumian, K. *et al.* TIF1 δ , a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J. Biol. Chem.* **279**, 48329–48341 (2004).

Résultats

Publication

Partie II : Interactions fonctionnelles entre TRIM24, TRIM28 et TRIM33 dans la répression du carcinome hépatocellulaire

Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, Ignat M, Télétin M, Mark M, Bechade G, Sanglier S, Cammas F, Chambon P, Davidson I#, Losson R.

Manuscrit en préparation

Functional interactions between TRIM24, TRIM28 and TRIM33 suppress hepatocellular carcinoma.

Benjamin Herquel, Khalid Ouararhni, Konstantin Khetchoumian, Mihaela Ignat, Marius Télétin, Manuel Mark, Guillaume Béchade, Sarah Sanglier, Florence Cammas, Pierre Chambon, Irwin Davidson#, and Régine Losson.

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire.
CNRS/INSERM/UDS.

1 Rue Laurent Fries,
67404 Illkirch Cédex.
France.

FAX: 33 3 88 65 32 01. TEL: 33 3 88 65 34 40 (45)

To whom correspondence should be addressed

E mail: irwin@igbmc.fr

Running Title: TIF factors suppress hepatocellular carcinoma.

Key words: carcinogenesis, retinoic acid, TGFbeta, transcriptional repression

Abstract

TRIM24 (TIF1 α), TRIM28 (TIF1 β) and TRIM33 (TIF1 γ) are three related cofactors that interact with diverse transcription factors. TRIM24 interacts with the liganded retinoic acid receptor (RAR) to repress its transcriptional activity. Inactivation of TRIM24 in mice deregulates RA signalling in hepatocytes leading to the development of hepatocellular carcinoma (HCC). Here we show that TRIM24 can be purified as a macromolecular complex together with TRIM28 and TRIM33. By using somatic hepatocyte-specific inactivation in mice we show that loss of TRIM24 and TRIM28 both lead to a high frequency of cell-autonomous HCC development, while loss of TRIM33 has a milder effect. However, HCC formation upon TRIM24 inactivation is strongly potentiated by loss of TRIM33, but not of TRIM28. These results demonstrate that TIF1 cofactors interact both physically and functionally to repress HCC formation in mice.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the 5th most common type of cancer, with 0.25-1 million newly diagnosed cases each year worldwide. HCC has a poor prognosis with a life expectancy of about 6 months from the time of diagnosis, causing about 600.000 deaths each year (Feo et al., 2006). To fight against this growing public health problem, considerable efforts have been made during the last years to provide insights into genetic alterations and molecular profiles of primary liver tumours. Overall, these studies revealed a large variety of gene expression profiles between individual HCC cases, supporting the notion that HCC ranks amongst the most complex and heterogeneous types of human solid tumours (Laurent-Puig and Zucman-Rossi, 2006 ; Lee and Thorgeirsson, 2006 ; reviewed in Buendia, 2007). Despite this heterogeneity, several morphological, biochemical and biological similarities have been found in human and rodent preneoplastic and neoplastic lesions, indicating that basic mechanisms of HCC development in different species could be similar (Lee et al., 2004).

Much effort has been made to create genetically engineered mouse models of hepatocarcinogenesis, but HCC spontaneously arises in only a few cases (reviewed in Newell, 2008). We have previously shown that inactivation of TRIM24 in mouse results in HCC formation (Khetchoumian et al., 2007). TRIM24, identified as Transcriptional Intermediary Factor 1 alpha (TIF1alpha), is a cofactor that interacts with liganded nuclear receptors to modulate either positively or negatively their activity (Le Douarin et al., 1995; Teyssier et al., 2006; Khetchoumian et al., 2007). TRIM24 was also identified in murine HCC as a fusion partner of B-RAF in the chimeric oncoprotein T18 (Miki et al., 1991). Despite the fact that TRIM24 is widely expressed, *Trim24*^{-/-} mice develop tumours only in liver, suggesting that TRIM24 is a key suppressor of the initiation and development of hepatocarcinogenesis. Based on these considerations, TRIM24 has been proposed to be a gatekeeper of hepatocarcinogenesis (Khetchoumian et al., 2008).

In *Trim24*^{-/-} mice, HCC develops as a result of a reproducible multistage process that closely parallel human HCC (Desmet, 2009). Increased hepatocyte proliferation is observed as soon as post-natal week 3, when normal hepatocytes enter into quiescence (Khetchoumian et al., 2007). At later times, a series of histological abnormalities (hypertrophic hepatocytes with enlarged nuclei), preneoplastic lesions (clear-cell foci of altered hepatocytes: FCA) and neoplastic lesions (hepatocellular adenomas and carcinomas) become visible in mutant livers. Remarkably, the carcinogenic process was shown to correlate with increased retinoic acid (RA) signalling and inactivation of a single allele of RA receptor α (*Rara*) is sufficient to

restore the correct expression level of RA target genes, the normal rate of hepatocyte proliferation and to completely suppress hepatocarcinogenesis. These observations revealed for the first time an oncogenic function of RAR α in the liver.

TRIM24 is the founding member of a conserved sub-family of TRIM proteins with orthologues from *Drosophila* to human (Le Douarin et al., 1995; Le Douarin et al., 1996; Venturini et al., 1999; Khetchoumian et al., 2004; Beckstead et al., 2001; Ransom et al., 2004) that play crucial roles in many physiological processes including cell differentiation, development and homeostasis (Cammass et al., 2000; Weber et al., 2002; Cammass et al., 2004; He et al., 2006; Dupont et al., 2005; Rowe et al., 2010; Ignat et al., 2008; Kim and Kaartinen, 2008). Members of this family share common structural features consisting of an N-terminal RBCC (Ring-Bbox-coiled-coil) motif and a C-terminal PHDfinger-bromodomain unit. Several members of the family such as TRIM28 (TIF1 β , KAP1) possess an intrinsic silencing activity through recruitment of chromatin modifiers (Nielsen et al., 1999; Schultz et al., 2001-2002; Sripathy et al., 2006; Matsui et al., 2010). Different members of the TRIM family interact with different transcription factors [i.e. ligand activated nuclear receptors (TRIM24: vomBaur et al., 1996); Krüppel associated box (KRAB) domain-containing zinc fingers (TRIM28: Abrinck et al., 2001) and TGF- β receptor-activated SMAD and co-SMAD proteins (TRIM33 also known as TIF1 γ : He et al., 2006; Dupont et al., 2005)]. Nevertheless, different TRIM family members may interact via their RBCC domain as has been shown for TRIM24 and TRIM33 (Peng et al., 2000-2002).

In the present report, we show using HeLa cells expressing an epitope tagged TRIM24, that TRIM28 and TRIM33 copurify with TRIM24 along with HDAC1 and 2, as well as HP1 proteins. TRIM28 and TRIM33 are major interacting partners, being almost stoichiometric with TRIM24 in the complex. These observations raise the question as to whether TRIM28 and TRIM33 also cooperate functionally with TRIM24 to suppress HCC. To test whether these TRIM proteins have a common function in hepatocarcinogenesis, we engineered hepatocyte-specific knock-out mice for all three TRIM proteins. We show that TRIM24 suppression of HCC is cell-autonomous and that TRIM24 is required to maintain hepatocyte quiescence throughout the life span. We further demonstrate that hepatocyte-specific inactivation of TRIM28 and TRIM33 leads to the formation of HCC and that TRIM33 inactivation is synergistic with that of TRIM24. These results demonstrate that TRIM24, TRIM28 and TRIM33 interact both physically and functionally to suppress HCC in mouse.

Material and methods

Cell lines and immunopurification. Generation of HeLa cell lines expressing the N-terminal Flag-HA-epitope tagged (E-) TRIM24 protein was performed by retroviral transduction (Ouararhni et al., 2006). Extract preparation and tandem affinity purification using the Flag and HA tags was performed essentially as previously described. Briefly, extracts from HeLa cells expressing the E-TRIM24 protein were prepared using a modification of the Dignam protocol (Dignam, 1990). Cells were lysed in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.65, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) and disrupted by Dounce homogenisation. The cytosolic fraction was separated from the pellet by centrifugation at 4°C. The nuclear-soluble fraction was also separated by incubation of the pellet in high-salt buffer (0.3 M NaCl). The nuclear fraction was digested with micrococcal nuclease to give predominantly mononucleosomes. E-TRIM24 was immunoprecipitated with anti-Flag M2-agarose (Sigma), eluted with Flag peptide (0.5 mg/mL), further affinity-purified with anti-HA antibody-conjugated agarose (Sigma), and eluted with HA peptide (1 mg/mL). Complexes were analysed on 4–12% Tris-Bis NuPage gels (Invitrogen) and stained using the Silver Quest kit (Invitrogen). Identification of proteins was carried out using an ion-trap mass spectrometer (nanoLC-MS/MS). For glycerol density gradients, samples were loaded onto a 4.5 mL glycerol gradient (17%–42%) and centrifuged at 300.000 g in a Beckman SW50.1 rotor for 8 h. Fractions were collected from the bottom of the tube and analysed by 8% SDS-PAGE.

Somatic hepatocyte-specific TRIM24, TRIM28 and TRIM33 knockout. The generation of mice harbouring conditional *Trim24* alleles (*Trim24*^{L2/L2} “floxed” mice) and conditional *Trim28* alleles have been previously described (Khetchoumian et al., 2007; Cammas et al., 2000). Mice with floxed *Trim33* alleles were engineered as described (Vincent et al., 2009). Briefly, LoxP sites were inserted in introns 1 and 4 the *Trim33* gene such that Cre treatment deletes exons 2–4 creating a novel reading frame with a stop codon in exon 5.

Constitutive hepatocyte inactivation was performed using transgenic Albumin-Cre (*Alb-Cre*) mice (Postic and Magnuson, 2000) and tamoxifen inducible inactivation with *Alb-CreER*^{T2} mice that have been previously described (Schüler et al., 2004). To generate hepatocyte-specific knockouts, *Trim*^{L2/L2} and *Alb-Cre* or *Alb-CreER*^{T2} mice were bred to obtain mice homozygous for the floxed *Trim* locus and heterozygous for *Alb-Cre* or *Alb-CreER*^{T2}. These mice produce control and hepatocyte-specific knockout littermates.

Tamoxifen induced inactivation was performed by intra-peritoneal injection of 2-month-old mice with 10 mg Tam dissolved in 100 µl of oil each day for 5 consecutive days.

For long-term studies tamoxifen injections were repeated every 3 months. The mice were maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle and provided with access to water and standard rodent chow diet *ad libitum*. All animal procedures were approved by the French Ministry of Agriculture (agreement B67-218-5) according to guidelines in compliance with the European legislation on care and use of laboratory animals.

PCR genotyping. Genomic DNA was isolated from mouse tails using standard procedures. Detection of recombination and presence of the Cre transgene was confirmed by PCR analysis. The primers used are listed in Supplementary Table 1.

Histopathological analysis. For analysis of tumourogenesis, at least 10 mice from each group were sacrificed >1 year after inactivation and at least 5 mice of each genotype were used for histopathological analysis at 3 months after inactivation. After fixation in buffered formaldehyde, liver samples (left median lobes) including visible tumours were embedded in paraffin, serially sectioned (5 μ m sections) and stained with haematoxylin and eosin. Lesions were classified into foci of cellular alterations (FCA), hepatocellular adenomas (HCA) and carcinomas (HCC) according to established criteria (Frith et al., 1994).

Ki67 labelling. Cell proliferation detected using the Ki67 antibody was carried out according to standard operating procedures (<http://empress.har.mrc.ac.uk/browser/>). The percentage of Ki67-positive cells (\pm s.d.) from five randomly chosen fields per section and 3 sections per liver from 4-5 animals of each genotype was determined and statistical significance of the results was analyzed using Student's t-test.

Tissue protein extraction and Western blot analysis. Whole cell protein extracts were prepared as described (Khetchoumian et al., 2004). Protein concentration was determined with Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad). Equal amounts of protein (100-200 μ g) were subjected to 8% SDS-PAGE. Immunoblots were carried out as previously described (Khetchoumian et al., 2004) using the primary antibodies to each TRIM protein and the β -tubulin monoclonal antibody, and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used as secondary antibodies.

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from liver tissue samples using an Rneasy (QIAGEN) kit according to the manufacturer's instructions. 1.5 μ g of RNA were reverse transcribed using SuperScript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen) and 500 ng of oligo-dT22 primer according to the manufacturer's instructions. The final product was diluted 80 times and 4 μ l were mixed with forward and reverse primers (250 nM final concentration) listed in Supplementary Table 1 and 5 μ l of

SYBR Green master mix. Real-time PCR was performed using the LightCycler 1.5 system (Roche). Each cDNA sample was tested at least in triplicate. For quantification of gene expression changes, the δC_t method was used to calculate relative fold changes normalized against the Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene (*Hprt*), as described in the manufacturer's protocol. All primers are listed in Supplementary Table 1.

Results

Identification of TRIM24 associated proteins. To purify a native TRIM24 complex and identify its interacting partners, we generated a HeLa cell line stably expressing a N-terminal FLAG-HA epitope-tagged TRIM24 (E-TRIM24) (Fig. 1A and B). E-TRIM24 localised in the nucleus with a diffuse euchromatin labelling, as previously described for wild-type TRIM24 (Remboutsika et al., 1999). Nuclear extracts from the E-TRIM24 expressing and control un-tagged cells (data not shown) were purified by tandem immunoprecipitation with FLAG and HA antibodies. The resulting precipitated fraction was resolved by SDS-PAGE (Fig. 1C) and the different subunits excised and identified by mass-spectrometry (Supplemental Table 2). HDAC1 and HDAC2, and HP1 α , β and γ were identified confirming a previous report from our laboratory (Nielsen et al., 1999). The presence of the core histones indicated that the TRIM24 complex, at least in part, is associated with chromatin which is a known feature of TRIM24 subcellular localization (Remboutsika et al., 1999). More importantly, mass-spectrometry analysis identified both TRIM28 and TRIM33 as TRIM24 partners. Silver nitrate staining of the SDS gel indicated that TRIM28 and TRIM23 are major TRIM24 partners (Fig. 1C). TRIM33 appears to be present in a close to stoichiometric ratio with TRIM24, while TRIM28 seems to be less abundant.

We performed a glycerol gradient purification on the immunopurified E-TRIM24 fraction to determine if it comprises distinct sub-complexes. This analysis confirmed that TRIM28 and TRIM33 co-sediment with TRIM24, however as TRIM28 and TRIM33 do not precisely co-sediment, it is possible that the immunoprecipitated fraction may comprise two (or more) distinct TRIM24-containing complexes (Fig. 1D). Together, these results indicate physical interactions between these three different members of the TIF1 family.

Somatic hepatocyte-specific TRIM24 inactivation increases proliferation in pre and post-quiescent hepatocytes. As the TRIM28 and TRIM33 germline knock-outs are embryonic lethal at day 8.5 and 9.5, respectively (Cammass et al., 2000; Kim and Kaartinen, 2008), evaluation of their role in HCC requires the use of tissue-specific somatic inactivation. We first verified however whether the HCC phenotype seen upon germline inactivation of TRIM24 is cell autonomous by generating a hepatocyte-specific knockout. Mice with floxed *Trim24* alleles were bred with mice expressing the Cre recombinase under the control of the albumin (*Alb*) promoter (*Trim24^{L2/L2}Alb-Cre⁺*) allowing recombination of the floxed allele from post-natal day 1 (Khetchoumian et al., 2007). To investigate the tumour suppressive

properties following hepatocyte quiescence, we also generated a mouse line in which *Trim24* could be inactivated in adult hepatocytes using a Cre-ER^{T2} fusion under the control of the *Alb* promoter (Schüler et al., 2004).

In the liver extracts of 5-week-old *Trim24*^{L2/L2}*AlbCre*⁺ mice, western blot analysis revealed a ~80% reduction of TRIM24, while its levels were unchanged in testis extracts (Fig. 2A). The residual TRIM24 in the hepatocyte extract is likely due to its expression in the non-hepatocyte cells of the liver. Histological examination of the livers of 3-month-old *Trim24*^{L2/L2}*AlbCre*⁺ mice by DAPI-staining revealed that similar to germline mutant TRIM24 mice, hepatocyte-specific TRIM24-deficient mice contained hepatocytes with enlarged polyploid nuclei (Fig. 2C). Labelling with Ki67 revealed a 4-fold increase in proliferative cells (Fig. 2C and E). These results show that hepatocyte-specific inactivation of TRIM24 is sufficient to cause abnormalities analogous to those observed in germline mutant mice, and indicate that TRIM24 inhibits hepatocyte proliferation in a cell-autonomous manner.

Similar results were observed in the *Trim24*^{L2/L2}*AlbCreER*^{T2+} where TRIM24 inactivation was induced in 2-month-old animals by Tamoxifen injection. Selective loss of TRIM24 expression in liver extracts was observed 12 weeks after injection (Fig. 2B). Histological analysis indicated the existence of enlarged polyploid nuclei and a 3-fold increase in Ki67 labelled proliferative cells (Fig. 1D and F). TRIM24 is thus not only required during the post-natal period when the hepatocytes normally enter into quiescence, but is continuously required for the maintenance of the quiescent state.

We previously identified several genes that are aberrantly expressed in germline TRIM24 knock-out livers (Khetchoumian et al., 2007). The expression of 8 of these genes was compared in the livers of the germline and the constitutive and inducible hepatocyte-specific TRIM24 knock-outs. In germline TRIM24 mutants, the expression of *Afp*, *Bmyc*, *Ccdc11*, *GluR3*, *2610305D13Rik*, *Lcn13*, *Mbd1* and *Cdkn1a* was reproducibly up-regulated (Fig. 3). Similarly, these genes were also overexpressed in both the constitutive and inducible hepatocyte-specific TRIM24-deficient livers (see appropriate panels in Fig. 3). Thus, hepatocyte-specific TRIM24 inactivation deregulates the expression of these genes in a manner similar to the germline mutant.

TRIM24 inactivation induces hepatocarcinogenesis in pre and post-quiescent hepatocytes. Germline TRIM24 inactivation leads to HCC as a consequence of a reproducible series of neoplastic transformations (Khetchoumian et al., 2007-2008), characterized by the development of clear-cell foci of altered hepatocytes (FCA) by 7 months,

then hepatocellular adenomas (HCA) by 9 months, ending with HCC starting from 12 months. We verified the presence of neoplastic foci in the constitutive and Tam-induced hepatocyte-specific mutant livers ~1 year after TRIM24 depletion (i. e. 12 and 15 months for *Trim24^{L2/L2}/Alb-Cre⁺* and tamoxifen-treated *Trim24^{L2/L2}/Alb-CreER^{T2+}* mice, respectively). Remarkably, all types of lesions previously observed in germline TRIM24 knock-out livers (FCA, HCA, HCC) were also observed in the hepatocyte-specific mutants (Fig. 4A-F). The penetrance of tumour formation in the constitutive inactivation line is similar to that seen in the germline mutant, while it is slightly lower in the inducible strain (Fig. 4G). Together, these data indicate that TRIM24 acts as a cell-autonomous tumour suppressor in quiescent hepatocytes and validate the use of *Alb-Cre* mice to investigate the potential roles of TRIM28 and TRIM33 in hepatocarcinogenesis.

Hepatocyte-specific inactivation of TRIM28 and TRIM33 induces hepatocarcinogenesis. To investigate the role of TRIM28 and TRIM33 in HCC, mouse lines with floxed alleles of TRIM28 and TRIM33 were crossed with the *Trim24^{L2/L2}/Alb-Cre* line to obtain hemizygous progeny for *Trim24^{L2/+}/Trim28^{L2/+}* or *Trim24^{L2/+}/Trim33^{L2/+}* and the presence of the *Alb-Cre* transgene. These mice were intercrossed to obtain progeny homozygous for the the floxed alleles of each *Trim* gene and the compound *Trim24* and *Trim33* or *Trim24* and *Trim28*. The presence of the *Alb-Cre* transgene promotes a hepatocyte-specific inactivation of TRIM28 and TRIM33, and double inactivation of TRIM24 with either TRIM28 or TRIM33. Western-blot analysis performed on liver extracts of 5-week-old mice showed a decrease in the TRIM28 and TRIM33 proteins, corresponding to hepatocyte-specific inactivation (Fig. 5A-B). Recombination of the floxed alleles in liver was also observed by PCR genotyping (data not shown).

As the floxed *Trim33* and *Trim28* mutant lines have different genetic backgrounds, we analyzed each line separately. We established statistics for macroscopic tumours in each single and double-mutant strain and distinguished between weakly affected livers (1-3 tumours) and highly affected livers (>3 tumours) (Fig. 5C-D). In both genetic backgrounds, hepatocyte-specific inactivation of TRIM24 led to the occurrence of hepatocarcinogenesis in analogous proportions, showing that the differences in genetic background do not affect the tumour suppressor properties of this factor. Hepatocyte-inactivation of TRIM28 and TRIM33 also promotes tumourogenesis, but with a lower penetrance compared to TRIM24 (Fig. 5C and D). In particular, only 2 of 8 TRIM33-knock out animals displayed macroscopic liver lesions neither of which was strongly affected. Strikingly however, inactivation of both

TRIM33 and TRIM24 led to a synergistic increase in tumour formation where all the mice now showed highly affected livers. In contrast, the TRIM24/TRIM28 double mutants behaved similarly to the corresponding single mutants and no cooperative effect was seen.

Discussion

Physical interactions amongst the TIF1-related subfamily of TRIM proteins. To better understand the molecular function of TRIM24, we used HeLa cells expressing a TAP-tagged derivative to isolate a native complex and identify its partner proteins. Purification of E-TRIM24 revealed the existence of several partners amongst which are core histones confirming our previous results (Remboutsika et al., 1999) that TRIM24 is a chromatin associated protein. Furthermore, the TRIM24 complex comprises the three HP1 proteins that were known to interact physically with TRIM24 via its HP1box domain (Nielsen et al., 1999). The presence of HDACs is also in accordance with the observation that the TRIM24 transcriptional repressor function could be abrogated by the HDAC inhibitor trichostatin A (Nielsen et al., 1999). More importantly, our results show that TRIM28 and TRIM33 are major components of the TRIM24 complex. With the limitations of silver nitrate staining, TRIM33 appeared almost stoichiometric with TRIM24, and TRIM28 less abundant. It is thus possible that the core histones, HP1 proteins and HDACs associate with the TRIM24 complex either via TRIM24, via the other TRIM proteins, or all three TRIM proteins.

To determine whether all three proteins form a single complex or whether there are distinct TRIM24-TRIM28 and TRIM24-TRIM33-containing complexes, we performed glycerol gradient sedimentation. This approach failed to clearly separate potentially distinct subcomplexes. Preliminary results using cells expressing tagged TRIM33 indicate that both TRIM24 and TRIM28 can be copurified (our unpublished data). However, we cannot exclude the possibility that there may be a mix of trimeric and dimeric TRIM24-containing complexes of similar mass. Note also that the above results reflect the complexes in cultured HeLa cells and that a different situation could exist in hepatocytes *in vivo*. Indeed, mouse genetic studies show that TRIM28 and TRIM33 differ in their ability to cooperate functionally with TRIM24. While the genetics provide evidence for distinct TRIM24-TRIM28/TRIM33 subcomplexes, only further biochemical experiments using liver extracts will determine whether this is indeed the case.

TRIM24 as a model for human hepatocarcinogenesis. We have previously shown that germline inactivation of TRIM24 results in the development of HCC, however, this could reflect a cell autonomous or non-cell autonomous effect. To address this question, we inactivated TRIM24 specifically in hepatocytes. Loss of TRIM24 in post-natal hepatocytes or later in adult hepatocytes promoted a series of neoplastic transformations resulting in HCC.

TRIM24 appears therefore to be required throughout the life-span of the animal to maintain hepatocyte quiescence and repress HCC formation in a cell autonomous fashion. Nevertheless, it should be noted that the penetrance of HCC was lower compared to the germline knock-out. While this difference may simply reflect a less efficient inactivation in the conditional knock-out, it could also reflect a more fundamental age-dependency of hepatocarcinogenesis. This may be explained by the the lower cycling rate of adult hepatocytes that may render them intrinsically more resistant to induction of hepatocarcinogenesis (Vesselinovitch and Mihailovich, 1983).

One of the central questions concerning the mouse modelling of cancer is to which extent it parallels human pathologies. In this respect, our TRIM24 germline knock-out recapitulates the histological properties and sequential events of human hepatocarcinogenesis. Nevertheless, as human cancers arise during adulthood, the effects of germline or early post-natal inactivation are not necessarily an appropriate model for human cancers. The observation that inactivation of TRIM24 in adult hepatocytes also leads to HCC therefore reinforces the idea that these animals may be a relevant model for the study of human HCC.

Functional interactions amongst the TIF1-related subfamily of TRIM proteins.

The observation that TRIM28 and TRIM33 physically interact with TRIM24 raised the question of whether TRIM24 HCC suppression required cooperative functional interactions with its partners. Previous studies indicated that TRIM28 and TRIM33 germline knock-outs elicit embryonic lethality at 8.5 and 9.5, respectively (Cammass et al., 2000; Kim and Kaartinen, 2008). Consequently, their functions in the adult liver could not be addressed. Moreover, the observations that the TRIM24 germ line knockout does not result in embryonic lethality and that the TRIM28 and TRIM33 knockouts have distinct embryonic phenotypes demonstrates that irrespective of their physical interactions, each TRIM protein has distinct and non-redundant functions.

To address the function of TRIM28 and TRIM33 in the liver, the corresponding genes were inactivated in post-natal hepatocytes alone or in combination with TRIM24. Loss of either TRIM28 or TRIM33 leads to the formation of HCC, however, tumour formation is rare in TRIM33-null hepatocytes. Strikingly however, loss of TRIM33 significantly potentiates the tumour formation seen upon TRIM24 inactivation. The livers of these animals are characterised by numerous large tumours, while at the same age, tumours are less numerous in the TRIM24-null animals. These observations indicate a cooperative action of TRIM24 and TRIM33 in tumour suppression. As TRIM24 attenuates RA signalling and TRIM33

modulates the TGF- β signalling pathway (Morsut et al., 2010), it is possible that the enhanced tumorigenesis is a consequence of simultaneous alterations in both of these signalling pathways. Analysis of gene expression in TRIM24 knockout livers in our laboratory showed an upregulation of several SMAD target genes (Tisserand et al., manuscript in preparation). Further comparative studies of the gene expression profiles of the tumours from each genotype may reveal additional evidence for cooperative modulation of RA and TGF β signalling. Similarly, it will be interesting to determine whether inactivation of a single *Rara* allele can suppress the cooperative tumour suppressor effect of the TRIM24 and TRIM33 double knock-out as has been demonstrated upon TRIM24 inactivation. Such experiments will address the idea that the TRIM24-TRIM33 complex acts as an integrator of the RA and TGF β signalling pathways.

It has previously been shown that TRIM33 cooperates with the KRAS oncogene to induce pancreatic tumours reminiscent of human Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (Vincent et al 2009). It will be interesting therefore to test whether loss of TRIM24 would potentiate pancreatic tumour formation in the same way as loss of TRIM33 potentiates HCC. These observations also raise the possibility that while loss of TRIM24 leads to tumour formation only in the liver, the simultaneous inactivation of TRIM33 may lead to tumorigenesis in other tissues.

In contrast, the double hepatocyte knock-out of TRIM24 and TRIM28 does not augment tumour formation compared to the corresponding single knock-outs. These data suggest that TRIM24 and TRIM28 act in the same pathway rather than in different pathways that cooperate to repress HCC. If this were indeed the case, *Rara* inactivation would suppress the HCC seen upon TRIM28 and TRIM24/TRIM28 inactivation. The lack of cooperativity between TRIM24 and TRIM28 is surprising in view of the fact that TRIM28 is a component of several complexes and binds to a large array of target genes (O'Geen et al., 2007). One may have expected that loss of TRIM28 would affect other pathways that could cooperate with increased RA signalling to enhance HCC. However, the double knockouts indicate that this is not the case. Further comparative studies of changes in hepatocyte gene expression upon TRIM28 and/or TRIM24 inactivation will determine whether a single or multiple pathways are indeed affected.

Acknowledgements

We thank M. Cervino for mice genotyping, L. Walsch and L. El-Fertak for mice breeding and M. Oulad-Abdelghani for providing the antibodies used in this study. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Agence Nationale de la Recherche. B.H. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Bibliography

- Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroi MR, Calvisi DF, Frau M, Pascale RM.** (2006) Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition, *Biochim Biophys Acta* 2:126-47.
- Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J.** (2006) Genetics of hepatocellular tumours, *Oncogene* 25:3778–3786.
- Lee JS, Thorgeirsson SS.** (2006) Comparative and integrative functional genomics of HCC, *Oncogene* 25:3801–3809.
- Buendia MA.** (2007) Tumour suppressors in hepatocellular carcinoma: many are called, but few are chosen. *J Hepatol.* 46:546-8
- Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, Thorgeirsson SS.** (2004) Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer, *Nat Genet.* 36:1306–1311.
- Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R.** (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18, *EMBO J.* 9:2020-33.
- Teyssier C, Ou CY, Khetchoumian K, Losson R, Stallcup MR.** (2006) Transcriptional intermediary factor 1alpha mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators, *Mol Endocrinol.* 6:1276-86.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R.** (2007) Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha, *Nat genet.* 12:1500-6.
- Miki T, Fleming TP, Crescenzi M, Molloy CJ, Blam SB, Reynolds SH, Aaronson SA.** (1991). Development of a highly efficient expression cDNA cloning system: application to oncogene isolation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5167-5171.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Herquel B, Ouararhni K, Losson R.** (2008) Trim24 (Tif1 alpha): an essential 'brake' for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer. *Cell Cycle* 23:3647-52.
- Desmet VJ** (2009) East-West pathology agreement on precancerous liver lesions and early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49:355-7.
- Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P.** (1996) A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15:6701-15.
- Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de Thé H.** (1999) TIF1g, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18:1209-17.
- Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cerviño M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2004) TIF1d, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem.* 279:48329-41.

- Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen HJ.** (2001) Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit β FTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell* 7:753-65.
- Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH, Zon LI.** (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1 γ , an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* 2:237.
- Cammas F, Mark M, Dollé P, Dierich A, Chambon P, Losson R.** (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1 β are defective in early postimplantation development. *Development* 127:2955-63.
- Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2002) Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1b is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 129:2329-37.
- Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R.** (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1b with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev.* 18:2147-60.
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massagué J.** (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* 125:929-41.
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S.** (2005) Germlayer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121:87-99.
- Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, Rougemont J, Reynard S, Aktas T, Maillard PV, Layard-Liesching H, Verp S, Marquis J, Spitz F, Constam DB, Trono D.** (2010) KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature.* 463:237-40.
- Ignat M, Teletin M, Tisserand J, Khetchoumian K, Dennefeld C, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2008) Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2598-603.
- Kim J, Kaartinen V.** (2008) Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis* 46:329-33.
- Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R.** (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* 18:6385-95.
- Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ, 3rd.** (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev.* 15:428-43.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd.** (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* 16:919-32.
- Sripathy SP, Stevens J, Schultz DC.** (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 26:8623-38.

- Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y.** (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 464:927-31.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R.** (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *Embo J* 15, 110-124.
- Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R.** (2001). Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1422-1426.
- Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, Speicher DW, Rauscher FJ 3rd.** (2000) Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol.* 295:1139-62.
- Peng H, Feldman I, Rauscher FJ 3rd.** (2002) Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol.* 320:629-44.
- Ouararhni K, Hadj-Slimane R, Ait-Si-Ali S, Robin P, Mietton F, Harel-Bellan A, Dimitrov S, Hamiche A.** (2006) The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev.* 20:3324-36.
- Dignam JD.** (1990) Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Enzymol.* 182:194-203.
- Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scoazec JY, Losson R, Bartholin L.** (2009) Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumours of the pancreas. *PLoS Genet.* 5:e1000575.
- Postic C, Magnuson MA.** (2000) DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age, *Genesis* 2:149-50.
- Schuler M, Dierich A, Chambon P, Metzger D.** (2004) Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse, *Genesis* 3:167-72.
- Frith CH, Ward JM, Turusov VS.** (1994) Tumours of the liver, *IARC Sci Publi* 111:223-69.
- Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P, Dupont S, Losson R, Piccolo S.** (2010) Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1{gamma} patterns the mammalian embryo. *Development* 137:2571-8.
- O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, Farnham PJ.** (2007) Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet.* 3:e89.
- Vesselinovitch SD, Mihailovich N.** (1983) Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.* 43:4253-9.

Legends to figures

Figure 1. Tandem affinity purification of TRIM24 containing complexes. **A.** Anti-Flag immunoblot to detect expression of E-TRIM24 in nuclear extracts from retroviral transduced or control HeLa cells. **B.** Detection of E-TRIM24 expression and localisation by immunofluorescence with anti-Flag antibody. **C.** SDS-PAGE and silver nitrate staining of tandem affinity purified TRIM24 and its partner proteins. The identity of proteins identified by mass-spectrometry is indicated. **D.** Glycerol gradient purification of E-TRIM24 associated subcomplexes. The different fractions (indicated above) were resolved by SDS-PAGE and blotted with anti-TRIM antibodies.

