





Thèse présentée par

Mayada ACHOUR

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'**Université de Strasbourg** Discipline : Sciences du Vivant Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Rôle de UHRF1 et de ses partenaires dans la régulation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeurs

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, CNRS UMR 7213

Soutenue publiquement le 30 Juin 2011 devant le jury composé de :

Examinateur : **Pr Marie-Claude KILHOFFER**, UMR CNRS 7200, Illkirch Rapporteur externe : **Pr Gilles SALBERT**, UMR CNRS 6026, Rennes Rapporteur externe : **Dr Robert DANTE**, INSERM U590, Centre Léon Bérard, Lyon Directeur de thèse : **Dr Christian BRONNER**, UMR CNRS 7213, Illkirch

mes parents

Que votre confiance, vos encouragements et votre soutien trouvent ici tout le témoignage de ma profonde reconnaissance

A

Ruslan,

Merci pour ton soutien et ta patience et surtout pour mes petits anges Omar, Ahmad, Naïm et Mohammad-Abdullah

A

A

Mon Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Christian BRONNER,

Je voudrais vous assurer de ma profonde reconnaissance et vous remercier pour la gentillesse avec laquelle vous avez dirigé mon travail

Aux

Membres du jury

Madame le professeur Marie-Claude KILHOFFER, Merci d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse.

Monsieur le professeur Gilles SALBERT, Je suis heureuse de pouvoir soumettre ce travail à votre jugement.

Monsieur le Docteur Robert DANTE,

Merci d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je vous remercie d'avoir accepté de porter un jugement sur mon travail.

Vous m'avez fait le grand honneur,

Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère gratitude.

Je tiens également à remercier,

Monsieur le professeur Yves Mely, Directeur de l'UMR 7213, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Madame le professeur Valérie Schini-Kerth, pour m'avoir accueilli dans son équipe.

Le Docteur Mahmoud Alhosin, ses critiques scientifiques constructives et sa bonne humeur ont été une aide précieuse pour la réalisation de ce travail.

Le Docteur Marc Mousli, le Docteur Guy Fuhrmann, le Docteur Christian D Muller et le Docteur Philippe Rondé, leur soutien et leur compétence ont été une aide précieuse pour la réalisation de ce travail.

Monsieur le Docteur Mouheyedin Issa, Monsieur le Docteur Munif Ghareeb et Madame le Docteur Samar AL-Nahas et tous les membres de Départements de Biologie Animale de la Faculté des Sciences à l'Université de Damas.

Mes collègues ainsi que tous ceux qui participé de près ou de loin à ce travail par leurs connaissances et leur apport technique.

Enfin, merci à toute ma famille et à tous mes amis, que votre confiance, vos encouragements et votre soutien trouvent ici tout le témoignage de ma profonde reconnaissance.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INDEX DE FIGURES ET DES TABLEAUX5
ABRÉVIATION7
RÉSUMÉ9
SUMMARY12
PREAMBULE15
INTRODUCTION17
I. L'Ubiquitin-like PHD Ring Finger 1 (UHRF1)18
1. Découverte de l'UHRF1 et du gène codant UHRF1 18
2. Domaines structuraux de l'UHRF118
2.1 Ubiquitin-like domain (NIRF_N domain)19
2.2 Cryptic Tandem Tudor domains (TTD domains)20
2.3 Plant-Homeo Domain (PHD domain)22
2.4 Set and Ring Finger Associated domain (SRA domain)23
2.5 Really Interesting New Gene Finger domain (RING Finger
domain)25
3. La famille de l'UHRF26
4. Évolution phylogénétique de l'UHRF129
5. Expression de l'UHRF1 dans le cancer et au cours du cycle
cellulaire30
6. L'UHRF1 cible thérapeutique intéressante ?
II. Les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes dans le
contexte de l'UHRF135
1. Définition du code épigénétique35
2. Strucutre du nucléosome

3. Méthylation de l'ADN et régulation de l'expression génique40
3.1 Rôles biologiques de la méthylation de l'ADN46
3.2 Méthylation de maintenance49
3.2.1 Structure de l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1)51
3.2.2 Mécanisme de régulation de l'expression de la DNMT152
3.3 Rôle de la méthylation de l'ADN dans le cancer54
• Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs54
Hypométhylation global du génome55
• Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN comme un traitement
anti-cancéreux56
3.4 Méthylation <i>de novo</i> 57
4. Modifications post-traductionnelles des histones60
4.1 Méthylation et déméthylation64
4.2 Acétylation et désacétylation68
4.2.1 Les Histones Acétyles Transférases (HATs)68
4.2.2 Les Histones DésACétylases (HDACs)73
4.3 Ubiquitination et déubiquitination76
4.4 Phosphorylation et déphosphorylation80
4.5 SUMOylation81
4.6 ADP-Ribosylation82
4.7 Biotinylation83
OBJECTIFS
RESULTATS & DISCUSSIONS
Publication I:

The UHRF1 family: Oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? (2007). Christian Bronner, **Mayada Achour**, Yoshimi Arima, Thierry Chataigneau, Hideyuki Saya and Valérie B. Schini-Kerth. *Pharmacol Ther* **115**: 419-434.

The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of *VEGF* gene expression. (2008). **Mayada Achour**, Xavier Jacq, Philippe Rondé, Mahmoud Alhosin, Céline Charlot, Thierry Chataigneau, Michaël Jeanblanc, Marcella Macaluso, Antonio Giordano, Alun D Hughes, Valérie B. Schini-Kerth and Christian Bronner. *Oncogene* **27**: 2187-2197.

UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. (2009). **Mayada Achour**, Guy Fuhrmann, Mahmoud Alhosin, Philippe Rondé, Thierry Chataigneau, Marc Mousli, Valérie B. Schini-Kerth and Christian Bronner. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 523-528.

Epigenetic control of gene transcription (Epigenetics and Gene Transcription Section III). Cancer Epigenetics: Biomolecular Therapeutic in Human Cancer. (2011). Christian Bronner, **Mayada Achour**, Thierry Chataigneau and Valérie B. Schini-Kerth. (Editors A. Giordano and M. Macaluso), by Wiley-Blackwell Health Sciences, June 2011.

Publication V:.....104

Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1. (2011) Nataliya Nady, Alexander Lemak, John R. Walker, George V. Avvakumov, Michael S. Kareta, **Mayada Achour**, Sheng Xue, Shili Duan, Abdellah Allali-Hassani, Xiaobing Zuo, Yun-Xing Wang, Christian Bronner, Frédéric Chédin, Cheryl H. Arrowsmith and Sirano Dhe-Paganon. *J Biol Chem.* In press.

CONCLUSION & PERSPECTIVES108
1. Rôle de l'UHRF1 dans l'expression génique et la modification de la structure
chromatinienne109
1.1 Rôle de l'UHRF1 dans la méthylation de l'ADN110
1.2 Rôle de l'UHRF1 dans la méthylation et l'acétylation des histones116
1.3 Rôle de l'UHRF1 dans l'ubiquitination des histones121
1.4 Transmission du code épigénétique ou transmission de la mémoire cellulaire123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES129
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS147

INDEX DE FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures

Figure 1 : La structure de l'UHRF1
Figure 2 : Mécanisme de la répression des gènes suppresseurs de tumeurs par le domaine SRA de l'UHRF1
Figure 3 : Le complexe ADN-domaine SRA
Figure 4 : La famille de l'UHRF27
Figure 5: Représentation schématique de la régulation et le fonctionnement de l'UHRF1
Figure 6 : Les principales étapes de l'assemblage de la chromatine
Figure 7 : La structure et la fonction des DNMTs41
Figure 8 : Un schéma représente les mécanismes de la régulation transcriptionnelle du gène DNMT1
Figure 9 : Mécanisme de RdDM (RNA directed DNA Methylation)
Figure 10: Modèle de la participation de DNMT3L à l'établissement du profil de méthylation
Figure 11 : Les modifications post-traductionnelles majeures des histones
Figure 12: Le [«] CODE HISTONE [»] : Méthylation des histones et reconnaissance de la marque
Figure 13: Équilibre entre l'acétylation et la désacétylation des histones gouverné par les enzymes HATs et HDACs
Figure 14: L'acétylation devrait activer la transcription au moins par deux mécanismes principaux
Figure 15: Interconnexion entre la méthylation de l'ADN, la désacétylation des histones et la méthylation des histones
Figure 16 : La monoubiquitination de l'histone H2B est généralement associée avec une expression génique active
Figure 17: L'UHRF1 gouverne l'interconnexion entre la méthylation de l'ADN, l'ubiquitination des histones, la désacétylation des histones et la méthylation des histones
Figure 18: Le [«] CODE HISTONE [»] : Influences réciproques des différentes modifications post-traductionnelles des histones

Figure 19: Régulation des gènes suppresseurs de tumeurs et du gène VEGF par l'UHRF194							
Figure 20: L'équilibre entre les destructeurs et les protecteurs de la DNMT1 durant le cycle cellulaire							
Figure 21: Boucle de renforcement entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9							
Figure 22: Modèle proposé de l'organisation spatiale de l'UHRF1 à l'interface entre l'ADN et les histones							
Figure 23: L'UHRF1 recrute Tip60 et contrôle son expression et son activité120							
Figure 24: Interconnexion des différentes machineries de la réplication du code épigénétique							
Figure 25: Modèle de la Mémoire Cellulaire							
Figure 26: Transmission du code épigénétique : la [«] mémoire cellulaire [»] 127							

Tableaux

Tableau 1 : Les Pourcentages d'identité entre les séquences d'acides aminés de l'UHRF1 de différentes espèces
Tableau 2 : Les Méthyltransférases de l'ADN (DNMTs) : Structure, Fonction, Leurs partenaires
Tableau 3 : La famille des protéines à domaine MBD ayant la capacité de lier l'ADN et leurs fonctions
Tableau 4 : Protéines cellulaires interagissant avec la DNMT1
Tableau 5 : Histones méthyltransférases des lysines (HKMT) et leurs spécificités
Tableau 6 : Histones acétyltransférases (HATs) humaines et leurs spécificités
Tableau 7 : Histones Désacétylases (HDACs) humaines et leurs spécificités
Tableau 8 : Protéines cellulaires interagissant avec l'UHRF1110

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

Abréviation	Signification					
ADN	Acide DésoxyriboNucléique					
ARN	Acide RiboNucléique					
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine					
DBD	DNA Binding Domain					
DNMT1	DNA MethylTransferase 1					
E2F1	Elongation Factor 1					
ECREM	Epigenetic Code REplication Machinery					
EuHMTase1	Eucaryotique Histone MethylTransferase					
H3K9me2	Histone H3 lysine 9 dimethylation					
H3K9me3	Histone H3 lysine 9 trimethylation					
H2AK5-Ac	Histone H2A lysine 5 Acetylation					
НАТ	HistoneAcetylTransferase					
HDAC1	Histone DeACetylase 1					
НКМТ	Histone lysine Methyltransferase					
HMTase	Histone MethylTransferase					
HP1	Heterochromatine Protein 1					
ICBP90	Inverted CCAAT box Binding Protein of 90kDa					
LSD1	Lysine Specific histone Demethylase 1					
MBD	Methl-CpG Binding Domain proteins					
MeCP2	Methyl CpG binding Protein 2					
MLL1	Mixed-Lineage Leukemia 1					
NIRF	NP95/ICBP90 Ring Finger					
Np95	Nuclear protein of 95 kDa					
p14 ^{ARF}	Tumor Suppressor Protein of 14kDa (ARF) Alternate Reading					
	Frame					
$p16^{nVK4A}$	Cyclin-dependent kinase INhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits					
50	CDK4)					
p53	Tumor Suppressor Protein of 53kDa					
PBA	PCNA- Binding Domaine					
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen					
PHD	Plant Homeo Domain					
pRB	Protein of Retinoblastoma					
RARβ	Retinoic Acid Receptors B					
RFTS	Replication Foci Targeting Sequence					
RING Finger	Really Interesting New Gene Finger					
SRA domain	Set and Ring Finger Associated Domain					
SRA-BD	SRA-Binding Domain					
Tip60	Tat-interactive protein, 60 kDa					
TTD	Tandem Tudor Domains					
UHRF	Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger Domain					
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor					

RÉSUMÉ

Rôle de UHRF1 et de ses partenaires dans la régulation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeurs

La mémoire d'une cellule, c'est-à-dire sa capacité à exprimer un nombre bien défini de gènes est liée entre autres à la présence de petites modifications appelées modifications épigénétiques, positionnées sur la cytosine ou sur certains acides aminés des histones. Ces modifications déterminent la nature et les fonctions d'une cellule. Lorsque les cellules se multiplient, elles doivent transmettre ces informations à la descendance en recopiant fidèlement les méthylations de l'ADN et le code histone au bon endroit. La maintenance des profils de méthylation de l'ADN est réalisée par la DNMT1 (DNA MethylTransferase 1) qui est la plus abondante des méthyltransférases de l'ADN dans les cellules somatiques et a une préférence pour l'ADN hémiméthylé et pour cela elle est considérée comme l'enzyme principale responsable de la duplication et de la maintienne des patrons de méthylation de brin parental au brin fille après la réplication de l'ADN.

Incontestablement, l'UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger Domain 1) apparaît de plus en plus comme un acteur essentiel dans la duplication de l'information épigénétique. L'UHRF1 est surexprimée dans plusieurs lignées cancéreuses dans lesquelles des modifications aberrantes des profils de méthylation de l'ADN et du code histone ont été constamment identifiées. L'UHRF1 joue un rôle en tumorigénèse par la dérégulation de l'expression des gènes qui sont bien connus pour jouer un rôle primordial en cancérogénèse comme les gènes *topoisomérase IIα*, *RB1*, $p16^{INK4A}$, $p14^{ARF}$ et *RARβ*. L'UHRF1 est requise pour la prolifération cellulaire particulièrement pour la transition G1/S. L'UHRF1 pourrait contribuer à la cancérogénèse par la répression permanente de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs aboutissant à la perte du contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire.

L'UHRF1 contient dans sa structure cinq domaines fonctionnels: le domaine « Ubiquitin-like » (NIRF_N domain) qui pourrait être impliqué dans l'interaction de l'UHRF1 avec le protéasome. Le « Cryptic Tandem Tudor Domain » (TTD domains) qui pourrait être impliqué dans la di / triméthylation de lysine 9 de l'histone H3. Le domaine PHD « The Plant Homeo Domain » qui est capable de lire le code histone et de discriminer entre les H3K4me3 et H3K4me2 (Histone 3 di-tri-méthylée à la lysine 4). Il a été proposé que le domaine PHD pourrait promouvoir l'activation génique ou la répression via son interaction avec H3K4 triméthylée et cette modification est une modification universelle de l'activation génique. Le « Set and Ring Finger Associated Domaine »

(SRA domain) qui est trouvé seulement dans la famille UHRF chez les mammifères, est capable d'interagir à la fois avec HDAC1 (Histone DeACetylase 1) et les îlots CpG méthylés. Enfin, le domaine RING Finger [«] Really Interesting New Gene [»] qui a une activité E3 ligase pour l'histone H1, H2B et H3 mais assui pour la DNMT1. La présence de ces cinq domaines dans la structure de l'UHRF1 suggère que l'UHRF1 a la faculté de lire et réguler le code épigénétique.

Pour comprendre le rôle de l'UHRF1 dans la régulation du code épigénétique et dans le but de rechercher des protéines qui pourraient interagir avec le domaine SRA de l'UHRF1, nous avons fait appel au système du double hybride en collaboration avec la société Hybrigenics (Paris). Plusieurs clones codants pour une séquence de 215 acides aminés ont été isolés, et montrent 100% d'homologie avec une séquence de la DNMT1 humaine. Nous avons appelé ce nouveau domaine de la DNMT1 le "SRA-binding domain" (SRA-BD). Cette interaction a été confirmée par GST-pull down et co-immunoprécipitation dans les cellules Jurkat et les cellules musculaires lisses immortalisées (SMC1-HVT). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux dans lesquels l'UHRF1 est proposée pour être capable de recruter la DNMT1 à l'ADN hémi-méthylé pour une duplication fidèle des patrons de méthylation de l'ADN. La structure du domaine SRA montre que ce domaine se comporte comme une [«] main [»], dont deux [«]doigts[»] font basculer une cytosine méthylée dans le grand sillon de l'ADN, permettant ainsi à la [«] paume [»] d'interagir avec le groupement méthyle. Ce mécanisme est appelé [«]methyl-cytosine-base-flipping mechanism[»].

Pour comprendre le rôle de ce complexe UHRF1/DNMT1 sur l'expression génique des gènes suppresseurs de tumeurs $p16^{INK4A}$, RB1 et sur l'expression du gène *Facteur de Croissance Endothélial Vasculaire (VEGF)*, nous avons analysé leur expression dans les cellules [«] knocked-down [»] pour l'UHRF1 ou pour la DNMT1. Nous avons trouvé que la perte de fonction de l'UHRF1 ou de la DNMT1 aboutit à la diminution de l'expression du gène du *VEGF*, un facteur pro-angiogénique majeur tandis que les expressions des gènes suppresseurs de tumeurs $p16^{INK4A}$ et *RB1* ont été significativement augmentées. Ces résultats indiquent que l'UHRF1 et la DNMT1 sont impliquées dans l'expression du gène *VEGF* probablement par l'interaction du domaine SRA de l'UHRF1 avec un nouveau domaine de la DNMT1 [«] SRA-BD [»] et l'augmentation de l'expression de $p16^{INK4A}$.

Nous avons proposé que la méthylation de l'ADN, l'ubiquitination et l'acétylation des histones soient présentées dans un grand complexe impliqué dans la réplication du code épigénétique que nous avons appelé « ECREM » pour « Epigenetic Code REplication Machinery », comportant Tip60 (Tat-interactive protein, 60 kDa). Tip60 est une histone acétyltransférase avec une spécificité vers la lysine 5 of H2A (H2AK5) et joue plusieurs rôles dans les processus du remodelage de la chromatine. Les expériences de co-immunoprécipitation et immunocytochemistrie ont montrées que Tip60 est présente dans le même complexe

macromoléculaire avec l'UHRF1, la DNMT1 et HDAC1. Le [«]knockdown [»] de l'expression de l'UHRF1 ou de la DNMT1 par RNA interférence, augmente l'expression de Tip60 mais diminue significativement le niveau de l'acétylation de H2AK5. Ces résultats suggèrent que l'UHRF1 et la DNMT1 sont requises pour acétyler H2AK5 et que Tip60 participe à un grand complexe comportant UHRF1, HDAC1 et DNMT1 responsable de la réplication du code épigénétique. Ainsi, un effet direct de l'UHRF1 sur le code histone pourrait être dû à son activité enzymatique (E3 ligase) alors qu'un effet indirect pourrait être produit par le biais de son association avec ses partenaires. Ces résultats suggèrent que l'UHRF1 commande et régule le lien entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN dans le contexte de l'angiogénèse tumorale et la répression des gènes suppresseurs de tumeurs.

Le « knockdown » de l'UHRF1 provoque une diminution du niveau de la méthylation de l'ADN et modifie la structure chromatinienne. La méthylation de l'ADN régule les modifications des histones considérant que la perte de la DNMT1 dans les cellules humaine du cancer du colon résulte en une diminution et distribution de H3K9me3 (histone H3 triméthylée sur la lysine 9). L'UHRF1 est nécessaire pour la maintenance des méthylations de l'ADN et interagit également avec H3K9me3 d'une manière indéterminée. Nous avons montré que l'UHRF1 contient un Tandem Tudor Domain (TTD) qui reconnaît les extrémités N-terminales de l'H3 associées à la lysine 9 triméthylée et à la lysine 4 non modifiée (H3K4me0/K9me3). La suppression de H3K4 montre l'importance de l'H3K4 non-modifiée pour que le domaine TTD de l'UHRF1 puisse reconnaître l'H3K9me3. L'UHRF1 déficiente en termes d'affinité pour l'H3K9me3 montre des localisations modifiées dans l'hétérochromatine et ne parvient pas à maintenir la répression d'un gène cible, p16^{INK4A}. La capacité de TTD d'interagir avec l'histone H3K9me3 et avec l'histone H3K4 non-modifiée dans le même peptide suggère que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones répressives sont fortement coordonnées par le biais de l'UHRF1, probablement par le recrutement des enzymes modificatrices de la chromatine HDAC1, DNMT1, Suv39H1 et G9a.

L'ensemble de ces travaux nous a amené à mieux comprendre le rôle de l'UHRF1 et de ses partenaires DNMT1, HDAC1 et Tip60 dans la régulation du code épigénétique et dans la régulation de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs ($p16^{INK4A}$ et RB1). De même nos études soutiennent le fait que de trouver un inhibiteur spécifique de l'UHRF1 serait très intéressant pour une stratégie anti-cancéreuse ciblant la transmission de l'information épigénétique d'une cellule mère cancéreuse aux cellules filles.

SUMMARY

Role of UHRF1 and its partners in the epigenetic regulation of tumor suppressor genes

The memory of a cell, *i.e.*, its ability to express a defined number of genes, is linked to the presence of small changes called epigenetic modifications, positioned on cytosine or on certain amino-acids of histones. These modifications determine the nature and functions of a cell. When the cells proliferate, they must transmit this information to the offspring by copying faithfully the methylation patterns of DNA and the histone code at the right place. The maintenance of methylation patterns of DNA is achieved by DNMT1 (DNA MethylTransferase 1) that is the most abundant DNA methyltransferase in somatic cells and has a preference for hemimethylated DNA. DNMT1 is considered as the main enzyme responsible for duplication and maintainance patterns of DNA methylation from the parental strand to the daughter strand after DNA replication.

Undoubtedly, the UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain 1) increasingly appears as a key player in the duplication of the epigenetic information. UHRF1 is overexpressed in several cancer cell lines in which aberrant changes of DNA methylation patterns and of the histone code have been identified. The UHRF1 plays a role in tumorigenesis by the maintainance of the deregulation of the expression of genes that are known to play an important role in carcinogenesis, such as *topoisomerase II* α , *RB1*, *p16*^{*INK4A*}, *p14*^{*ARF*} and *RAR* β . UHRF1 is required for cell proliferation, particularly for the transition G1/S. UHRF1 may contribute to carcinogenesis by the permanent repression of the expression of tumor suppressor genes leading to the loss of control of G1/S transition of the cell cycle.

UHRF1 contains in its structure five functional domains: the ubiquitin-like domain (NIRF_N domain) which may be involved in the interaction of UHRF1 with the proteasome. The "Cryptic tandem Tudor domain" (TTD domains) that may be involved in the di/trimethylation of lysine 9 of histone H3. The PHD domain "The Plant Homeo Domain" which is able to read the histone code and discriminate between H3K4me3 and H3K4me2 (histone 3 di- tri-methylated at lysine 4). It was proposed that the PHD domain could promote gene activation or repression through its interaction with trimethylated H3K4 and this change is a universal modification of gene activation. The "Set and Ring Finger Associated domain" (SRA domain) which is only found in the family UHRF in mammals and is able to interact with both HDAC1 (Histone Deacetylase 1) and methylated CpG islands. Finally, the RING finger domain "Really Interesting New Gene"

that has an E3 ligase activity towards histones H1, H2B and H3 but also towrds DNMT1. The presence of these five domains in the structure of UHRF1 suggests that UHRF1 has the ability to read and control the epigenetic code.

To understand the precise role of UHRF1 in the regulation of the epigenetic code and in order to search for proteins that could interact with the SRA domain of UHRF1, we used the two-hybrid system in collaboration with Hybrigenics (Paris). Several clones encoding a sequence of 215 amino acids were isolated, and showed 100% homology with a sequence of a new domain of the human DNMT1. We called this new domain of DNMT1 the "SRA-binding domain" (SRA-BD). This interaction was confirmed by GST pull-down assay and coimmunoprecipitation experiments in Jurkat cells and immortalized smooth muscle cells (SMC1-HVT). These results are consistent with other studies which showed that UHRF1 is able to recruit DNMT1 to hemimethylated DNA for faithful replication of DNA methylation patterns. Analysis of the SRA domain structure demonstrates that this domaine behaves as a "hand" with a "palm" that holds the methylated cytosine residue, after which two "fingers" flip the methylated cytosine out from the DNA helix into the major DNA groove. The flipped methylated cytosine enables UHRF1 to be anchored at the hemimethylated site to give the time necessary for DNMT1 to methylate the newly synthesized DNA. This mechanism is called "methyl-cytosine base-flipping mechanism".

To understand the role of the UHRF1/DNMT1 complex on gene expression of tumor suppressor genes $p16^{INK4A}$, *RB1* and on the expression of *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*), we analyzed their expression in UHRF1 or DNMT1-knocked-down cells. We found that the loss of UHRF1 or DNMT1 function leads to decreased expression of VEGF, a major proangiogenic factor, while the expressions of the tumor suppressor genes $p16^{INK4A}$ and *RB1* were significantly increased. These results indicate that UHRF1 and DNMT1 are involved in *VEGF* gene expression probably by the interaction of the SRA domain of UHRF1 with the "SRA-BD" of DNMT1 and increasing the expression of $p16^{INK4A}$.