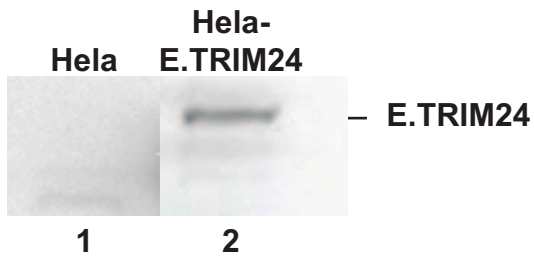
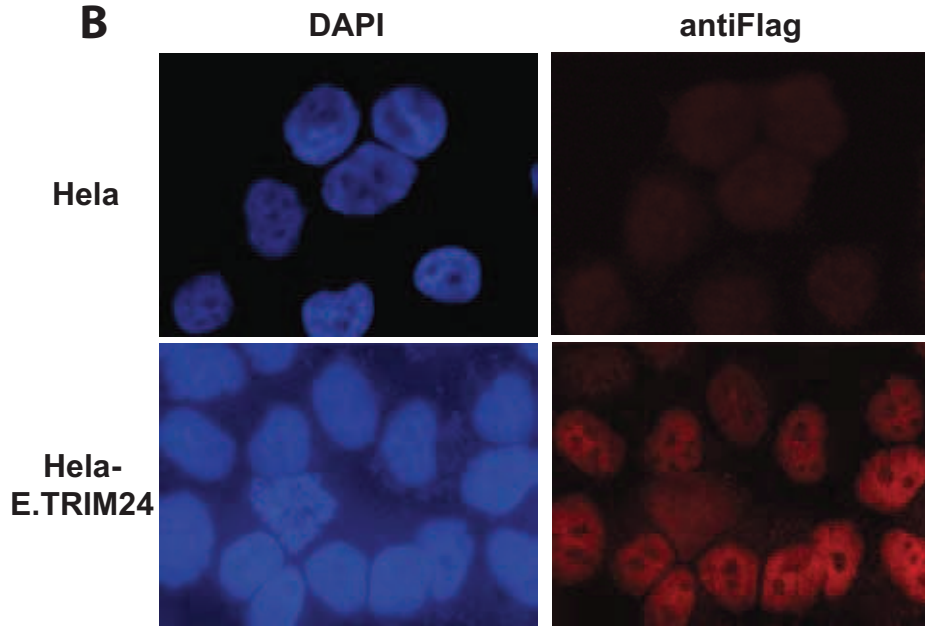
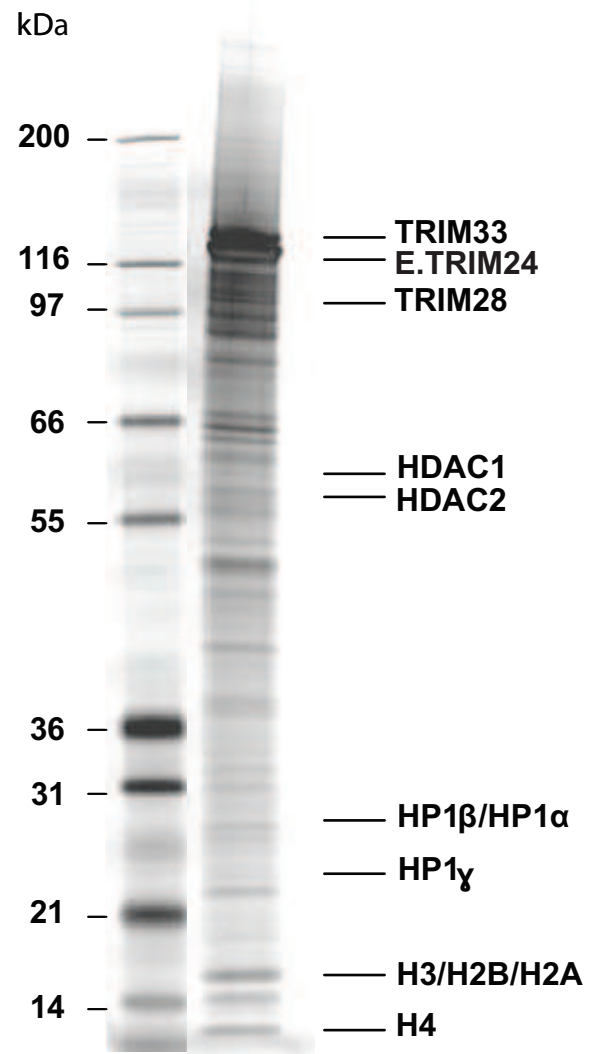
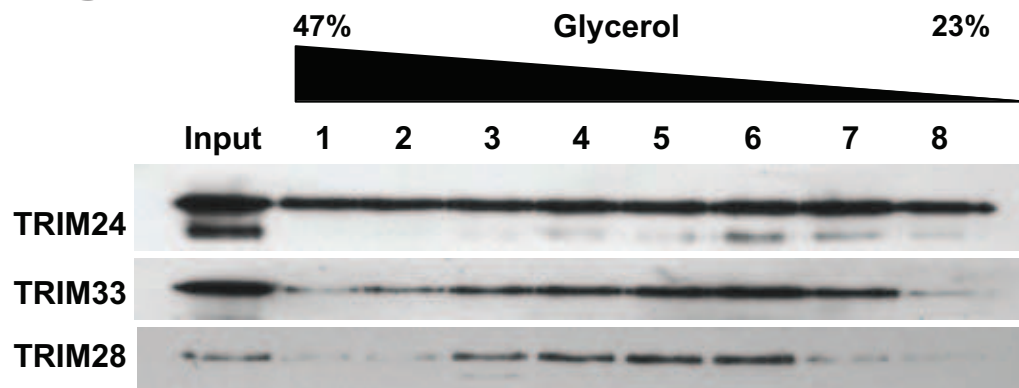
Figure 2. Characterisation of hepatocyte-specific TRIM24 knock out mice. **A-B.** Western-blot analysis with anti-TRIM24 and β -tubulin antibodies performed on liver and testis extracts from *Trim24^{L2/L2}* mice whose genotypes with respect to the *Alb-Cre* and *Alb-CreER^{T2}* transgenes are shown above each lane. In panel B all mice were injected with Tam. **C-D.** Ki67 staining performed on liver sections from 5-week-old *Trim24^{L2/L2}* mice (panel C) or 5-month-old Tam injected *Trim24^{L2/L2}* animals (panel D) with the indicated transgenes. The inserts in the upper DAPI-stained panels show higher magnification images of enlarged polyploid nuclei. **E-F.** Quantification of Ki67-positive hepatocytes in the indicated strains. Means (N=4) \pm s.d. * P < 0.05 ** P < 0.005.

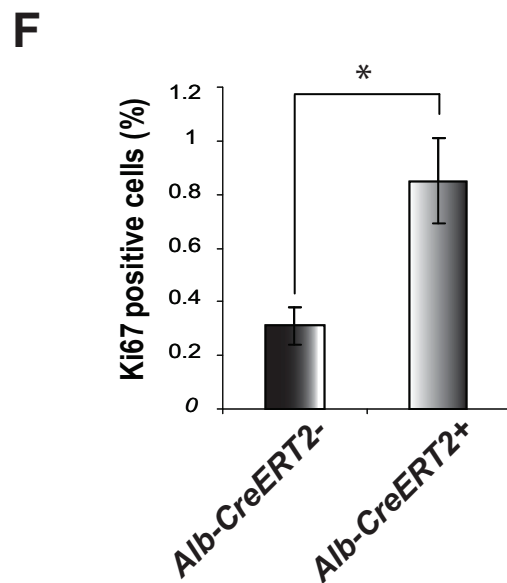
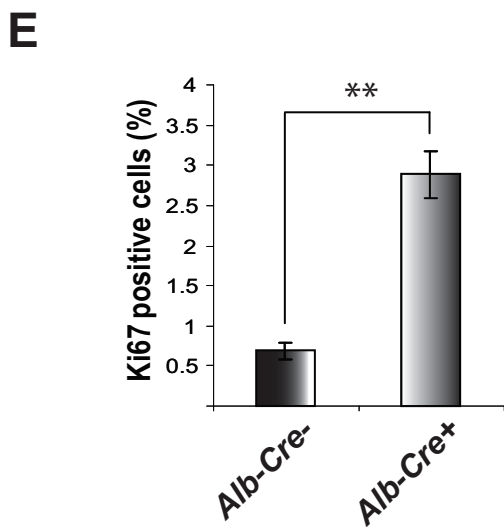
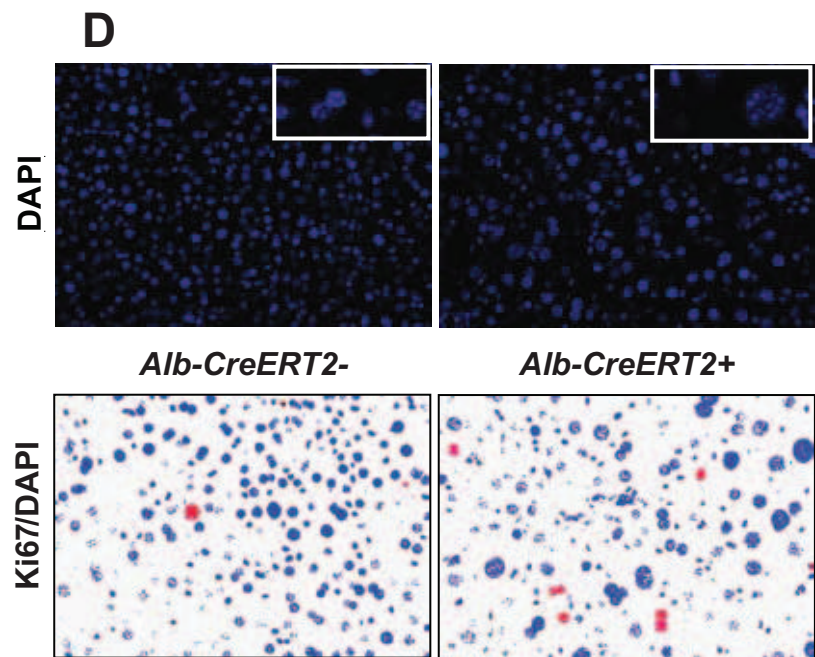
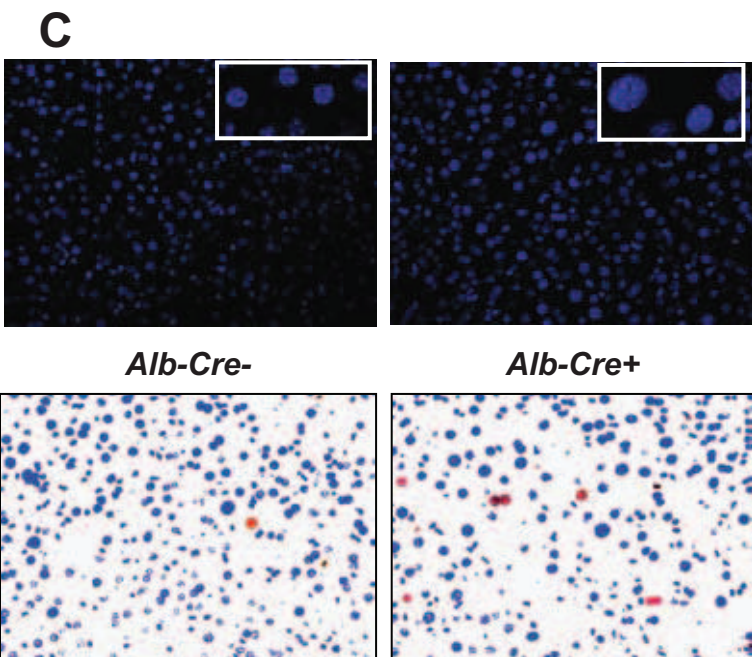
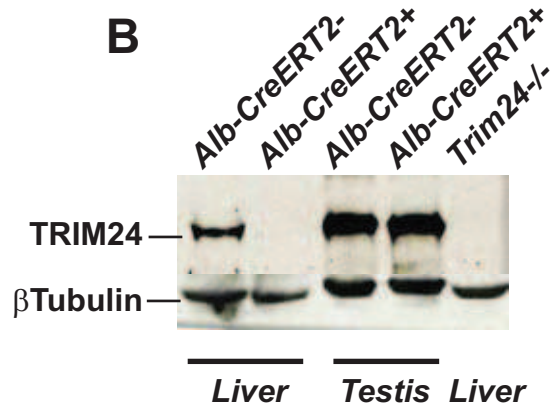
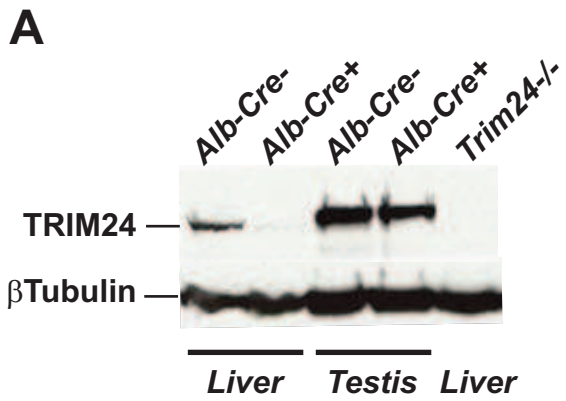
Figure 3. Comparison of gene expression in TRIM24 germline and hepatocyte-specific knock-out mice. The expression of the 8 selected genes was determined by RT-qPCR on whole total liver RNA from *Trim24^{L2/L2}* littermates with the indicated transgenes. Expression in the control mice was arbitrarily considered as =1. Means (N=4) \pm s.d. * P < 0.05, ** P < 0.005.

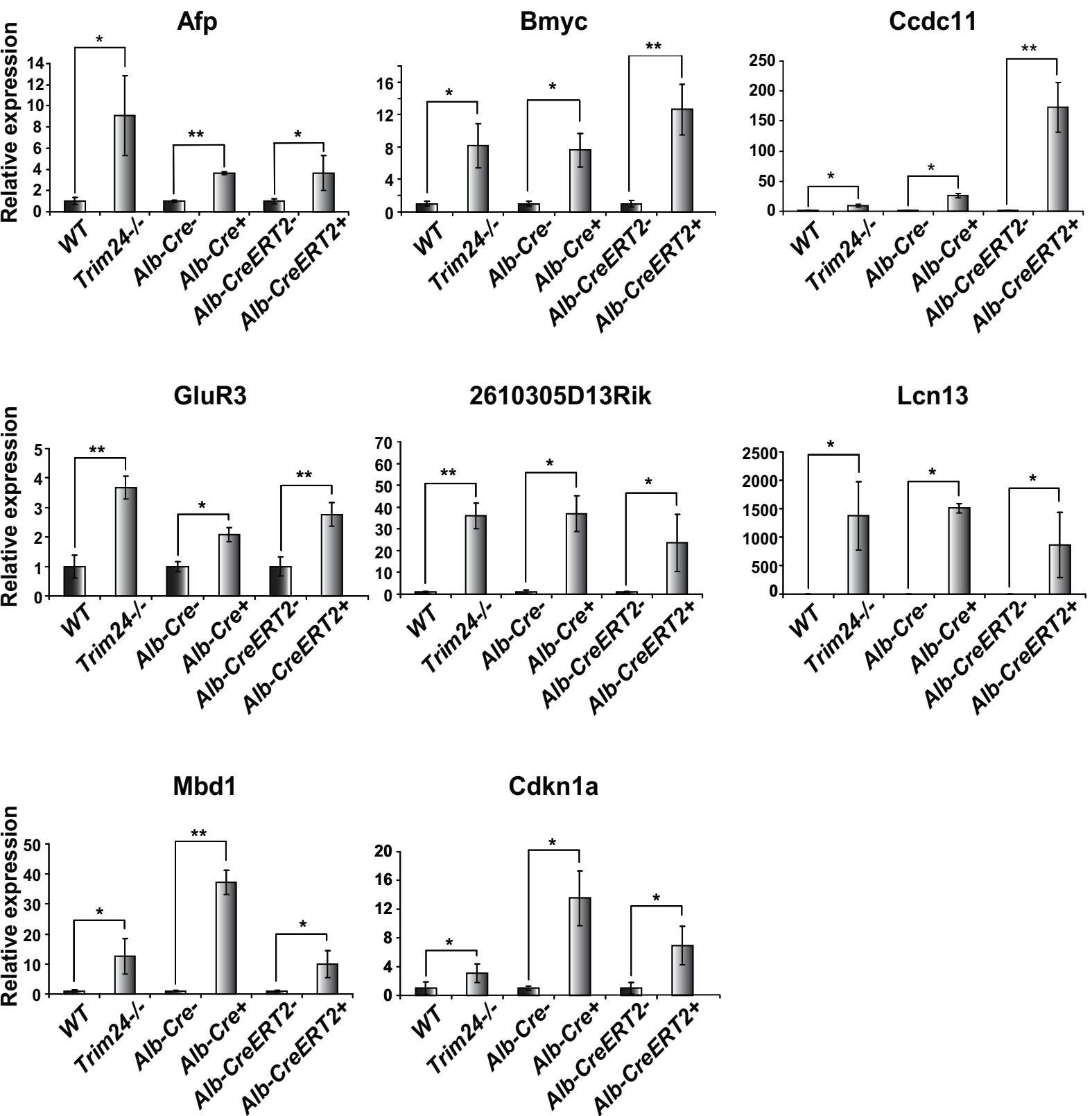
Figure 4. Spontaneous liver tumour formation in hepatocyte-specific TRIM24 knock-out mice. **A.** Representative macroscopic view of a 14-month-old *Trim24^{L2/L2}/Alb-Cre⁺* liver showing multiple tumour nodules, which were histologically classified as HCA and/or HCC. **B-F.** Hematoxylin/Eosin staining of representative microscopic views of benign (HCA, panel B) and malignant (HCC, panel C) lesions observed in *Trim24^{L2/L2}/Alb-Cre⁺* 12-month-old animals. Clear-cell foci of cellular alteration (FCA) observed in a 15-month-old *Trim24^{L2/L2}/Alb-CreER^{T2}⁺* tamoxifen-treated mice (panel D). The boundary of the focus is marked by arrowheads. Benign (HCA, panel E) and malignant (HCC, panel F) in tamoxifen-injected *Trim24^{L2/L2}/Alb-CreERT2⁺* 15-month-mice. **G.** Statistics of neoplasias observed in hepatocyte-specific constitutive and Tam-inducible TRIM24 mutants. Neoplasias are

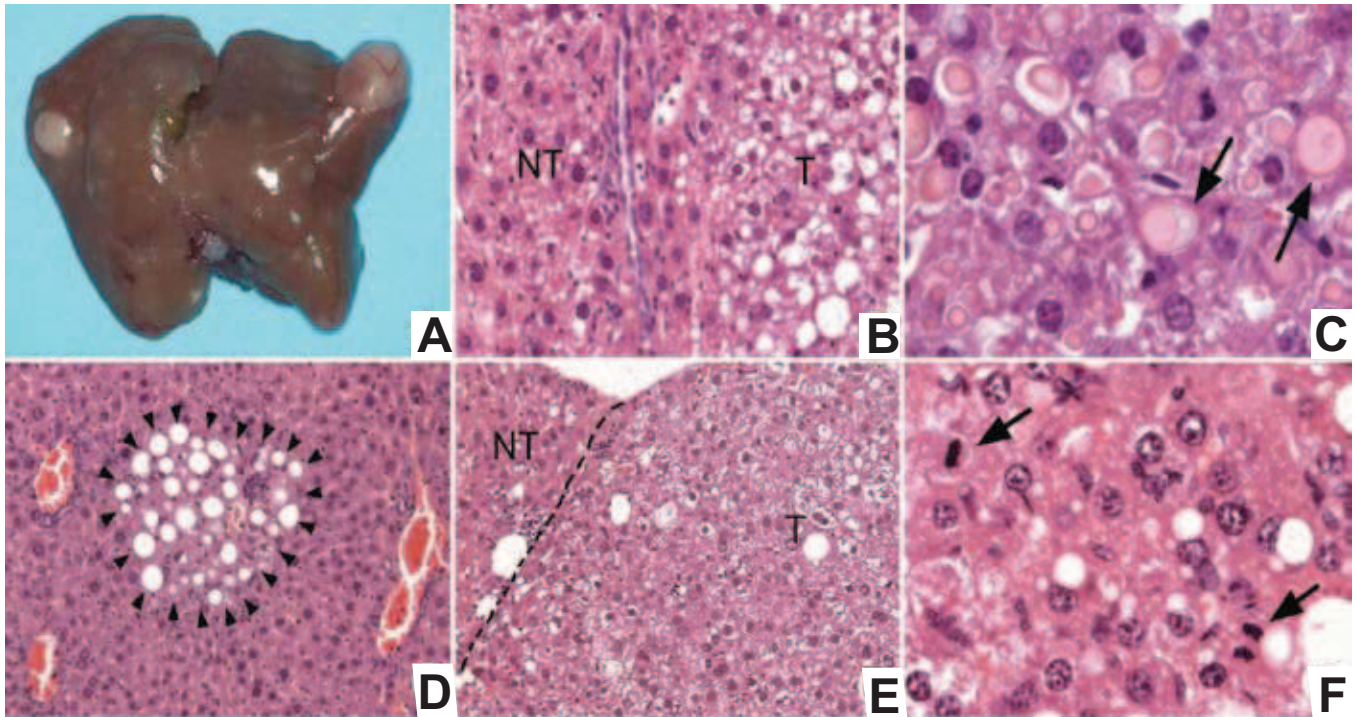
classified as foci of altered hepatocytes (FCA), hepatoadenoma (HCA) or hepatocarcinoma (HCC).

Figure 5. Spontaneous HCC tumour formation in hepatocyte-specific TRIM28 and TRIM33 knock-out mice. **A-B.** Western-blot analysis of TRIM28 and TRIM33 expression following hepatocyte-specific inactivation. **C-D.** Statistics of macroscopic liver neoplasias in mice with the indicated genotypes. Livers were classified into two groups with; 1 to 3 tumours with a size >1mm indicated by the open bars; livers containing multiple tumours (>3) indicated by the filled bars. **E.** Macroscopic views of livers from mice with the indicated genotypes. Lesions are indicated by arrows.

A**B****C****D**

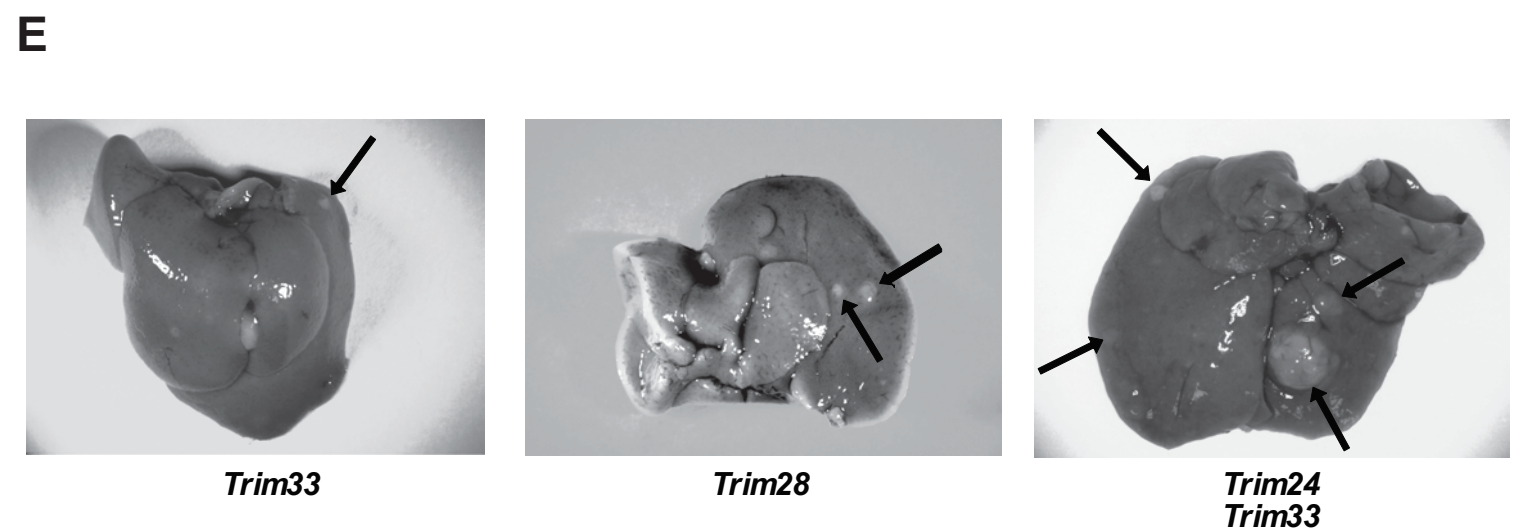
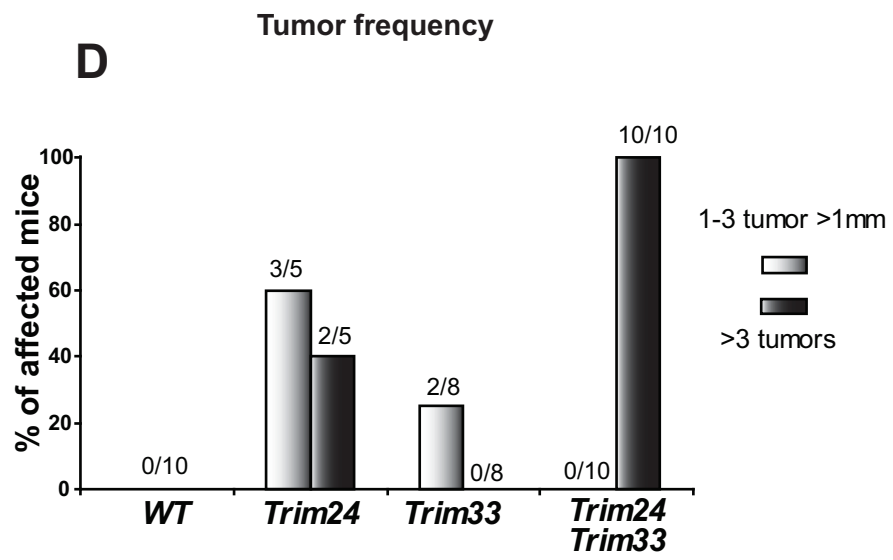
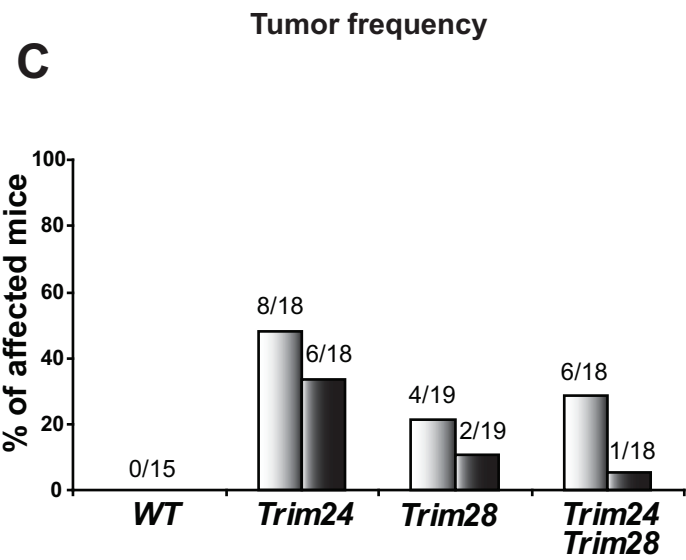
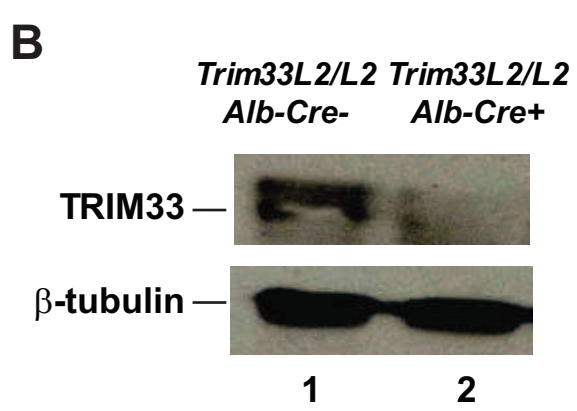
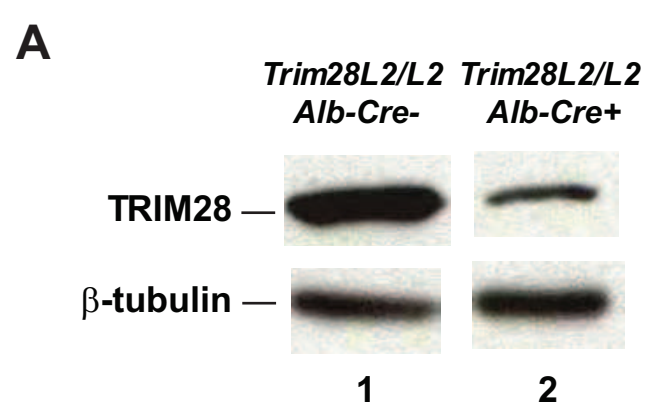






G

| | | Type of neoplasia | | | Total | |
|---------------------|---------------------|-------------------|------|------|------------|----|
| | | FCA | HCA | HCC | neoplasias | % |
| Constitutive | <i>Alb-Cre-</i> | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0 |
| | <i>Alb-Cre+</i> | 7/10 | 5/10 | 3/10 | 7/10 | 70 |
| Inducible | <i>Alb-CreERT2-</i> | 0/14 | 0/14 | 0/14 | 0/14 | 0 |
| | <i>Alb-CreERT2+</i> | 7/14 | 5/14 | 2/14 | 7/14 | 50 |



| Gene | Primer sequence |
|--------|--|
| Cre | ATTTGCCTGCATTACCGGTC ATCAACGTTTTGTTTTCGGA |
| Trim24 | TGTGGGAGTTGGTTCTCCTG AGACAGGCAGCAGCAGTTAC GGCCAGTGAGATACTTCAGC |
| Trim28 | GGAATGGTTGTTCAATTGGTG GCGAGCACGAATCAAGGTCAG ACCTTGGCCCATTTATTGATAAAG |
| Trim33 | GGTAGTACTTGTATGGAGGT AGCTCTGGAGGAACGTCGTC GGTAAGTCAGCAAGAGCTCA |
| Afp | TAGCATAGCTACCATCACCTTT GCCTGAGAGTCCATACTTGTTA |
| Bmyc | CGAGACCTTCGTGAAGAACA TGTTGCAGGTGCAGTCTGGA |
| Ccdc11 | GCAGCGAAAACCTCAGAGAAC CTTTTCTGCTTCTCGAGCCT |
| Cdkn1a | TTCAGAGCCACAGGCACCATG GGGACCCAGGGCTCAGGTAGA |
| GluR3 | CTGGATGTGCATTGTCTTCG CTGCATAAAAGCACCCAAGG |
| HPRT | TGACACTGGCAAACAATG GGTCCTTTTACCAGCAAGCT |
| Kito | TTCATAGAGGAGAGAAACCT TTACTGAGGTTGTGGTAAT |
| Lcn13 | CTCTGGTGAAAATCCAGAGG GAAGCAGTGGGAAGTTTGGT |
| Mbd1 | TCCGAAGCAAAGTTGAGCTG GGCTGGTTTAGAAGGCTTCT |

| Protein | Peptides identified | Peptides |
|--|---------------------|--|
| Transcription intermediary factor 1-alpha - Homo sapiens (Human) | > 30 | ALLHQLESIAK CLPAPQR CPVCSQECAER DTTEVPSSTVEK ESQPQMPK FPTQISLAQLR FSDDSDDDFVQPR FTGNQIQNR HIIDNFFVK IIEVNQNK IKQENSGPPENYDFPVVI VK KDTNIDHGQPRPPSNR LIFQNCAEFNEPDSEVA NAGIK LITYR LMQQQQEVAGLSK LNLLDTCVCHQNIQSR LTPIDK LTPIDKR LYCETCDK NLYPEK NPMDLSTIK QENSGPPENYDFPVVIV K QVEQDIK RLITYR SILTSLLLNSSQSSTSEE TVLR TVQSPNSSVSPGLAGP VTMTSVHPPIR VAIFTLMVEINK VAIFTLMVEINKK VIIDTLTK VPVVMLEPIR |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33 - Homo sapiens (Human) | > 30 | AVALYFEDK DTSEAPSSSDEK GAIEILLAK HSQHYQIPDDFVADVR HVMNFTNWAIASGSST ALLYSK KNYVHFAATQVQNR KPMDLSTVK LITFQLR LLQQQNDITGLSR LTEIYSDR NYVHFAATQVQNR QEPGTEDEICSFSGGVK QIDLVDNYFVK QLSVPIPGGSNGDIQQV GVIR QSGLSSLVNGK TAQGISPVDR |

| | | |
|---|-----|---|
| | | VAIFTLNEINKK VKQEPGTEDEICSFSGG VK AVALYFEDK DTSEAPSSSDEK GAIENLLAK GNMNCGAFQAHQMR HVMNFTNWAIASGSST ALLYSK LITFQLR LLQQQNDITGLSR LQHMQQQVYAQK LTEIYSDR NYVHFAATQVQNR |
| Transcription intermediary factor 1-beta - Homo sapiens (Human) | >30 | ADVQSIIGLQR FQWDLNAWTK IVAERP GTNSTGPAPMA PPR KLLASLVK SGEGEV SGLMR AASAAAA SAAAA SAASG SPGPGEGSAGGEK ADVQSIIGLQR APGPLSK DHQYQFLEDAVR DIVENYFMR EEDGSLSLDGADSTGVV AK FASWALES DNNTALLS K FFETR FQWDLNAWTK FSAVLVEPPPMSLPGAG LSSQELSGGPGDGP GAAAAATGQPGTAPAGT PGAPPLAGMAIVK IVAERP GTNSTGPAPMA PPR KLIYFQLHR KLLASLVK LASPSGSTSSGLEVVAP EGTSAPGGGPGTLDDS LDLDTADSQPPVFK LIYFQLHR LLASLVK LSPPYSSPQEFAQDVGR LTEDKADVQSIIGLQR MAILQIMK MIVDPVEPHGEMK MNEAFGDTK QSGSGSSQPMEVQEGYG FGSGDDPYSSAEPHVS GVK SGEGEV SGLMR |

| | | |
|--|---|---|
| Histone deacetylase 2 - Homo sapiens (Human) | 4 | LGCFNLTVK YGEYFPGTGDLR YHSDEYIK YYAVNFPMR |
| Chromobox protein homolog 5 - Homo sapiens (Human) | 4 | GQVEYLLK LTWHAYPEDAENK SNFSNSADDIK WKDTDEADLVLAK |
| Chromobox protein homolog 3 - Homo sapiens (Human) | 8 | CPQIVIAFYEER GLDPER IIGATDSSGELMFLMK KVEEAPEEFVVEK SLSDSESDDSK VEYFLK WKDSDEADLVLAK LTWHSCPEDEAQ |
| Histone H2B type 1-K - Homo sapiens (Human) | 5 | AMGIMNSFVNDIFER EIQTAVR KESYSVYVYK LLLPGELAK QVHPDTGISSK |
| Histone H3.1 - Homo sapiens (Human) | 6 | EIAQDFK FQSSAVMALQEACEAYL VGLFEDTNLCAIHAK KLPFQR LPFQR STELLIR YRPGTVALR |
| Histone H4 - Homo sapiens (Human) | 5 | DAVTYTEHAK ISGLIYEETR DNIQGITKPAIR KTVTAMDVVYALK VFLENVIR |
| Histone deacetylase 1 - Homo sapiens (Human) | 6 | LFENLR LHISPSNMTNQNTNEYL EK MTHNLLLNYGLYR SIRPDNMSEYSK YGEYFPGTGDLR YYAVNYPLR |
| Chromobox protein homolog 8 - Homo sapiens (Human) | 3 | KLDDTPSGAGK SPQDLASTSR VFAAEALLK |
| | | |

Herquel et al., Supplemental table 2

Résultats

Publication

Partie III : Les protéines TIF1 répriment la transcription des rétrotransposons VL30 pour réguler l'expression de gènes avoisinants

Herquel B, Lerouge T, Cammas F, Davidson I#, Losson R.