It was proposed that DNA methylation, ubiquitination and acetylation of histones are presented in a large complex involved in replication of the epigenetic code that was named "ECREM" for "Epigenetic Code REplication Machinery", with Tip60 (Tat-interactive protein, 60 kDa). Tip60 is a histone acetyltransferase with specificity towards lysine 5 of H2A (H2AK5) and plays multiple roles in the processes of chromatin remodeling. The co-immunoprecipitation and immunocytochemistry experiments have shown that Tip60 is present in the same macromolecular complex with UHRF1, DNMT1 and HDAC1. The knockdown expression of UHRF1 or DNMT1 by RNA interference increased the expression of Tip60 but significantly decreased the level of acetylation of H2AK5. These results suggest that UHRF1 and DNMT1 is required to acetylate H2AK5, and Tip60 participates in a large complex including UHRF1, HDAC1 and DNMT1

responsible for the replication of the epigenetic code. Thus, a direct effect of UHRF1 on the histone code might be due to its enzymatic activity (E3 ligase) while an indirect effect could be produced through its association with its partners. These results suggest that UHRF1 control and regulate the relationship between histone modifications and DNA methylation in the context of tumor angiogenesis and suppression of tumor suppressor genes.

UHRF1 knockdown causes a decrease in the levels of DNA methylation and chromatin structure changes. DNA methylation controls histone modifications considering that the loss of DNMT1 in human colon cancer cells results in a decrease and redistribution of H3K9me3 (histone H3 trimethylated on lysine 9). UHRF1 is necessary for maintenance DNA methylation and also interacts with H3K9me3 in an unknown manner. We showed that UHRF1 contains a Tandem Tudor Domain (TTD) that recognizes H3 tail peptides with the heterochromatin-associated modification state of trimethylated lysine 9 and unmodified lysine 4 (H3K4me0/K9me3). Mutant UHRF1 protein deficient for H3K4me0/K9me3 binding shows altered localization to heterochromatic chromocenters and fails to reduce expression of a target gene, p_{16}^{INK4A} , when overexpressed. Our results demonstrate that DNA methylation and repressive histone modifications are highly coordinated through UHRF1, probably by the recruitment of chromatin modifying enzymes HDAC1, DNMT1, G9a and Suv39H1.

Finally this work led us to better understand the role of UHRF1 and its partners DNMT1, HDAC1 and Tip60 in regulating the epigenetic code and in regulating the expression of some tumor suppressor genes ($p16^{INK4A}$ and RB1). Similarly, our studies support the idea that finding a specific inhibitor of UHRF1 would be very interesting for a anti-cancer therapy targeting the transmission of the epigenetic information from a mother cancer cell to daughter cells.

Préambule

L'ADN est compacté dans une structure hautement condensée et organisée et il requiert que la machinerie transcriptionnelle ait accès aux gènes pour la transcription selon un programme crucial permettant la différentiation cellulaire et le développement. La transcription est un événement complexe qui implique une machinerie enzymatique convertissant le code génétique de l'ADN au code ARN (transcription) qui est traduit en code d'acides aminés connu comme polypeptide ou protéine (traduction). La différenciation cellulaire, la prolifération et le développement requièrent que les gènes soient transcrits spécifiquement pendant un moment précis du cycle cellulaire selon le type cellulaire. À l'exception des cellules germinales, toutes les autres cellules d'un organisme ont le même code génétique, excluant la possibilité que les caractéristiques de la différenciation sont héritées par le seul code génétique. Il est maintenant évident que des modifications discrètes de la chromatine peuvent réguler la transcription et peuvent être transmises à la descendance (cellules ou organismes) par des mécanismes peu connus. Ces modifications, référées comme modifications épigénétiques, impliquent des modifications post-traductionnelles des histones surtout dans les parties N-terminales, les petits ARN nucléaires et la méthylation de l'ADN des îlots CpG. Les modifications épigénétiques jouent un rôle fondamental dans la régulation de la transcription particulièrement pendant le développement embryonnaire, l'inactivation du chromosome X chez les femelles, l'empreinte génomique parentale et le « silencing » des éléments rétroviraux (Li, 2002 ; Jaenisch et Bird, 2003).

Des altérations intempestives de ce code épigénétique auront des répercussions sur la prolifération et la différentiation et peuvent résulter de la surexpression (fonction oncogénique) ou de la perte (fonction de gène suppresseur) d'acteurs clefs de leurs régulations. De tels cas ont été décrits dans de nombreux types de cancers, mais ne répondent

pas toujours à un schéma simple. Ainsi, des anomalies génétiques retrouvées fréquemment dans des leucémies myéloïdes touchent volontiers des acteurs de la régulation épigénétique, en général, dans le sens de l'extinction des gènes promoteurs de la différentiation. En conséquence, un programme de "silencing" aberrant peut tout à fait constituer un événement principal dans la génèse de certaines formes de cancers.

Durant ces dernières années la régulation des modifications épigénétiques est devenue un sujet d'intérêt intense. Pendant mes travaux de thèse, je me suis intéressée à identifier les partenaires de l'UHRF1, dont la structure comporte 5 domaines fonctionnels intéressants impliqués dans la régulation du code épigénétique et à comprendre le rôle de ces interactions dans la régulation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs *p16^{INK4A}* et *RB1*. D'abord, je vais introduire ce nouvel acteur du code épigénétique [«] UHRF1 [»] et ensuite je vais présenter les différents mécanismes de la régulation épigénétique.

INTRODUCTION

Introduction

I. L'Ubiquitin-like PHD Ring Finger 1 (UHRF1)

1. Découverte de l'UHRF1 et du gène codant UHRF1 :

En 2000, notre équipe a identifié, grâce au système du simple hybride (interaction ADN/protéine) un nouveau gène modulant l'expression du gène *topoisomérase IIα* que nous avons appelé ICBP90 pour [«] Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa[»] (Hopfner et coll., 2000, 2001 & 2002). D'un point de vue structural, la protéine ICBP90 possède un domaine [«] ubiquitin-like [»], deux sites de localisation nucléaire, deux domaines à doigt de zinc (PHD et RING finger), deux domaines TTD (Tandem Tudor Domain), ainsi qu'un domaine SRA [«] Set and Ring Associated domain[»] (**Figure 1**) (Hopfner et coll., 2000 ; Mousli et coll., 2003 ; Bronner et coll., 2007a ; Bronner et coll., 2009 ; Nady et coll., in press). À partir de cette structure, la nomenclature internationale (HUGO committee) a donné le nom de [«] UHRF^{*} à cette famille, pour Ubiquitin-like containing PHD and Ring Finger domain 1. L'UHRF1 (ICBP90) est donc codée par le gène *UHRF1* tandis que l'*UHRF2* code pour NIRF (Np95/ICBP90 Ring Finger). Cette famille contient 4 membres chez l'homme (**Figure 2**) (Bronner et coll., 2007a).

Le gène de l'*UHRF1* a été localisé dans la région chromosomique 19 p13.3 (Hopfner et coll., 2001). Ce gène couvre une portion de l'ADN génomique d'au moins 53 kb (numéro d'accession GenBank : AF129507).

2. Domaines structuraux de l'UHRF1 :

De l'extrémité NH2 terminale vers l'extrémité COOH terminale, on note successivement la présence de cinq domaines très conservés au cours de l'évolution (**Figure 1**) : un domaine NIRF_N ou un domaine [«] ubiquitin-like [»], les domaines TTD [«] Cryptic Tandem Tudor Domains[»], le domaine PHD [«] plant Homeo domain[»] un domaine à doigt de zinc de type C4HC3, un domaine SRA pour [«] Set and Ring Finger Associated Domain [»], et enfin un domaine à doigt de zinc de type C3HC4 appelé RING finger domain pour [«]Really Interesting New Gene[»] (**Figure1**).

UHRF1: Ubiquitin-like, containing PHD and RING Finger domains, 1 ICBP90: Inverted CCAAT box Binding Protein of <u>90</u> kDa



Figure 1 : La structure de l'UHRF1. La structure de l'UHRF1 révèle la présence de cinq domaines fonctionnels. De l'extrémité NH2 terminale vers l'extrémité COOH terminale: un domaine NIRF_N ou un domaine « ubiquitine-like », les domaines TTD « Cryptic Tandem Tudor Domains», un domaine à doigt de zinc de type C4HC3 ou le domaine PHD « plant Homeo domain», un domaine de type « SRA » pour Set and Ring Finger Associated Domain, et enfin un domaine à doigt de zinc de type C3HC4 ou RING finger domain pour «Really Interesting New Gene».

2-1 Ubiquitin-like domain (NIRF_N domain)

Les motifs [«] ubiquitin-like [»], dont la structure est 35% identique à celles de l'ubiquitine, sont constitués de 45 à 80 acides aminés hautement conservés des protozoaires aux vertébrés. Ils interviennent dans de nombreux processus cellulaires comme la dégradation des protéines réalisée par le protéasome 26S, la réparation de l'ADN, la maintenance de la structure chromatinienne, ou encore la régulation de l'expression génique (Schauber et coll., 1998 ; Sun, 2003 ; Kerscher et coll., 2006). Néanmoins, le rôle du domaine NIRF_N est moins clair et il pourrait être impliqué dans des interactions protéine/protéine. En effet, il a été récemment démontré que le domaine ubiquitin-like (NIRF_N) de PLIC-1 [«] Protein Linking IAP to the Cytosquelette » est capable de se fixer au « Ubiquitin-Interacting Motif (UIM) » de la sousunité protéasomique S5a et il a été proposé pour être impliqué dans le transport aux aggregosomes (Heir et coll., 2006). On pourrait imaginer que le domaine NIRF-N de l'UHRF1 pourrait être impliqué dans le transport aux aggregosomes. Une relation entre l'ubiquitination de l'H2B et la méthylation de l'H3 par l'intermédiaire des protéines protéasomales chez les levures a été décrite par Ezhkova et Tansey, (2004). La monoubiquitination des histones H2B est requise pour deux événements activateurs, i.e., la méthylation de H3K4 et la méthylation de H3K79. Il a été montré que les ATPases protéasomales Rpt4 et Rpt6 fonctionnent pour connecter ces deux modifications des histones (Ezhkova et Tansey, 2004). Il a été trouvé que le recrutement de la sous-unité protéasomique à la chromatine dépend de l'ubiquitination de H2B et qu'une mutation dans les sous-unités protéasomiques Rpt4 et Rpt6 perturbe la méthylation de l'H3 sur K4 et K79 mais laisse l'ubiquitination de H2B intact (Ezhkova et Tansey, 2004). En outre, Citterio et coll., (2004) ont suggéré que l'ubiquitination des histones par l'UHRF1 est un mécanisme clé régulateur pour contrôler l'expression des gènes. On peut imaginer que l'UHRF1 recrute le protéasome aux sites où les histones monoubiquitinées devraient être éliminées et dégradées (Bronner et coll., 2007a).

2-2 Cryptic Tandem Tudor domains (TTD domains):

Les domaines Tudor appartiennent à la super famille de SH3 (Charier et coll., 2004). Les domaines SH3 sont souvent des protéines modulatrices qui ont une polyvalence fonctionnelle très importante à partir de la transmission du signal à la fixation aux acides nucléiques (Charier et coll., 2004). Il y a trois domaines centraux dans les TTD qui sont impliqués dans des processus clés du remodelage de la chromatine : le domaine PWWP (Séquence de Proline et Tryptophane conservée), le chromatin-binding domain (Chromo) et le domaine MBT

(Malignant Brain Tumor). Les domaines TTD correspondent à un motif de 50 acides aminés conservés avec 10 répétitions dans les différents protéines associées à l'ARN (Ponting, 1997; Maurer-Stroh et coll., 2003 ; Callebaut et Mornon 1997). Leur structure est caractérisée par cinq brins de motif β et quatre boucles de connexion. Une grande variation dans la séquence, la longueur et de la flexibilité des trois premières boucles est responsable de la spécificité fonctionnelle des domaines SH3-like (Charier et coll., 2004). Par contre, la quatrième boucle a une structure très conservée et joue un rôle très important dans la stabilité de la structure de ces protéines SH3 (Dalgarno et coll., 1997). La structure 3D des domaines TTD de l'UHRF1 a été montrée pour la première fois par Hashimoto et coll., (2009). L'alignement structural le plus proche était entre TTD1 (résidus 126-206) de l'UHRF1 et le domaine N-terminal de TTD de 53BP1 (p53-Binding Protein). En général, des similarités fonctionnelles résident dans les similarités structurales. Charier et coll., (2004) ont trouvé deux motifs correspondant à un domaine TTD dans la structure de 53BP1. Le domaine TTD de SMN (Survival of Motor Neuron) et de 53BP1 est capable de se fixer aux arginines diméthylées d'une séquence riche en arginine-glycine (Selenko et coll., 2001). Les domaines TTD de 53BP1 sont capables de reconnaître la lysine 382 diméthylée de p53 (p53K382me2) suite à des dommages à l'ADN, une interaction qui stabilise p53 (Kachirskaia et coll., 2008). La 53BP1 de mammifères et ses orthologues Rad9 et Crb2/Rhp9 chez la levure, reconnaissent les coupures doubles brins de l'ADN via le domaine TTD qui est capable d'interagir avec les histones méthylées (Huyen et coll., 2004 ; Sanders et coll., 2004). La 53BP1 humaine reconnaît soit la K79 diméthylée de l'histone H3 soit la K20 diméthylée de l'histone H4 (Botuyan et coll., 2006 ; Huyen et coll., 2004 ; Schotta et coll., 2008 ; Yang et coll., 2008). Un fait intéressant, Nady et coll., ont montré que le domaine TTD de l'UHRF1 est capable d'interagir avec l'histone H3K9me3 et avec l'histone H3K4 non-modifiée dans le même peptide. L'UHRF1 déficiente en termes d'affinité pour l'H3K9me3 montre des localisations modifiées dans l'hétérochromatine et ne parvient pas à maintenir la répression d'un gène cible, p16^{INK4A} (Nady et coll., in press). Rad9, qui est impliquée dans la réparation de l'ADN chez S. cerevisiae, reconnaît via son TTD exclusivement la K79 méthylée de l'histone H3 (Grenon et coll., 2007); alors que Crb2/Rhp9 (DNA repair protein) chez Schizosaccharomyces pombe reconnaît exclusivement la K20 méthylée de l'histone H4 via son TTD (Du et coll., 2006; Sanders et coll., 2004). Ces interactions du domaine TTD et du domaine BRCT (Carboxyl-Terminal domain of the BReast Cancer gene 1 protein) de Rad9 avec la chromatine coopèrent pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Hammet et coll., 2007). Cepandant l'UHRF1 est impliquée dans la transition G1/S (Jeanblanc et coll., 2005), cela pourrait être expliqué via son TTD. On pourrait imaginer que le TTD de l'UHRF1 triméthyle la H3K9 à proximité du promoteur du gène suppresseur de tumeur $p16^{INK4A}$. La triméthylation de la H3K9 favoriserait la désacétylation de H3K9 par l'HDAC1 et la méthylation de l'ADN par la DNMT1. Ces événements sont responsables de la répression du gène $p16^{INK4A}$ qui à son tour est impliquée dans l'inhibition de la liaison de la cycline D à la Cdk 4 ou Cdk 6 qui est impliquée dans la progression de phase G1. Par conséquent, le TTD de l'UHRF1 favorise l'entrée des cellules en phase S en réprimant l'expression du gène $p16^{INK4A}$. D'autres protéines possèdent aussi les TTD domaine comme l'hétérochromatine HP1 qui est capable de se fixer à l'histone H3 méthylée par le chromo-domaine.

2-3 Plant Homeo Domain (PHD domain):

Ce domaine est un domaine hautement spécialisé dans la liaison aux lysines méthylées, qui a été trouvé dans plusieurs protéines régulatrices de l'expression génique. En effet, de récentes publications décrivent comment le PHD Finger est capable de lire une partie du code histone (Pena et coll., 2006 ; Shi et coll., 2006 ; Wysocka et coll., 2006 ; Li et coll., 2006). Le PHD Finger pourrait stimuler l'activation ou la répression d'un gène via l'interaction avec H3K4 tri-méthylée, qui est la modification universelle pour l'activation de l'expression génique (Mellor, 2006). Le domaine PHD montre moins d'affinité pour K4 di-méthylée que pour K4 tri-méthylée suggérant que le domaine PHD est capable de discriminer des petites différences chimiques, une propriété fondamentale pour lire le code épigénétique. En outre, il a été démontré que l'UHRF1 de souris (mUHRF1) est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine péricentromérique via son domaine PHD (Papait et coll., 2007). Karagianni et coll., (2008) ont montré que l'UHRF1 est capable d'interagir avec l'H3K9me3 via son domaine PHD suggérant que l'UHRF1 assume un lien entre la méthylation des histones via son domaine PHD et la méthylation de l'ADN via son domaine SRA qui est capable d'interagir avec l'ADN hémi-méthylé et avec la DNMT1 (Unoki et coll., 2004; Achour et coll., 2008). Il a été proposé que l'interaction UHRF1-H3K9me3 favorise l'ubiquitination de la chromatine (Karagianni et coll., 2008). Cet évènement pourrait être un signal pour recruter les autres acteurs du code épigénétique comme les méthyltransférases et les désacétylases ce qui favorise la formation de l'hétérochromatine (Karagianni et coll., 2008).

2-4 Set and Ring Finger Associated Domain (SRA domain):

Le domaine SRA est un domaine composé de 150 à 170 acides aminés caractérisés par la conservation de 13 résidus glycine et un motif de VRVVRG (Baumbusch et coll., 2001). Jusqu'à présent, le domaine SRA n'a été trouvé que dans la famille de l'UHRF pour ce qui concerne les vertébrés. Cependant, ce domaine a été trouvé dans les histones méthyltransférases d'*Arabidopsis thaliana* comme SU(VAR)3-9, homologues de SUVH1 et SUVH2. Chez *A. thaliana*, le domaine SRA régule la méthylation de l'ADN (Naumann et coll., 2005). Il a été démontré que la méthylation de l'ADN est un préalable à une méthylation consécutive de H3 et H4 dépendante de SUVH2 pour la maintenance de l'hétérochromatine (Naumann et coll., 2005). En effet, il a été trouvé que l'UHRF1 était capable d'interagir avec la

désacétylase HDAC1 par le biais de son domaine SRA ainsi que avec les îlots CpG méthylés présents au niveau de promoteur de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme *RB1*, $p14^{ARF}$ et $p16^{INK4A}$ (Figure 2) (Unoki et coll., 2004). Nous avons observé que le domaine SRA interagit avec la DNMT1 humaine (Achour et coll., 2008). La DNMT1 et HDAC1 ont été trouvées dans le même complexe macro-moléculaire comme Suv39H1, une histone méthyltransférase (Macaluso et coll., 2003). Cela suggère que l'UHRF1 et Suv39H1 pourrait se trouver aussi dans le même complexe.



Figure 2: Mécanisme de la répression des gènes suppresseurs de tumeurs par le domaine SRA de l'UHRF1. L'UHRF1 est capable d'interagir avec l'histone désacétylase HDAC1et la DNMT1 par le biais de son domaine SRA, ainsi qu'avec les îlots CpG méthylés présents au niveau de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme RB1, $p14^{ARF}$ et $p16^{INK4A}$. La DNMT1 et l'HDAC1 ont été trouvées dans le même complexe macromoléculaire que Suv39H1, une histone méthyltransférase et ensemble participeraient à la répression génique. L'association entre l'UHRF1 et la Suv39H1 n'a jamais été clairement montrée mais reste fortement probable.

Le domaine SRA est également impliqué dans les mécanismes d'interaction avec les histones H3 comme cela a pu être démontré pour l'UHRF1 de souris (Citterio et coll., 2004). La liaison spécifique de l'UHRF1 avec la H3K9 triméthylée (H3K9me3) dépend de deux domaines fonctionnels, du domaine PHD qui définit la spécificité de liaison et du domaine SRA qui favorise l'activité de cette liaison de (UHRF1-H3K9me3) (Karagianni et coll., 2008). Il a été suggéré que l'UHRF1, par le biais du domaine SRA, assure chez les vertébrés une partie des fonctions des histones méthyltransférases chez les plantes (Bronner et coll., 2007a). Le domaine SRA de l'UHRF1 pourrait être comme un [«] pont [»] entre la méthylation de l'ADN

et le code histone, une propriété fondamentale dans la transmission du code épigénétique (Bronner et coll., 2007a). Hashimoto et coll., (2008) ont montré que le domaine SRA de la mUHRF1 fait basculer la 5-méthylcytosine à l'extérieure de l'hélice de l'ADN. Avvakumov et coll., (2008) ont montré que le domaine SRA de l'hUHRF1 fait basculer la 5-méthylcytosine à l'extérieur de l'hélice de l'ADN et que le remplacement ponctuel de la Gly448 par l'acide aspartique produit une protéine mutée dont l'affinité à l'ADN hémi-méthylé est significativement plus faible (**Figure3**). Également, il a été démontré que l'Arg 491 et l'Asn 489 du SRA domaine de l'UHRF1 jouent des rôles centraux dans la spécificité et l'affinité à la séquence 5-mCpG (Avvakumov et coll., 2008).



Avvakumov et coll., 2008. Nature 455, 822-825

Figure 3 : Le complexe ADN-domaine SRA. Le domaine SRA est représenté et étiquetés avec des boucles souples en vert, des brins en jaune et des hélices en rouge. Le duplex d'ADN est représenté comme des bases de couleur bleue. Le « flipped » désoxycytidine méthylé est mC. La structure du domaine SRA montre que ce domaine se comporte comme une « main », dont deux «doigts» font basculer une cytosine méthylée dans le grand sillon de l'ADN, permettant ainsi à la « paume » d'interagir avec le groupement méthyle. Ce mécanisme est appelé «methyl-cytosine-base-flipping mechanism».

2-5 Really Interesting New Gene Finger domain (RING Finger domain):

L'ubiquitination est une des modifications post-transcriptionnelles dans lesquelles un polypeptide de 76 acide aminés est conjugué par son extrémité carboxylique (C-terminal) aux lysines des protéines cellulaires qui sont destinées à la dégradation (polyubiquitination) via le protéasome ou pour des fonctions régulatrices (mono-ubiquitination). Une cascade enzymatique conservée (E1-E2-E3) est impliquée dans l'ubiquitination. Les membres de la famille UHRF, comme plusieurs ligases comportant un domaine RING Finger (Lorick et coll., 1999; Joazeiro et Weissaman, 2000; Chen et coll., 2002), ont une activité d'autoubiquitination in vitro (Mori et coll., 2002; Citterio et coll., 2004; Jenkins et coll., 2005). Le rôle de cette auto-ubiquitination reste inconnu. Il est probable que les histones sont les substrats pour les membres de la famille UHRF. En effet, il a été démontré que l'UHRF1 ubiquitine les histones, in vitro et in vivo, avec une préférence claire pour l'histone H3 (Citterio et coll., 2004). Mais les histones ne pourraient pas être les seuls substrats des membres de l'UHRF puisque des protéines non-histones ont été identifiées d'être ubiquitinées par l'hUHRF1 (Mori et coll., 2002). Par exemple, l'UHRF1 ubiquitine la DNMT1 par son activité E3 ligase conduisant la DNMT1 vers le protéasome pour y être dégradée (Du et coll., 2010). En fait, il a été récemment démontré que l'UHRF1 et la DNMT1 coprécipitent avec USP7 (Ubiquitin-Specific Peptidase 7, connue également sous le nom HAUSP pour Herpes virus-Associated Ubiquitin Specific Protease), une enzyme de déubiquitination. La surexpression de l'UHRF1 et USP7 a entraîné des changements opposés à l'état de l'ubiquitination et de la stabilité de la DNMT1 suggérant que l'UHRF1 et USP7 régulent la stabilité de la DNMT1 en équilibrant l'ubiquitination de la DNMT1 (Qin et coll., 2011; Bronner, 2011b). Par ailleurs, le rôle de Tip60 (Histone acétyltransférase) est d'acétyler la DNMT1 pour être ubiquitinée ensuite par l'UHRF1, tandis que le rôle de HDAC1 et USP7 est de protéger la DNMT1 de la dégradation (Du et coll., 2010 ; Bronner, 2011b).

3. La famille de l'UHRF :

Les alignements de la structure primaire de sept protéines ont permis de déterminer les pourcentages d'homologie entre les différents membres de la famille (**Figure 4**): l'hUHRF1 (ICBP90, Hopfner et coll., 2000), l'hUHRF4 (ICBP87), la mUHRF1 (Np95, Fujimori et coll.,

1998), l'hUHRF3 (ICBP55), la mUHRF3 (Np55), l'hUHRF2 (NIRF, NP95/ICBP90 Ring Finger, Mori et coll., 2002), la mUHRF2 (NP97, mouse NIRF, GenBank numéro d'accession BAB68317).