Manuscrit en préparation

TIF1 proteins repress VL30 retrotransposon transcription to regulate expression of neighbouring genes.

Benjamin Herquel, Thierry Lerouge, Florence Cammas, Irwin Davidson#, and Régine Losson.

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire.
CNRS/INSERM/UDS.

1 Rue Laurent Fries,
67404 Illkirch Cédex.
France.

FAX: 33 3 88 65 32 01. TEL: 33 3 88 65 34 40 (45)

To whom correspondence should be addressed

E mail: irwin@igbmc.fr

Running Title: TIF factors repress retrotransposon transcription

Key words: Transcriptional repression, retinoic acid, retrotransposon, nuclear receptor

Abstract

TRIM24 (TIF1 α), TRIM28 (TIF1 β) and TRIM33 (TIF1 γ) are three related cofactors that interact with each other and with diverse transcription factors. TRIM24 interacts with the liganded retinoic acid receptor (RAR) to repress its transcriptional activity. Inactivation of TRIM24 in mice de-regulates RA signalling in hepatocytes leading to the development of hepatocellular carcinoma. Here we show that TRIM24 inactivation de-represses transcription from the VL30 class of retrotransposons in hepatocytes *in vivo* and in cultured MEFs. In normal hepatocytes, TRIM24 silences these retrotransposons by repressing the activity of the RAR bound to a direct repeat type RA response element in the VL30 LTR. De-repression by TRIM24 inactivation is further potentiated by loss of either TRIM28 or TRIM33 showing that these protein cooperate to repress VL30 activity. A significant fraction of TRIM24 target genes are located downstream of VL30 elements. We describe two distinct mechanisms whereby de-repression of VL30 elements regulates neighbouring genes either by acting as a surrogate proximal promoter as observed at the *Mbd1* gene, or by generating long non-coding RNAs that modify chromatin structure and facilitate the activation of the downstream genes. These results reveal a novel function of TRIM24 as a repressor of retrotransposon activity.

Introduction

The nuclear receptor co-repressor TRIM24 is the first identified member of a family of transcriptional co-repressors composed of TRIM24 (TIF1 α), TRIM28 (KAP1, KRIP1, TIF1 β), TRIM33 (TIF1 γ) and TRIM66 (TIF1 δ) (Le Douarin et al., 1995; Le Douarin et al., 1996; Venturini et al., 1999; Khetchoumian et al., 2004). The TIF1 family members have specific non-redundant roles in various physiological processes such as development (Cammass et al., 2000), differentiation (Cammass et al., 2004), spermatogenesis (Weber et al., 2002; Khetchoumian et al., 2004), and cancer (Khetchoumian et al., 2007; Vincent et al., 2009). Differences in function are due to the involvement of the TIF1 proteins in the repression of pathways involving different transcription factors. TRIM24 is the only member of the family able to bind nuclear receptors in a ligand-dependent manner (Le Douarin et al., 1995; Le Douarin et al., 1996), TRIM28 is also known as the KRAB-ZFP co-repressor KAP1 (Abrinck et al., 2001) and a role for TRIM33 in TGF- β signalling pathway was discovered through its interaction with the SMAD transcription factors (Dupont et al., 2005; He et al., 2006).

TRIM24 functions as a gatekeeper of hepatocarcinogenesis by antagonising the oncogenic function of the retinoic acid receptor alpha (RAR α) in hepatocytes (Khetchoumian et al. 2007; Khetchoumian et al. 2008). *Trim24*^{-/-} mice develop spontaneous hepatadenomas and hepatocarcinomas from the age of 9 months. A recent effort to decipher the transcriptional pathways deregulated in *Trim24*^{-/-} livers (Tisserand et al., manuscript in preparation) identified a set of genes that were over-expressed amongst which are several RA target genes. The de-regulated genes could be grouped in two classes, those whose expression was restored to normal levels by the loss of one allele of the gene encoding RAR α , and those that remained up-regulated irrespective of the RAR α genotype. Inactivation of one allele of the *Rara* gene completely suppresses tumourogenesis, but does not completely rescue all of the changes in gene expression.

VL30 (virus-like 30S) retrotransposons form a class of transposons specific to the *muridae* lineage initially discovered by their ability to hijack the MLV (Murine Leukemia Virus) during the infectious cycle. VL30s are unable to encode any protein as their genome contains multiple Stop codons (Adams et al., 1988) and thus are thought to be strictly dependent on the reverse transcriptase of other retrotransposons (Scolnick et al., 1979). Their U3 region contains multiple response elements, including at least one RA-response element (RARE) (Choudhuri et al., 1983; for review, French and Norton, 1997). If VL30s show only

overall weak similarities to known retroviruses, they possess small regions of high similarity with Moloney MLV (Giri et al., 1983).

Recent data revealed a global role for TRIM28 in retrotransposon restriction in the embryo and in ES cells (Rowe et al., 2010; Matsui et al., 2010). TRIM28 was shown to bind to MoMLV through interaction with KRAB-ZFP809 (Wolffe and Goff, 2007-2009). Our finding that TIF1 family members interact and exist in complexes that share a common function in suppressing hepatocarcinogenesis (Herquel et al., manuscript in preparation) raises the possibility that TRIM24 and/or TRIM33 may be involved in restriction of retrotransposon transcription.

Here we show that TRIM24 controls VL30 expression most likely through interaction with an RAR bound to the LTR U3 region RARE. Deregulated VL30 transcription is not however corrected upon loss of a *Rara* allele. We show that in the liver, TRIM33 synergizes with TRIM24 in this process, but independently of TRIM28 whose inactivation has little effect on VL30 activity. Interestingly, a significant subset of genes deregulated by TRIM24 inactivation in the liver are located in the vicinity of a VL30 element. Examination of the *Mbd1* gene shows that its transcription initiates not at the annotated start site, but at a VL30 element immediately upstream. Two up-regulated genes, *Lcn13* and *Bmyc*, are located downstream of a VL30 element and RT-qPCR and Chromatin immunoprecipitation (ChIP) suggest that a long non-coding polyadenylated RNA initiating at the 3'LTR induces increased acetylation and transcription of these two genes. These data show that deregulation of VL30 retrotransposon transcription upon TRIM24 inactivation may be responsible for altered expression of neighbouring genes.

Material and methods

Mice. The mice lines used in this study are already described (see Herquel et al., manuscript in preparation).

Mouse embryonic fibroblasts. Wild-type and *Trim24*^{-/-} mice were dissected at day E10.5. Embryos were eviscerated and decapitated; the remaining tissues were dissociated by multiple flushing through a 1.2 mm syringe. Cells were then kept in culture in a DMEM medium with 10% FCS and gentamycine for no more than one week before analysis.

5'RACE. 5' RACE was performed with a 2nd generation 5'/3' RACE kit (Roche) using a primer located in the second exon of the *Mbd1* gene (see Fig1A). Total RNAs from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3-month-old livers were retrotranscribed and further amplified by a PCR using one oligodT primer and a primer located in the second exon. The PCR products were then subjected to digestion with SalI and BglII restriction enzymes. Resulting fragments were cloned into a pSG5 plasmid and sequenced. The sequences of all primers are listed in Supplemental Table 1.

VL30 genomic mapping. Identification of VL30 positions in the genome was performed by a BLAST analysis using the sequences specific for each sub-class listed in supplemental Table 2.

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from liver tissue samples by Trizol reagent (Invitrogen) using manufacturer's instructions. Further purification of the RNA was achieved by Dnase-Rnase free (Roche) treatment (10U for 20 µg RNA). 1,5 µg of RNA was reverse transcribed using a mix 1/1 of SuperScript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen) and AMV retrotranscriptase (Roche) with 500 ng of oligodT₂₂ primer, hexanucleotides or specific primers according to the manufacturer's instructions. The final product was then diluted 100 times and 4 µl were mixed with forward and reverse primers listed in Supplementary Table 1 (250 nM of each primer at final concentration) and 5 µl of SYBR Green master mix. The real-time PCR reaction was performed using the LightCycler 1.5 system (Roche). Each cDNA sample was tested at least in triplicate. For quantification of gene expression changes, the δ Ct method was used to calculate relative fold changes normalized against the *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* gene (*Hprt*), as described in the manufacturer's protocol.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay. ChIP assay was performed according to the Millipore protocol with some minor modifications. Total liver was homogenized by dounce in a "swelling" buffer (25mM Hepes pH=7,8, 1,5mM MgCL₂,

10mM KCl, 0,1% NP40). Nuclei were purified by centrifugation (4000 rpm, 5 min) and resuspended in fixation buffer (PBS1X, PIC PMSF and DTT, 1% PFA) and further incubated 15 min. Cold glycine was added to stop the reaction and nuclei were subsequently washed twice in PBS1X followed by centrifugation (4000 rpm, 5min). Nuclei were incubated 10min at 4°C in lysis buffer (EDTA 10mM, Tris HCl pH=8,0 50mM, SDS 1% +PIC +PMSF) and sonicated to average fragment size of 200-1000 nt. The solubilized chromatin was diluted 10 times in Dilution buffer (0,01% SDS, 1,1% Triton, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl pH=8,0, 167mM NaCl) and precleared with protein A beads. Immunoprecipitation was performed overnight with 3µl of the following antibodies: anti H3K9ac, anti panH4ac, anti H3K9me3, anti H3K27me3 from Millipore, anti-PolIII from Santa-Cruz. Protein A were used to precipitate the antibody-protein complexes and were washed with low salt buffer twice (0,1% SDS, 1% Triton, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH=8,0, 150mM NaCl), high salt buffer once (0,1% SDS, 1% Triton, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH=8,0, 500mM NaCl), LiCl buffer once (0,25M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH=8,0) and TE buffer twice (10mM Tris pH=8,0, 1 mM EDTA). Immunocomplexes were eluted with 250 µl elution buffer twice (1% SDS and NaHCO₃ 0,1M) for 15 min at RT. Eluates and inputs were heated at 65°C overnight in the presence of 0,2M NaCl, and subsequently treated with proteinase K 2h at 55°C and purified by Phenol/Chloroform V/V. Q-PCR results were normalized against the inputs. Oligonucleotide primers used for PCR amplifications on the immunoprecipitated DNA are listed in Supplemental Table 1.

Results

Transcription of the *Mbd1* gene in hepatocytes initiates at an upstream VL30 LTR. Transcriptome analysis of *Trim24*^{-/-} livers showed that *Mbd1* expression is strongly up-regulated. Dereglulation of its expression can be observed as early post-natal week 3 and remains so throughout the life span of *Trim24*^{-/-} mice. To understand how TRIM24 regulates *Mbd1* expression, we studied the region upstream of the *Mbd1* transcription start site (TSS). This analysis revealed the presence of an endogenous retroviral insertion 415 nucleotides upstream of the annotated TSS (Fig. 1A). As it is well established that the LTR sequences of such retrotransposons contain multiple promoter sequences, notably a RARE (Choudhuri et al., 1993) and a TATA element, we performed 5'-RACE on *Mbd1* mRNA to locate an eventual alternative TSS. The sequence of the resulting fragment showed that the *Mbd1* transcript initiates in the LTR sequence, 22 nucleotides downstream of a putative TATA element (Fig. 1A). This data was confirmed by RT-qPCR on wild-type and *Trim24*^{-/-} liver RNA with primer pairs located between the LTR and the previously annotated *Mbd1* TSS and primer pairs located in each of the 3 first exons and the first intron of *Mbd1*. The sequence located immediately 3' of the LTR was as abundant as the *Mbd1* exons, and significantly higher than the *Mbd1* intron, confirming that this sequence is expressed and retained after splicing (Fig. 1B). These data suggest that TRIM24 exerts its repressive effect on *Mbd1* via elements of the VL30 LTR.

VL30 transcription is dependent on TRIM24 and RAR α . VL30 retrotransposons can be divided in 4 subgroups on the basis of homologies of their U3 promoter region (Nilsson and Bohm, 1994). To assess TRIM24 repressive potential on the VL30 retrotransposons, we performed RT-qPCR with primers specific for each U3 subgroup (Suppl. Fig. 1). In *Trim24*^{-/-} 5-week-old liver RNA, expression of the U3II subgroup was strongly up-regulated either at the LTR sequence or at virus-like pseudogenes *Gag*, *Pol* and *Env* (Fig. 2A). Interestingly, inactivation of a single *Rara* allele did not restore a normal level of expression of these retro-elements, although it rescues the expression of many other TRIM24 target genes (Tisserand et al., manuscript in preparation).

The same analysis was performed on 5 week-old hepatocyte-specific TRIM24 mutants generated using floxed *Trim24* alleles and an Albumin-Cre transgene (*Trim24*^{L2/L2} *Alb-Cre* versus *Trim24*^{L2/L2} mice, Herquel et al., manuscript in preparation). U3II VL30 expression was also up-regulated in the liver RNA from these animals, showing that de-regulation is the

consequence of a cell-autonomous loss of TRIM24 (Fig. 2B). Hepatocyte-specific inactivation of both *Rara* alleles in the compound *Trim24^{L2/L2}/Rara^{L2/L2}/Alb-Cre* mice led to a significant reduction of VL30 activity. The lack of full repression may be explained by incomplete defloxing of the *Rara* alleles in these mice. Thus, loss of a single *Rara* allele did not restore VL30 repression, while loss of both alleles significantly restored repression.

The apparent requirement for RARs in VL30 U3II activity prompted us to evaluate the effect of RA treatment on VL30 retrotransposon transcription. As RA is endogenously present in the mouse liver, we derived Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) from wild-type and *Trim24^{-/-}* littermates, which enable us to cultivate the cells in a RA-free environment and hence evaluate the effect of RA addition. The wild-type and *Trim24^{-/-}* MEFs show similar growth in culture and the mutant cells show no evident phenotype.

We assessed by RT-qPCR the effect of RA treatment and TRIM24 inactivation on the 4 different VL30 subgroups (Fig. 3). We could confirm that expression of VL30 subtypes III and IV is mildly increased upon RA treatment in the wild-type MEFs, while no change is seen for the U3I and II subtypes. The effect of RA on these subtypes is not affected by the loss of TRIM24. In the absence of RA treatment, U3I and U3IV were already up-regulated in *Trim24^{-/-}* MEFs, demonstrating that TRIM24 is potentially a repressor of the entire VL30 family, with the exception of U3III, depending on the cellular context. Interestingly, the expression of the U3II subgroup was not increased upon RA treatment in wild-type MEFs, whereas it was strongly increased in the absence of TRIM24, suggesting that TRIM24 represses the activity of the RARs on this specific class of retrotransposons. In accordance with our expectations, the level of expression of the gene *Mbd1* followed that of the U3II subgroup.

VL30 retrotransposon expression regulates neighbouring genes. The observation of VL30-dependent regulation of *Mbd1* prompted us to ask whether more distal VL30 elements may mediate the deregulation of other genes in TRIM24 mutant mice. We based our study on Affymetrix data obtained on liver RNA from 5-week-old and 3-month-old wild-type and TRIM24 mutant mice (Tisserand et al., manuscript in preparation). It was previously shown that at 5 weeks of age, 179 genes were de-regulated in *Trim24^{-/-}* livers, and that 122 of these genes recover normal expression after loss of a single *Rara* allele. These TRIM24 and RAR α -dependent genes are designated group 1 as opposed to the TRIM24 only dependent genes designated group 2. At the age of 3 months, 65 genes (thereafter designated “group 3”)

are up-regulated in *Trim24*^{-/-} livers which significantly overlap with group 2 genes. As a control, we randomly picked a list of 132 genes from the Affymetrix microarray.

The coordinates of the VL30 retrotransposons in the mouse genome were determined by an extensive BLAST analysis using U3 sequences specific for each VL30 subgroup. We established a list of 449 VL30 elements, which is superior to what was previously speculated (French and Norton, 1997). We next calculated the distance between each TRIM24 target gene of groups 1, 2 and 3 and the closest VL30 retrotransposon. This analysis shows that 3,64% of the randomly chosen genes were positioned less than 220kb from a VL30 element (Fig. 4A). A similar proportion is conserved for the group 1 genes (3,37%). Strikingly, we found that 25% of the group 2 and 24% of the group 3 genes are positioned less than 220kb from a VL30 retrotransposon. This data suggests that expression of a significant proportion of TRIM24 target genes could be influenced by a VL30 retrotransposon.

A further analysis of loci comprising TRIM24-dependent genes and a neighbouring VL30 (See Supplementary Table 3) showed that they contain either a full-length VL30 or an isolated LTR (Fig. 4B). For the group 3 genes the full element and isolated LTR are present in the same proportions as they are generally found in the genome (Fig. 4B) suggesting that isolated LTRs may be targets of TRIM24 repression in the same way as full VL30 elements. TRIM24 target genes could be found in sense or antisense directions compared to the VL30 element (Fig. 4C). However, there is a strong preference for TRIM24-dependent genes to be positioned downstream of the VL30 in 93% and 86,6% for the group 2 and group 3 genes respectively (Fig. 4D). Furthermore, most of the U3 subgroups involved in these clusters are of the VL30 U3II subgroup (Fig. 4E).

Together this analysis revealed a general mode of organization of TRIM24 dependent genes which are preferentially positioned at an average distance of 64 kB downstream of a full VL30 element or an isolated VL30 LTR either in sense or antisense direction (Fig. 4F).

A distal VL30 element regulates transcription and chromatin organisation of TRIM24 target genes. To determine if a distal VL30 can modulate the transcription of neighbouring TRIM24 target genes, we chose to study the locus composed of a VL30 and the *Lcn13* and *Bmyc* genes that are up-regulated in *Trim24*^{-/-} livers. This locus conforms to the general features deduced from the statistical analysis where the two genes are located 11 and 17 kb downstream of the VL30 element (Fig. 4F and Fig. 5A). The transcription and chromatin organisation of this region were investigated at several positions designated A-I in wild-type and *Trim24*^{-/-} livers.

We reverse transcribed RNA from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3-month-old livers with hexanucleotides and performed qPCR with primer pairs at each position to quantify potential transcription independently of its polyadenylation status. The results show increased transcription in 3-month-old *Trim24*^{-/-} mice compared to wild-type at each position (C-H) between the *Lcn13* gene and the VL30, but not in the region upstream of the element (I) or upstream of *Lcn13c* (A-B) (Fig. 5B). We next performed the reverse transcription reaction with an oligo-dT primer followed by qPCR revealing the presence of one or more polyadenylated transcripts between *Bmyc* and VL30 only in TRIM24-null RNA (Fig. 5C). Reverse transcription performed with strand-specific oligonucleotides to distinguish sense or antisense transcripts showed that transcription in this region runs from the VL30 element towards the *Bmyc* and *Lcn13* genes (Fig. 5D). This suggests that, like at *Mbd1* locus, transcription initiates in the LTR, but in this case runs in an anti-sense direction to the regulated genes.

Further support for transcription in this region comes from ChIP analysis performed on chromatin from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3-month old livers. ChIP against RNA polymerase II (Pol II) showed a potent increase in its occupancy at the regulated genes but also in the region between the genes and the VL30 element in the absence of TRIM24 (Fig. 5F). Moreover, an increase in acetylated lysine 9 of histone H3 (H3K9ac) was seen throughout the locus in the TRIM24 mutant livers.

Together, the results of the RT-qPCR and ChIP assays support the idea that an anti-sense transcript(s) initiates at the VL30 element in TRIM24 hepatocytes that may be responsible for opening the locus and promoting transcription of the neighbouring *Bmyc* and *Lcn13* genes.

TRIM24, TRIM28 and TRIM33 cooperate to repress VL30 transcription. We previously reported that TRIM24, TRIM28 and TRIM33 interact physically and functionally to suppress HCC (Herquel et al., manuscript in preparation). To assess the potential involvement of TRIM28 and TRIM33 in VL30 restriction, we prepared liver RNA from mice in which expression of these TRIM proteins is selectively inactivated in hepatocytes using an Albumin-Cre transgene.

We first compared VL30 expression in *Trim24*^{-/-}, *Trim28*^{L2/L2}/*AlbCRE* and compound *Trim24*^{-/-}/*Trim28*^{L2/L2}/*AlbCRE* at 5 weeks of age. TRIM28 inactivation by itself did not affect expression of VL30 U3II elements in general (Fig. 6A). In addition, no increase in *Lcn13* expression and no anti-sense transcription at this locus was observed (corresponding to

position H, see Fig. 5A). Surprisingly, double knock-out mice showed a greater increase of VL30 U3II expression, indicating cooperativity between TRIM28 and TRIM24 for their repression, but no effect could be seen at the other U3 subgroups (data not shown).

We performed a similar analysis on *Trim33^{L2/L2}/AlbCRE* and *Trim24^{-/-}/Trim33^{L2/L2}AlbCRE* double knock-out livers (Fig. 6B). The U3II subgroup was weakly up-regulated following TRIM33 inactivation at the LTR or the *Gag*, *Pol* and *Env* genes. Expression of the *Lcn13* gene and the antisense transcript was also increased. Interestingly, transcription of the U3II element was significantly higher in the double TRIM33/TRIM24 mutant than in each of the single mutants. A similar increase was seen when the anti-sense transcript was analysed, however the increase in *Lcn13* expression was less marked.

Together, these data show that these three TRIM proteins cooperate to repress VL30 U3II expression in hepatocytes.

Discussion

Mechanisms of TRIM24 repression of VL30 activity. We show here that inactivation of TRIM24 in hepatocytes de-represses transcription from the VL30 family of retrotransposons and that both TRIM28 and TRIM33 cooperate with TRIM24 in their repression. Our results also suggest that de-repression of VL30 activity may contribute to regulation of neighbouring genes, but our results do not point to a direct role of this phenomenon in the development of HCC.

Germline and hepatocyte-specific TRIM24 inactivation both lead to de-repression of VL30 retrotransposon transcription in hepatocytes. This effect is limited to the U3II subgroup in hepatocytes, while in MEFs, our results show that the U3I and U3IV subgroups are also affected. TRIM24 inactivation therefore has cell-type specific effects. The repressive effect of TRIM24 appears to be at least in part due to its ability to repress the activity of the RARs bound to the RAREs in the U3II subgroup. The U3II subgroup comprises a DR5 type RARE and in MEFs, the expression of this subgroup is RA inducible only in the absence of TRIM24. These results strongly suggest that TRIM24 represses the activity of the RARs bound to the VL30 RARE.

In hepatocytes, the effect of RA is more difficult to evaluate due to its endogenous presence. However, de-repression of the U3II elements by TRIM24 inactivation is not reversed by the loss of a single *Rara* allele, but is significantly reduced by loss of both alleles. Thus, while the effects of RA cannot be evaluated directly *in vivo*, these observations, together with the observation that VL30 U3II activity in *Trim24*^{-/-} MEFs requires RA, argue that TRIM24 represses the activity of VL30 U3II bound RARs *in vivo* in hepatocytes.

TRIM24 functions in a complex with TRIM28 and TRIM33 (Herquel et al., manuscript in preparation). TRIM24 may therefore be recruited to other elements of the VL30 UTR by TRIM28 or TRIM33 to repress its activity by a RA-independent mechanism. Nevertheless, loss of TRIM28 or TRIM33 on their own have only minor effects on VL30 expression in hepatocytes, much less than observed with TRIM24. This suggests that it is TRIM24 that recruits the complex to the VL30 elements via the RAR. However, this model would not explain why the loss of TRIM28 and TRIM33 potentiates TRIM24 inactivation. Our results rather suggest a model whereby TRIM24 can be directly recruited via the RAR, but TRIM28 and TRIM33 are also recruited via transcription factors like KRAB-ZFPs bound to other elements of the LTR. Loss of these interactions by themselves are not sufficient to

de-repress the LTR while TRIM24 remains associated with the RAR, but can potentiate transcription, when the RAR is active in absence of TRIM24.

A recent report highlighted the strong dependency of VL30 repression on chromatin acetylation as treatment with the HDAC inhibitor TSA treatment dramatically up-regulated their expression, more so than other retrotransposons (Brunmeir et al., 2010). TRIM24 is known to repress transcription through HDAC activity (Nielsen et al., 1999), and HDACs 1 and 2 are associated with tandem affinity purified TRIM24 complexes (Herquel et al., manuscript in preparation). TRIM24 may therefore repress VL30 expression through histone de-acetylation by HDACs 1 and 2.

In MEFs, TRIM24 inactivation also de-represses the U3I and U3IV subgroups. The U3I subgroup is characterized by the presence of a DR1, that can act as a RAR/RXR and PPAR/RXR binding site. The U3IV subgroup also comprises in most cases a DR1, but it should be noted that for both of these subgroups some copies comprise an insertion in the DR1 that converts it to a DR2-type RARE. As TRIM24 is known to bind to liganded PPAR (Le Douarin et al., 1995), this may explain why TRIM24 inactivation can de-repress the U3I and U3IV subgroups irrespective of the presence of RA.

TRIM28 has been shown to have an important function in retrotransposon silencing in embryos and ES cells (Rowe et al., 2010). In particular, TRIM28 was demonstrated to bind and repress the class of endogenous retroviruses. Our results show that loss of TRIM28 does not however de-repress VL30 elements. Although TRIM28 acts as a rather general retrotransposon repressor, this is not likely to be the case for TRIM24, since its effect on VL30 is likely mediated by an RARE. It is tempting to hypothesize however that TRIM24 may function at other repeated elements possessing RAREs. In humans, for example, the widespread Alu sequences contain DR2 type RAREs (Laperrière et al., 2007), and thus may be targets for a RAR-TRIM24 complex. Hence, although VL30 elements are specific to rodents, TRIM24 is potentially involved in the silencing of retrotransposons in humans.

Does VL30 de-repression contribute to TRIM24 target gene regulation and HCC? Several observations suggest that de-repression of VL30 activity by TRIM24 inactivation may be responsible for changes in the expression of neighbouring genes. Analysis of the *Mbd1* promoter in the murine genome indicated that transcription did not initiate from the annotated start site, but from the LTR of a VL30 U3II element immediately upstream. The transcript identified by 5'RACE originates in the LTR and, is spliced at the intron 1. Only a

single transcript appears to exist at this locus, excluding the alternative possibility that a second short RNA initiates at the LTR and terminates before first *Mbd1* exon.

Although, the effect of RA on *Mbd1* transcription cannot be directly evaluated in hepatocytes, in MEFs we clearly show that maximal *Mbd1* activation requires both RA and TRIM24 inactivation. These results show that TRIM24 represses RAR function on the VL30 LTR to repress *Mbd1* transcription. Thus in this case, the VL30 LTR immediately upstream of a cellular gene becomes the dominant promoter element rendering expression of the gene dependent on the mechanisms that regulate LTR activity.

Our observations suggest a second distinct mechanism by which the VL30 retrotransposons regulate expression of cellular genes. An examination of the location of cellular genes de-regulated by TRIM24 inactivation, showed that a significant fraction were located downstream of VL30 elements. However, in the majority of these cases, the VL30 element does not act as a surrogate proximal promoter element as observed for *Mbd1*. Instead, we propose that VL30 elements may act as distant enhancer elements to regulate gene expression, or more interestingly non-coding transcripts initiated at the VL30 elements may influence the expression of neighbouring genes. In support of this latter idea, the polyadenylation signals at these LTR are known to be inefficient (French and Norton, 1997), highlighting the possibility that a transcript initiated from the LTR may alter downstream chromatin structure. Examination of the *Bmyc/Lcn13* locus provides direct evidence for this second mechanism.

Expression of *Bmyc/Lcn13* is induced upon TRIM24 inactivation (Tisserand et al., manuscript in preparation). RT-qPCR experiments show not only the enhanced transcription of these genes, but also throughout the region that lies between the genes and the VL30 element. Use of strand specific primers shows that the transcript(s) runs anti-sense with respect to the *Bmyc* gene and cannot be ascribed to a long transcript from this gene. We further show by ChIP the presence of Pol II and spread of H3K9 acetylation throughout the locus as far as the *Lcn13* gene. Together, these observations suggest upon TRIM24 inactivation, a long non-coding RNA, whose expression is driven by the RAR, initiates at the LTR and decondenses the chromatin to facilitate transcription from the two other initially repressed promoters present 20 kb downstream.

Our statistical analysis reveals that this mechanism could account for de-regulation of a subset of TRIM24 target genes downstream of VL30 elements. The spreading of chromatin remodelling over long distances is not improbable as non-coding RNA longer than 100 kb have been described (for review: Taft et al., 2009). Further experiments will be required to

demonstrate that there is indeed a single LTR initiated transcript in this locus and that it is required for *Lcn13* and *Bmyc* activation. This issue could in principle be addressed by RNA interference, using siRNAs directed against the intergenic transcript. Similarly, homologous recombination could also be used to delete the VL30 element and the effect on *Lcn13* and *Bmyc* expression evaluated.

The influence of repeated elements transcription on coding genes expression is nowadays a widely accepted concept. It is well appreciated that endogenous retroviruses are “domesticated” in our genome by mean of their repression, but can in some cases assume particular functions as, for example, providing alternative promoters for tissue-specific expression of genes (Van de Lagemaat et al., 2003). These considerations raise the question as to whether the de-repression of the VL30 elements and that of neighbouring genes contributes to HCC. Two sets of observations argue that this is not the case.

We have previously shown that hepatocyte-specific TRIM28 and TRIM33 inactivation lead to HCC. Loss of TRIM28 led to the appearance of HCC at a frequency similar to that of TRIM24, while it was less frequent upon loss of TRIM33. Loss of TRIM33, did however strongly potentiate HCC formation seen upon TRIM24 inactivation whereas, loss of TRIM28 had no significant effect. These observations show that TRIM24 strongly cooperates with TRIM33, but not TRIM28 in HCC formation.

The results obtained concerning VL30 de-repression in the double mutants reveals that TRIM28 loss alone has no effect, whereas TRIM33 inactivation had at best a weak effect. However, loss of each of these proteins potentiated the de-repression seen upon TRIM24 inactivation. TRIM28 and TRIM33 therefore cooperate with TRIM24 to repress VL30 activity. The differing profiles of cooperativity seen in HCC formation and VL30 de-repression fail therefore to reveal an obvious correlation; in particular TRIM28 inactivation has no significant effect on VL30 activity, while it elicits HCC. VL30 de-repression therefore does not appear to contribute to HCC.

This conclusion is also supported by the observation that loss of a single *Rara* allele has no effect of VL30 de-repression, while it abolishes HCC. These two observations argue that VL30 de-repression is not the primary cause of HCC, but is an independent phenomenon. Further experiments will be required to determine whether VL30 de-repression has other effects on hepatocyte function.