Figure 4: La famille de l'UHRF. La structure de l'hUHRF1 (ICBP90), l'hUHRF4 (ICBP87), la mUHRF1 (Np95), l'hUHRF3 (ICBP55), la mUHRF3 (Np55), l'hUHRF2 (NIRF) et la mUHRF2 (Np97). Les séquences ont été obtenues par GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Les numéros d'accession sont AF129507, EAW58743, EAW96409, Q8VDF2, AF274047, XP_993132, pour l'hUHRF1, hUHRF2, hUHRF3, mUHRF1, mUHRF2 and mUHRF3, respectivement. L'hUHRF4 a été trouvé dans AceView (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Les nombres correspondent aux positions des acides aminés. Les sites de la fixation de la protéine du rétinoblastome (RB) sont indiqués par des boîtes. Les valeurs indiquent les pourcentages d'identité avec l'UHRF1 et l'UHRF2, respectivement. Le domaine TTD n'est pas représenté parce qu'il a été découvert plus tard. D'après Bronner et coll., 2007.Pharmacol Ther **115**, 419-434.

La NIRF murine (mUHRF2) montre 54,8% d'identité avec l'hUHRF1. La NIRF humaine et murine partagent 90,3% d'identité, tandis que l'homologie entre l'hUHRF1 et la mUHRF1 (Np95) est seulement de 73,6% (**Figure 4**). L'hUHRF1 et l'hUHRF2 montrent 78.1% et 42.1% d'identité avec hUHRF4 (ICBP87), respectivement. L'hUHRF1 et l'hUHRF2 (NIRF humaine) montrent 59.8% et 35.8% d'identité avec l'hUHRF3 (ICBP55), respectivement et 48.7% et 35.8% avec la mUHRF3, respectivement. Ces similarités suggèrent que la NIRF et l'hUHRF1 dérivent de deux gènes ancestraux communs (Bronner et coll., 2007a).

Il faut noter que SIN259 (Similar to ICBP90 et NIRF) une protéine de 259 acides aminés similaire à l'hUHRF1 (numéro d'accession GenBank XM_066969), deux protéines d'*Arabidopsis thaliana* 1 et 2 (les numéros d'accession GenBank AAG29238 et NP_176778, respectivement) et une protéine d'*Oryza sativa* (le numéro d'accession GenBank AAG03103) ont été considérées de la famille de l'UHRF1 (Mousli et coll., 2003). Ces protéines ont une très faible identité avec l'hUHRF1 et l'hUHRF2 (NIRF). Par exemple, l'hUHRF1 et la NIRF montrent 21,4% et 18,3% d'identité avec la protéine 1 d'*A. thaliana*, respectivement. La protéine d'*O. sativa* a 19,2% d'identité avec l'hUHRF1 et 17,7% d'identité avec la NIRF humaine. La protéine *O. Sativa* ne posséde pas le domaine ubiquitin-like ni le domaine PHD Finger. La deuxième protéine d'*A. thaliana* montre 24% et 19% d'identité avec l'hUHRF1 et la NIRF, respectivement, et elle possède un domaine PHD et un domaine RING Finger ainsi que un domaine SRA mais pas dans le même ordre que celui trouvé dans l'hUHRF1, posant ainsi la question de son appartenance à cette famille (Mousli et coll. 2003, Bronner et coll. 2007a).

Depuis, six membres de la famille ORTH/VIM des gènes d'Arabidopsis thaliana, qui jouent un rôle dans la méthylation de l'ADN *in vivo*, sont connus pour coder des protéines

contenant chacune un PHD, deux domaines RING, et un domaine SRA alors ORTH like-1 code pour une protéine avec un seul domaine RING et un domaine SRA (Kraft et coll., 2008).

4. Évolution phylogénétique de l'UHRF1 :

Le tableau 1 montre les pourcentages d'identité des séquences des acides aminés de l'UHRF1 de différentes espèces. Il montre que le gène de l'UHRF1 est hautement conservé au cours de l'évolution (Bronner et coll., 2007a). L'UHRF1 de singe (Rhésus) est la version plus récente avec une identité de 98% avec l'UHRF1 humaine (hUHRF1). L'UHRF1 de chien a 87,6% d'identité avec l'hUHRF1. L'UHRF1 de souris et de rat curieusement, ne montrent que 73,6% et 75,4% d'identité avec l'hUHRF1. L'UHRF1 du poisson Zèbre et de Xénope ont respectivement 65,6% et 57,5% d'homologie avec l'hUHRF1 (Bronner et coll., 2007a). L'UHRF1 est absente chez la drosophile et le ver nématode mais est présente de l'homme jusqu'au poisson zèbre. Ainsi, nous avons suggéré que phylogénétiquement l'UHRF1, ainsi que les interactions avec ses partenaires, sont apparues avec les vertébrés (Bronner et coll., 2007a).

	Human 793AA	Rhésus 795AA	Chien 799AA	Souris 783AA	Rat 829AA	Poule 760AA	Zébre 776AA	Tétrao. 692AA	Xénop. 656AA
Human	100	98.0	87.6	73.6	75.4	68.3	65.6	55.7	57.5
Rhésus	98.0	100	87.9	74.0	70.9	68.8	67.0	55.5	57.3
Chien	87.6	87.9	100	72.4	73.2	70.0	67.7	54.9	57.1
Souris	73.6	74.0	72.4	100	93.4	61.8	63.0	53.2	52.7
Rat	75.4	70.9	73.2	93.4	100	57.9	63.3	54.0	50.0
Poule	68.3	68.8	70.0	61.8	57.9	100	69.0	54.8	57.7
Poisson Zébre	65.6	67.0	67.7	63.0	63.3	69.0	100	67.1	61.5
Tétrao	55.7	55.5	54.9	53.2	54.0	54.8	67.1	100	65.6
Xénopus	57.5	57.3	57.1	52.7	50.0	57.7	61.5	65.6	100

Tableau 1: Les Pourcentages d'identité entre les séquences d'acides aminés de l'UHRF1 de différentes espèces. Les pourcentages correspondent aux pourcentages des acides aminés identiques entre deux séquences analysés par le logiciel « DNA Strider ». Les

séquences ont été obtenues dans GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Les numéros d'accession sont AF12957 (Human), XP_001082893 (Rhésus), XP_868468 (Chien), AAP86266 (Rat), Q8VDF2 (Souris), XP_418269 (Poule), AAT68031 (Poisson Zèbre), CAG00621 (Tétraodon) and AAI10934 (Xénopus). D'après Bronner et coll., 2007a.

5. Expression de l'UHRF1 dans le cancer et au cours du cycle cellulaire:

L'UHRF1 (ICBP90 et NP95) est surexprimée dans plusieurs lignées cancéreuses incluant le cancer du sein (Hopfner et coll., 2000 ; Mousli et coll., 2003 ; Unoki et coll., 2004 ; Jenkins et coll., 2005), les lésions cervicales (Lorenzato et coll., 2005), rhabdomyosarcome (Schaaf et coll., 2005), adénocarcinome pancréatique (Crnogorac-Jurcevic et coll., 2005), le cancer de la prostate (Jenkins et coll., 2005; Taylor et coll., 2006), les gliomes (Oba-Shinjo et coll., 2005) le cancer de la vessie et du poumon (Unoki et coll., 2009 ; Unoki et coll., 2010). Il a été montré que l'anticorps anti-UHRF1 marque les cellules cancéreuses dans des lésions cervicales (col de l'utérus) avec des propriétés de marqueur d'agressivité du cancer (Lorenzato et coll., 2005). Une publication a mis en exergue les qualités de l'UHRF1, en tant que marqueur cancéreux dans les adénomes du pancréas comparativement aux pancréatites chroniques ou du tissu pancréatique normal (Crnogorac-Jurcevic et coll., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont proposé que l'analyse de l'expression de l'UHRF1 serait utile pour le diagnostique des adénocarcinomes du pancréas. Ainsi, l'UHRF1 pourrait jouer un rôle en dérégulant l'expression des gènes qui sont bien connus pour jouer un rôle primordial en cancérogénèse comme le gène de la topoisomérase II a (Hopfner et coll., 2000 & 2002), RB1 (Jeanblanc et coll., 2005), $p16^{INK4A}$ (Achour et coll., 2008), $p14^{ARF}$ et $RAR\beta$ (Unoki et coll., 2004). Néamoins, l'UHRF1 pourrait réprimer également l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs dans des conditions physiologiques (non cancéreuses) principalement pendant la transition G1/S, par exemple pendant la prolifération des fibroblastes pulmonaires humains et les cellules musculaires lisses immortalisées (SMC1-HVT) (Jeanblanc et coll., 2005, Achour et coll., 2008).
L'expression de l'UHRF1 est variable suivant la nature tissulaire. L'UHRF1 n'est pas exprimée dans les tissus hautement différenciés (système nerveux central, leucocytes périphériques) tandis qu'au niveau des tissus prolifératifs (thymus adulte et fœtal), son expression est particulièrement élevée (Hopfner et coll., 2000). Au sein des cellules non cancéreuses, l'UHRF1 présente deux pics d'expression au cours des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire (Mousli et coll., 2003 ; Jeanblanc et coll., 2005). Au niveau des lignées cancéreuses, au contraire, l'expression de l'UHRF1 est à la fois constante et élevée ce qui suggère une participation active de l'UHRF1 dans les mécanismes liés à la prolifération cellulaire et dont la dérégulation pourrait être à l'origine du caractère tumoral de ces cellules.

En ce que concerne la régulation de l'expression de l'*UHRF1*, les voies de signalisation mitogènes stimulent l'expression de la cycline D et permet la formation et l'activation des complexes cycline-cdk catalysant la phosphorylation successive du suppresseur de tumeur pRB (Figure 5). Lorsque la pRB est hyper-phosphorylée elle devient inactive, et se dissocie du facteur de transcription E2F1 qui peut dorénavant activer l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire dont celui de l'UHRF1 (Figure 5). Arima et collaborateurs (2004) ont montré que l'UHRF1 était réprimée après activation de la voie p53-p21. Également, il a été démontré que l'expression de l'UHRF1 augmente sous l'influence de l'E2F1 (Mousli et coll., 2003), et il a été confirmé que la surexpression de l'*UHRF1* était provoquée par la fixation de l'E2F1 sur l'intron 1 du gène *UHRF1* (Unoki et coll., 2004) (Figure 5). L'UHRF1 régule positivement l'expression de la *Topoisomérase IIa* (Hopfner et coll., 2000) et négativement à l'aide de la DNMT1 et de HDAC1, l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs comme $p16^{INK4A}$, *RB1*, $p14^{ARF}$ et *RAR* β (Unoki et coll., 2004).



Figure 5 : Représentation schématique de la régulation et le fonctionnement de l'UHRF1. Les voies de signalisation mitogènes stimulent l'expression de la cycline D et permet la formation et l'activation des complexes cycline-cdk catalysant la phosphorylation successive du suppresseur de tumeur pRB. Une fois inactivé, ce dernier se dissocie du facteur de transcription E2F1 qui peut dorénavant activer l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire dont celui de l'UHRF1. L'UHRF1 régule positivement l'expression de la *Topoisomérase IIa* et négativement à l'aide de la DNMT1 et de l'HDAC1, l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs.

6. L'UHRF1 : cible thérapeutique intéressante ?

Il y a 3 raisons principales en faveur de ce point de vue. D'abord, il a été démontré que l'inhibition de l'expression de l'UHRF1 empêche l'entrée des cellules en phase S provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Arima et coll., 2004 ; Unoki et coll., 2004 ; Jenkins et coll., 2005). D'autre part, la surexpression de l'UHRF1 est capable de contrer l'inhibition de contact cellulaire dans les fibroblastes pulmonaires humains (Hopfner et coll., 2002). Pourtant, l'UHRF1 n'est pas requise pour la prolifération cellulaire des cellules souches embryonnaires, étant donné que la sous régulation de la mUHRF1 expression ne conduit pas à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Muto et coll., 2002).

Deuxièmement, étant donné que les membres de la famille UHRF1 sont des ubiquitine E3 ligases et qu'il est intéressant d'inhiber les voies de signalisation du protéasome pour développer des médicaments anti-cancéreux, cibler UHRF1 peut s'avérer pertinent pour développer de nouvelles stratégies anti-tumorales (Sun, 2003). De cibler les E3 ligases dans le traitement du cancer a attiré l'attention des industries pharmaceutiques. Parmi les inhibiteurs des E3 ligases les plus récents autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) il y a le bortezomib (Vecade, Millenium, MA) et le NPI-0052 (Chauhan et coll., 2006 ; Roccaro et coll., 2006 ; Anderson, 2007). Cependant, contrairement aux inhibiteurs généraux du protéasome, de cibler une E3 ligase spécifique pourrait stabiliser des protéines cellulaires spécifiques régulées par ces E3 ligases. Cela permettrait d'atteindre un haut niveau de spécificité avec moins de toxicité ou d'effets indésirables. Pourtant cibler ces enzymes n'est encore qu'au début puisque aucun inhibiteur des E3 ligases n'est arrivé aux essais cliniques (Chen et coll., 2006).

Troisièmement, les E3 ligases, y compris l'UHRF1, sont surexprimées dans plusieurs cancers humains et leurs inhibition induit l'arrêt du cycle cellulaire et/ou de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Sun, 2003 ; Chen et coll., 2006 ; Sun et coll., 2006). En effet, par le

33

criblage d'une banque de cDNA dans les cellules A549 pour les gènes qui interfèrent avec la prolifération, un fragment du gène *UHRF1* se comporte comme un dominant négatif de l'UHRF1 a été isolé (Jenkins et coll., 2005). Il est intéressant de noter que la surexpression de l'UHRF1 dont le RING Finger est muté et pour lequel il manque donc l'activité ligase, sensibilise les cellules aux traitements avec plusieurs agents chimiothérapeutiques, comme l'étoposide, le cis-platinium, l'hydroxyurée et le taxol (Jenkins et coll., 2005). La suppression du domaine NIRF_N a conféré une protection des cellules (augmentation de la survie cellulaire) en présence d'étoposide (Jenkins et coll., 2005). En diminuant l'expression de l'UHRF1, une sensibilité plus grande pour l'hydroxyurée a été obtenue dans les cellules cancéreuses résistantes à cet anti-cancéreux (Un et coll., 2006). Il a été suggéré que la modulation de l'expression de l'UHRF1 pourrait être une stratégie intéressante pour inverser la résistance à la cytotoxicité de l'hydroxyurée (Un et coll., 2006). L'augmentation de la chimio-sensibilité pourrait provenir de l'augmentation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs déclenchant les voies de signalisation apoptotiques (Bronner et coll., 2007a).

Il serait intéressant de trouver un inhibiteur spécifique de l'UHRF1 qui permettrait l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales sans entraver l'UHRF1 à exercer son rôle dans la stabilité génomique dans les cellules non cancéreuses. Une possibilité est d'inhiber l'activité E3 ligase du RING Finger qui, à notre connaissance, n'est pas impliquée dans la réplication et dans la stabilité génomique tout en permettant au domaine SRA de recruter l'HDAC1 et la DNMT1 pour désacétyler les histones dans l'hétérochromatine péricentromérique.

II. Les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes dans le contexte de l'UHRF1

1. Définition du code épigénétique

Toute modification covalente au niveau des nucléotides ou des histones, susceptible d'entraîner une reprogrammation de la cellule, sans altérer la séquence génomique, peut-être qualifiée d'épigénétique (Bronner et coll., 2007b ; Turner, 2007). La régulation de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques est très finement contrôlée et essentielle pour le développement harmonieux de l'organisme (Bronner et coll., 2007b). Elle nécessite l'intervention de multiples enzymes qui sont capables de transférer ou d'enlever des groupements méthyles, acétyles, phosphates ou autres (Bronner et coll., 2007b). Les modifications de certains acides aminés des extrémités N-terminales des histones sont stables et transmissibles aux cellules filles. Ces modifications constituent une sorte de code que d'autres protéines, en rapport avec l'état de différentiation de la cellule, vont reconnaître (Bronner et coll., 2007b). D'autres enzymes transfèrent des résidus méthyles sur les cytosines, en particulier dans des îlots CpGs. Ces enzymes sont appelées les méthyltransférases de l'ADN (Bronner et coll., 2007b).

Dans les organismes multicellulaires, la capacité des marques épigénétiques de persister au cours du développement et potentiellement être transmises à la descendance peut être nécessaire pour générer le large éventail de phénotypes différents qui résultent en fait du même génotype (Esteller, 2008 ; Rideout et coll., 2001 ; Fraga et coll., 2005 ; Kaminsky et coll., 2009). Par exemple, les animaux clonés provenant du même donneur ne sont pas identiques, et élaborent des maladies avec une incidence différente de leur donneur (Esteller, 2008 ; Rideout et coll., 2001). Des [«] clones [»] humains qui découlent spontanément des jumeaux monozygotes, sont identiques au niveau de la séquence de l'ADN, mais ont des profils différents de la méthylation de l'ADN et des modifications des histones qui pourraient affecter l'incidence de plusieurs maladies, tels que le cancer ou des troubles auto-immuns (Fraga et coll., 2005 ; Kaminsky et coll., 2009 ; Javierre et coll., 2010). Cependant, ce phénomène est également observé au niveau d'une seule cellule: comment les cellules souches peuvent se développer en n'importe quel type cellulaire et comment une cellule du foie toujours donne lieu à deux nouvelles cellules hépatiques après la division cellulaire? Encore une fois, l'épigénétique semble faire partie de la réponse qui a été décrit comme l'un des facteurs clés dans la différenciation cellulaire (Chi et Bernstein, 2009 ; Meissner et coll., 2008).

L'importance de l'épigénétique dans le maintien et le développement normal se reflète par l'observation que beaucoup de maladies se développent lorsque de mauvaises marques épigénétiques sont mises en place ou sont ajoutés au mauvais moment ou au mauvais endroit (Esteller, 2002). Par exemple, un rôle de causalité clair pour la méthylation de l'ADN dans le cancer est suggéré par l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes, par exemple, $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$, comme un événement précoce dans la tumorigénèse, ainsi que par le profil de méthylation spécifique du type de tumeur (Esteller, 2007).

Les modifications épigénétiques peuvent être regroupées en trois catégories principales : la structure du nucléosome, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (Portela et Esteller, 2010).

2. Structure du nucléosome

L'unité fondamentale de la chromatine est appelée le **nucléosome** qui est composé de l'ADN et des histones (**Figure 6**) (Turner, 2007). Il constitue le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Cette structure est ensuite régulièrement répétée pour former le nucléofilament qui peut, lui-même, adopter des niveaux d'organisation plus compacts (**Figure 6**), le niveau de condensation le plus élevé étant atteint au sein du chromosome métaphasique (Turner, 2007 ; Robert et Vian, 2004).



domaines spécifiques dans le noyau

Figure 6 : Les principales étapes de l'assemblage de la chromatine. L'assemblage commence avec la mise en place d'un tétramère $(H3-H4)_2$ d'histones nouvellement synthétisées (1), à laquelle viennent s'adjoindre deux dimères H2A-H2B (2) pour former la

particule nucléosomale [«] cœur [»]. Les histones nouvellement synthétisées sont spécifiquement modifiées; la modification la plus conservée est l'acétylation de l'histone H4 sur les lysines 5 et 12 (H3-H4*). L'étape de maturation nécessite la présence d'ATP afin d'établir un espacement régulier des nucléosomes et les histones nouvellement incorporées sont désacétylées (3). L'incorporation des histones internucléosomales est accompagnée par le repliement du nucléofilament. Ici est présenté le modèle de type solénoïde dans lequel il y a 6 nucléosomes par tour (4). Finalement, plusieurs repliements successifs conduisent à des niveaux d'organisation supérieurs en domaines spécifiques dans le noyau (5) (http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromatinEducFr.html).

La chromatine a été divisée en **euchromatine** et **hétérochromatine**. L'hétérochromatine a été définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire tandis que l'euchromatine apparaît décondensée pendant l'interphase (Turner, 2007). L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole tandis que l'euchromatine est répartie à l'intérieur du nucléoplasme (Turner, 2007). On distingue: l'hétérochromatine constitutive qui contient peu de gènes, formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères, de l'hétérochromatine facultative qui contient des régions codantes pouvant adopter les caractéristiques structurale et fonctionnelle de l'hétérochromatine, comme le chromosome X inactif chez la femelle des mammifères (Turner, 2007 ; Deplus, 2005).

Le nucléosome est constitué d'un octamère d'histones H3, H4, H2A et H2B, chacune présente sous forme de dimères, sont de petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution (**Figure 6**) (Robert et Vian, 2004 ; Turner, 2007 ; Bronner et coll., 2007b ; Deplus, 2005). La région la plus conservée de ces histones est leur domaine central structuré composé du "motif histone fold" qui comprend trois hélices séparées par deux boucles (Arents et Moudrianakis, 1995 ; Baxevanis et coll., 1995). En revanche, les extrémités N-terminales de ces histones sont plus variables et sont dépourvues de structure secondaire. Ces extrémités sont particulièrement riches en résidus lysine et arginine et donc très basiques (Turner, 2007 ; Bronner et coll., 2007b). Elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles

pouvant affecter leurs charges mais aussi l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéines/protéines avec le nucléosome (Robert et Vian, 2004 ; Turner, 2007 ; Bronner et coll., 2007b ; Deplus, 2005).

L'assemblage de l'ADN en chromatine comprend plusieurs étapes qui commencent par la formation de son unité fondamentale, le nucléosome, et finissent par des niveaux d'organisation supérieurs en domaines spécifiques dans le noyau (Figure 6) (Deplus, 2005 ; Taddei et coll., 2000). La première étape comprend la mise en place, sur l'ADN, d'un tétramère d'histones (H3-H4)₂ nouvellement synthétisées formant la particule subnucléosomale, à laquelle viennent s'adjoindre deux dimères H2A-H2B. L'ensemble constitue la particule nucléosomale « cœur » composée de 146 paires de base d'ADN enroulées autour de l'octamère d'histones (Figure 6) (Robert et Vian, 2004 ; Bronnet et coll., 2007b ; Ray-Gallet et Almouzni, 2010 ; Taddei et coll., 2000). Cette particule [«] cœur [»] et l'ADN de liaison forme le nucléosome. Les histones nouvellement synthétisées sont spécifiquement modifiées (ex: acétylation de l'histone H4). L'étape suivante est une étape de maturation nécessitant la présence d'ATP, au cours de laquelle les nucléosomes sont régulièrement espacés et forment le nucléofilament (Figure 6) (Taddei et coll., 2000). Pendant cette étape, les histones nouvellement incorporées sont désacétylées (Taddei et coll., 2000). L'UHRF1 pourrait jouer un rôle primordial dans cette étape. En fait, il a été démontré que l'homologue murin de l'UHRF1, Np95 joue un rôle crucial dans la formation de l'hétérochromatine via son domaine PHD en favorisant la désacétylation des histones (Papait et coll., 2007). Ensuite, l'incorporation des histones internucléosomales est accompagnée par le repliement du nucléofilament en fibre de 30 nm (Robert et Vian, 2004) dont la structure n'est pas élucidée à ce jour. Deux modèles principaux existent : le modèle de type solénoïde (Figure 6) et le modèle de type zig zag (Robert et Vian, 2004 ; Woodcock et Horowitz, 1995). Finalement, plusieurs repliements successifs conduisent à des niveaux d'organisation supérieurs en domaines spécifiques dans le noyau (Taddei et coll., 2000).

3. Méthylation de l'ADN et régulation de l'expression génique

Au contraire des procaryotes, la méthylation de l'ADN dans les cellules eucaryotiques se produit uniquement sur les bases de cytosines (**Figure 7A**) et est associée à une chromatine réprimée et donc à l'inhibition de l'expression génique (Bird et Wolffe, 1999). La méthylation de l'ADN chez les eucaryotes a été proposée pour avoir évolué à partir de la méthylation de l'ARN chez les eucaryotes (Goll et coll., 2006).

La méthylation de l'ADN est catalysée par une famille des méthyltransférases de l'ADN (**Tableau 2**) qui transfère le groupement de méthyle du donneur [«] S-adénosyl méthionine [»] à la position 5^{ème} de l'anneau de cytosine (**Figure 7A**). Cinq méthyltransférases de l'ADN ont été identifiées: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (**Figure 7B**). Ces enzymes exposent différentes fonctions et acceptent différents substrats (**Tableau 2**). Cependant, la variabilité des DNMTs est plus large parmi les différentes espèces (Ponger et Li, 2005). Les DNMTs ont des expressions variables pendant le cycle cellulaire, l'embryogénèse et dépendent sur la différentiation ainsi que l'état pathologique. Par exemple, la DNMT10 est seulement exprimée pendant le premier stade après la fertilisation et ensuite laisse sa place pour la DNMT1 qui a une séquence 114AA plus courte (**Tableau 2**). Deux activités majeures pourraient principalement être distinguées : la méthylation de [«]maintenance[»] et la méthylation [«] *de novo*[»] (Bronner et coll., 2011a) (**Figure 7C**).