Acknowledgements

We thank M. Cervino for mice genotyping, L. Walsch and L. El-Fertak for technical support at the Animal House and S. Uge for sequencing. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Agence Nationale de la Recherche. B.H. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Bibliography

1. **Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R.** (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* 14:2020-2033.
2. **Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P.** (1996) A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15:6701-6715.
3. **Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de The H.** (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18:1209-1217.
4. **Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2004) TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J. Biol. Chem.* 279:48329-48341.
5. **Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R.** (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* 127:2955-2963.
6. **Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R.** (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev.* 18:2147-2160.
7. **Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2002) Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 129:2329-2337.
8. **Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scoazec JY, Losson R, Bartholin L.** (2009) Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* 5:e1000575.
9. **Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R.** (2001) Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1422-1426.
10. **Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S.** (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121:87-99.
11. **He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J.** (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125:929-941.
12. **Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, et al.** (2007) Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat. Genet.* 39:1500-1506.

13. **Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Herquel B, Ouararhni K, Losson R.** (2008) Trim24 (Tif1 alpha): an essential 'brake' for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer. *Cell Cycle* 7:3647-52.
14. **Adams SE, Rathjen PD, Stanway CA, Fulton SM, Malim MH, Wilson W, Ogden J, King L, Kingsman SM, Kingsman AJ.** (1988) Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element. *Mol. Cell. Biol.* 8:2989-98.
15. **Scolnick EM, Vass WC, Howk RS, Duesberg PH.** (1979) Defective retrovirus-like 30S RNA species of rat and mouse cells are infectious if packaged by type C helper virus. *J. Virol.* 29:964-72.
16. **Choudhuri TI, Bugge TH, Bohm S.** (1993) The long terminal repeat of VL30 retrotransposon contains sequences that determine retinoic-acid induced transcription in cultured keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 268:3251-3259.
17. **French NS, Norton JD.** (1997) Structure and functional properties of mouse VL30 retrotransposons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1352:33-47.
18. **Giri CP, Hodgson CP, Elder PK, Courtney MG, Getz MJ.** (1983) Discrete regions of sequence homology between cloned rodent VL30 genetic elements and AKV-related MuLV provirus genomes. *Nucleic Acids Res.* 11:305-19.
19. **Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, Rougemont J, Reynard S, Aktas T, Maillard PV, Layard-Liesching H, Verp S, Marquis J, Spitz F, Constam DB, Trono D.** (2010) KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature* 463:237-40.
20. **Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y.** (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464:927-31.
21. **Wolf D, Goff SP.** (2007) TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 131:46-57.
22. **Wolf D, Goff SP.** (2009) Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* 458:1201-1204.
23. **Nilsson M, Bohm S.** (1994) Inducible and cell type-specific expression of VL30 U3 subgroups correlate with their enhancer design. *J. Virol.* 68:276-88.
24. **Brunmeir R, Lager S, Simboeck E, Sawicka A, Egger G, Hagelkruys A, Zhang Y, Matthias P, Miller WJ, Seiser C.** (2010) Epigenetic regulation of a murine retrotransposon by a dual histone modification mark. *PLoS Genet.* 6:e1000927.
25. **Nielsen AL, Ortiz JA, You Y, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R.** (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* 18:6385-6395.
26. **Laperriere D, Wang TT, White JH, Mader S.** (2007) Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics.* 19 : 8:23.
27. **Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS.** (2009) Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* 220:126-39.
28. **van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P.** (2003) Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet.* 19:530-6.

Figure legends

Figure 1. Mbd1 transcription initiates in a VL30 LTR in the liver. **A.** Genomic sequence of Mbd1 promoter including VL30 3'LTR, Mbd1 exon1, intron1 and exon2. Position of the LTR is highlighted in grey, putative RARE (DR5 and DR2) and TATAbox are highlighted in red, Mbd1 exons are highlighted in yellow and +1 of translation is highlighted in blue (exon2). The transcript identified by 5'RACE is figured by underscored letters (+1: TSS). **B.** Quantification by RT-qPCR performed on wild-type versus *Trim24*^{-/-} livers. Oligos used are located 236 nucleotides downstream of the 3' LTR, in the 3 first exons and the first intron of Mbd1. Means (N=4) ± s.d. * P < 0.05

Figure 2. VL30 expression is dependent on Trim24 and Rara. **A.** Expression by RT-qPCR on wild-type, *Trim24*^{-/-} and *Trim24*^{-/-} *Rara*^{+/-} littermates of the 4 subgroups of VL30 (measured at the LTR) and of the coding phase of the U3II subgroup. **B.** Expression by RT-qPCR on *Trim24*^{L2/L2} *AlbCre*⁻, *Trim24*^{L2/L2} *AlbCre*⁺ and *Trim24*^{L2/L2} *Rara*^{L2/L2} *AlbCre*⁺ littermates of the 4 subgroups of VL30 (LTR) and the coding phase of the U3II subgroup. Means (N=4) ± s.d. * P < 0.05

Figure 3. Expression by RT-qPCR of wild-type and *Trim24*^{-/-} MEF, untreated or treated with 1µM retinoic acid (+RA), on the 4 VL30 subgroups LTR and the gene *Mbd1*. Means (N=4) ± s.d. * P < 0.05

Figure 4. Correlation between TRIM24 target gene and VL30 retrotransposon locations. **A.** Percentage of genes positioned at less than 220 kb from a VL30 retrotransposon. The control list contains 137 randomly chosen genes. Group 1 corresponds to TRIM24/RARα-dependent genes identified at 5 weeks of age. Group 2 corresponds to TRIM24 only dependent genes. Group 3 corresponds to TRIM24 target genes identified at 3 months of age. **B.** Percentage of full-length VL30 and isolated LTR identified in vicinity of a TRIM24 dependent gene. The first column represents the global percentage of full-length VL30 and isolated LTR in the genome. **C.** Position of the VL30 (upstream or downstream) compared with the corresponding TRIM24 dependent gene. **D.** Position of the TRIM24 dependent gene (upstream or downstream) compared with the proximal VL30 retrotransposon. **E.** Identification of the U3 subgroups involved in VL30-TRIM24 target genes couples in category 2 (TRIM24 only dependent genes at 5 weeks of age) and category 3 (TRIM24 dependent genes at 3 months of age). **F.** Schematic model of the organization of VL30-associated TRIM24 target genes. VL30 and TRIM24 target gene orientation are represented by black arrows, LTR sequences in 5' and 3' of the VL30 are represented by grey arrows. The indicated distance corresponds to the

mean distance calculated from all the VL30-TRIM24 target genes identified (see suppl. Table 3).

Figure 5. Enhanced expression of the *Lcn13*-VL30 locus is in TRIM24 mutant livers. **A.** Schematic representation of the *Lcn13*/B-myc/VL30 locus. Positions of primers are indicated by letters. **B-C.** RT-qPCR of both polyadenylated and non-polyadenylated transcripts throughout the *Lcn13*/*Bmyc*/VL30 locus performed on liver RNA from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3 months-old littermates. **D.** RT-qPCR of using strand-specific primers, at positions E and H. **E.** Quantification of histone H3 lysine 9 acetylation by ChIP on liver chromatin from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3 months-old littermates. Data are normalized against input and expressed as percentage. **F.** Quantification of Pol II recruitment by ChIP on liver chromatin from wild-type and *Trim24*^{-/-} 3 months-old littermates. Data are normalized against input and expressed as percentage. Means (N=4) ± s.d. * P < 0.05

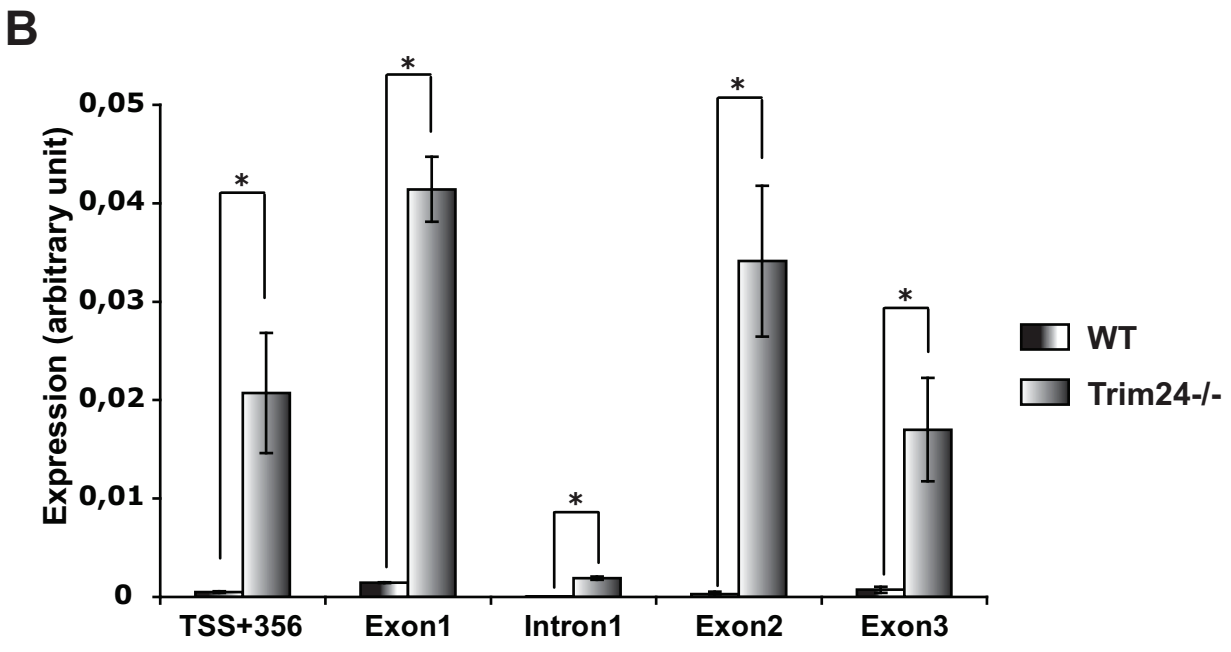
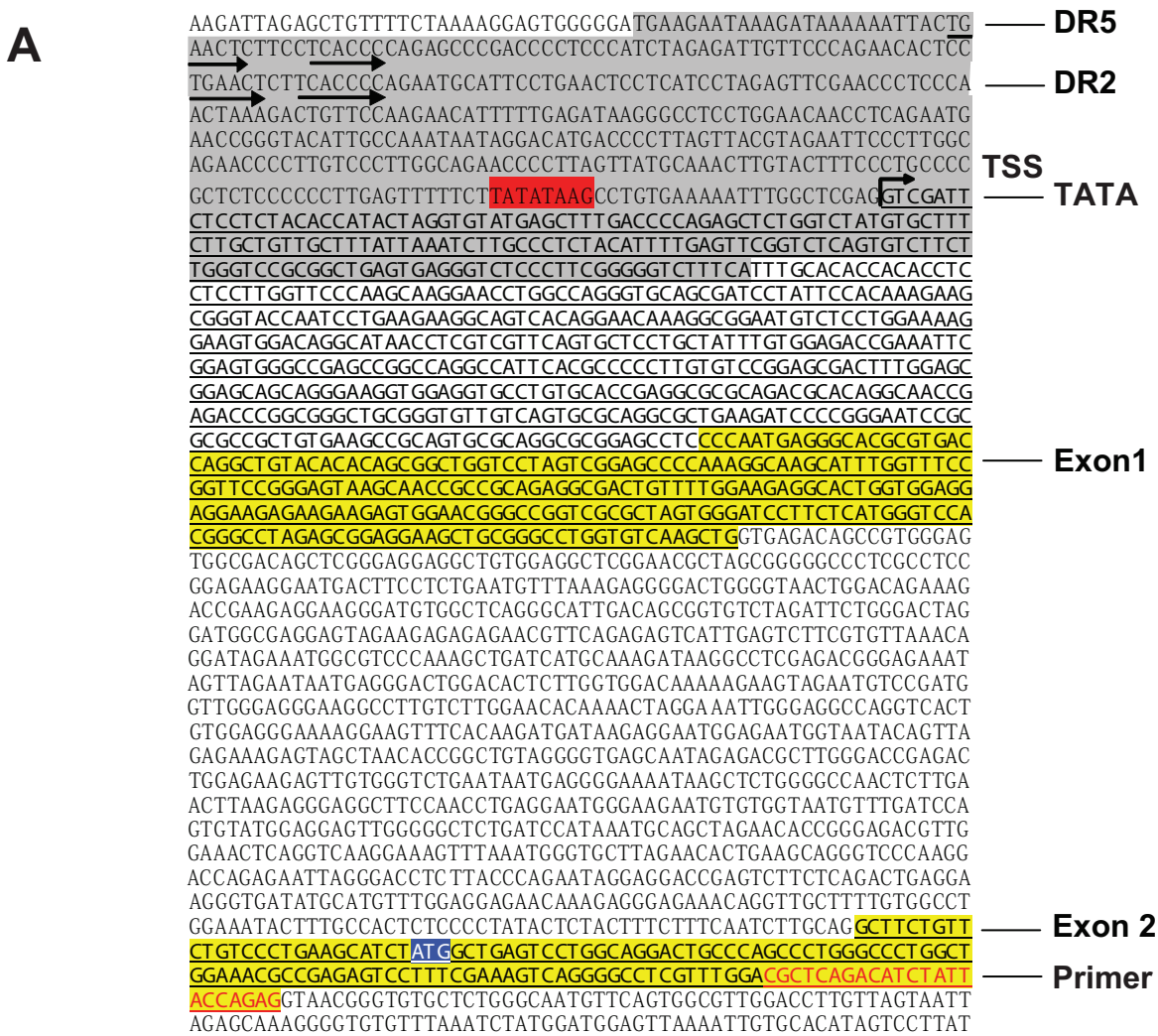
Figure 6. Quantification of VL30 and *Lcn13* expression in *Trim24*, *Trim28* and *Trim33* mutants. **A.** RT-qPCR on the 4 different VL30 subgroups, the coding phase of U3II subgroup and the *Lcn13* gene in wild-type, *Trim24*^{-/-}, *Trim28*^{L2/L2} *AlbCRE*⁺ and *Trim24*^{-/-} *Trim28*^{L2/L2} *AlbCRE*⁺ livers at 5 weeks of age. **B.** Expression by RT-qPCR of the 4 different VL30 subgroups, the coding phase of U3II subgroup and *Lcn13* in wild-type, *Trim24*^{-/-}, *Trim33*^{L2/L2} *AlbCRE*⁺ and *Trim24*^{-/-} *Trim33*^{L2/L2} *AlbCRE*⁺ livers at 5 weeks of age. Means (N=4) ± s.d. * P < 0.05

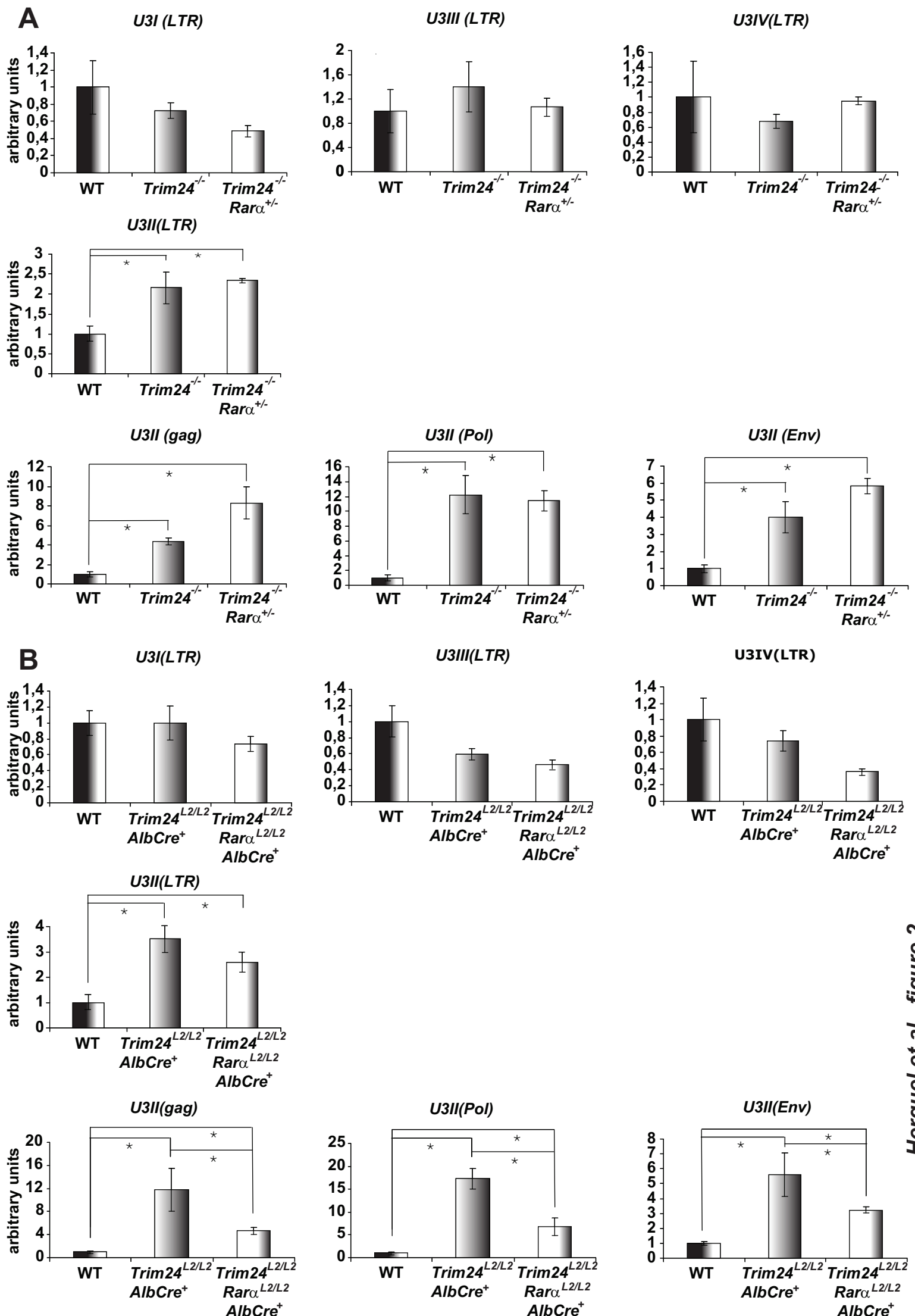
Supplemental figure 1. Subgroups of VL30 elements. Consensus sequences of the 4 subgroups of VL30. Direct repeats are figured by arrows and TATAbox are underscored. Primers used for the RT-qPCR are enclosed in frames.

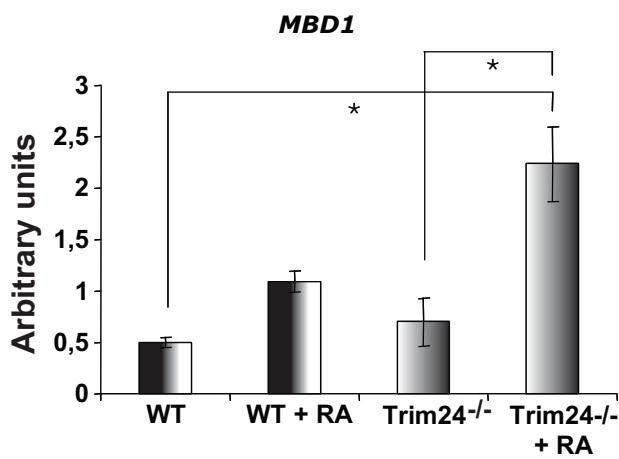
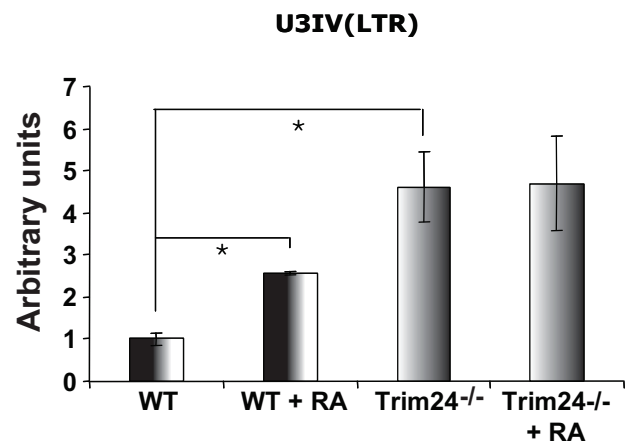
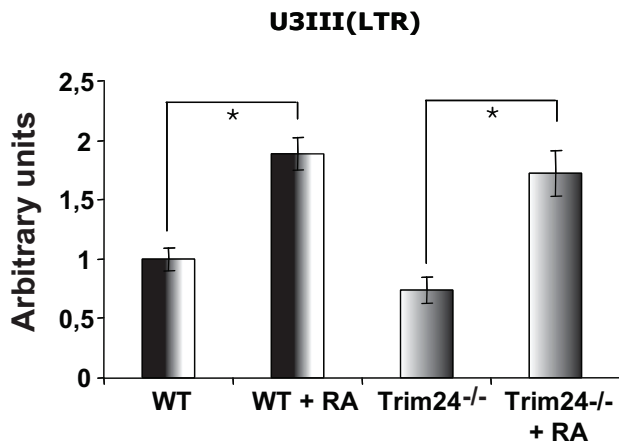
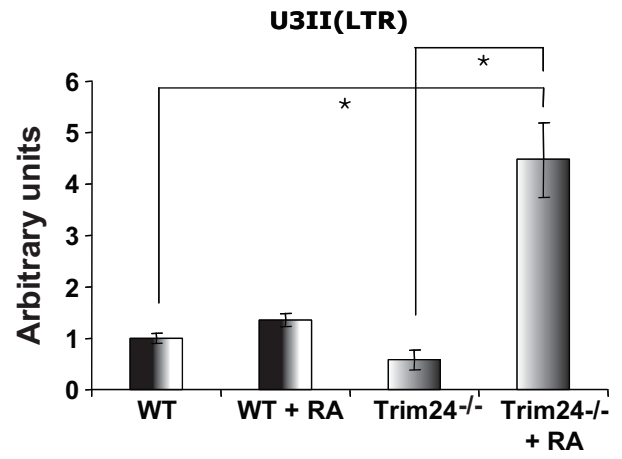
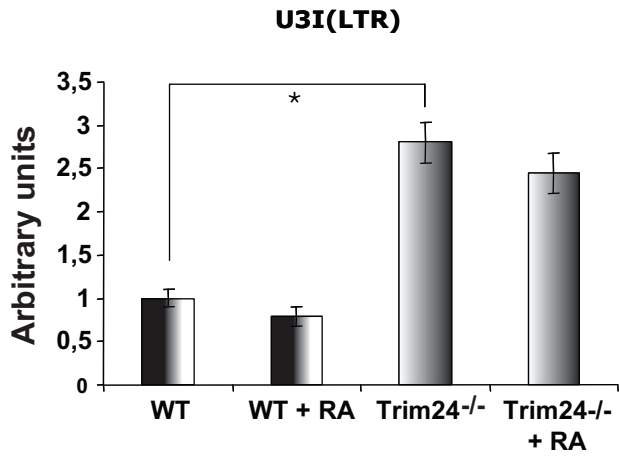
Supplemental table 1. List of the primers used in this study.

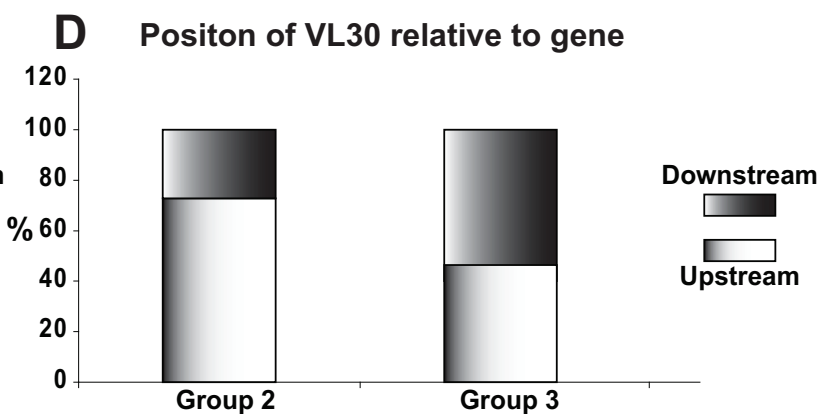
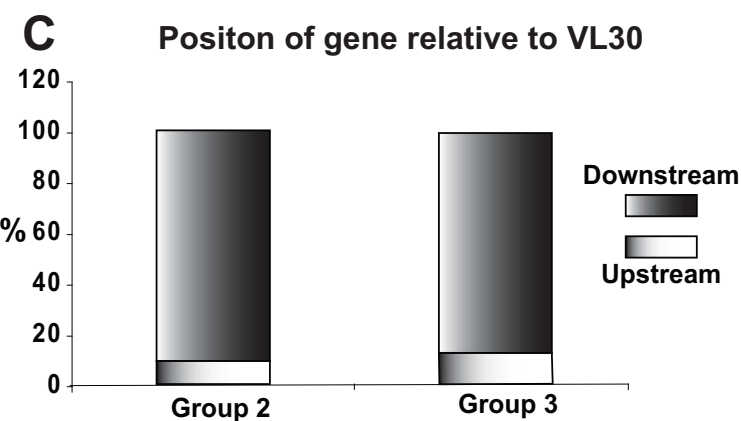
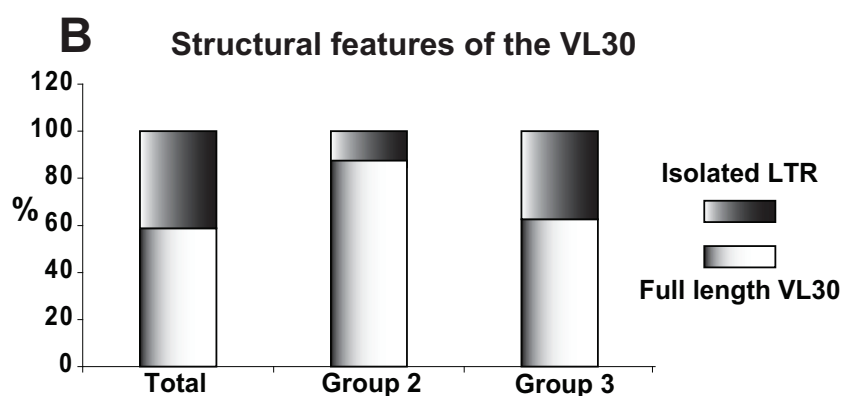
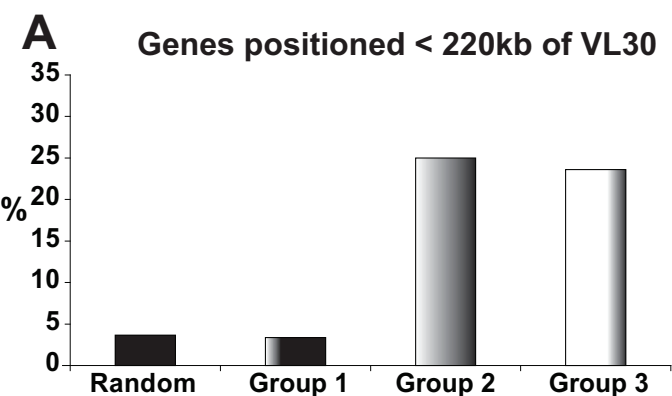
Supplemental table 2. Sequences specific for each VL30 subgroup used for the BLAST analysis.

Supplemental table 3. List of VL30-dependent genes identified by statistical analysis.







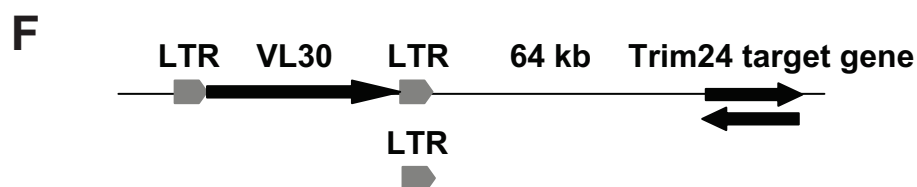


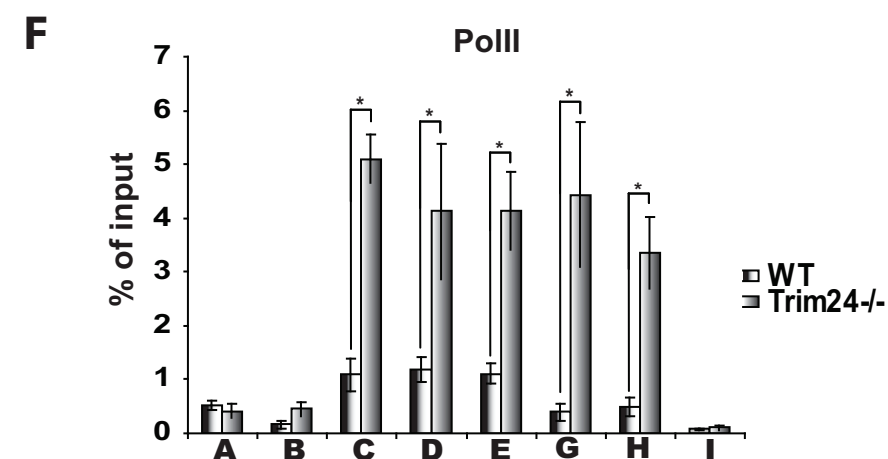
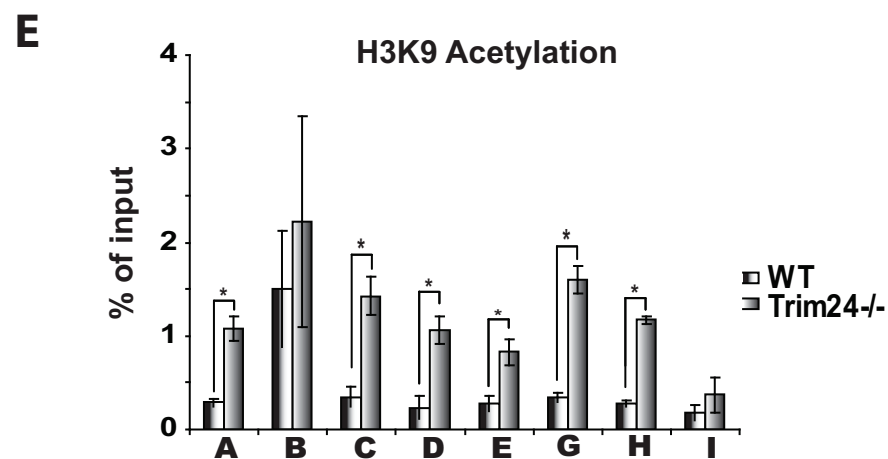
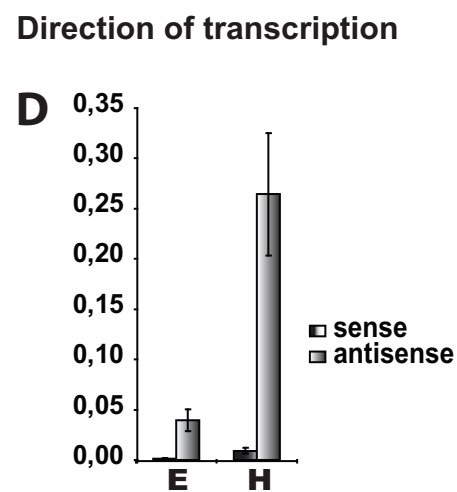
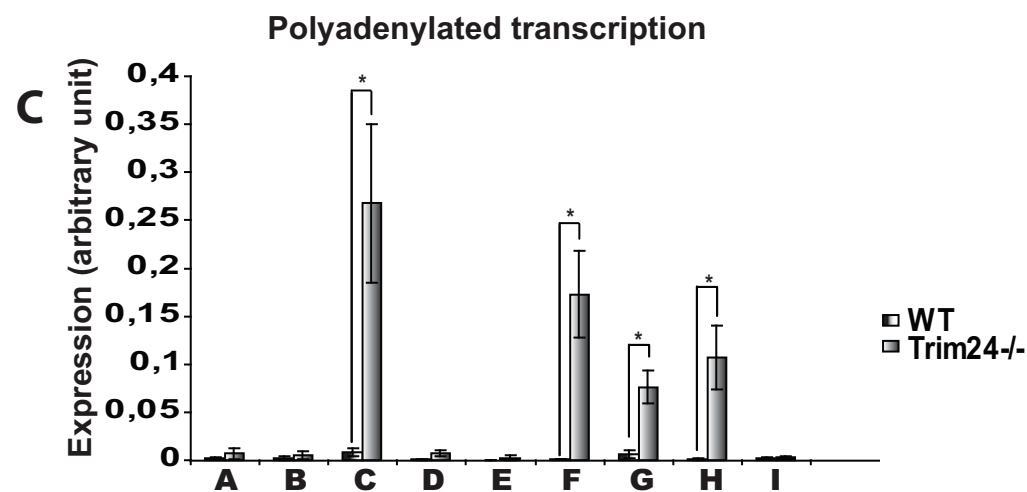
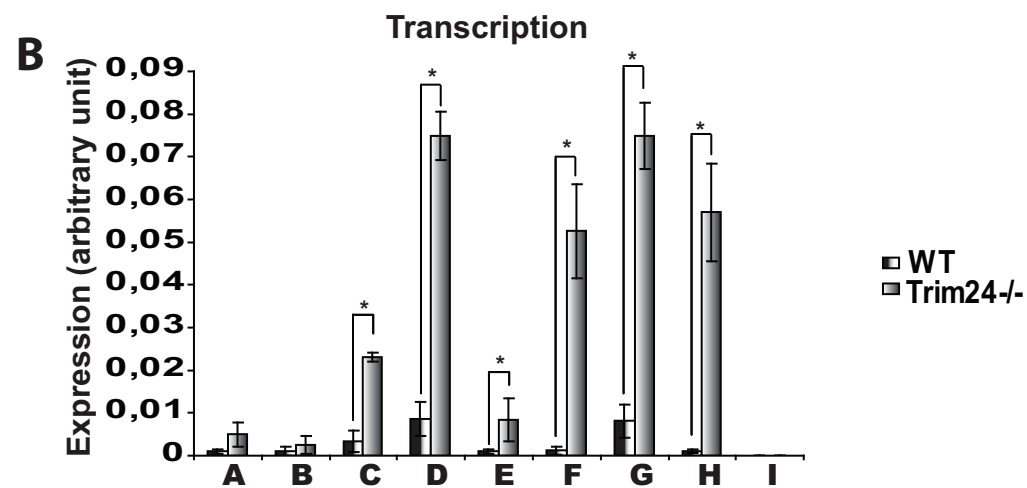
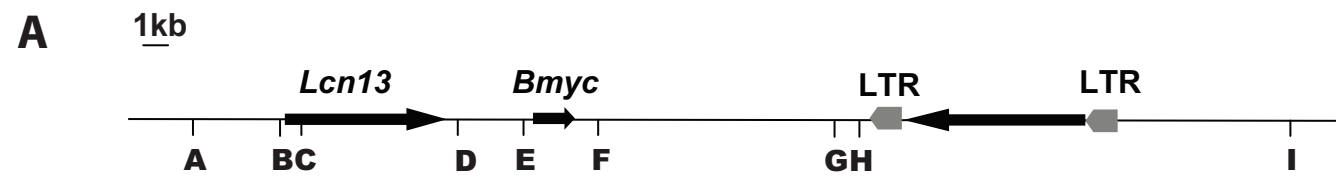
E Group 2