La méthylation de la cytosine chez les mammifères est la modification épigénétique qui se produit sur les dinucléotides CpG palindromique sur les deux brins de l'ADN (**Figure 7A & 7C**). Les sites CpGs sont distribués régulièrement dans le génome. Environ 60% des promoteurs de gènes humains sont associés aux îlots CpG et sont généralement non méthylés dans les cellules normales, bien que certains d'entre eux (~ 6%) sont méthylés d'une manière spécifique de tissu au début du développement ou dans les tissus différenciés (Straussman et coll., 2009). Ces îlots CpGs sont principalement trouvés dans les régions 5' de plusieurs gènes dans la proximité du site d'initiation de la transcription. Le profil de la distribution des îlots CpGs méthylés varie d'un type cellulaire à un autre (Sun et coll., 2010).



D'après cheng et coll., 2008. Structure 16, 341-350

Figure 7 : La structure et la fonction des DNMTs. A: La méthylation de l'ADN sur le carbone 5 de la cytosine. Le point d'interrogation indique l'activité potentielle des déméthylases de l'ADN. **B:** Les membres de la famille de DNMT. Une représentation schématique de DNMT1, DNMT2 et DNMT3. DNMT2 est un tRNA^{Asp} MTase. Les nombres ou chiffres en romains indiquent les motifs conservés des DNMTs. **C:** Méthylation de maintenance versus méthylation *de novo*. Les segments bleus sont les substrats de DNMTs (normalement CpG) et les formes turquoises représentent les groupements méthyles sur la cytosine. Après la réplication ou la réparation de l'ADN, le duplex est méthylé sur un seul brin de l'ADN.

Tableau 2Les Méthyltransférases de l'ADN (DNMTs)Structure, Fonction, Leurs partenaires

Nom	Structure	Substrat	Fonctions	Interactions avec d'autre protéines
DNMT10	1502 AA 175 kDa	ADN hémi-méthylé	-Maintenir les profils de la méthylation de l'ADN sur les allèles des gènes de l'empreinte génomique parentale après fertilisation	Non connu, mais probablement les mêmes que la DNMT1
DNMT1	1616 AA 190 kDa	ADN hémi-méthylé	-Maintenir les profils de la méthylation de l'ADN	UHRF1, HDAC1, HDAC2, PCNA, Suv39H1, HP1, MeCP2, MBD2, MBD3, DMAP1, DNMT3a, DNMT3b, p21 ^{Cip/WAF1} , E2F1, pRB et p53
DNMT2	415 AA	ADN et ARN faiblement, fortement tRNA	Rôles pas clairs	Non connu
DNMT3a DNMT3a2	909 AA 686 AA	ADN, CpG dinucléotide (moins CpA et CpT) sans préférence pour l'ADN hémi- méthylé	-Méthylation <i>de novo</i> pendant le développement des cellules germinales mâles -Méthylation <i>de novo</i> dans l'euchromatine	Suv39H1, DNMT1, DNMT3L, co- represseur RP58, PML- RAR, HP1b, HDAC1
DNMT3b	853 AA	ADN, CpG dinucléotides dans les régions des satellites péricentromériques sans préférence pour l'ADN hémi- méthylé	Joue un rôle dans le développement de souris, -Maintenir les méthylations <i>de novo</i> dans les stades précoces de la mitose des cellules germinales mâles -Maintenir la stabilité génomique de la méthylation <i>de novo</i> dans les satellites péricentromériques	DNMT1, DNMT3L, Sin3a, condensine, KIF4A, SUMO-1/Ubc9, hSNF2H, HDAC1, Suv39H1/HP1, Sumo/Ubc9
DNMT3L	387 AA	pas d'activité méthyltransférase	Joue un rôle dans l'empreinte génomique parentale, contrôle les activités de DNMT3a et 3b	HDAC1, DNMT3a, DNMT3b

Hermann et coll., 2004; Turek-Plewa et Jagodzinski, 2005 Bronner et coll., 2011a

L'hyperméthylation des îlots CpGs est un événement fréquent en cancérogénèse quand cela concerne les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs (Robertson, 2005).

Récemment, il a été démontré que la plupart des méthylations de l'ADN, spécifiques des tissus, semblent se produire dans des plages « shores » d'îlots CpG qui sont des régions de faible densité de CpG se trouvant en amont des sites d'initiation de la transcription (> 2 kb) et qui sont impliquées dans la différenciation cellulaire (Doi et coll., 2009 ; Ji et coll., 2010).

La méthylation de l'ADN est liée à un état transcriptionnel dit « silencieux » des gènes (Boyes et Bird, 1991). Deux modèles ont été élaborés à partir de ces études. Le premier suppose que la méthylation des cytosines empêche l'association des facteurs de transcriptions avec la séquence de l'ADN ciblée. Le deuxième modèle propose que les CpGs méthylés interagissent avec les protéines de fixation aux CpGs-méthylés « Methyl-CpG Binding Domain proteins (MBD)» avec un recrutement subséquent de co-répresseur pour réprimer la transcription (Bronner et coll., 2011a). Les DNMTs sont capables de réprimer l'expression génique en recrutant les MBDs aux îlots CpGs méthylés qui interagissent avec les histones désacétylases, où localement, une structure chromatinienne compacte est générée (Bird et Wolffe, 1999, Wade 2001, Bird 2002, Bronner et coll., 2011a). La famille des MBDs inclut MeCP2, MBD1-MBD4 (Tableau 3) ainsi que Kaiso (Daniel et Reynolds, 1999) et potentiellement l'UHRF1 (Hopfner et coll., 2000 ; Unoki et coll., 2004 ; Jeanblanc et coll., 2005 ; Achour et coll., 2008). Par exemple, MBD2 a des cibles spécifiques et sa présence sur ces cibles est indispensable pour la répression des gènes (Auriol et coll., 2005). MBD2 est spécifiquement et directement impliquée dans la répression transcriptionnelle de hTERT [«] human TElomerase Reverse Transcriptase [»] dans des cellules HeLa (Chatagnon et coll., 2009). Cette répression transcriptionnelle spécifique a également été observée dans le sein, le foie et des lignées cellulaires du cancer du neuroblastome (Chatagnon et coll., 2009). Dans les tissus pathologiques, le niveau d'ARNm de MBD2 est significativement plus élevé dans les tumeurs bénignes par rapport aux tissus normaux du sein, alors que l'expression de MeCP2 n'est pas modifiée. Ces données suggèrent que la régulation positive de MBD2 pourrait être

associés à la prolifération cellulaire (Billard et coll., 2002). Lopez-Serra et coll., (2008) ont proposé un rôle fondamental pour les protéines MBD dans le maintien direct de la répression transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs et identifié de nouveaux gènes candidats pour les perturbations épigénétiques dans les cellules cancéreuses.

Tableau 3 La famille des protéines à domaine MBD ayant la capacité de lier l'ADN et leurs fonctions

PROTEINES	LIAISON ADN	FONCTIONS	REFERENCES
MBD1	Méthylé ou non méthylé	-Répression transcriptionnelle -Lie une HKMT et HP1	Fuijita et coll., 2000
MBD2	Préférence pour plusieurs CpG consécutifs	-Répression de la transcription -Fait partie du complexe répresseur NuRD	Zhang et coll., 1999 Lewis et coll., 1992
MBD3	Non	Fait partie du complexe répresseur NuRD	Hendrich et Bird 1998 Feng et coll., 2001
MBD4	?	-Thymine glycosylase	Millar et coll., 2002
MeCP2 1 seul CpG suffit		-Répression transcriptionnelle -Faite partie du complexe Sin3a/HDAC -lie une HKMT et HP1Wakefield et coll., 1Wakefield et coll., 1Jones et coll., 1998	

HKMT: Histone lysine MethylTransferase. HP1: Heterochromatin Protein. NuRD: Nucleosome Remodeling and Deacetylase. Sin3a: Switch intensive 3a. D'après Deplus, 2005

Métivier et coll., (2008) ont montré l'existence d'oscillations de la méthylation de l'ADN, considérée jusqu'alors comme relativement stable. Cette observation suppose l'alternance rapide de mécanismes permettant de déposer et d'enlever cette marque. Leurs travaux montrent que ce sont les mêmes enzymes, des méthyltransférases de l'ADN, qui sont à la base de ces mécanismes, leur dualité fonctionnelle permettant d'établir ces oscillations. L'inhibition de ce processus empêche la déméthylation du promoteur du gène *pS2/TFF1* [«] TreFoil Factor 1 [»] et son activation ultérieure de la transcription. Les changements cycliques de l'état de méthylation des îlots CpG du promoteur *pS2/TFF1* peuvent donc représenter un événement critique dans la réalisation de la transcription (Métivier et coll., 2008).

Bien que la méthylation de l'ADN se produit principalement dans le dinucléotide CpG chez les mammifères, la méthylation a été récemment décrite chez l'homme dans des sites CHG et CHH (où H est A, C ou T), trouvée dans les cellules souches (Lister et coll., 2009). Les patrons de méthylation de l'ADN sont des cibles thérapeutiques anti-cancéreuses intéressantes. D'un point de vue théorique, les modifications épigénétiques sont plus facilement réversibles que les modifications génétiques (Karpf et Jones, 2002). En effet, les gènes suppresseurs de tumeurs pourraient être réactivés en utilisant des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, comme la 5-aza-cytidine ou des inhibiteurs des histones désacétylases (Cameron et coll., 1999). La déméthylation d'une séquence de l'ADN pourrait être passivement ou activement induite. Plusieurs candidats pour la déméthylation active de l'ADN ont été postulés, principalement MBD2, « 5-methylcytosine DNA glycosylase », Thymine DNA glycosylase (TDG), Demeter, ROS1 et Tet 1, 2, 3 (Detich et coll., 2002; Vairapandi et Duker, 1993 ; Wu et Zhang, 2010). Tet 1 (Ten-Eleven-Translocation) est un partenaire à la H3K4 méthyltransférase MLL [«] Mixed-Lineage Leukemia [»]. Tet1 hydroxyle la 5-méthyle cytosine en 5-hydroxyméthyle cytosine (Wu et Zhang, 2010). Il a été démontré que Tet1 et Tet2 maintiennent 5-hydroxyméthyle cytosine dans les cellules souches embryonnaires de souris (Koh et coll., 2011). La déméthylation a lieu dans les cellules germinales primordiales (PGC) chez les mammifères et dans les embryons précoces, et il est important pour l'effacement des empreintes, épimutations, et pour le retour à la pluripotence (Popp et coll., 2010; Koh et coll., 2011). Il a été démontré que l'AID « Activation-Induced cytidine Deaminase » et de la cytidine désaminases APOBEC1 qui peuvent désaminer la 5méthylcytosine in vitro et cherz Escherichia coli et chez la souris, sont exprimées dans les tissus dans lesquels se produit la déméthylation (Popp et coll., 2010). Les PGCs wild-types ont été marquées par effacement de la méthylation de l'ensemble du génome d'un niveau inférieur à celui de la méthylation de déficients (Np95^{-/-}) (Popp et coll., 2010). En revanche,

les PGCs déficientes pour AID ont été jusqu'à trois fois plus hypermethylées dans l'ensemble du génome que les PGCs wild-types (Popp et coll., 2010). Il a été proposé que l'effacement de la méthylation de l'ADN dans la lignée germinale est un processus global, ce qui limite le potentiel d'hérédité épigénétique transgénérationnelle (Popp et coll., 2010). De plus, il a été démontré que la méthylation de l'ADN a un rôle dynamique dans la régulation des gènes dans les cellules humaines (Métivier et coll., 2008). La méthylation/déméthylation se produit pendant la transcription du promoteur du gène pS2/TFF1 sur l'activation par les oestrogènes (Métivier et coll., 2008). Les DNMTs présentent double activité, être impliquées dans la méthylation des îlots CpGs et la déméthylation active de 5mCpGs par désamination (Métivier et coll., 2008). L'inhibition de ce processus empêche la déméthylation du promoteur du gène pS2/TFF1 et son activation ultérieure de la transcription (Métivier et coll., 2008).

La méthylation de maintenance se produit après la réplication de l'ADN sur les motifs CpG et CpNpG hémi-méthylés, alors que la méthylation *de novo* se produit sur les cytosines non-méthylées (**Figure 7C**).