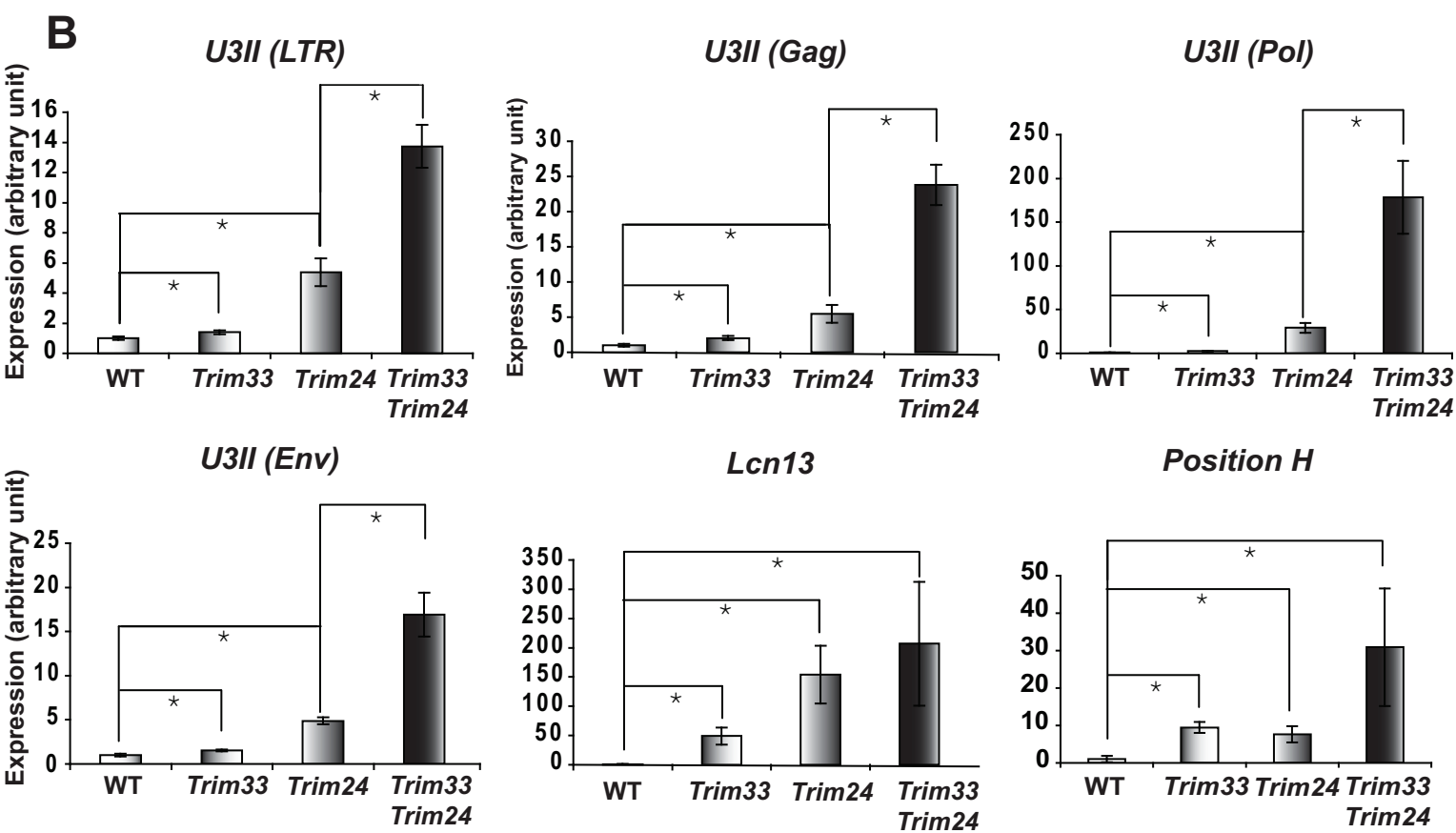
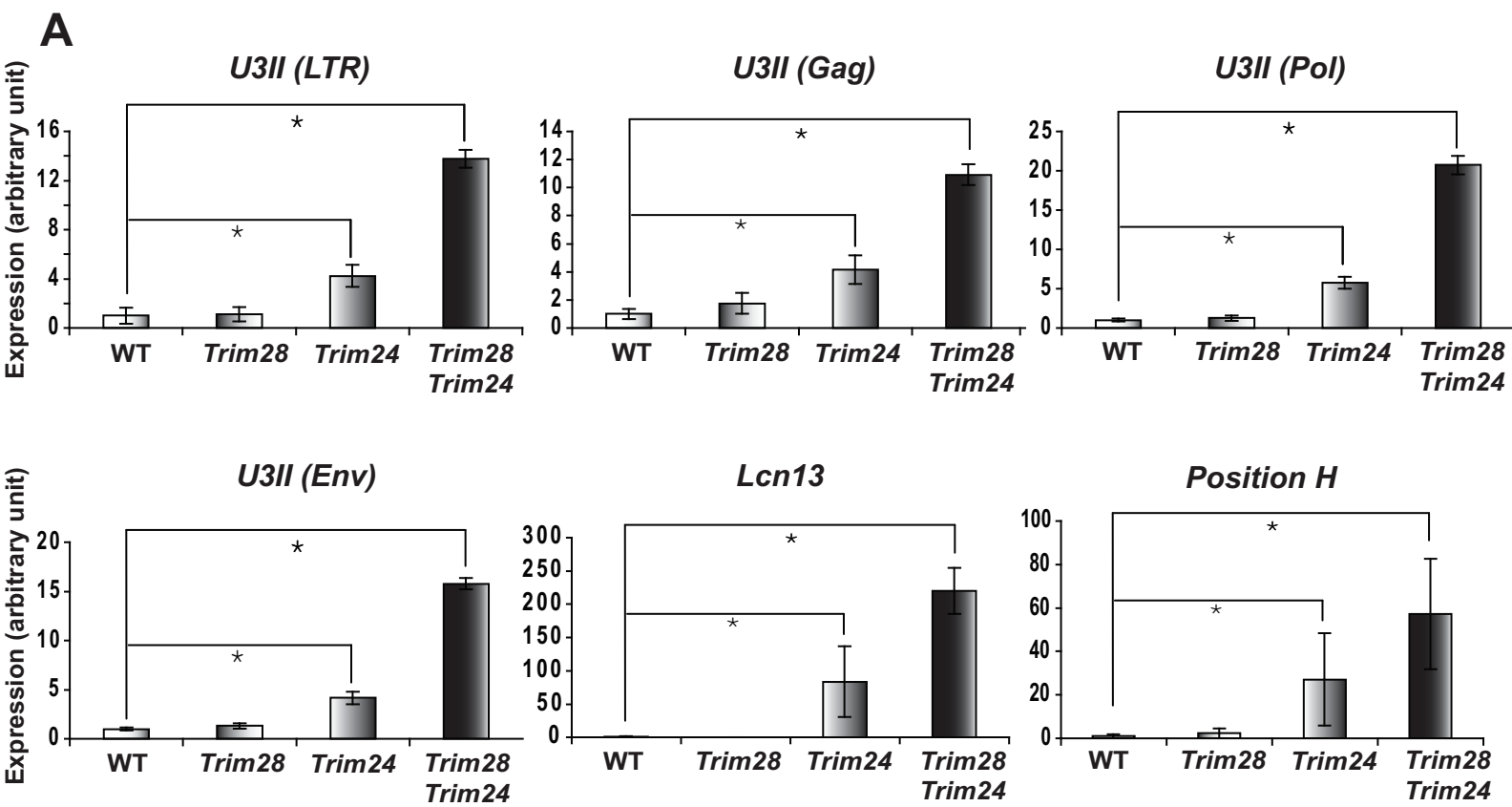
| LTR subgroup | Nbr of genes | % of genes |
|--------------|--------------|------------|
| U3I | 0 | 0,00 |
| U3II | 10 | 76,92 |
| U3III | 1 | 7,69 |
| U3IV | 2 | 15,38 |

Group 3

| LTR subgroup | Nbr of genes | % of genes |
|--------------|--------------|------------|
| U3I | 3 | 17,65 |
| U3II | 12 | 70,59 |
| U3III | 1 | 5,88 |
| U3IV | 1 | 5,88 |







U3I (U3)

5' TGA^{DR1}AAAATTACTGGCCTCTTGTAGAGACATGAAC^{DR1}TTTACCTCGGAGCCCACCCCCACCCATCTGGAAAACATACTTGAGAAAAAACATTTTC
TGAACAACCACAGAATGTTTCAACAGGCCAGATGTATTGCCAAACACAGGATATGACTCTTGGTTGAGTAAACTGTGGTTGTTGGGCTTC
CCCTGTTCCCTCCCATCCCTCCCTCCCAGTTTGTAGGTTTGTAGCCTTTAAAAGCTTGTGAAAAATTTGAGTCTTC 3'
TATA

U3II (U3)

5' TGAAGAATAAAGATAAAAAATTACTGA^{DR5}ACTCTTCCTCACCCAGAGCCCGACCCCCTCCCATCTAGAGGTTGTTCCAGAACACTCCTGA^{DR2}ACT
CTTCACCCCAGAAATGCATTCCTGA^{DR2}ACTCCTCACCCCTAGAGTTTGAACCCTCCCAACTAAAGACTGTTCCAAGAACATTTTTGAGATAAGGGCC
TCATGGAACAACCTCAGAATGAACCGGGTACATTGCCAAATAATAGGACATGACCCTTAGTTACGTAGAATTCCCTTGGCAGAACCCCTTGTCC
CTTGGCAGAACCCCTTAGTTATGCAAACCTGTACTTCCCTGCCCGCTCTCCCCCTTGAGTTTTTTCCTATATACGCCTGTGAAAAATTTTGGC
TCGAG 3'
TATA

U3III (U3)

5' TGAAGAATAGAAAAATTACTGGCCTCTTGTGAAAACATGA^{DR1}ACTTTTACCTCGGAGCCCACCCCCTCCCATCTAGAGGTTGTTCTCGGAACA
CTCCTAAAC^{DR2}CTTTTACCCCAAAACTCCTCACCCCTAAAGTTTCGACCAAGAAACATTTTTGAGATAAAGGCCTCCTGAAACAACCTCAAATGAA
CCGGGTACATTGCCAAATGATAGGACATGACTCCTTAGTTACGTAGGTTCTTGATAGGACATGACTCCTTAGTTATAGATTCCTTTGGCAGAA
CTCCCTAGTGATGTAAACTTTGTACTTCCCTGCCAGTTCTCCCCCTTTGAGTTTTACTATATAAGCCTGTGAAAAATTTGGCTGGTTCG 3'
TATA

U3IV (U3)

5' TGAAGAATGAAAAATTACTGGCCTCTTGTGAGAACATGA^{DR1}ACTTTTACCTCGGCGCCCACCCCCTCCCATCTAGAAAACATTTTTGAGATAA
AGGCCTCCTGGAACAACTC^{DR1}AAAATGACATTGCCAAATGATAAGACATGACACCTTAGTTACGTAGGTTCTTGATAGGACATGACTCCTTA
GTTACGTAGGTTCTTGATAGGACATGACTCCTTAGTTACGTAGAATCCTTTGGCAGAACCCCTTGTCCCTTGGCAGA^{DR1}ACTCCCTAGTGATG
TAACTTGTACTTCCCTGCCCTGCCAGTTCTCCCCCTTTGAGTTTTACTATATAAGCCTGTGAAAATTTGGCTGGTTCG 3'
TATA

| Gene | Primer |
|---------------------|--|
| <i>U3I (LTR)</i> | AGATGTATTGCCAAACACAGG AGGGGGAATGGGGAGGGAA |
| <i>U3II (LTR)</i> | GAACTCTTCCTCACCCAGAG GAGGAGGAGTTCAGGAATGC |
| <i>U3III (LTR)</i> | CTTTTCACCCCAAACTCCTC CATCACTAGGGAGTTCTGCCA |
| <i>U3IV (LTR)</i> | CCTCAAAATGACATTGCCAAA TTTCACAGGCTTATATAGTAAACTC |
| <i>U3II (Gag)</i> | GATTGTCAGCAGCTCTTGCA AAAGCCTCGTCCACAAGGTT |
| <i>U3II (Pol)</i> | CACTAAAACTGAGACTGCC AATCGATGCCCACTGAGTG |
| <i>U3II (Env)</i> | CAAATTTGAGCATCGGGTCC ACATCCATAGCTGCACGTAG |
| <i>A</i> | GAAGGGCCAAGACATCTGAA CAGGCAACAGGAATCATCTTT |
| <i>B</i> | CCTCTACCCGAGTTACTCAT GGAGCTGAAGGTTGTTGTTG |
| <i>C</i> | CCAAGTGCTGGTATCTCTCT AAAAGTGTGAGCACACCCGAG |
| <i>D</i> | GAATCAGGCTGGTGTCTTCC GCGTAGTCCCTGTCTGAAGC |
| <i>E</i> | CCTGGTTGGAGACATCCTGT CCAGAAAGCCATTACCTGCT |
| <i>F</i> | CTTCACCCAGGAGAAGCTGAA AATCCCAGTCACAGACC |
| <i>G</i> | GAGAGACAAGCAGAGCACCTG TGGCCTTGTTTATCTCTTCC |
| <i>H</i> | CCCAACTCTACCCTCCATA GAGAGATTTGGGAACCACCA |
| <i>I</i> | ACTGACCACAGCCAGGAGAT AGCATCCTCAGTGCTCCTGT |
| <i>Lcn13</i> | GACGTCGGTGAATGAGCACT CCGATCTCTGGCACAAACAT |
| <i>Mbd1 +236</i> | ACAAAGGCGGAATGTCTCCT CAAAGTCGCTCCGGACACAA |
| <i>Mbd1 exon1</i> | CAGAGGCGACTGTTTTGGAA CAGCTTCCTCCGCTCTAGG |
| <i>Mbd1 intron1</i> | GGGACTAGGATGGCGAGGAGT TTTGGGACGCCATTTCTATC |
| <i>Mbd1 exon2</i> | TCTGTTCTGTCCCTGAAGCA ATGTCTGAGCGTCCAAACG |
| <i>Mbd1 exon3</i> | GCCTTCTAAACCAGCCAAGA GATGCAGATGCAGACGAAG |

| VL30 subtype | Sequence (BLAST) |
|---------------------|--|
| U3I | <p>tgaaaactactggcctctgtagagacatgaacttttacctcggagcccacccccacc catctggaaaacatacttgagaaaaacattttctggaacaaccacagaatgtttcaac aggccagatgtattgccaaacacaggatatgactctttggttgagtaaactgtggtgtt gggcttcccctgttccctccccattccccctcccagtttgaggtttagcctttaaagctt gtgaaaaatttgagtcttc</p> |
| U3II | <p>tgaagaataagataaaaaattactgaactcttctcaccagagcccagaccctcc catctagaggtgttcccagaacactcctgaactctcaccagaaatgcattctgaa ctctcaccctagagttcgaaccctccaactaaagactgtccaagaacattttgaga taaggcctcatggaacaacctcagaatgaaccgggtacattgccaaataataggac atgacccttagttacgtagaattccctggcagaacccttgccctggcagaacc cttagttatgcaaaactgtacttccctgccccgctctcccccttgagttttctatata cgctgtgaaaaatttggtcggag</p> |
| U3III | <p>tgaagaatagaaaaattactggcctctgtgaaaacatgaactttacctcggagccca ccccctccatctagaggtgttctcggaaactcctaaactttcaccctaaactcct caccctaaagttcgaccaagaaacattttgagataaaggcctcctgaaacaacctcaa aatgaaccgggtacattgccaaatgataggacatgactccttagttacgtaggttcttg ataggacatgactccttagttatagattccttggcagaactcctagtgtatgtaaactg tacttccctgcccagttctcccccttgagtttactatataagcctgtgaaaaatttggc tggctg</p> |
| U3IV | <p>tgaagaatgaaaaattactggcctctgtgagaacatgaacttcacctcggagcccac ccccctccatctagaaaaattttgagataaaggcctcctggaacaacctcaaatga cattgccaaatgataagacatgacaccttagttacgtaggttcttgataggacatgact ccttagttacgtaggttcttgataggacatgactccttagttacgtagaatccttggca gaacccttgccctggcagaactcctagtgtatgtaaactgtacttccctgcccag ttctcccccttgagtttactatataagcctgtgaaaaatttggtggtc</p> |

| VL30 structure | Chr. | VL30 Coordinates | Gene | Distance (nt) | LTR position / gene | Gene position | Subgroup | Age of deregulation |
|----------------|------|------------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|----------|---------------------|
| Full-length | 2 | 25574649 | B-myc | 11810 | 3' | downstream | U3II | 5 weeks / 3 months |
| Full-length | 2 | 25574649 | Lcn13 | 16649 | 3' | downstream | U3II | 5 weeks / 3 months |
| Full-length | 4 | 120850891 | Rlf | 0 | in gene | downstream | U3II | 5 weeks / 3 months |
| Full-length | 18 | 74427000 | Mbd1 | 600 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks / 3 months |
| Full-length | 18 | 74427000 | Ccdc11 | 15000 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks / 3 months |
| Full-length | 2 | 84747372 | Slc43a3 | 28628 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Isolated LTR | 3 | 18189581 | Cyp7b1 | 46581 | 5' | upstream | U3IV | 5 weeks |
| Full-length | 4 | 146315000 | OTTMUSG00000010657 | 191000 | 5' | downstream | U3IV | 5 weeks |
| Full-length | 6 | 149173000 | 2810474019Rik | 110925 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | 8 | 28414200 | Adrb3 | 76200 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | 9 | 122757000 | ZFP445 | 18000 | 3' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | 15 | 82192965 | Cyp2d9 | 89035 | 5' | downstream | U3III | 5 weeks |
| Isolated LTR | 16 | 93822729 | Setd4 | 218000 | 3' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | 19 | 29760000 | Ermp1 | 38000 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | X | 69986000 | Gabra3 | 84000 | 5' | downstream | U3II | 5 weeks |
| Full-length | 1 | 85134000 | Csprs | 112000 | in gene | downstream | U3II | 3 months |
| Isolated LTR | 4 | 74893000 | 3110001D03Rik | 30000 | 5' | downstream | U3II | 3 months |
| Isolated LTR | 4 | 145140000 | OTTMUSG00000010173 | 75000 | 5' | downstream | U3II | 3 months |
| Full-length | 5 | 92972000 | Fam47e | 28000 | 5' | downstream | U3II | 3 months |
| Isolated LTR | 6 | 149308500 | 2810474019 | 51500 | 3' | downstream | U3I | 3 months |
| Full-length | 7 | 49771000 | BC063263 | 10000 | 5' | downstream | U3II | 3 months |
| Full-length | 8 | 4959000 | Slc10a2 | 126000 | 3' | downstream | U3II | 3 months |
| Full-length | 8 | 75778067 | Large | 121933 | in gene | downstream | U3II | 3 months |
| Isolated LTR | 17 | 15730000 | Chd1 | 112000 | 5' | upstream | U3III | 3 months |
| Isolated LTR | 17 | 21615000 | ZFP54 | 43000 | 3' | upstream | U3I | 3 months |
| Full-length | 19 | 4062000 | BC021614 | 3000 | 5' | downstream | U3I | 3 months |

Herquel et al., Supplemental table 3

Discussion et perspectives

I. Caractérisation des protéines de la famille TIF1 comme suppresseurs de tumeur dans le foie

Le carcinome hépatocellulaire est l'un des cancers les plus meurtriers avec 500.000 décès par an (Feo et al., 2006). La pathogenèse moléculaire de cette maladie n'est que partiellement connue, mais de récents progrès technologiques fournissent l'espoir d'une amélioration de la compréhension de ces mécanismes. Parmi les méthodes disponibles, l'utilisation de souris génétiquement modifiées constitue une stratégie de choix pour valider l'importance des différentes voies de signalisation dérégulées dans les CHC ainsi que pour tester différents composés pharmacologiques susceptibles de constituer de nouveaux traitements.

Les cas de *knock-out* conduisant au CHC ne sont pas très fréquents (**tableau 15**). Cette liste se voit à présent complétée par trois nouveaux cas : La délétion germinale ou hépato-spécifique de TIF1 α , et la délétion hépato-spécifique de TIF1 β et TIF1 γ . Si tous ces membres de la famille TIF1 possèdent des propriétés de suppresseur de tumeur dans le foie, seul TIF1 α a été caractérisé dans le détail, les effets de TIF1 β et TIF1 γ n'étant pour le moment décrits que par leurs propriétés communes ou synergiques avec TIF1 α .

Le phénotype des souris mutantes pour TIF1 α suit les étapes caractéristiques de la tumorigénèse : des *foci* d'altération cellulaire sont détectés chez 10% des souris mutantes à 7 mois ; l'apparition d'hépatoadénomes est d'environ 50% à 9 mois, puis, à 12 mois, 20% des souris TIF1 α ^{-/-} développent des hépatocarcinomes. Entre 19 et 29 mois, la pénétrance du phénotype devient complète et des métastases peuvent dans certains cas être détectées dans le poumon, prouvant la malignité de ces tumeurs (Khetchoumian et al., 2008).

Dans notre laboratoire, des expériences de traitement au DEN ont été menées sur des souris sauvages et TIF1 α ^{-/-}. Le protocole utilisé, consistant en une unique injection à l'âge de 2 semaines, est insuffisant pour induire l'hépatocarcinogénèse à l'âge de 7 mois chez les souris contrôles. Il est en effet établi qu'un tel protocole ne provoque la cancérisation du foie qu'au bout d'1 an, avec toutefois une forte pénétrance (Heindryckx et al., 2010). Chez les souris mutantes, cette injection aggrave considérablement le phénotype puisque 85% des souris présentent des tumeurs à 7 mois, dont 39% de CHC (Khetchoumian et al. 2008). TIF1 α possède donc un effet protecteur contre la tumorigénèse hépatique induite.

1. Dérégulation du cycle cellulaire chez les hépatocytes $TIF1\alpha^{-/-}$

Le premier défaut phénotypique observé en l'absence de $TIF1\alpha$ est une prolifération accrue des hépatocytes à partir de 3 semaines post-natales. L'hyperprolifération est un phénomène fréquent dans les événements initiaux du CHC (Laurent-Puig et Zucman-Rossi, 2006). Cette observation est en corrélation avec le fait qu'une proportion importante des suppresseurs de tumeur et oncogènes causant l'hépatocarcinogénèse chez la souris soient impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. $TIF1\alpha$ est à ajouter à cette liste de facteurs provoquant une dérégulation de l'entrée dans le cycle des hépatocytes.

Cette hyperprolifération devient détectable alors que se produit dans le foie la mise en quiescence des hépatocytes, c'est-à-dire leur entrée progressive en phase G0 du cycle cellulaire. Ces défauts ont été observés à la fois chez les souris invalidées pour $TIF1\alpha$ dans la lignée germinale et dans le cas de l'invalidation hépato-spécifique ($TIF1\alpha^{L2/L2} AlbCre^+$) démontrant que l'effet de $TIF1\alpha$ sur la prolifération est un phénomène cellulaire-autonome. En accord avec ces résultats, nous avons montré que la sur-expression de $TIF1\alpha$ dans les cellules Hepa1-6 et HepG2, dérivées respectivement d'hépatocarcinomes murins et humains, ralentissait considérablement leur croissance. L'entrée dans le cycle cellulaire de ces cellules dépend de la quantité de $TIF1\alpha$ intracellulaire : une sur-expression entraîne l'inhibition de l'entrée en phase S du cycle cellulaire et à la perte du potentiel de ces lignées à former des colonies en *soft-agar*, propriété caractéristique des cellules transformées.

L'entrée anormale dans le cycle cellulaire des hépatocytes $TIF1\alpha^{-/-}$ pourrait être le facteur déterminant de l'apparition de néoplasies dans le foie. En effet, suite à l'observation qu'un certain nombre d'agents carcinogènes étaient en réalité mitogènes pour les hépatocytes, il a été postulé que la prolifération hépatocytaire pourrait intrinsèquement constituer la cause du cancer (Ames et Gold, 1990). Une cellule en cycle produit naturellement un certain nombre de mutations lors de la réplication de son ADN, celles-ci pouvant favoriser l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs. D'autre part, le foie étant un organe de détoxification, les hépatocytes pourraient s'avérer sensible aux agents mutagènes produits par le métabolisme en particulier dans le cadre d'une prolifération anormale.

L'hypothèse alternative consiste à dire que la tumorigénèse est une conséquence de la polyploïdisation des hépatocytes. Dans le foie, les hépatocytes ont effectivement tendance à polyploïdiser, une fraction d'entre eux possède un génotype tétraploïde dès 3 mois. Les souris $TIF1\alpha^{-/-}$ accomplissent une polyploïdisation supérieure dès 14 semaines, âge où une fraction

importante d'entre eux possède un génotype 8n ou 16n (Khetchoumian et al., 2007). La polyploïdisation des hépatocytes est un phénomène décrit comme correspondant à leur entrée en sénescence. Il a été proposé que ces cellules aient la capacité d'activer les cellules progénitrices du foie, ce qui favoriserait le développement de néoplasies (Gupta, 2000).

2. Implication de TIF1 α dans le maintien de la quiescence

Nos observations sur le *knock-out* germinale démontrent que TIF1 α possède la capacité de stimuler la mise en quiescence des hépatocytes. Cette observation implique deux mécanismes potentiels parmi lesquels le *knock-out* germinale ne permet pas de faire la distinction : TIF1 α pourrait être uniquement requis au moment de cette mise en quiescence dans la période post-natale, ou bien il pourrait être garant de son maintien tout au long de la vie des hépatocytes.

Les souris invalidées spécifiquement dans les hépatocytes à l'âge adulte (*TIF1 α ^{L2/L2}/Alb-CreER^{T2+}* traitées au tamoxifène) nous permettent de confirmer cette seconde hypothèse. En effet, dans ces souris où TIF1 α est efficacement invalidé dans les hépatocytes matures, il se produit une hyperprolifération dans des proportions similaires à celles observées chez le *knock-out* hépato-spécifique (*TIF1 α ^{L2/L2}/Alb-Cre*). TIF1 α est donc nécessaire au maintien de la quiescence hépatocytaire durant toute la vie de l'animal. Son rôle au niveau du cycle cellulaire ne se limite donc pas à stimuler l'entrée en phase en G0 mais à empêcher la transition de la phase G0/G1 à la phase S du cycle cellulaire.

D'autre part, ces souris invalidées pour TIF1 α à l'âge adulte développent spontanément des CHC dans des proportions légèrement inférieures au cas de l'invalidation germinale de TIF1 α . Dans cette lignée, les hépatocytes sont anormalement proliférants et polyploïdes, il n'est donc pas surprenant que la cancérisation se produise. Les différences en termes de pénétrance peuvent trouver deux explications : Il est possible que le traitement au tamoxifène provoque la recombinaison des allèles floxés avec une efficacité inférieure à 100%, ce qui pourrait diminuer la probabilité de transformation des hépatocytes ; la seconde possibilité serait que les hépatocytes soient moins susceptibles à la perte de TIF1 α lorsqu'ils sont adultes. Cette seconde possibilité est illustrée par l'observation selon laquelle le protocole d'induction du CHC au DEN est plus efficace sur des souris jeunes que sur des adultes (Vesselinovitch et Mihailovich, 1983), ce qui serait dû aux différences de prolifération des hépatocytes.

3. Pathogenèse moléculaire

a. La voie de l'acide rétinoïque

Dans le fond génétique $TIF1\alpha^{-/-}$, l'inactivation d'une copie de $Rara$ sauve le phénotype d'hyperprolifération et d'hépatocarcinogénèse (Khetchoumian et al., 2007). L'hypothèse de travail principale pour expliquer le phénotype d'hépatocarcinogénèse des souris invalidées pour $TIF1\alpha$ est par conséquent que $RAR\alpha$ soit un pro-oncogène pour le foie.

Pour confirmer cette hypothèse, des études de transcriptomiques ont été menées au laboratoire par Johan Tisserand. Ces études ont été basées sur la comparaison de souris de 5 semaines sauvages, $TIF1\alpha^{-/-}$ et $TIF1\alpha^{-/-}Rara^{+/-}$. A cet âge, seul l'événement le plus précoce, à savoir la dérégulation du cycle cellulaire, a lieu chez le mutant.

Les résultats ont montré que la voie de l'acide rétinoïque était sur-activée (Tisserand et al., manuscrit en préparation). Un total de 42 gènes assimilés à cette voie ont été trouvés sur-exprimés uniquement chez les souris $TIF1\alpha^{-/-}$, leur expression étant inchangée chez les souris $TIF1\alpha^{-/-}Rara^{+/-}$ par rapport aux souris sauvages, ce qui démontre que la voie de l'AR est sur-activée en l'absence de $TIF1\alpha$ de façon strictement dépendante de la quantité de $RAR\alpha$.

Des travaux complémentaires menés au laboratoire ont montré que l'hyperprolifération caractéristique dans les hépatocytes invalidés pour $TIF1\alpha$ ne se produit pas après délétion biallélique hépato-spécifique de $Rara$ (souris $TIF1\alpha^{L2/L2}/Rara^{L2/L2}/Alb-CRE$), confirmant que $TIF1\alpha$ contrôle la prolifération des hépatocytes en antagonisant la voie de l'acide rétinoïque médiée par $RAR\alpha$ de façon cellulaire autonome. Confortant cette observation, l'administration d'antagonistes pan-RAR (BMS493) aboutit à une diminution de l'hyperprolifération des hépatocytes $TIF1\alpha^{-/-}$ (Khetchoumian et al., 2007). La régulation de cette voie est donc cruciale dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire et son activation pourrait constituer un événement déterminant de l'hépatocarcinogénèse.

b. Autres voies dérégulées

D'autres voies de signalisation ont été mises en évidence comme sur-activées spécifiquement chez les souris $TIF1\alpha^{-/-}$ et non-dérégulées chez les souris $TIF1\alpha^{-/-}Rara^{+/-}$:

➤ Les voies $TGF\beta$ et $IFN\gamma/STAT1$ sont considérées comme anti-oncogéniques, notamment pour le foie. En effet, la voie de l' $IFN\gamma$ peut être pro-apoptotique, notamment grâce à l'activité de son facteur de transcription $STAT1$. $STAT1$ est trouvé sous-exprimé dans

de nombreux cancers (Yoshimura et al., 2006). La voie du TGF- β est, quant à elle, retrouvée inhibée dans les phases précoces du développement de cancers du foie car elle possède des effets anti-prolifératifs. Elle est néanmoins fréquemment activée dans les phases tardives du CHC où elle promeut le potentiel métastatique de la tumeur (Dooley et al., 2009). Il est donc inapproprié d'expliquer le phénotype des souris *TIF1 α ^{-/-}* par ces dérégulations.

➤ La voie Wnt- β -caténine est, par contre, connue pour son importance prépondérante dans l'hépatocarcinogénèse. En effet, il est connu que l'oncogène le plus souvent muté dans les CHC est le gène codant pour la β -caténine (CTTNB1) et que certains régulateurs négatifs de la voie comme la protéine AXIN1 sont fréquemment retrouvés inactivés dans le CHC humain (French, 2010). D'autre part, les souris mutées pour APC, un inhibiteur majeur de cette voie, font partie des modèles d'induction spontanée du CHC (Colnot et al., 2004). La sur-activation de la voie Wnt observée chez les souris *TIF1 α ^{-/-}* est donc un excellent candidat pour expliquer le phénotype d'hyperprolifération et d'hépatocarcinogénèse spontanée.

TIF1 α pourrait réguler ces voies de manière primaire ou secondaire. Il est en effet possible que des liens directs existent entre la voie de l'AR et ces différentes voies, au contraire il est aussi possible que ces voies soient activées en réponse à l'hyperprolifération des hépatocytes, en particulier en ce qui concerne les voies anti-prolifératives mises en évidence. L'identification de potentiels sites de fixation de RAR α dans le promoteur des régulateurs de ces voies par la méthode de CHIP pourrait permettre de distinguer les cibles directes et indirectes des complexes RAR α /TIF1 α .

4. Spécificité pour le foie

Si TIF1 α est exprimé dans un grand nombre de tissus (Remboutsika et al., 1999 ; Niederreither et al., 1999), sa perte ne provoque de tumeurs qu'au niveau du foie. Cette propriété organo-spécifique est partagée par d'autres suppresseurs de tumeurs (Sherr, 2004). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette spécificité :

➤ Dans le foie, les hépatocytes ne sont pas tous quiescents à l'âge adulte, une certaine proportion continue à se diviser. D'autre part, les hépatocytes gardent leur capacité à entrer dans le cycle cellulaire, en particulier dans le cas de section chirurgicale mais aussi en cas de dommages causés aux hépatocytes. Ce phénomène, appelé « régénération hépatocytaire », permet de retrouver la masse initiale du foie après un dommage important (Fausto et al., 2006). Le foie est l'un des rares organes capables de régénération, partageant

cette propriété avec la peau ou les cellules β du pancréas. Cette propriété nécessite vraisemblablement un programme de contrôle du cycle cellulaire particulier qui pourrait expliquer la spécificité de l'effet de TIF1 α .

➤ Il existe un certain nombre de co-répresseurs des RN qui pourraient potentiellement partager des fonctions redondantes avec TIF1 α (LCOR, NSD1, PRAME, RIP140 et REA). On peut imaginer que certains de ces co-facteurs soient capables d'assumer les fonctions de TIF1 α dans des organes spécifiques ou, par exemple, au cours de l'embryogenèse. Les données issues de nos puces Affymetrix (Tisserand et al., manuscrit en préparation) indiquent que LCOR et NSD1 sont présents dans le foie, ce qui ne serait pas le cas de PRAME, REA et RIP140. Des études plus poussées d'immunohistochimie dans différents tissus devraient permettre de corréliser leur expression et l'effet de TIF1 α .

➤ Des études menées dans notre laboratoire ont démontré que la perte de TIF1 α induit la dérégulation de gènes différents d'un organe à un autre. Cette étude menée par Mihaela Ignat trouve son origine dans l'observation que les souris *TIF1 α ^{-/-}* présentent une hypercalcification artérielle rappelant le syndrome de Mönckeberg chez l'homme. Il est connu que cette pathologie dépend d'une sur-activation de la voie de la vitamine D3 au niveau du rein. Une comparaison des gènes cibles de VDR dans le rein a été entreprise sur les souris sauvages et *TIF1 α ^{-/-}*. Cette méthode a permis de montrer que ces gènes sont sur-exprimés, alors qu'ils sont inchangés dans les foies mutants (Ignat et al., 2008 ; Tisserand et al., manuscrit en préparation). TIF1 α peut donc agir sur des voies et des processus biologiques différents d'un organe à un autre grâce à sa capacité à interagir avec de multiples récepteurs nucléaires. Cette constatation explique qu'il puisse posséder des effets très différents en fonction de l'organe.

5. Un modèle valide pour l'homme ?

Quelques connexions entre TIF1 α et la cancérogenèse humaine sont connues. TIF1 α est trouvé dans plusieurs protéines de fusion oncogéniques identifiées dans des types particuliers de cancers humains, comme les cancers de la thyroïde des « enfants de Tchernobyl » (Klugbauer and Rabes, 1999), ou le syndrome myeloprolifératif (Belloni et al., 2005). De plus, le locus chromosomique de *TIF1 α* (7q32-34) a été trouvé endommagé dans des cas de leucémie lymphoblastique aiguë (Strefford et al., 2007) et de cancer de la muqueuse buccale (Liu et al., 2006). Il n'existe cependant aucune étude à l'heure actuelle démontrant que TIF1 α soit muté ou inactivé dans le CHC humain.

Les souris génétiquement modifiées ne reproduisent pas précisément la situation de cancérisation humaine. En effet, un *knock-out* germlinal est plus adapté pour modéliser un type de cancer causé par une anomalie génétique familiale puisque, dans ce cas, toutes les cellules de l'organisme comportent la mutation. Le CHC est connu pour être causé par des altérations transcriptomiques apparaissant à l'âge adulte. De ce fait, l'inactivation de TIF1 α dans les hépatocytes matures grâce à la fusion CreER^{T2} inducible au tamoxifène est un meilleur modèle. Chez ces souris, nous avons observé une complète phénocopie du mutant TIF1 α ^{-/-}, aussi bien au niveau histologique que transcriptomique, ce qui renforce l'hypothèse que nos mutants TIF1 α ^{-/-} constituent un modèle d'étude intéressant pour l'hépatocarcinogénèse humaine. Une approche de génomique fonctionnelle (Thorgeirsson et al., 2006) permettrait de comparer le profil d'expression génique des tumeurs TIF1 α ^{-/-} à ceux des CHC humains et de déterminer le sous-type de CHC humain qui correspond à notre modèle.

II. Interactions entre les protéines TIF1

1. Purification d'un complexe comprenant les différents TIF1

Au laboratoire, un projet visant à purifier les complexes liés à TIF1 α a été mis en œuvre par Khalid Ouarrhni. Le principe de cette expérience a consisté à étiqueter TIF1 α à l'aide de deux épitopes placés en 5' de la protéine afin de le purifier par deux précipitations successives.

TIF1 α a une localisation subcellulaire strictement nucléaire, et lie la chromatine avec une grande affinité (Remboutsika et al., 1999). L'expérience de purification a confirmé ces résultats : une fraction des complexes nucléaires contenant TIF1 α est liée aux histones, un nucléosome complet (H2A, H2B, H3 et H4) ayant été identifié par spectrométrie de masse.

Un certain nombre d'interactions physiques entre TIF1 α et différentes protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ont été décrites. TIF1 α est capable d'interagir avec les HDAC ainsi que les protéines HP1, protéines responsables de l'établissement et du maintien de structures de type hétérochromatinien (Nielsen et al., 1999). La purification des complexes liés à TIF1 α confirme ces interactions : les trois isotypes des HP1 ont été identifiés de même que les HDAC 1 et 2.

Les HDAC 1 et 2 sont fortement identiques en séquence et sont trouvées dans les mêmes complexes répresseurs sous forme d'hétérodimères (Sin3, NuRD, CoRest, PRC2). Il n'est donc pas étonnant que TIF1 α puisse aussi bien recruter les deux isotypes. Il existe

d'autre part une redondance fonctionnelle entre les deux HDAC illustrée par le fait que les différents KO tissus-spécifiques étudiés pour HDAC1 ou HDAC2 soient sans phénotype (pour revue : Haberland et al., 2009). L'implication des HDAC dans la répression médiée par TIF1 α est confirmée par la sur-acétylation observée au niveau du locus *Lcn13/Bmyc/VL30* dans les foies TIF1 α ^{-/-}. Si notre étude a montré une modulation de l'acétylation sur la Lysine 9 de l'histone H3, il se pourrait que d'autres lysines soient affectées puisque les HDAC1 et 2 désacétylent aussi bien les histones H3 et H4 sans montrer de spécificité de substrat marquée.

La purification des complexes liés à TIF1 α a révélé la présence abondante de deux autres membres de la famille : TIF1 β et TIF1 γ . Les deux protéines sont les partenaires de TIF1 α ayant donné le plus grand nombre d'identifications de peptides en spectrométrie de masse, suggérant qu'ils puissent être des interactants primaires de TIF1 α . En particulier, TIF1 γ est trouvé dans des proportions quasiment stoechiométriques alors que TIF1 β est généralement moins abondant. Si la possibilité que TIF1 α et TIF1 γ puissent interagir *via* leur domaine *coiled-coil* est connue (Peng et al., 2002), les deux TIF1 sont incapables d'interagir avec TIF1 β par ce domaine. L'étude citée ayant été réalisée uniquement avec les fragments RBCC des différents TIF1, elle n'exclut donc pas que TIF1 β puisse lier TIF1 α ou TIF1 γ par leur domaine central ou C-terminal.

Une séparation supplémentaire de ces complexes par l'utilisation d'un gel gradient de glycérol a permis de montrer que les pics de protéine TIF1 β et TIF1 γ sédimentent dans des fractions proches, sinon identiques. Cette méthode n'a pas permis de séparer avec certitude des sous-complexes comprenant seulement deux des trois TIF1. Une autre approche a été utilisée au laboratoire, elle consiste à purifier les complexes liés à TIF1 γ par la même méthode de TAPtag décrite précédemment. Les partenaires de TIF1 γ identifiés comprennent notamment TIF1 α et TIF1 β . Ainsi, pour s'assurer définitivement de l'architecture de ces complexes, une étape supplémentaire de purification est nécessaire : nous envisageons actuellement d'immunoprécipiter TIF1 γ sur les complexes isolés par immunoprécipitation de TIF1 α en utilisant un anticorps dirigé contre TIF1 γ endogène. La présence éventuelle de TIF1 β dans ce sous-complexe serait évaluée par Western-blot.

La présence de TIF1 β et TIF1 γ parmi les partenaires de TIF1 α implique que les HDAC et HP1 puissent être aussi bien des partenaires de l'un des trois TIF1 que des trois à la fois. Il est possible que les TIF1 aient des partenaires redondants dans le remodelage de la chromatine, mais il se peut aussi que ces partenaires soient spécifiques (par exemple un isotype particulier d'HP1 pour un TIF1 donné) entraînant ainsi un phénomène de coopération au sein de ces complexes.

2. Interactions fonctionnelles entre les TIF1

Les protéines TIF1, bien qu'elles possèdent des fonctions communes de répression transcriptionnelle, sont connues pour leur implication dans des voies de signalisation différentes. Si leurs partenaires enzymatiques sont communs (les HDAC par exemple), elles se lient à des facteurs de transcription distincts. Ainsi TIF1 α est le seul membre de la famille à avoir « hérité » de la propriété de Bonus de moduler l'activité des RN tandis que TIF1 β a suffisamment divergé au cours de l'évolution pour adopter la capacité de se lier aux facteurs de transcription à domaine KRAB, enfin TIF1 γ est impliqué dans la modulation de la voie du TGF- β par son interaction avec les facteurs de transcription SMAD. La démonstration de leur non-redondance est illustrée par la létalité embryonnaire des souris *knock-out* pour TIF1 γ (Kim et al., 2008) et TIF1 β (Cammass et al., 2000). La perte de TIF1 α n'est, par contre, pas létale au stade embryonnaire, ce qui pourrait laisser penser qu'il ne possède pas de fonction cruciale à cette étape du développement, ou bien que d'autres co-facteurs puissent prendre en charge ses fonctions de façon redondante comme TIF1 β , TIF1 γ ou bien encore d'autres co-répresseurs des RN comme RIP140 ou LCOR.

Pour comprendre la signification biologique de la présence de TIF1 β et TIF1 γ au sein des complexes liés à TIF1 α , nous avons invalidé TIF1 β et TIF1 γ spécifiquement dans les hépatocytes en croisant les lignées de souris « floxées » pour les deux gènes (Cammass et al., 2000 ; Vincent et al., 2009), et la lignée invalidée pour TIF1 α dans les hépatocytes (*TIF1 α ^{L2/L2}/Alb-CRE*). Nous avons ainsi pu comparer les mutants simples pour les trois TIF1 ainsi que les mutants composés TIF1 α /TIF1 β et TIF1 α /TIF1 γ .

Tous les mutants simples générés de cette manière développent l'hépatocarcinogénèse avec une pénétrance différente. Les plus atteints à l'âge de 14 mois sont les mutants TIF1 α , les mutants TIF1 β ont un phénotype de gravité intermédiaire, et les mutants TIF1 γ développent l'hépatocarcinogénèse le plus faiblement. Ces résultats impliquent que les trois protéines aient des fonctions spécifiques dans la suppression de tumeurs.

Le double *knock-out* TIF1 α /TIF1 β développe des tumeurs du foie avec une pénétrance équivalente au *knock-out* de TIF1 β seul, indiquant que les effets des deux TIF1 ne sont pas additifs. Dans la mesure où la perte de TIF1 α seule a plus d'effet que celle de TIF1 β , on peut imaginer que les deux protéines possèdent des gènes cibles en partie indépendants dont la dérégulation module la gravité de l'hépatocarcinogénèse. Si les gènes cibles de TIF1 α sont en nombre restreint (Tisserand et al., manuscrit en préparation) ceux de TIF1 β sont connus pour

être nettement plus nombreux (O'Geen et al., 2007). On peut donc formuler l'hypothèse selon laquelle TIF1 α et TIF1 β posséderaient un groupe restreint de gènes cibles communs alors que TIF1 β agirait sur de nombreuses autres cibles sans TIF1 α . Le phénotype d'hépatocarcinogénèse observé chez les mutants TIF1 β pourrait être moins pénétrant car ses cibles comprendraient notamment des voies anti-prolifératives ou pro-apoptotiques qui limitent la cancérisation. Des études transcriptomiques comparant les deux mutants permettraient de mieux comprendre ce phénomène.

La double délétion de *TIF1 α* et *TIF1 γ* résulte en une situation différente : TIF1 γ possède un effet moins pénétrant sur l'hépatocarcinogénèse que TIF1 α , mais le double *knock-out* est synergique. En effet, la totalité des foies double *knock-out* disséqués à 13 mois contient des dizaines de tumeurs, phénotype correspondant au phénotype des mutants TIF1 α à 24 mois. Ces différences pourraient s'expliquer par l'implication des deux co-facteurs dans des voies différentes dont chacune contribuerait au développement de l'hépatocarcinogénèse. Néanmoins, plusieurs arguments viennent contredire cette supposition. En effet, TIF1 α semble être impliqué dans la voie TGF- β puisque dans les souris mutantes *TIF1 α ^{-/-}* de 5 semaines, cette voie est sur-activée (Tisserand et al., manuscrit en préparation). D'autre part, les purifications entreprises au laboratoire des complexes liés à TIF1 γ ont clairement démontré que celui-ci est capable d'interagir avec RAR, en particulier en présence d'acide rétinoïque. Cette interaction pourrait s'avérer être indirecte. Au vu de ces données, il est tentant d'imaginer que TIF1 α et TIF1 γ soient capables d'interagir directement via le *coiled-coil* (Peng et al., 2002) et que le recrutement de TIF1 γ sur les RN soit secondaire et dépendant de TIF1 α . A l'inverse, la présence de TIF1 α semble affecter la capacité régulatrice de TIF1 γ dans la voie du TGF- β ; ceci pourrait signifier que TIF1 α possède une action sur cette voie *via* le recrutement par TIF1 γ . Ainsi, les deux TIF1 seraient capables d'affecter les mêmes voies, mais dans des proportions différentes : dans la mesure où TIF1 α serait le partenaire primaire des RN et que TIF1 γ serait le partenaire primaire des SMAD, leur perte affecterait respectivement ces voies principalement. Une nouvelle fois, cette hypothèse pourrait être confortée par des analyses de transcriptomes des souris TIF1 α et TIF1 γ , ainsi que des mutants composés.

III. Les TIF1 dans la répression des éléments transposables

1. Mécanismes de l'inhibition des éléments répétés par les co-facteurs TIF1

Le génome des eucaryotes contient une proportion considérable d'éléments répétés dont l'impact sur la biologie des cellules est actuellement mal défini (Tomilin, 2008). Il pourrait être étendu comme en témoignent certaines études : La recherche des éléments répétés présents dans les régions non-traduites de transcrits humains et de souris a mis en évidence qu'environ 20% des transcrits contiennent un élément répété dans les parties 5' ou 3' (Van de Lagemaat et al., 2003). D'autre part, 25% des promoteurs ont été montrés contenir un élément transposable (Van de Lagemaat et al., 2003). Il est donc vraisemblable que les éléments répétés soient une composante importante du contrôle de l'expression de très nombreux gènes.

Consécutivement à leur insertion, les éléments transposables sont réprimés par des mécanismes épigénétiques mettant en jeu les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN (Maksakova et al., 2008). Des expériences d'infection rétrovirales ont mis en évidence que les séquences insérées dans le génome hôte sont transcriptionnellement inactives au bout de 2 à 3 jours. Le premier évènement épigénétique se produisant est une désacétylation des histones H3 puis H4, alors que la méthylation d'H3K9, H4K20 et de l'ADN n'interviennent que bien plus tard (Pannel et al., 2000 ; Maksakova et al., 2008). La dérégulation de tels éléments peut être causée par divers mécanismes déstabilisant le caractère hétérochromatinien de l'environnement dans lequel ils se trouvent (pour revue : Maksakova et al., 2008).

La famille des protéines TIF1 comprend un membre dont l'effet sur les rétrotransposons est bien défini : TIF1 β est responsable du maintien d'une structure de type hétérochromatine sur de nombreux éléments transposables (Rowe et al., 2010 ; Matsui et al., 2010). Notre étude présentée en publication n°3 démontre l'implication des deux autres TIF1, TIF1 α et γ , dans la restriction des rétrotransposons.

a. Dépendance à l'acide rétinoïque

Cet effet est néanmoins circonscrit au cas particulier des rétrotransposons de type VL30 qui ont la particularité de posséder des RARE dans leur séquence LTR. Ces RARE sont fonctionnels comme nous l'avons montré dans les MEFs où les sous-groupes U3II, U3III et

U3IV sont inductibles par traitement au RA. Ils sont néanmoins de séquences différentes selon le sous-groupe, en effet seul le LTR de type U3II possède un DR5. Nous avons montré dans les MEFs que la perte de TIF1 α était un pré-requis à l'activation transcriptionnelle RA-dépendante de ce sous-groupe, ce qui appuie l'hypothèse qu'un complexe RAR-TIF1 α y soit recruté. Dans les hépatocytes, seul ce sous-groupe U3II est dérégulé. Comme attendu, la délétion des deux allèles de *Rara* rétablit partiellement le niveau d'expression de ces éléments sans pour autant rétablir un niveau d'expression normal. Nous pouvons vraisemblablement expliquer ce phénomène par une inactivation incomplète de *Rara* à l'âge étudié (5 semaines). Il paraît ainsi clair que la dérégulation des VL30 soit dépendante d'un complexe « classiques » RAR-TIF1 α . Néanmoins, nous avons montré que le sous-groupe U3I, qui ne possède qu'un DR1 et n'est pas inductible au RA, est régulé par TIF1 α . Cela implique la possibilité que TIF1 α puisse inhiber ce sous-groupe particulier par un recrutement dû, par exemple, au récepteur nucléaire PPAR qui est connu pour interagir avec TIF1 α en présence de ligand (Le Douarin et al., 1995).

b. Interaction fonctionnelle entre les membres de la famille TIF1

L'interaction décrite précédemment entre les protéines TIF1 suggère qu'elles puissent coopérer dans le contrôle transcriptionnel des rétrotransposons VL30. Nous avons donc comparé l'expression de ces éléments dans les fonds génétiques *knock-out* pour TIF1 α , TIF1 β et TIF1 γ ainsi que chez les doubles mutants TIF1 α /TIF1 β et TIF1 α /TIF1 γ . Nous avons ainsi pu montrer que la perte de TIF1 β est insuffisante pour affecter leur transcription. Néanmoins, dans un fond *TIF1 α ^{-/-}*, la perte de TIF1 β accentue leur dérégulation, suggérant que TIF1 β possède un effet répresseur subordonné à l'effet de TIF1 α sur ces éléments. Il semble donc que la présence des complexes répresseurs liés à TIF1 α suffise pour établir une structure répressive au niveau des VL30, l'effet des complexes répresseurs liés à TIF1 β étant secondaire. Ceci suggère que les deux co-facteurs recrutent des enzymes de remodelage de la chromatine différentes sur ces éléments. Notons que le recrutement des deux TIF1 peut se faire par des facteurs de transcription distincts puisqu'il est connu que TIF1 β puisse être lié aux rétrotransposons par une KRAB-ZFP (Wolf et Goff, 2009).

Le cas de TIF1 γ est différent dans la mesure où sa perte provoque une dérégulation modérée de l'élément VL30 de type U3II. La perte de TIF1 α a un effet nettement plus drastique et la perte des deux co-facteurs entraîne une augmentation de l'expression par rapport aux deux mutants simples. Selon l'hypothèse où les deux TIF1 feraient partie du

même complexe lié aux RN, on peut donc imaginer qu'ils soient tous deux capables d'apporter des enzymes de remodelage de la chromatine aux activités complémentaires et non redondantes. Ce modèle impliquerait d'autre part que TIF1 γ puisse être recruté au niveau du LTR en l'absence de TIF1 α . Ceci pourrait s'expliquer par sa capacité à lier TIF1 β , on peut ainsi imaginer qu'en l'absence de TIF1 α , un complexe KRAB-ZFP/TIF1 β /TIF1 γ réprime partiellement l'expression des rétrotransposons VL30.

2. Impact des rétrotransposons VL30 sur le transcriptome

Notre étude en publication n°3 démontre que la dérégulation des VL30 a un effet sur la transcription de gènes placés à proximité. Nous avons identifié un groupe composé de 26 gènes dont l'expression semble dépendre d'un VL30 dans le foie. Ces gènes sont placés à une distance moyenne d'une soixantaine de kB de leur élément régulateur et ont la particularité d'être systématiquement positionnés en aval. Pour expliquer ce phénomène, deux mécanismes distincts ont pu être mis en évidence.

a. Les rétrotransposons VL30 comme promoteurs alternatifs

Chez les souris sauvages et TIF1 $\alpha^{-/-}$, la transcription du gène *Mbd1* est initiée dans le LTR 3' d'un élément VL30. Dans ce cas, la dérégulation du gène observée aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine (résultat non publié) semble dépendre directement d'un mécanisme « canonique » de régulation transcriptionnelle impliquant un couple RAR/TIF1 α . Les séquences LTR des rétrotransposons VL30 pourraient ainsi servir de promoteurs alternatifs pour de nombreux gènes, ce qui leur conférerait une dépendance à l'acide rétinoïque.

b. Dérégulation de territoires chromatinien

Le cas observé au niveau du locus *Lcn13/Bmyc/VL30* met en évidence un mécanisme différent. Les deux gènes étant positionnés en antisens par rapport au VL30, l'hypothèse du promoteur alternatif est à exclure. Une indication cruciale est apportée par l'observation statistique démontrant que les gènes dépendants des VL30 sont systématiquement positionnés en aval de leur rétrotransposon proximal. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène serait que la transcription des VL30 ne s'arrête pas à l'extrémité 3' du LTR et

perturbe ainsi la structure chromatinienne sur plusieurs dizaines de kB. Ce phénomène est possible car les signaux de polyadénylation présents dans le LTR 3' sont connus pour être de faible efficacité (French et Norton, 1997).

Nous avons vérifié sur le locus composé des gènes *Lcn13* et *Bmyc*, que le VL30 placé à 11kB de *Bmyc* donnait effectivement naissance à un long ARN non codant. Cette transcription anormale a été corrélée à une présence accrue de la PolIII et de la marque H3K9ac dans tout le locus. Notre modèle consiste à expliquer les dérégulations des gènes *Lcn13* et *Bmyc* comme la conséquence de la transcription de ce long ARNnc : elle entraînerait en effet la sur-acétylation du locus jusqu'à une proximité suffisante des promoteurs *Lcn13* et *Bmyc* pour stimuler la décondensation de la chromatine et faciliter le recrutement du PIC sur ces gènes. Ce cas est un nouvel exemple de régulation transcriptionnelle par un long ARNnc, notion qui est en émergence depuis quelques années (pour revue Taft et al., 2009).

c. Etude globale des dérégulations VL30-dépendantes

Les deux cas décrits laissent supposer que ces mécanismes puissent être généralisés pour les 26 gènes identifiés dont la régulation semble être VL30-dépendante. Il est néanmoins possible que d'autres modes de régulation existent. La technique de séquençage à haut débit d'ARN (RNAseq) utilisée sur des hépatocytes sauvages et *TIF1α*^{-/-} devrait se révéler particulièrement informative à cet égard. En effet, il reste à savoir quelle est l'étendue de l'effet de TIF1α sur les VL30. Nous savons qu'en fonction du type cellulaire (hépatocytes et MEF) TIF1α n'a pas d'effet sur les mêmes éléments VL30. Son effet semble restreint au sous-type U3II dans le foie tandis que dans les fibroblastes, il régule les sous-types U3I, U3II et U3IV. A cette complexité s'ajoute une donnée importante : il a en effet été démontré que tous les VL30 n'ont pas la capacité d'être transcrits. L'utilisation de la trichostatine A a montré que les VL30 étaient fortement induits en l'absence d'activité HDAC ; dans cette étude, l'identification des VL30 dérégulés grâce à une technique de clonage et séquençage des transcrits a permis de montrer que seuls certains d'entre eux étaient sur-exprimés sans qu'il n'y ait de corrélation en fonction du sous-type (Brunmeir et al., 2010). Cela signifie que des facteurs probablement liés à leur position dans le génome, au contexte chromatinien et à la présence de mutations dans leur séquence les rendent ou non transcriptionnellement inductibles. L'expérience de RNAseq permettra de dire quels VL30 peuvent être dérégulés au sein de ces sous-types. En croisant ces données avec des ChIPseq de différentes modifications d'histones réalisés sur des extraits de foie, il serait sans doute possible de comprendre

l'importance du contexte chromatinien sur la compétence transcriptionnelle de ce type particulier de rétrotransposons.

Bibliographie

A

- Aasland R, Gibson TJ, and Stewart AF.** (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20:56-59.
- Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R.** (2001) Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1422-1426.
- Adams SE, Rathjen PD, Stanway CA, Fulton SM, Malim MH, Wilson W, Ogden J, King L, Kingsman SM, Kingsman AJ.** (1988) Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element. *Mol. Cell. Biol.* 8:2989-98.
- Ahn SH, Diaz RL, Grunstein M, Allis CD.** (2006) Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol. Cell* 24:211-220.
- Allton K, Jain AK, Herz HM, Tsai WW, Jung SY, Qin J, Bergmann A, Johnson RL, Barton MC.** (2009) Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:11612-6.
- Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, and Gronemeyer H.** (2007) RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6:793-810.
- Aranda A, Pascual A.** (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81:1269-304.
- Alvarez S, Germain P, Alvarez R, Rodríguez-Barrios F, Gronemeyer H, de Lera AR.** (2007) Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:1406-15.
- Ames BN, Gold LS.** (1990) Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science.* 249:970-1.
- Arkhipova IR, Pyatkov KI, Meselson M, and Evgen'ev MB.** (2003) Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nat. Genet.* 33:123-124.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, and Evans RM.** (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237 :268-275.
- Ashburner M.** (1974) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev. Biol.* 39:141-57.
- Ayyanathan K, Lechner MS, Bell P, Maul GG, Schultz DC, Yamada Y, Tanaka K, Torigoe K, Rauscher FJ 3rd.** (2003) Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* 17:1855-1869.

B

- Baek SH, Rosenfeld MG.** (2004) Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:707-14.
- Baek HJ, Kang YK, Roeder RG.** (2006) Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. *J. Biol. Chem.* 281:15172-81.

- Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, and O'Malley BW.** (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3294-3.
- Bannert N, and Kurth R.** (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 Suppl 2:14572-14579.
- Bannert N, and Kurth R.** (2006) The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:149-173.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T.** (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120-124.
- Batty E, Jensen K, Freemont P.** (2009) PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Front. Biosci.* 14:1182-96.
- Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, and Bellen HJ.** (2001) Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol. Cell* 7 :753-765.
- Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA.** (1991) The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88:3608-3612.
- Belloni E, Trubia M, Gasparini P, Micucci C, Tapinassi C, Confalonieri S, Nuciforo P, Martino B, Lo-Coco F, Pelicci PG, Di Fiore PP.** (2005) 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes. *Genes Chromosomes Cancer* 42 :320-325.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Trepo C, Hainaut P, et al.** (2008) Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 99 :143-150.
- Benoit G, Cooney A, Giguere V, Ingraham H, Lazar M, Muscat G, Perlmann T, Renaud JP, Schwabe J, Sladek F, Tsai MJ, Laudet V.** (2006) International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 58:798-836.
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES.** (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120:169-181.
- Bettermann K, Vucur M, Haybaeck J, Koppe C, Janssen J, Heymann F, Weber A, Weiskirchen R, Liedtke C, Gassler N, Müller M, de Vos R, Wolf MJ, Boege Y, Seleznik GM, Zeller N, Erny D, Fuchs T, Zoller S, Cairo S, Buendia MA, Prinz M, Akira S, Tacke F, Heikenwalder M, Trautwein C, Luedde T.** (2010) TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell* 17:481-96.
- Blomhoff R, and Blomhoff HK.** (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol* 66:606-630.
- Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, Chambon P, Gronemeyer H.** (1989) The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res.* 17:2581-95.
- Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, and Fink GR.** (1985) Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40:491-500.

- Boeke JD, Eickbush TH, Sandmeyer S, and Voytas DF.** (1999) Metaviridae. Virus Taxonomy: VIIth Report of the ICTV:359-367.
- Bogdanović O, Veenstra GJ.** (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 118:549-65.
- Bohm S, Bakke M, Nilsson M, Zanger UM, Spyrou G, Lund J.** (1993) Cooperating nonconsensus cAMP-responsive elements are mediators of adrenocorticotropin-induced VL30 transcription in steroidogenic adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 268:3952-63.
- Bourguet W, Germain P, and Gronemeyer H.** (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:381-388.
- Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, Tiollais P, and Dejean A.** (1988) Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332:850-853.
- Breuhahn K, Longerich T, and Schirmacher P.** (2006) Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:3787-3800.
- Bruck N, Vitoux D, Ferry C, Duong V, Bauer A, de Thé H, Rochette-Egly C.** (2009) A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *EMBO J.* 28:34-47.
- Brunmeir R, Lagger S, Simboeck E, Sawicka A, Egger G, Hagelkruys A, Zhang Y, Matthias P, Miller WJ, Seiser C.** (2010) Epigenetic regulation of a murine retrotransposon by a dual histone modification mark. *PLoS Genet.* 6:e1000927.
- C**
- Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R.** (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* 127:2955-2963.
- Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2002) Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J. Cell Sci.* 115:3439-3448.
- Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R.** (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev.* 18:2147-2160.
- Cammas F, Janoshazi A, Lerouge T, Losson R.** (2007) Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1beta with the heterochromatin protein HP1 isoforms during cell differentiation. *Differentiation* 75:627-637.
- Campos EI, Reinberg D.** (2009) Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet.* 43:559-99.
- Cantarini MC, Trevisani F, Morselli-Labate AM, Rapaccini G, Farinati F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegna L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M.** (2006) Effect of the etiology of viral cirrhosis on the survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 101:91-98.
- Capili AD, Schultz DC, Rauscher III FJ, Borden KL.** (2001) Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J.* 20 :165-177.
- Cavaillès V, Dauvois S, Danielian PS, and Parker MG.** (1994) Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10009-10013.

- Cavaillès V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, and Parker MG.** (1995) Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14:3741-3751.
- Chambeyron S, and Bucheton A.** (2005) I elements in *Drosophila*: in vivo retrotransposition and regulation. *Cytogenet. Genome. Res.* 110:215-222.
- Chambon P.** (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J.* 10:940-954.
- Chan HM, and La Thangue NB.** (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* 114:2363-2373.
- Chang CS, Kokontis J, and Liao ST.** (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240:324-326.
- Chang CJ, Chen YL, Lee SC.** (1998) Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 18:5880-7.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK.** (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318:444-447.
- Chen JD, and Evans RM.** (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM.** (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569-580.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR.** (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284:2174-2177.
- Choudhuri TI, Bugge TH, Bohm S.** (1993) The long terminal repeat of VL30 retrotransposon contains sequences that determine retinoic-acid induced transcription in cultured keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 268:3251-3259.
- Cohen SM, Cappello J, Lodish HF.** (1984) Transcription of *Dictyostelium discoideum* transposable element DIRS-1. *Mol. Cell. Biol.* 4:2332-2340.
- Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, Giovannini M, Perret C.** (2004) Liver-targeted disruption of *Apc* in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17216-17221.
- Columbano A, and Shinozuka H.** (1996) Liver regeneration versus direct hyperplasia. *Faseb J.* 10:1118-1128.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G.** (2000) NPS@: Network protein sequence analysis. *TIBS* 25:147-50.
- Conner EA, Lemmer ER, Omori M, Wirth PJ, Factor VM, Thorgeirsson SS.** (2000) Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene.* 19:5054-62.
- Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS.** (2008) Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology* 47:2059-2067.

Couture JF, Hauk G, Thompson MJ, Blackburn GM, Trievel RC. (2006) Catalytic roles for carbon-oxygen hydrogen bonding in SET domain lysine methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **281** :19280-19287.

D

Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* **12**:3343-3356.

David G, Terris B, Marchio A, Lavau C, Dejean A. (1997) The acute promyelocytic leukemia PML-RAR alpha protein induces hepatic preneoplastic and neoplastic lesions in transgenic mice. *Oncogene.* **14**:1547-54.

Deane NG, Parker MA, Aramandla R, Diehl L, Lee WJ, Washington MK, Nanney LB, Shyr Y, Beauchamp RD. (2001) Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice. *Cancer Res.* **61**:5389-95.

de The H, Marchio A, Tiollais P, and Dejean A. (1987) A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* **330** :667-670.

de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* **347**:558-561.

Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. (1986) Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* **322** :70-72.

Dejean A, de The H. (1990) Hepatitis B virus as an insertional mutagen in a human hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Med.* **7**:213-222.

Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. (2000) Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J. Biol. Chem.* **275**:35848-35856.

Deshaies RJ, Joazeiro CA. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:399-434.

Desmet VJ. (2009) East-West pathology agreement on precancerous liver lesions and early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**:355-7.

Dewannieux, M., Esnault, C., and Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.* **35**:41-48.

Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**:491-496.

Di Bisceglie AM, Osmack P, Brunt EM. (2005) Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: use of tamoxifen in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J. Lab. Clin. Med.* **145**:134-138.

Dilworth FJ, Chambon P. (2001) Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* **20**:3047-3054.

Dooley S, Weng H, Mertens PR. (2009) Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis.* **27**:93-101.

Duesberg PH, Scolnick EM. (1977) Murine leukemia viruses containing an approximately 30 S RNA subunit of unknown biological activity, in addition to the 38 S subunit of the viral genome. *Virology* 83:211-6.

Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S. (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121:87-99.

Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ, Piccolo S. (2009) FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136:123-35.

E

Eaton L, Norton JD. (1990) Independent regulation of mouse VL30 retrotransposon expression in response to serum and oncogenic cell transformation. *Nucleic Acids Res.* 18:2069-77.

El-Serag HB. (2004) Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 127:27-34.

Estes SD, Stoler DL, Anderson GR. (1995) Anoxic induction of a sarcoma virus-related VL30 retrotransposon is mediated by a cis-acting element which binds hypoxia-inducible factor 1 and an anoxia-inducible factor. *J. Virol.* 69:6335-41.

Evgen'ev MB, Zelentsova H, Shostak N, Kozitsina M, Barskyi V, Lankenau DH, Corces VG. (1997) Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:196-201.

Eickbush TH, Malik HS. (2002) Origins and Evolution of Retrotransposons, In Mobile DNA II, N. L. Craig, C. R. M. Gellert, and A. M. Lambowitz, eds. (Washington DC: ASM Press):1111-1144.

Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R. (2005) The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122:835-847.

Evans RM. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

F

Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. (1998) Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J. Biol. Chem.* 273:15639-15645.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. (2006) Liver regeneration. *Hepatology.* 43(2 Suppl 1):S45-53.

Fazzari MJ, Grealley JM. (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev. Genet.* 5:446-455.

Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr., Boeke JD. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87:905-916.

Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroni MR, Calvisi DF, Frau M, Pascale RM. (2006) Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim. Biophys. Acta* 2:126-47.

Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, et al. (2003) Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Cell* 11:139-150.

Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438:1116-1122.

Flajollet S, Lefebvre B, Cudejko C, Staels B, Lefebvre P. (2007) The core component of the mammalian SWI/SNF complex SMARCD3/BAF60c is a coactivator for the nuclear retinoic acid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 270:23-32.

Fondell JD, Ge H, Roeder RG. (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8329-33.

French NS, Norton JD. (1997) Structure and functional properties of mouse VL30 retrotransposons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1352:33-47.

French SW. (2010) Molecular events in hepatic preneoplasia: a review. *Exp Mol Pathol.* 88:219-24.

Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ 3rd. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* 10:2067-2078.

G

Garcia M, de The H, Tiollais P, Samarut J, Dejean A. (1993) A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor beta chimera transforms erythrocytic progenitor cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:89-93.

Garcia-Dominguez M, Reyes JC. (2009) SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim. Biophys. Acta.* 1789:451-9.

Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol. Rev.* 58:760-72.

Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.

Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM. (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91-94.

Giri CP, Hodgson CP, Elder PK, Courtney MG, Getz MJ. (1983) Discrete regions of sequence homology between cloned rodent VL30 genetic elements and AKV-related MuLV provirus genomes. *Nucleic Acids Res.* 11:305-19.

Godde JS, Ura K. (2009) Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int. J. Dev. Biol.* 53:215-24.

Goodman DS, Huang HS. (1965) Biosynthesis of Vitamin A with Rat Intestinal Enzymes. *Science* 149:879-880.

Goodwin TJ, Poulter RT, Lorenzen MD, Beeman RW. (2004) DIRS retroelements in arthropods: identification of the recently active TcDir1 element in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mol. Genet. Genomics* 272:47-56.

Govindan MV, Devic M, Green S, Gronemeyer H, Chambon P. (1985) Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 13:8293-8304.

Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Payraastre B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J. (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114:99-111.

Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA, Shiekhattar R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev.* 14:1048-57.

Gupta S. (2000) Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin. Cancer Biol.* 10:161-71.

Gurevich I, Flores AM, Aneskievich BJ. (2007) Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223:288-298.

Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J. Steroid Biochem.* 24:77-83.

Grewal SI, Jia S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8:35-46.

Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Déneraud N, Bucher P, Trono D. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* 6:e1000869.

Grüne T, Brzeski J, Eberharter A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB, Müller CW. (2003) Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol. Cell* 12:449-460.

H

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* 10:32-42.

Haigis MC, Sinclair DA. (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* 5:253-95.

Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. (1994) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264:1455-8.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

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

Happel N, Doenecke D. (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1-12.

Harrigan MT, Baughman G, Campbell NF, Bourgeois S. (1989) Isolation and characterization of glucocorticoid- and cyclic AMP-induced genes in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 9:3438-46.

Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:789-829.

Hassan YI, Zempleni J. (2008) A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr. Rev.* 66:721-5.

- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J.** (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125:929-941.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG.** (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A.** (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 278:31717-31721.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R.** (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26:5528-5540.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM.** (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635-641.
- Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR.** (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17:2735-44.
- Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, et al.** (2004) Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* 113:1774-1783.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, and et al.** (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR.** (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2104:829-838.
- Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY.** (1988) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72:567-572.
- Huang N, vom Baur E, Garnier JM, Lerouge T, Vonesch JL, Lutz Y, Chambon P, Losson R. (1998) Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. *EMBO J.* 17:3398-3412.
- Huang P, Chandra V, Rastinejad F.** (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* 72:247-72.
- Huntley S, Baggott DM, Hamilton AT, Tran-Gyamfi M, Yang S, Kim J, Gordon L, Branscomb E, Stubbs L.** (2006) A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors. *Genome Res.* 16:669-677.
- I**
- Ivarie RD, O'Farrell PH.** (1978) The glucocorticoid domain: steroid-mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins. *Cell* 13:41-55.
- Ignat M, Teletin M, Tisserand J, Khetchoumian K, Denefeld C, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2008) Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2598-2603.
- International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia.** (2009) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology* 49:658-64.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Issemann I, Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.

Itin A, Rotman G, Keshet E. (1983) Conservation patterns of mouse "virus-like" (VL30) DNA sequences. *Virology* 127:374-84.

Itokawa Y, Yanagawa T, Yamakawa H, Watanabe N, Koga H, Nagase T. (2009) KAP1-independent transcriptional repression of SCAN-KRAB-containing zinc finger proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388:689-94.

Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou MM, Rauscher FJ 3rd. (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol. Cell* 28 :823-837.

J

Jacobson HI, Gupta GN, Fernandez C, Hennix S, Jensen EV. (1960) Determination of tritium in biological material. *Arch. Biochem. Biophys.* 86:89-93.

Jakobsson J, Cordero MI, Bisaz R, Groner AC, Busskamp V, Bensadoun JC, Cammas F, Losson R, Mansuy IM, Sandi C, Trono D. (2008) KAP1-mediated epigenetic repression in the forebrain modulates behavioral vulnerability to stress. *Neuron* 60 :818-831.

Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R. (1997) The bromodomain revisited. *Trends Biochem. Sci.* 22:151-153.

Jeltsch JM, Krozowski Z, Quirin-Stricker C, Gronemeyer H, Simpson RJ, Garnier JM, Krust A, Jacob F, Chambon P. (1986) Cloning of the chicken progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 :5424-5428.

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

Jeppesen P, Turner BM. (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74:281-9.

Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. (1990) TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell.* 61:1137-46.

Juven-Gershon T, Kadonaga JT. (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.* 339:225-9.

K

Karrer P, Wehrli H, Wettstein A. (1930) über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv. Chim. Acta.* 13:1431-1436.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820-825.

Kaye JS, Pratt-Kaye S, Bellard M, Dretzen G, Bellard F, Chambon P. (1986) Steroid hormone dependence of four DNase I-hypersensitive regions located within the 7000-bp 5'-flanking segment of the ovalbumin gene. *EMBO J.* 5:277-285.

Kazazian HH Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626-1632.

- Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD.** (2003) Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat. Rev. Cancer* 3:321-329.
- Keppler B, Archer T** (2008a) Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1 *Expert Opin. Ther. Targets* 12:1301–1312.
- Keppler B, Archer T** (2008b) Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 2 *Expert Opin. Ther. Targets* 12:1457–1467.
- Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2004) TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J. Biol. Chem.* 279:48329-48341.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, et al.** (2007) Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat. Genet.* 39:1500-1506.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Herquel B, Ouararhni K, Losson R.** (2008) Trim24 (Tif1 alpha): an essential 'brake' for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer. *Cell Cycle* 7:3647-52.
- Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, Bonventre JV.** (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:15299-15304.
- Kim J, Daniel J, Espejo A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT.** (2006) Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* 7:397-403.
- Kitisin K, Ganesan N, Tang Y, Jogunoori W, Volpe EA, Kim SS, Katuri V, Kallakury B, Pishvaian M, Albanese C, et al.** (2007) Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation. *Oncogene* 26:7103-7110.
- Klugbauer S, Rabes HM.** (1999) The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 18:4388-4393.
- König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhlen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK.** (2008) Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135:49-60.
- Kornberg RD.** (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-71.
- Kornberg RD, Lorch Y.** (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285-294.
- Kouzarides T.** (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Kramerov D, Vassetzky N.** (2005) Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int. Rev. Cytol.* 247:165–221.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P.** (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5:891-897.

Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. (1989) A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5310-5314.

Kumar R, Litwack G. (2009) Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids* 74:877-83.

L

Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D. (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11:1003-13.

Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. (2006) Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 25:3778-3786.

Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* 14:2020-2033.

Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P. (1996a) A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15:6701-6715.

Le Douarin B, vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine M, Vivat V, Gronemeyer H, Losson R, Chambon P. (1996b) Ligand-dependent interaction of nuclear receptors with potential transcriptional intermediary factors (mediators). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351:569-578.

Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM. (1993) Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260:1117-21.

Lee SK, Kim JH, Lee YC, Cheong J, Lee JW. (2000) Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J. Biol. Chem.* 275:12470-4.

Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. (2004a). Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 40:667-676.

Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, Thorgeirsson SS. (2004b) Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat. Genet.* 36:1306-1311.

Lee JS, Grisham JW, Thorgeirsson SS. (2005) Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis* 26:1013-1020.

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, et al. (2006) A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* 12:410-416.

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S, et al. (1992) Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377-395.

Lenormand P, Pribnow D, Rodland KD, Magun BE. (1992) Identification of a novel enhancer element mediating calcium-dependent induction of gene expression in response to either epidermal growth factor or activation of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 12:2793-803.

- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH.** (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**:865-873.
- Levine M, Davidson EH.** (2005) Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:4936-4942.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ.** (2006) Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**:91-95.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA.** (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell Biol.* **22**:480-491.
- Libertini LJ, Ausio J, van Holde KE, Small EW.** (1988) Histone hyperacetylation. Its effects on nucleosome core particle transitions. *Biophys. J.* **53**:477-87.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL.** (2001) Snf1: a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**:1142-1146.
- Lonard DM, O'Malley BW.** (2006) The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* **125**:411-414.
- Looman C, Mark C, Abrink M, Hellman L.** (2003) MZF6D, a novel KRAB zinc-finger gene expressed exclusively in meiotic male germ cells. *DNA Cell Biol.* **22**:489-496.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E.** (1986) Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:9045-9049.
- Lowe CB, Bejerano G, Haussler D.** (2007) Thousands of human mobile element fragments undergo strong purifying selection near developmental genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:8005-8010.
- Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M.** (2007) Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* **11**:119-32.
- Lunyak VV.** (2008) Boundaries. Boundaries... Boundaries??? *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:281-7.
- M**
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC.** (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol. Cell* **20**:199-211.
- Maksakova IA, Mager DL, Reiss D.** (2008) Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell Mol Life Sci.* **65**:3329-47.
- Malik HS, Henikoff S.** (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**:882-891.
- Malik S, Roeder RG.** (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* **30**:256-263.
- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM.** (1991) A direct repeat in the cellular retinoid-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell.* **66**:555-61.

- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM.** (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6:329-44.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
- Marfella CG, Imbalzano AN.** (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat. Res.* 618:30-40.
- Markov GV, Paris M, Bertrand S, Laudet V.** (2008) The evolution of the ligand/receptor couple: a long road from comparative endocrinology to comparative genomics. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293:5-16.
- Marsden MP, Laemmli UK.** (1979) Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17:849-58.
- Martens JA, Winston F.** (2002) Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S.cerevisiae*. *Genes Dev.* 16:2231-2236.
- Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T.** (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* 24:800-12.
- Martin J, Dufour JF.** (2008) Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World. J. Gastroenterol.* 14:1720-1733.
- Martinez-Chantar ML, Corrales FJ, Martinez-Cruz LA, Garcia-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, Avila MA, Mato JM, Lu SC.** (2002) Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *Faseb J.* 16:1292-1294.
- Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Ariz U, Martinez N, Varela M, Luka Z, Capdevila A, Rodriguez J, Aransay AM, Matthiesen R, et al.** (2008) Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 47:1191-1199.
- Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr., Boeke JD, Gabriel A.** (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254:1808-1810.
- Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y.** (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464:927-31.
- Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Verkruisen RP, Groen AK, Oude Elferink RP, et al.** (1994) Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 145:1237-1245.
- Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Vadlamudi RK, Kumar R.** (2001) Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat. Cell Biol.* 3:30-7.
- McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW.** (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* 235:1214-1217

- McCormick DL, Hollister JL, Bagg BJ, Long RE.** (1990) Enhancement of murine hepatocarcinogenesis by all-trans-retinoic acid and two synthetic retinamides. *Carcinogenesis* 11:1605-1609.
- Meinke G, Sigler PB.** (1999) DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat. Struct. Biol.* 6:471-7.
- Meroni G, Diez-Roux G.** (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*. 27:1147-57.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F.** (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-763.
- Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH, Buettner R, Schüle R.** (2008) Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat. Cell Biol.* 10:53-60.
- Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel MT, Tasset D, Chambon P.** (1989) Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57:433-442.
- Miesfeld R, Okret S, Wikstrom AC, Wrangé O, Gustafsson JA, Yamamoto KR.** (1984) Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. *Nature* 312:779-781
- Miki T, Fleming TP, Crescenzi M, Molloy CJ, Blam SB, Reynolds SH, Aaronson SA.** (1991) Development of a highly efficient expression cDNA cloning system: application to oncogene isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5167-5171.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE.** (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448:553-60.
- Mínguez B, Tovar V, Chiang D, Villanueva A, Llovet JM.** (2009) Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25:186-94.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C.** (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303:343-348.
- Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS.** (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* 9:814-825.
- Moosmann P, Georgiev O, Le Douarin B, Bourquin JP, Schaffner W.** (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res.* 24:4859-4867.
- Morrison AJ, Shen X.** (2009) Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10:373-84.
- Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P, Dupont S, Losson R, Piccolo S.** (2010)

Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1{gamma} patterns the mammalian embryo. *Development* 137:2571-8.

Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-62.

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

Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM. (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26:5521-5527.

N

Nakau M, Miyoshi H, Seldin MF, Imamura M, Oshima M, Taketo MM. (2002) Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. *Cancer Res.* 62:4549-4553.

Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T. (2006) Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126:905-916.

Neumann P, Pozarkova D, Macas J. (2003) Highly abundant pea LTR retrotransposon Ogre is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Mol. Biol.* 53:399-410.

Neueglise C, Feldmann H, Bon E, Gaillardin C, Casaregola S. (2002) Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Res.* 12:930-943.

Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. (2008) Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 48:858-79.

Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, Pham TA, Dillard-Telm L, Tsai SP, Stephan JP, Stinson J, Stewart T, French DM. (2002) A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Pathol.* 160:2295-307.

Niederreither K, Remboutsika E, Gansmuller A, Losson R, Dolle P. (1999) Expression of the transcriptional intermediary factor TIF1alpha during mouse development and in the reproductive organs. *Mech. Dev.* 88:111-117.

Nielsen AL, Ortiz JA, You Y, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R. (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* 18:6385-6395.

Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* 7:729-739.

Nilsson M, Bohm S. (1994) Inducible and cell type-specific expression of VL30 U3 subgroups correlate with their enhancer design. *J. Virol.* 68:276-88.

Nilsson M, Toftgård R, Bohm S. (1995) Activated Ha-Ras but not TPA induces transcription through binding sites for activating transcription factor 3/Jun and a novel nuclear factor. *J. Biol. Chem.* 270:12210-8.

Noutsopoulos D, Markopoulos G, Koliou M, Dova L, Vartholomatos G, Kolettas E, Tzavaras T. (2007) Vanadium induces VL30 retrotransposition at an unusually high level: a possible carcinogenesis mechanism. *J. Mol. Biol.* 374:80-90.

O

Ohmura T, Columbano GL, Columbano A, Katyal SL, Locker J, Shinozuka H. (1996) 9-cis retinoic acid is a direct hepatocyte mitogen in rats. *Life Sci.* 58:211-216.

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

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-1357.

Orgel LE, Crick FH. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-7.

Ostertag EM, Kazazian HH Jr. (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 35:501-538.

Orlando V, Paro R. (1993) Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* **75**:1187-1198.

Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4:281-300.

Owen RD, Bortner DM, Ostrowski MC. (1990) ras oncogene activation of a VL30 transcriptional element is linked to transformation. *Mol. Cell. Biol.* 10:1-9.

P

Pal S, Sif S. (2007) Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J. Cell Physiol.* **213**:306-315.

Pannell, D., Osborne, C. S., Yao, S., Sukonnik, T., Pasceri, P., Karaiskakis, A., Okano, M., Li, E., Lipshitz, H. D. and Ellis, J. (2000) Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *EMBO J.* 19, 5884-5894.

Panozzo J, Bertoncini D, Miller D, Libertin CR, Woloschak GE. (1991) Modulation of expression of virus-like elements following exposure of mice to high- and low-LET radiations. *Carcinogenesis* 12:801-4.

Park DJ, Lim RW, Kim HD. (1993) Rapid induction of mouse virus-like (VL30) element transcripts by erythropoietin in murine erythroid progenitor cells. *Blood* 82:77-83.

Peña PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG. (2006) Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442:100-103.

Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, Speicher DW, Rauscher FJ 3rd. (2000) Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 295:1139-62.

Peng H, Feldman I, Rauscher FJ 3rd. (2002) Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J. Mol. Biol.* 320:629-44.

Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 13:3198-3208.

Perissi V, Rosenfeld MG. (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:542-554.

Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. (2010) Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat. Rev. Genet.* 11:109-23.

Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.

Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B. (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72-82.

Pratt WB, Toft DO. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306-60.

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* 40:41-58.

Privalsky ML. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 66:315-60.

Puopolo KM, Klinzing DC, Lin MP, Yesucevitz DL, Cieslewicz MJ. (2007) A composite transposon associated with erythromycin and clindamycin resistance in group B *Streptococcus*. *J. Med. Microbiol.* 56:947-955.

Q

Quentin Y. (1992) Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. *Nucleic Acids Res.* 20:487-493.

R

Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP. (1998) A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 12:1787-800.

Racki LR, Narlikar GJ. (2008) ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:137-44.

Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Arskog V, Tufteland KR, Breen K, Am OY, Eberharter A, Gibson TJ, Becker PB, Aasland R. (2004) Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J. Mol. Biol.* 337:773-788.

Rambaud J, Desroches J, Balsalobre A, Drouin J. (2009) TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J. Biol. Chem.* 284:14147-56.

Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, et al. (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* 2:E237.

Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol. Cell* 11, 695-707.

Reisman D, Glaros S, Thompson EA. (2009) The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28:1653-68.

Remboutsika E, Lutz Y, Gansmuller A, Vonesch JL, Losson R, Chambon P. (1999) The putative nuclear receptor mediator TIF1alpha is tightly associated with euchromatin. *J. Cell Sci.* 112:1671-1683.

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, et al. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20:2140-2151

Riclet R, Chendeb M, Vonesch JL, Koczan D, Thiesen HJ, Losson R, Cammas F. (2009) Disruption of the interaction between transcriptional intermediary factor 1{beta} and heterochromatin protein 1 leads to a switch from DNA hyper- to hypomethylation and H3K9 to H3K27 trimethylation on the MEST promoter correlating with gene reactivation. *Mol. Biol. Cell.* 20:296-305.

Ringold GM. (1985) Steroid hormone regulation of gene expression. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:529-566.

Rochette-Egly C, Chambon P. (2001) F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol. Histopathol.* 16:909-922.

Rochette-Egly C, Germain P. (2009) Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* 8;7:e005.

Rodland KD, Pribnow D, Lenormand P, Chen SL, Magun BE. (1993) Characterization of a unique enhancer element responsive to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and elevated calcium. *Mol. Endocrinol.* 7:787-96.

Roeder R. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Letters* 579:909-915.

Rogler CE, Yang D, Rossetti L, Donohoe J, Alt E, Chang CJ, Rosenfeld R, Neely K, Hintz R. (1994) Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 269:13779-84.

Rooney JW, Calame KL. (2001) TIF1beta functions as a coactivator for C/EBPbeta and is required for induced differentiation in the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 15:3023-38.

Rotman G, Itin A, Keshet E. (1984) 'Solo' large terminal repeats (LTR) of an endogenous retrovirus-like gene family (VL30) in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* 12:2273-82.

Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, Rougemont J, Reynard S, Aktas T, Maillard PV, Layard-Liesching H, Verp S, Marquis J, Spitz F, Constam DB, Trono D. (2010) KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature* 463:237-40.

Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, Rauscher FJ 3rd. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell Biol.* 19:4366-4378.

S

Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. (2006) Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl. Cell Differ.* 41:127-148.

Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, LaRochelle WJ. (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* 7:1513-23.

Salem AH, Ray DA, Xing J, Callinan PA, Myers JS, Hedges DJ, Garber RK, Witherspoon DJ, Jorde LB, Batzer MA. (2003) Alu elements and hominid phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:12787-12791.

- Sanchez R, Zhou MM.** (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12:659-65.
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL.** (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-8.
- Santoni-Rugiu E, Preisegger KH, Kiss A, Audolfsson T, Shiota G, Schmidt EV, Thorgeirsson SS.** (1996) Inhibition of neoplastic development in the liver by hepatocyte growth factor in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9577-82.
- Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B.** (1986) The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-640.
- Schiff R, Itin A, Keshet E.** (1991) Transcriptional activation of mouse retrotransposons in vivo: specific expression in steroidogenic cells in response to trophic hormones. *Genes Dev.* 5:521-32.
- Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M.** (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 18:1263-1271.
- Schultz DC, Friedman JR, Rauscher III FJ.** (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.* 15:428-443.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ.** (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* 16:919-932.
- Schwartz YB, Pirrotta V.** (2008) Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:266-273.
- Seol W, Choi HS, Moore DD.** (1996) An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272:1336-9.
- Scolnick EM, Vass WC, Howk RS, Duesberg PH.** (1979) Defective retrovirus-like 30S RNA species of rat and mouse cells are infectious if packaged by type C helper virus. *J. Virol.* 29:964-72.
- Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, Dadgar S, Bottazzi ME, Ghedin E, Pumfery A, Kashanchi F.** (2004) Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front. Biosci.* 9:2388-413.
- Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M.** (2009) Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 136:2304-2315.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M.** (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852.
- Sherr CJ.** (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-46.
- Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thippavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Lusk AJ.** (2006) Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. *Oncogene* 25:3528-3536.

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

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O. (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**:96-99.

Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M. (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**:221-232.

Sikorski TW, Buratowski S. (2009) The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**:344-51.

Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. (2004) Retinoic acid receptors and cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **24**:201-221.

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**:194-8.

Sripathy SP, Stevens J, Schultz DC. (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.* **26**:8623-8638.

Srivastava M, Montagna C, Leighton X, Glasman M, Naga S, Eidelman O, Ried T, Pollard HB. (2003) Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7(+/-) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:14287-14292.

Strefford JC, Worley H, Barber K, Wright S, Stewart AR, Robinson HM, Bettney G, van Delft FW, Atherton MG, Davies T, et al. (2007) Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* **26**:4306-4318.

Stokes DG, Tartof KD, Perry RP. (1996) CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**:7137-7142.

Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* **279**:27816-27823.

T

Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. (2009) Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* **220**:126-39.

Talbert PB, Henikoff S. (2010) Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**:264-75.

Thomas MC, Chiang CM. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**:105-178.

Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E, Chambon P. (1990) Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* **62**:1177-1187.

Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**:1025-1040.

- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K.** (1997) High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* 7:713-716.
- Teysier C, Ou CY, Khetchoumian K, Losson R, Stallcup MR.** (2006) Transcriptional intermediary factor 1alpha mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.* 20:1276-1286.
- Thiesen HJ, Bellefroid E, Revelant O, Martial JA.** (1991) Conserved KRAB protein domain identified upstream from the zinc finger region of Kox 8. *Nucleic Acids Res.* 19:3996.
- Thompson CC, Bottcher MC.** (1997) The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8527-8532.
- Tian C, Xing G, Xie P, Lu K, Nie J, Wang J, Li L, Gao M, Zhang L, He F.** (2009) KRAB-type zinc-finger protein Apak specifically regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 11:580-591.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW.** (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 31:339-346.
- Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW.** (2006) Functional genomics of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43:145-150.
- Tomilin NV.** (2008) Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays.* 30:338-48.
- Tönjes RR, Löhler J, O'Sullivan JF, Kay GF, Schmidt GH, Dalemans W, Pavirani A, Paul D.** (1995) Autocrine mitogen IgEGF cooperates with c-myc or with the Hcs locus during hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Oncogene.* 10:765-8.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P.** (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487.
- Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG.** (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387:677-684.
- Torres-Padilla ME, Zernicka-Goetz M.** (2006) Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote. *J. Cell Biol.* 174:329-338.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y.** (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439:811-816.
- Turner BM.** (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* 75:5-8.
- Tzavaras T, Eftaxia S, Tavoulari S, Hatzi P, Angelidis C.** (2003) Factors influencing the expression of endogenous reverse transcriptases and viral-like 30 elements in mouse NIH3T3 cells. *Int. J. Oncol.* 23:1237-43.
- U**
- Umesono K, Evans RM.** (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57:1139-46.
- Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J.** (2000) A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J. Biol. Chem.* 275:40463-40470.

Urrutia R. (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* 4:231.

V

van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. (2003) Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet.* 19:530-6.

Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de The H. (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18:1209-1217.

Vesselinovitch SD, Mihailovich N. (1983) Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.* 43:4253-9.

Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scoazec JY, Losson R, Bartholin L. (2009) Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* 5:e1000575.

Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen HJ. (1995). Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Lett.* 369:153-157.

Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15:3667-3675.

vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. (1996) Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* 15:110-124.

W

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* 23:62-66.

Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM. (2001) Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 153:1023-34.

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

Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ 3rd, Chen J. (2005) MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J.* 24:3279-3290.

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y. (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* 22:383-394.

Wang C, Rauscher FJ 3rd, Cress WD, Chen J. (2007) Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *J. Biol. Chem.* 282:29902-29909.

Weake VM, Workman JL. (2010) Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 11:426-37.

- Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2002) Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 129:2329-2337.
- Weill JD, Busch S, Chambon P, Mandel P.** (1963) The effect of estradiol injections upon chicken liver nuclei ribonucleic acid polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10:122-6.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Ong ES, Harmon JM, Brower ST, Cidlowski J, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM.** (1985) Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228:740-742.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM.** (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324:641-646.
- Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, McInerney EM, Rose DW, Milburn MV, Rosenfeld MG, Glass CK.** (1998) Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395:199-202.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, et al.** (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* 8:973-982.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I.** (2009) HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* 277:8-21.
- Wolf D, Goff SP.** (2007) TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 131:46-57.
- Wolf D, Cammas F, Losson R, Goff SP.** (2008) Primer binding site-dependent restriction of murine leukemia virus requires HP1 binding by TRIM28. *J. Virol.* 82:4675-4679.
- Wolf D, Goff SP.** (2009) Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* 458:1201-1204.
- Wolffe AP, Pruss D.** (1996) Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84:817-819.
- Wong CM, Ng IO.** (2008) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 28:160-174.
- Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS.** (1997) Characterization of the CHD family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:11472-11477.
- Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, Lu J, Qi HH, Wang W, Nickoloff JA, Wu C, Shi Y.** (2007) A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1165-72.

X

- Xie X, Mikkelsen TS, Gnirke A, Lindblad-Toh K, Kellis M, et al.** (2007) Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:7145-7150.
- Xu Z, Chen L, Leung L, Yen TS, Lee C, Chan JY.** (2005) Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:4120-4125.
- Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W.** (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* 2:851-861.

Y

Yamamoto KR. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19:209-252.

Yan TD, Wu H, Zhang HP, Lu N, Ye P, Yu FH, Zhou H, Li WG, Cao X, Lin YY, He JY, Gao WW, Zhao Y, Xie L, Chen JB, Zhang XK, Zeng JZ. (2010) Oncogenic potential of retinoic acid receptor-gamma in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 70:2285-95.

Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10626-31.

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* 11:3681-94.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13:335-40.

Yoshida Y, Nakamura T, Komoda M, Satoh H, Suzuki T, Tsuzuku JK, Miyasaka T, Yoshida EH, Umemori H, Kunisaki RK, et al. (2003) Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes Dev.* 17:1201-1206.

Yoshimura A. (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.* 97, 439-447

Z

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-corsi P, Camerino G. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372:635-41.

Zender L, Villanueva A, Tovar V, Sia D, Chiang DY, Llovet JM. (2010) Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 52:921-9.

Zeng L, Yap KL, Ivanov AV, Wang X, Mujtaba S, Plotnikova O, Rauscher FJ 3rd, Zhou MM. (2008) Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:626-633.

Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ. (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1070-6.

Zhou MM. (2008) Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:626-633.

Zhong S, Delva L, Rachez C, Cenciarelli C, Gandini D, Zhang H, Kalantry S, Freedman LP, and Pandolfi PP. (1999) A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins. *Nat. Genet.* 23:287-295.

Zhou W, Zhu P, Wang J, Pascual G, Ohgi KA, Lozach J, Glass CK, Rosenfeld MG. (2008) Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell* 29:69-80.

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

Zucman-Rossi, J., and Laurent-Puig, P. (2007) Genetic diversity of hepatocellular carcinomas and its potential impact on targeted therapies. *Pharmacogenomics* 8:997-1003.

Annexes

Publication

Revue I : Trim24 (Tif1 alpha) : Un frein essentiel à l'induction de la transcription par l'acide rétinoïque qui inhibe le cancer du foie.

Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, **Herquel B**, Ouararhni K, Losson R.

Cell Cycle (2008)

Volume 7 : pages 3647-3652.

Perspective

Trim24 (Tif1 α)

An essential 'brake' for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer

Konstantin Khetchoumian,[†] Marius Teletin, Johan Tisserand, Benjamin Herquel, Khalid Ouararhni and Régine Losson*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC); Department of Functional Genomics; CNRS/INSERM/ULP; Illkirch France

[†]Current address: Laboratoire de Génétique Moléculaire; Institut de recherches cliniques de Montréal (IRC); Quebec Canada

Key words: retinoic acid receptor alpha, TRIM24/TIF1 α , transcriptional repression, knockout, hepatocarcinogenesis, proliferation, quiescence, mouse model

Retinoic acid (RA), the active derivative of vitamin A, is an important signaling molecule that controls various developmental processes and influence the proliferation and differentiation of a variety of cell types. RA exerts its biological functions primarily through binding to and activating nuclear RA receptors (RARs, which include the RAR α , β and γ isotypes RARA, RARB and RARC). Aberrant expression or impaired function of these nuclear receptors has been linked to diverse types of cancer. RARs are RA-dependent transcription factors that regulate gene expression through the recruitment of different co-regulators (co-activators and co-repressors). TRIM24 (formerly known as TIF1 α) was among the first co-regulators identified as interacting with RARs in a ligand-dependent fashion, and it was recently shown to function in mice as a potent liver-specific tumor suppressor by attenuating Rara-mediated transcription. The fact that *Trim24*^{-/-}, but not *Trim24*^{-/-}*Rara*^{+/-}, mutant mice are highly predisposed to the development of hepatocellular carcinoma (HCC) has significant implications in cancer research. This result, along with the observation that in response to pharmacological inhibition of the RA signaling, hepatocytes lacking Trim24 lose their ability to proliferate, strongly implicates *Rara* as a proto-oncogene in hepatocytes and demonstrates that overactivated RA signaling is deleterious to liver homeostasis.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer in the world causing at least 600,000 deaths each year.¹ While the highest incidences are found in Asia and Africa, with more than half of the patients being reported from China, there is a trend of rising rates of HCC in other countries, especially in Western Europe and the United States where the incidence and mortality rates of HCC have doubled in the past two decades and are expected to

double again over the next 10 to 20 years.^{2,3} Although much is known about the cellular changes leading to HCC and the etiological factors [i.e., hepatitis B virus (HBV) and HCV infection, aflatoxin exposure and alcohol abuse] responsible for the majority of HCCs, the molecular pathogenesis of this disease is not well understood.^{4,5} Moreover, due to the lack of early diagnostic markers and effective therapeutic strategies, HCC has an extremely poor prognosis (7% survival at 5 years).⁶ Consequently, to improve our current strategies for screening and treatment of this disease, a profound knowledge of the molecular mechanisms involved in tumor initiation and progression is essential. In recent years, several animal models for HCC development have been described, providing some insights into this issue (reviewed in refs. 7 and 8).

Included in these animal models are those with chemically induced HCC and those with gain or loss of function mutations in genes representing the major molecular pathways known to be frequently dysregulated in human HCCs (i.e., the p53, Wnt/ β -catenin and Rb pathways, and the TGF β /IGF axis)⁹⁻¹¹ as well as in other genes (e.g., *Myc*, *Ccnd1*, *Egf*, *Hgf*, *PML-RAR α* , *Met*, *Acox1*, *Lkb1*, *Mdr2* and *Pten*) (reviewed in refs. 7 and 8). In addition to permitting us to evaluate the importance of particular genes in HCC development and, by interbreeding of different transgenic and knockout mice, to assess the effects of combining different activated oncogenes or inactivated tumor suppressor genes on tumor progression, these models have also proven to be extremely useful for defining oncogene-specific gene expression alterations.¹² Four of these experimental models, the *Myc*, *E2f1*, *Myc/E2f1* and *Myc/Tgfa* transgenic mouse lines, have recently been demonstrated to closely reproduce the molecular features of specific subtypes of human HCCs,^{13,14} which makes them ideal models for the identification of biomarkers of the earliest disease stage and for the evaluation of potential therapeutic agents. However, the need for additional models still exists to mimic the various subgroups of human HCCs.

Initially identified as a fusion partner of the B-Raf protein in the oncoprotein T18 found in mouse HCC,¹⁵ the Tripartite motif (Trim) 24 protein, also known as Transcriptional intermediary factor 1 (Tif1) α , has subsequently emerged as the founding member of a conserved subfamily of TRIM proteins, with orthologs present from *Drosophila* to humans and playing crucial roles in cell differentiation, development and homeostasis.¹⁶⁻³¹ Members of this

*Correspondence to: Régine Losson; IGBMC; 1 rue Laurent Fries; BP10142; Illkirch cedex 67404 France; Tel.: 33.3.88.65.34.71; Fax: 33.3.88.65.32.01; Email: losson@igbmc.u-strasbg.fr

Submitted: 10/02/08; Accepted: 10/05/08

Previously published online as a *Cell Cycle* E-publication:
<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/7123>

family all consist of an amino-terminal RING-B boxes-coiled coil (RBCC or TRIM) motif and a carboxy-terminal PHD finger-bromodomain unit. They also have intrinsic silencing activity once they are targeted to a promoter, and exert much of their repressing activities through recruitment of chromatin modifiers.^{17,19-21,32-36} Based on their capability to interact directly with distinct sequence-specific transcription factors [i.e., ligand-activated nuclear receptors (Trim24),¹⁶⁻¹⁸ Krüppel-associated box (KRAB) domain-containing zinc fingers (Trim28/Tif1 β /KAP1),³⁷ and TGF β receptor-activated Smad and co-Smad proteins (Trim33/Tif1 γ)],^{26,27} the TIF1 proteins have been implicated in the control of various regulatory pathways. Recently, a fundamental physiological role for Trim24 in repressing the retinoic acid (RA) signaling pathway to prevent liver tumor formation was demonstrated by genetic studies in mice.²⁸ In this review article, we describe our current knowledge of the role of Trim24 in tumor suppression, and will discuss the potential therapeutic applications of *Trim24*-deficient mice as a promising tool for understanding RA-dependent liver carcinogenesis.

Trim24 Suppresses Spontaneous and Chemically Induced Hepatocarcinogenesis

To address the physiological functions of Trim24, we produced murine ES cells with *Trim24* null alleles by targeted gene deletion.²⁸ Homozygous knockout mice generated from these cells were viable and fertile, indicating that *Trim24* is not essential for development, growth and reproduction in mice. However, by 9 months of age, the knockout mice, both in a mixed (129Sv x C57BL/6) and an inbred (129Sv) genetic background, showed a high incidence of hepatic tumors, thus indicating that *Trim24* deficiency predisposes to spontaneous liver tumor formation. In accordance with a multistep process of tumorigenesis,³⁸ clear-cell foci of hepatocyte alteration (FCA) were first detected in approx. 10% of *Trim24*^{-/-} mutants at 7 months of age. Thereafter, hepatocellular adenoma (HCA) were seen in 50% of 9-month-old mutant mice. Around 12 months of age, 20% of mice showed locally invasive hepatocellular carcinoma (HCC) displaying either solid or trabecular pattern, and more of 80% did so between 19 and 29 months of age. Importantly, HCC lung metastases were found in two *Trim24*^{-/-} mice, thus proving the malignancy of these tumors.²⁸

These results led us to assess the role of Trim24 in tumor suppression in the context of chemically induced hepatocarcinogenesis. Remarkably, we found that a single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) (20 mg/kg) into 2-week-old *Trim24*^{-/-} mice dramatically accelerated the development of liver tumors; at 7 months after DEN administration, no tumors were observed in wild-type mice (0/12), whereas almost 85% (11/13) of *Trim24*^{-/-} mice had developed tumors, including 46% (6/13) with hepatocellular adenoma (HCA) and 39% (5/13) with HCA and HCC. 10 months after DEN treatment, 100% (16/16) of mutant, but only 8% (2/24) of wild-type mice, developed HCA, and among these, no wild-type, but 75% (12/16) of mutant mice, showed both HCA and HCC. Homozygous knockout *Trim24* mice are, therefore, more susceptible to chemically induced liver tumor formation than wild-type animals.

Altogether, these findings convincingly demonstrate that *Trim24* is a functional tumor suppressor gene playing a key role in protecting liver from cancer in mice. Given the ubiquitous expression of *Trim24*

during embryonic development and also in adult mouse tissues,^{16,39} it may seem paradoxical that a germline mutation in this gene predisposes only to liver cancer. However, such tissue specificity in tumor suppression is not peculiar to *Trim24*, but was also reported for many other tumor suppressor genes, possibly reflecting various degrees of functional compensation in distinct tissues.^{40,41}

Trim24 Controls Hepatocyte Proliferation

To gain insight into the mechanisms by which *Trim24* deficiency increases susceptibility to liver cancer, null mutant livers were evaluated for potential defects in proliferation before tumor onset. As revealed by incorporation of the thymidine analog BrdU and immunostaining with Ki67 (a marker of cycling cells), no significant difference in the number of proliferating cells was detected between 1-week-old *Trim24*^{-/-} and *Trim24*^{+/+} livers, indicating that *Trim24* deletion does not affect neonatal liver proliferation. From week 1 to week 5, a progressive decrease in hepatocyte proliferation characterizing the entry into quiescence was observed in both the mutant and the wild-type. However, relative to their respective controls, mutant mice, males and females, showed a significant increase in the number of proliferating hepatocytes beginning around week 3 (female) and week 5 (male) and persisting throughout adulthood (reviewed in ref. 28 and our unpublished data). Thus, in the absence of Trim24, hepatocytes fail to execute proper cell cycle exit during the neonatal-to-adult transition and continue to cycle in adult livers.

We conditionally deleted *Trim24* in the postpartum liver using the albumin-promoter-driven Cre recombinase-loxP system, and found that 14-week-old *Trim24*-deficient hepatocytes (*Trim24*^{fl/fl} *Alb-Cre*⁺) proliferated at a greater rate than wild-type.²⁸ This indicates that Trim24 functions autonomously in hepatocytes to control proliferation.

The above results lead us to investigate whether increasing Trim24 expression would influence proliferation in HCC cells. We found that the enforced expression of Trim24 in human and murine HCC cells not only blocked progression from G₀/G₁ to S phase and reduced cell growth rate, but also efficiently diminished anchorage-independent colony formation.²⁸

Hepatocyte Polyploidization and other Age-Related Phenotypes in Trim24-Deficient Mice

A striking anomaly that consistently appeared in *Trim24*^{-/-} mice as early as 3 months of age was the presence of hypertrophic hepatocytes with dramatically enlarged nuclei.²⁸ Consistent with the fact that such changes in nuclear size are usually associated with increased ploidy, DNA content quantification by flow cytometry revealed a ploidy higher than 4N in approx. 20% of *Trim24*^{-/-} hepatocytes, as compared with less than 5% in wild-type littermate livers.²⁸ This indicates that loss of *Trim24* promotes hepatocyte polyploidy. Whether compensatory or pathological, this response is likely to reflect the potential of *Trim24*-deficient hepatocytes to uncouple DNA replication from mitosis.⁴²

In normal rodents and human livers, polyploidy is a classical age-related process.⁴³ Of importance with respect to this, we found that in addition to a premature polyploidy, all *Trim24*-deficient livers at 3 months of age contained increased numbers of nuclei with intra-nuclear inclusions,³⁰ which is another hallmark of liver aging.⁴⁴ Furthermore, it was recently found that, in addition to

hepatic lesions, *Trim24*^{-/-} mice spontaneously developed a calcifying arteriopathy as early as 3 months of age, sharing many features with the human age-related Mönckeberg's disease.³⁰

Altogether, these observations strongly suggest an accelerated aging in *Trim24*^{-/-} mice and thereby emphasize the links between aging and cancer.⁴⁵

Trim24 and Rara: Opposing Effects on Transcription and Liver Homeostasis

The first indication that *Trim24* plays a role in regulating negatively *Rara* transcriptional activity came from transient reporter assays in which, upon RA induction, a tagged form of *Trim24* was detected on the RARE region of RARE reporter promoters and it was shown that forced expression of *Trim24* repressed in a dose-dependent manner *Rara*-mediated transactivation.^{16,19,28} This result was confirmed by recent studies wherein an enhanced RA induction of well established target genes such as *Cyp26a1*, *Rbp1*, *Tgm2* and *Strat6* was observed in *Trim24*-null compared to wild-type mouse embryonic fibroblast (MEF) cell lines.²⁸ The molecular mechanisms by which *Trim24* downregulates RA-induced transcription are still unknown, but a substantial body of evidence suggests the recruitment of histone deacetylases (HDAC) (ref. 32 and our unpublished results). HDACs are chromatin-modifying enzymes which participate in the dynamic control of histone acetylation and antagonize the activity of histone acetyltransferases (HAT), thus switching chromatin from active to transcriptionally inactive states.

To identify the alterations in gene expression patterns associated with *Trim24* loss and consequent liver tumor formation, we carried out a microarray experiment comparing the expression profiles of HCC from *Trim24* mutants to those from normal livers of wild-type littermates. A striking observation of this analysis was the aberrant expression of a considerable number of genes known to be regulated by RA, such as *Cyp26a1*, *Rbp1*, *Tgm2*, *Egr1*, *Btg2*, *Hbgef*, *Tgfbrii*, *Tgfb1*, *c-fos*, *Cdkn2b*, *Junb*, *Stat1*, *Spp1*, *Cdkn1a* and *Sparc*.²⁸ In order to quantify these deregulations in an unbiased manner, we utilized the RA-responsive Genes Table of Balmer and Blomhoff.⁴⁶ We first selected from this database a total of 190 and 181 RA-responsive genes as being expressed in the *Trim24*^{-/-} tumors and WT liver controls, respectively. The expression level of 55 of these genes was significantly altered in the tumors: of these, 47 were upregulated (2.1- to 392-fold) and 8 were downregulated (3- to 10-fold). Fisher's exact test confirmed the statistical significance of this large-scale deregulation, and successful qRT-PCR validation on a selected group of genes was obtained with an independent series of HCC samples.²⁸ From these data, it was concluded that an altered RA signaling pathway is a prominent feature of HCC developed in *Trim24*^{-/-} mice.

To investigate the contributing role of the RA signaling pathway in the cancer-prone phenotype of *Trim24*-deficient hepatocytes, both genetic and pharmacological approaches were undertaken. Importantly, a marked decrease in the number of proliferating cells in *Trim24*^{-/-} livers was observed under conditions in which RA signaling was reduced by either treatment with a pan-RA antagonist or hepatocyte-specific gene ablation of *Rara*. Conversely, treatment with a single dose of all-trans RA induced strong proliferation in livers of WT but not knockout mice.²⁸ These results confirmed that RA has mitogenic activity on WT liver cells,⁴⁷ and indicated that the

proliferative phenotype of *Trim24*-deficient mice is dependent on *Rara* ligand activation, and therefore could be due to an aberrantly activated RA signaling pathway. Definitive proof for an instrumental role of *Rara* in *Trim24*-knockout-induced tumorigenesis was provided by the observation that deletion of a single *Rara* allele in a *Trim24*-null background suppresses liver tumor formation.²⁸

Overall, these data demonstrate that *Trim24* and *Rara* co-regulate hepatocarcinogenesis in an antagonistic manner and strongly suggest that excessive RA signaling activity can be deleterious to liver homeostasis.

Concluding Remarks and Perspectives

Trim24, a gatekeeper of liver carcinogenesis. Based on our studies in mice and (rodent and human) cells, *Trim24* can be considered to be a gatekeeper in hepatocarcinogenesis. Gatekeepers are genes that directly regulate tumor growth by inhibiting cell growth and/or promoting cell death. Inactivation of these genes is rate-limiting for the initiation of the neoplastic process, and generally leads to very specific tissue distribution of cancer, even though they are expressed in many tissues.⁴⁸ Examples of gatekeeper genes are *RB1* in retinal epithelial cells, *NF1* in Schwann cells, *APC* in colon epithelial cells, and *VHL* in kidney cells. In most common tumors, however, the gatekeeper is not known, and for those that do not have obviously inherited predisposition, there may be more than a single gatekeeper. Identification of these gatekeeper genes is of primary importance to understand the mechanisms of tumor initiation, as well as for preventive and therapeutic approaches. So far, no candidate gene was proposed to play a gatekeeper function in the liver, although some critical loci of susceptibility that might modify the risks of developing HCC have been described (reviewed in refs. 4, 5 and 9–11). Two major pathways of liver carcinogenesis have been implicated, i.e., inactivation of the tumor suppressor gene p53 through *TP53* gene mutation and the activation of the Wnt- β -catenin pathway through *CTNNB1*/ β -catenin activated mutation and *AXIN1* inactivated mutations.⁹⁻¹¹ However, these mutations are not key players in the initiation of HCC development.⁴⁹⁻⁵¹

Over the last two decades, many familial clusterings of HCC have been reported in high-risk areas and patients with chronic hepatitis viral infection, but to what extent the results show shared environment, inherited susceptibility, or a combination of the two remains unknown (reviewed in ref. 52). Only very recently has there been evidence for familial clustering of HCC in a low- and a moderately high-risk area, both of them characterized by early-onset tumors, which strongly argues for an inherited genetic predisposition to develop liver cancer.^{53,54} However, the molecular basis for such genetic predisposition toward HCC remains to be elucidated, and in this respect, it would be of particular interest to assess the status of the *TRIM24* locus in the predisposed families. To date, the only direct evidence arguing for a role of *TRIM24* in human hepatocarcinogenesis comes from comparative genomic hybridization (CGH) and karyotypic analyses, which revealed genetic aberrations at the chromosomal position 7q32 harboring the *TRIM24* gene in several HCC cases. In particular, losses of 7q32-qter and rearrangements with breakpoints at 7q32 have been described.⁵⁵⁻⁵⁸

Trim24-deficient mice: a promising tool for understanding hepatocarcinogenesis. Although the relevance of *TRIM24* to human carcinogenesis remains yet to be proven, *Trim24*-deficient mice

represent an attractive experimental model for studying HCC development: a model that does not require intervention from outside sources, such as chemically induced cancer models, that is associated with a reproducible and high incidence of HCC, that is strictly limited to HCC, and in which tumor development proceeds through a well-defined sequential pattern of cellular and histopathological changes.²⁸ The use of this mouse line coupled with global gene expression profiling provides, therefore, the opportunity to dissect the molecular events associated with each stage of the disease, including early and late precancerous stages as well as defined pre-neoplastic lesions and tumors. Such gene expression profiling experiments using microarrays are currently in progress and will be completed by direct high-throughput mRNA sequencing to look for changes in RNA splice variants and microRNAs.⁵⁹ We anticipate that this study, through the identification of stage-specific signatures, will provide insights into the molecular pathogenesis of HCCs induced by *Trim24* deficiency. Next, in order to define to what extent *Trim24*-knockout mice reproduce human HCCs, a comparative functional genomic approach will be applied to look for similarities in gene expression patterns between HCCs from *Trim24*-deficient mice and human HCCs from defined sub-types.^{13,14} Identification of a subset of human HCCs showing significant overlap with *Trim24* knockout HCC will strongly stimulate interest in harnessing the *Trim24* knockout model to evaluate potential drug therapies.⁶⁰

The retinoid paradox in liver cancer. The finding that, in *Trim24*^{-/-} mice, *Rara* expression is instrumental to the development of HCC represents the first evidence that *Rara* can function as an oncogene *in vivo*.²⁸ Specifically, it was shown through genetic and pharmacological studies that in the liver lacking *Trim24*, ligand-activated *Rara* displays an oncogenic activity correlating with an aberrant expression of RA-responsive genes and an increase in cell proliferation that ultimately causes tumor formation. Although it is not known yet exactly how at the molecular level *Trim24* inhibits *Rara* signaling in the liver and through which downstream targets activated *Rara* mediates mitogenic and tumorigenic responses, these findings confirm and extend previous studies demonstrating that in WT mice, RA is a powerful inducer of hepatocyte proliferation,⁴⁷ and are also consistent with the independent demonstration that supplementation of the diet with RA or two other synthetic retinoids (i.e., retinamides) enhances the incidence of liver tumors following initiation with DEN in mice and this when administered at doses that suppress tumorigenesis in other tissues.⁶¹ In a more recent screen for drugs preventing HCC, 13-*cis* RA has also been shown to significantly increase the development of chemically-induced HCC in mice.⁶² Furthermore, others have reported that in chicken, retroviral-mediated overexpression of *RARB* caused hepatocarcinogenesis.^{63,64} These data altogether may explain why overexpression of *RARA* is positively selected during oncogenesis in human HCCs,⁶⁵ and along with the observation that prolonged therapeutic consumption of vitamin A can result in liver fibrosis and even cirrhosis,⁶⁶ there are two main conclusions that can be drawn. First, too much RA signaling activity is deleterious to liver cells, in both rodent and human systems. RA can thus be added to the list of nuclear receptor ligands, including peroxysome proliferators, triiodothyronine and the halogenated hydrocarbon TCPOBOP (agonist ligands for PPAR α , TR and CAR, respectively), that are all strong hepatomimetics (reviewed in ref. 67). Second, targeting *RARA* itself with

specific antagonists might be an effective antitumor strategy for some HCCs. For testing such molecules as potential anti-HCC agents, the mouse model of *Trim24* deficiency should represent a valuable tool, allowing investigation of their effects on both early and late stages of tumor development.

This experimental model of *Rara*-dependent hepatocarcinogenesis will also be extremely useful to further explore the issue of the opposing (i.e., beneficial versus detrimental) effects of retinoids—vitamin A and its active derivatives—on liver homeostasis.⁶⁸ Indeed, in sharp contrast to the above-discussed tumorigenic effects but consistent with the general chemopreventive effect of retinoids described in a variety of experimental and clinical studies (review in refs. 69–73), Muto et al. have demonstrated in a Phase II clinical trial that 1 year treatment with an acyclic retinoid (ACR) could reduce the incidence of recurrent primary HCC after tumor resection.⁷⁴ Although the mechanism(s) of action of this retinoid is still matter of debate, a direct effect on HCC cells, that is, induction of differentiation and apoptosis of the cancer cells, has been demonstrated *in vitro*.⁷⁵ In addition to these effects seen in the late phase of the carcinogenic process, ACR may also interfere with early steps by reducing the emergence of TGF α -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells, as recently shown in a rat model of chemically-induced HCC.^{76,77} Another report of interest in support for an essential role of the RA signaling in preventing hepatocarcinogenesis is that of Yanagitani et al. (2004). These researchers have demonstrated that mice expressing a dominant-negative form of *Rara* in hepatocytes developed steatohepatitis and liver tumors, while feeding on high RA diet reversed and inhibited the carcinogenesis process.⁷⁸ These findings further reinforce the view that the liver is a highly susceptible organ to alterations in the RA signaling pathway and, along with the study described here and the above-mentioned published reports, depict a quite complex scenario in which it seems clear that increasing or blocking RA signaling can be deleterious to liver homeostasis, both leading to the occurrence of HCC. This duality has considerable implications for cancer therapy, indicating that the use of retinoids should proceed with caution as long as no clear concept has emerged regarding the mechanisms and contexts that determine whether a retinoid will act as a carcinogen or as a beneficial chemotherapeutic agent.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. Pierre Chambon for his constant support, and all our collaborators, whose work and comments have contributed to the realization of this review. Our special thanks to Manual Mark for his expertise in histopathology. Thierry Lerouge and Margarita Cerviño are acknowledged for technical help. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Agence Nationale de la Recherche (ANR06_BLAN_0377) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
2. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004; 127:27-34.
3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557-76.
4. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31:339-46.

5. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:674-87.
6. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48:20-37.
7. Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008; 48:858-79.
8. Lee JS, Grisham JW, Thorgeirsson SS. Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26:1013-20.
9. Lévy L, Renard CA, Wei Y, Buendia MA. Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma *Ann N Y Acad Sci* 2002; 963:21-36.
10. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006; 25:3778-86.
11. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27:55-76.
12. Coulouarn C, Gomez-Quiroz LE, Lee JS, Kaposi-Novak P, Conner EA, Goldina TA, Onishchenko GE, Factor VM, Thorgeirsson SS. Oncogene-specific gene expression signatures at preneoplastic stage in mice define distinct mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2006; 44:1003-11.
13. Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, Thorgeirsson SS. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet* 2004; 36:1306-11.
14. Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Functional genomics of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; 43:145-50.
15. Miki T, Fleming TP, Crescenzi M, Molloy CJ, Blam SB, Reynolds SH, Aaronson SA. Development of a highly efficient expression cDNA cloning system: application to oncogene isolation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5167-71.
16. Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J* 1995; 14:2020-33.
17. Le Douarin B, Nielsen AL, garbier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P. A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J* 1996; 15:6701-15.
18. vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* 1996; 15:110-24.
19. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de Thé H. TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 1999; 18:1209-17.
20. Khetchooumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cerviño M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R. TIF1 δ , a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem* 2004; 279:48329-41.
21. Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen HJ. Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit β FTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell* 2001; 7:753-65.
22. Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH, Zon LI. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1 γ , an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol* 2004; 2:237.
23. Cammas F, Mark M, Dollé P, Dierich A, Chambon P, Losson R. Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1 β are defective in early postimplantation development. *Development* 2000; 127:2955-63.
24. Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M. Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1 β is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 2002; 129:2329-37.
25. Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Association of the transcriptional corepressor TIF1 β with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* 2004; 18:2147-60.
26. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massagué J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* 2006; 125:929-41.
27. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005; 121:87-99.
28. Khetchooumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R. Loss of Trim24 (Tif1 α) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet* 2007; 39:1500-6.
29. Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 2007; 131:46-57.
30. Ignat M, Teletin M, Tisserand J, Khetchooumian K, Denefeld C, Chambon P, Losson R, Mark M. Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:2598-603.
31. Kim J, Kaartinen V. Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis* 2008; 46:329-33.
32. Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* 1999; 18:6385-95.
33. Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ, 3rd. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev* 2001; 15:428-43.
34. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 2002; 16:919-32.
35. Sripathy SB, Stevens J, Schultz DC. The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2006; 26:8623-38.
36. Cammas F, Janoshazi A, Lerouge T, Losson R. Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1 β with the heterochromatin protein HP1 isoforms during cell differentiation. *Differentiation* 2007; 75:627-37.
37. Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R. Conserved interaction between distinct Krüppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1422-6.
38. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9:138-41.
39. Niederreither K, Remboutsika E, Gansmuller A, Losson R, Dollé P. Expression of the transcriptional intermediary factor TIF1 α during mouse development and in the reproductive organs. *Mech Dev* 1999; 88:111-7.
40. Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278:1043-50.
41. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116:235-48.
42. Guidotti J-E, Brégerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278:19095-101.
43. Kudryavtsev BN, Kudryavtsev MV, Sakuta GA, Stein GI. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of cell cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993; 64:387-93.
44. Johnson JE. Age-related fine structural changes. In *Aging and Cell Structure*. Edited by Johnson JE Jr. New York: Plenum Press 1984; 2:37-88.
45. Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; 4:45-54.
46. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002; 43:1773-808.
47. Ledda-Columbano GM, Pibiri M, Molotzu F, Cossu C, Sanna L, Sinbula G, Perra A, Columbano A. Induction of hepatocyte proliferation by retinoic acid. *Carcinogenesis* 2004; 25:2061-6.
48. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386:761-3.
49. Tanaka S, Toh Y, Adachi E, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 mutation. *Cancer Res* 1993; 53:2884-7.
50. Park JY, Park WS, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park CK. Mutations of beta-catenin and AXIN1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver Int* 2005; 25:70-6.
51. Farazi PA, Glickman J, Horner J, Depinho RA. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res* 2006; 66:4766-73.
52. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, Chen PJ, Hsiao TJ, Lee PH, Chen CJ. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1159-64.
53. Cai RL, Meng W, Lu HY, Lin WY, Jiang F, Shen FM. Segregation analysis of hepatocellular carcinoma in a moderately high-incidence area of East China. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2428-32.
54. Hemminki K, Li X. Familial liver and gall bladder cancer: a nationwide epidemiological study from Sweden. *Gut* 2003; 52:592-6.
55. Parada LA, Hallén M, Tranberg KG, Hägerstrand I, Bondeson L, Mitelman F, Johansson B. Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7 and 8 in primary liver cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 23:26-35.
56. Wong N, Lai P, Lee SW, Fan S, Pang E, Liew CT, Sheng Z, Lau JW and Johnson PJ. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis: relationship to disease stage, tumor size and cirrhosis. *Am J Pathol* 1999; 154:37-43.
57. Wong N, Lai P, Pang E, Leung TW, Lau JW, Johnson PJ. A comprehensive karyotypic study on human hepatocellular carcinoma by spectral karyotyping. *Hepatology* 2000; 32:1060-8.
58. van Dekken H, Wink J, Alers JC, de Man RA, IJzermans JN, Zondervan PE. Genetic evaluation of the dysplasia-carcinoma sequence in chronic viral liver disease: a detailed analysis of two cases and a review of the literature. *Acta Histochem* 2003; 105:29-41.
59. Morazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008; 5:621-8.
60. Weiss B, Shannon K. Mouse cancer models as a platform for performing preclinical therapeutic trials. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:84-9.

61. McCormick DL, Hollister JL, Bagg BJ, Long RE. Enhancement of murine hepatocarcinogenesis by all-trans retinoic acid and two synthetic retinamides. *Carcinogenesis* 1990; 11:1605-9.
62. Di Bisceglie AM, Osmack P, Brunt EM. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: use of tamoxifen in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J Lab Clin Med* 2005; 145:134-8.
63. de Thé H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1987; 330:667-70.
64. Garcia M, de Thé H, Tiollais P, Samarut J, Dejean A. A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor β chimera transforms erythrocyte progenitor cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:89-93.
65. Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3679-83.
66. Geubel AP, De Galocsy C, Alves N, Rahier J, Dive C. Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* 1991; 100:1701-9.
67. Columbano A, Ledda-Columbano GM. Mitogenesis by ligands of nuclear receptors: an attractive model for the study of the molecular mechanisms implicated in liver growth. *Cell Death Diff* 2003; 10:19-21.
68. Shiota G, Tsuchiya H, Hoshikawa Y. The liver as a target organ of retinoids. *Hepato Res* 2006; 36:248-54.
69. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:181-93.
70. Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41:41-55.
71. Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:201-21.
72. Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurui H, Muto Y, Friedman SL, Moriwaki H. Retinoids in cancer chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets* 2004; 4:285-98.
73. Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 2007; 75:853-70.
74. Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, Tanaka T, Tsurumi K, Okuno M, Tomita E, Nakamura T, Kojima T. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:1561-7.
75. Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H. Acyclic retinoid induces partial differentiation, downregulates telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derived cell lines. *J Hepatol* 2002; 36:660-71.
76. Kagawa M, Sano T, Ishibashi N, Hashimoto M, Okuno M, Moriwaki H, Suzuki R, Kohno H, Tanaka T. An acyclic retinoid, NIK-333, inhibits N-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis through suppression of TGF α expression and cell proliferation. *Carcinogenesis* 2004; 25:979-85.
77. Sano T, Kagawa M, Okuno M, Ishibashi N, Hashimoto M, Yamamoto M, Suzuki R, Kohno H, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Tsurumi H, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Tanaka T. Prevention of rat hepatocarcinogenesis by acyclic retinoid is accompanied by reduction in emergence of both TGF α -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells. *Nutr Cancer* 2005; 51:197-206.
78. Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeiki T, Ichiba M, Tanabe Y, Yoshida Y, Morino S, Kurimasa A, Usuda N, Yamazaki H, Kunisada T, Ito H, Murawaki Y, Shiota G. Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 2004; 40:366-75.

Résumé

TIF1 α est un co-facteur des récepteurs nucléaires. Les souris *knock-out TIF1 α ^{-/-}* générées au laboratoire développent spontanément des hépatocarcinome avec une pénétrance totale. Le premier défaut phénotypique observé est une mise en quiescence incomplète des hépatocytes dans les premières semaines post-natales. La perte d'un allèle de RAR α rétablit un phénotype normal dans le fond *TIF1 α ^{-/-}*, démontrant que RAR α est un pro-oncogène dans le foie.

J'ai participé à la caractérisation des propriétés de suppresseur de tumeur de TIF1 α en sur-exprimant la protéine dans des cellules en culture. Cette méthode a permis de montrer que TIF1 α est un frein au cycle cellulaire des hépatocytes bloquant la transition G1-S et inhibant la capacité de ces cellules à pousser en *soft-agar*. Nous avons d'autre part analysé des souris dans lesquelles *Tif1 α* est excisé spécifiquement dans les hépatocytes pré- et post-quiescents. Ces modèles nous ont permis de valider l'aspect cellulaire-autonome de l'action de TIF1 α et de démontrer qu'il est nécessaire pour le maintien de la quiescence hépatocytaire tout au long de la vie chez la souris.

D'autre part, la purification des complexes liés à TIF1 α entreprise au laboratoire a identifié TIF1 β et TIF1 γ comme partenaires de TIF1 α . Nous avons validé leur implication dans l'hépatocarcinogénèse murine grâce à des souris invalidées spécifiquement pour les deux TIF1 dans les hépatocytes.

Enfin, une étude menée au laboratoire a identifié les gènes dérégulés en l'absence de TIF1 α dans le foie. Nous avons mis en évidence qu'une partie de ces gènes est en réalité régulée par l'activité d'un rétrotransposon de type VL30 dont l'expression dépend de TIF1 α , TIF1 β , TIF1 γ et RAR α . Ces rétrotransposons, une fois sur-activés, provoquent des dérégulations géniques en servant de promoteur alternatif ou bien en induisant la transcription de longs ARNnc.

Summary

TIF1 α is a nuclear receptor co-factor. The *TIF1 α ^{-/-}* mice develop spontaneously hepatocarcinomas with a high penetrance. The first phenotypical defect in this mutant is an incomplete entry into quiescence of the hepatocytes. The loss of one allele of RAR α suppresses this phenotype in a *TIF1 α ^{-/-}* background, demonstrating an oncogenic function of RAR α in the liver.

I took part in the characterization of TIF1 α features in tumour suppression by overexpressing this protein in cultured hepatocytes. This method permitted us to demonstrate that TIF1 α inhibits the G1-S transition and the ability to grow in *soft-agar* of these cells. Furthermore, we analysed a mouse line in which TIF1 α is excised specifically in pre- and post-quiescent hepatocytes. This model allowed us to demonstrate the cell-autonomous character of TIF1 α in tumour suppression and to show that it is required throughout the life of the mouse.

Secondly, a purification of TIF1 α associated complexes performed in the laboratory identified TIF1 β and TIF1 γ as TIF1 α major partners. We validated their involvement in liver tumour suppression by studying mouse lines in which both TIF1 were knocked-out.

Finally, a study from our laboratory identified the genes which are deregulated in the liver upon TIF1 α loss. We showed that a part of these genes is in fact regulated by the activity of a VL30 retrotransposon which expression is dependent on TIF1 α , TIF1 β , TIF1 γ and RAR α . These retroelements, when overexpressed, provoke genes deregulation by functioning as alternative promoters or inducing the transcription of long ncRNA.