3.1 Rôles biologiques de la méthylation de l'ADN

Les cellules germinales et le développement embryonnaire sont deux périodes qui sont caractérisées par une reprogrammation épigénétique due à de profondes modifications de la méthylation de l'ADN (Jaenisch et Bird, 2003). Les cellules germinales primordiales (PGC) sont globalement déméthylées. Récemment, il a été démontré que dans les PGCs la 5-méthyle cytosine est hydroxylée en 5-hydroxyméthyle cytosine dans l'ensemble du génome et cela a été cru une déméthylation globale de PGCs (Popp et coll., 2010). Au cours de la maturation et pendant la gamétogénèse, elles deviennent méthylées et la majorité des patrons de méthylation de l'ADN est établie. La deuxième période de modification survient après la fécondation où le pronucléus mâle est rapidement déméthylé. Par contre le génome maternel

présente une déméthylation qui serait plutôt passive et plus lente jusqu'au stade huit cellules ou les deux génomes présentent le même taux de méthylation, c'est-à-dire 15% du taux initial (Oswald et coll., 2000 ; Reik et coll., 2001). À ce stade, la plupart des marques de la méthylation sont effacées sauf au niveau des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (Li, 2002). Une vague de méthylation *de novo* mise en place majoritairement par DNMT3a et DNMT3b établit après les patrons de méthylation de l'ADN des cellules somatiques après l'implantation (Robertson, 2005). Au fil des générations cellulaires, les profils de méthylation sont transmis à la descendance grâce à l'activité de méthylation de maintenance de la DNMT1 (détaillé dans le chapitre du livre Bronner et coll., 2011a).

Lors de la différenciation, les cellules évoluent du stade de totipotence en passant par des étapes de pluripotence pour aboutir à un état bien différencié. Au cours de cette progression, elles acquièrent des propriétés spécifiques reflétant un profil d'expression précis. Ceci nécessite des modifications de la répartition de la méthylation de l'ADN qui par la suite seront transmises aux cellules filles, garantissant la pérennité de l'état différencié. La méthylation de l'ADN participe donc au contrôle de l'expression des gènes tissus spécifiques. En outre, il a été démontré que la plupart des méthylations de l'ADN spécifiques des tissus semblent se produire dans des plages d'îlots CpG et ces méthylations sont suffisantes pour discriminer les différent tissus (comme c'est décrit plus haut) (Doi et coll., 2009 ; Ji et coll., 2010).

La méthylation de l'ADN est moins fréquemment associée à l'activation transcriptionnelle, comme lorsque, par exemple, il se produit au sein des gènes « genes bodies ». La méthylation des gènes est commune dans les gènes exprimés de manière ubiquitaire et est positivement corrélée avec l'expression génique. Elle pourrait être liée à l'efficacité d'élongation et la prévention des erreurs d'initiations de la transcription (Hellman et Chess, 2007 ; Zilberman et coll., 2007).

La méthylation de l'ADN n'est pas seulement liée à la régulation de la transcription du gène. Une fraction importante des CpG méthylés se trouve dans les éléments répétitifs. Cette méthylation de l'ADN est nécessaire pour protéger l'intégrité chromosomique, qui est réalisée en prévenant la réactivation des séquences [«] parasites [»] qui provoquent une instabilité chromosomique (Esteller, 2007).

La méthylation de l'ADN intervient dans certaines étapes plus précises du développement comme l'inactivation du chromosome X et l'établissement de l'empreinte génomique parentale. L'empreinte génomique est le processus par lequel seul l'allèle paternel ou maternel est exprimé. La méthylation de l'ADN joue un rôle clé dans l'empreinte génomique, où l'hyperméthylation de l'un des deux allèles parentaux conduit à une expression monoallélique (Kacem et Feil, 2009). Une réduction de l'expression génique est également observée dans l'inactivation du chromosome X chez les femelles (Reik et Lewis, 2005). L'établissement de celle-ci s'opère lors de la gamétogénèse. Des expériences de transfert nucléaire ont montré que les deux génomes parentaux n'étaient pas équivalents et étaient tous les deux nécessaires pour le développement des embryons (McGrath et Solter, 1984). Après fécondation, l'empreinte est maintenue, dans les cellules somatiques, durant tout le développement de l'individu. De plus, la méthylation de l'ADN permet de stabiliser le génome en masquant ou en inhibant les recombinaisons entre les séquences répétées.

Les progrès récents dans la compréhension des influences nutritionnelles sur l'épigénétique suggèrent que les éléments nutritifs qui font partie du métabolisme du groupement méthyle peuvent influencer de manière significative l'épigénétique. Au cours de périodes critiques dans le développement, l'apport alimentaire du groupement méthyle (choline, la méthionine et l'acide folique) peut altérer la méthylation de l'ADN et des histones, ce qui entraîne des changements tout au long de l'expression génique (Zeise, 2009). Dans des modèles de rongeurs, des femelles enceintes qui ont reçu des aliments riches en méthionine,

48

acide folique et choline, produisent des descendances avec couleurs différents du pelage ou avec une queue déformée. Un certain nombre de syndrômes chez l'homme peuvent être provoqués par la régulation épigénétique défectueuse, y compris le syndrome de Rett. Il existe des exemples intéressants des effets de la nutrition en début de vie qui conduisent à une santé altérée chez les adultes, et certains d'entre eux pourraient être le résultat de modifications épigénétiques (Zeise, 2009).

3.2 Méthylation de maintenance

La DNMT1 est la plus abondante des méthyltransférases de l'ADN dans les cellules somatiques et a une préférence 30 à 40 fois pour l'ADN hémi-méthylé et pour cela elle est considérée comme l'enzyme principale responsable pour copier et maintenir les patrons de méthylation du brin parental au brin fille après la réplication de l'ADN (Portela et Esteller, 2010 ; Turek-Plewa et Jagodzinski, 2005).

La DNMT1 est dirigée aux sites de la réplication de l'ADN par son domaine PBD (PCNA Binding Domain) (**Figure 7B**) pendant la phase S (Chuang et coll., 1997 ; Iida et coll., 2002). L'affinité de la DNMT1 à l'ADN nouvellement synthétisé est accrue par son interaction avec PCNA [«] Proliferating Cell Nuclear Antigen [»], en veillant à la localisation avec la fourche de la réplication (Chuang et coll., 1997; Iida et coll., 2002). L'UHRF1 pourrait remplir une fonction analogue, en guidant la DNMT1 sur l'ADN hémi-méthylé, grâce à son domaine SRA, qui montre une forte liaison préférentielle aux CpGs hémi-méthylés (Unoki et coll., 2004 ; Achour et coll., 2008 ; Bostick et coll., 2007 ; Portela et Esteller, 2010). Par conséquent, la DNMT1 est localisée au niveau de la fourche de la réplication et méthyle l'ADN directement après la réplication (Kishikawa et coll., 2003). Approximativement, 40 millions de dinucléotides CpGs sont à méthyler sur le brin de l'ADN nouvellement synthétisé pendant la réplication de l'ADN afin de maintenir les patrons de méthylation de l'ADN. La DNMT1 est considérée comme l'ADN méthyltransférase de maintenance. Il faut noter que des méthylations de novo sont également dépendantes de la DNMT1 (Liang et coll., 2002). Cela est soutenu par le fait que la DNMT1 interagit avec les DNMT3a et DNMT3b (Tableau 4) (Datta et coll., 2003; Kim et coll., 2002). Toutefois, la division du travail entre la méthylation *de novo* et de maintenance n'est pas toujours aussi claire, et un modèle révisé a récemment été proposé par Jones et Liang, (2009). Le modèle mis à jour prend en charge l'idée que la majeure partie de la méthylation de l'ADN dans les cellules en division serait maintenue par la DNMT1 en liaison avec l'UHRF1 et PCNA. Néanmoins, il propose également que la DNMT3a et la DNMT3B, qui ont été présentées pour s'ancrer fortement aux nucléosomes contenant de l'ADN méthylé (Jeong et coll., 2009), sont compartimentées dans les régions méthylées, méthylant les sites oubliés par la DNMT1 à la fourche de la réplication (Portela et Esteller, 2010; Pogribny, 2010). Le plus intéressant est que la perturbation des interactions DNMT1/PCNA/UHRF1 semble favoriser une hypométhylation de l'ADN globale dans les gliomes humains (Hervouet et coll., 2010). De plus, il a été démontré que la DNMT1 phosphorylée par l'Akt et / ou la PKC abroge les interactions de la DNMT1 avec la PCNA et l'UHRF1. La perturbation des interactions DNMT1/PCNA/UHRF1 agirait comme un événement oncogénique et que l'une de ses signatures (à savoire le niveau faible de l'activité méthyltransférase) est un biomarqueur moléculaire associée à un pronostic chez les patients atteints de gliome (Hervouet et coll., 2010).

Tableau 4

Protéines cellulaires interagissant avec la DNMT1

PROTEINES	FONCTIONS	REFERENCES	
PCNA	Ciblage à la fourche de la réplication Ciblage aux sites de réparation	Chuang et coll., 1997	
HDAC1/HDAC2	Répression transcriptionnelle Remodelage de la chromatine	Fuks et coll., 2000 Robertson et coll., 2000 Rountree et coll., 2000	
DMAP1	Répression transcriptionnelle	Rountree et coll., 2000	
pRB	Suppresseur de tumeur Régulation cycle cellulaire Répression transcriptionnelle Ciblage via E2F	Robertson et coll., 2000	
MBD2/3	Ciblage vers l'ADN hémi-méthylé?	Talematsu, 2000	
PMLRAR	Facteur de transcription oncogénique	Di Croce et coll., 2002	
DNMT3a/DNMT3b	Coopération dans la méthylation de maintenance	Kim et coll., 2002 Datta et coll., 2003	
MeCP2	IeCP2 Ciblage vers l'ADN hémi-méthylé?		
Suv39H	Méthyltransférase des histones	Fuks et coll., 2003	
RNA pol II	Transcription	Leonhardt et coll., 1992	
p300	Histone acétyltransférase	Macaluso et coll., 2003	
Annexine V	Annexine V Liaison à la matrice nucléaire?		
UHRF1	Protéine anti-apoptotique Acteur du code épigénétique Transition phase G1/S du cycle cellulaire Répression des gènes suppresseurs de tumeur	Achour et coll., 2008 (cf résultats) Bostick et coll., 2007	

D'après Deplus, 2005

3.2.1 Structure de l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1)

La DNMT1 contient dans sa structure neuf domaines (**Figure 7B**): une région riche en charges, correspondant au site d'interaction avec la DMAP1 (DNMT1 Association Protein) ; PBD, PCNA- binding domain ; NLS, Nuclear Localisation Signal ; RFTS, DNA Replication Foci Targeting Sequence ; Cysteine-rich ATRX, zinc finger DNA binding motif ; PHD-like, polybromo homology domain, motifs conservés de C-terminal catalytique domaine de DNMTs. Pour chercher les protéines qui interagissent avec le domaine SRA (acides aminés 356–635) de l'UHRF1, nous avons utilisé le système du double hybride en collaboration avec la société Hybrigenics (Paris). Nous avons isolé plusieurs clones contenant une séquence de 215 acides aminés qui montrent 100% d'homologie avec une séquence d'un nouveau domaine de la DNMT1 humaine (AA 401 à 615) que nous avons appelé le SRA-Binding Domain (SRA-BD) (Achour et coll., 2008).

3.2.2 Mécanisme de régulation de l'expression de la DNMT1

La DNMT1 est requise pour un maintien fidèle des patrons de méthylation de l'ADN des cellules cancéreuses et est essentielle pour leur prolifération et survie (Chen et coll., 2007). L'activité de la DNMT1 est deux à trois fois plus forte dans les lignées cellulaires cancéreuses comparées à une lignée non-cancéreuse (Patra et coll., 2002). La surexpression de DNMT1 correspond significativement au niveau faible de la différentiation tumorale (Etoh et coll., 2004). C'est-à-dire dans les tumeurs très peu différenciées, on trouve une forte expression de DNMT1. Il a été démontré que pRB interagit avec la DNMT1 et inhibe son activité méthyltransférase (Pradhan et Kim, 2002). Dans les cellules épithéliales de prostate $Rb^{-/-}$, le niveau de l'expression de la DNMT1 est élevé (McCabe et coll., 2005). La surexpression d'E2F1 provoque une augmentation de l'expression de la DNMT1 suggérant que le promoteur de *DNMT1* est régulé par la voie de signalisation pRB/E2F1 (**Figure 5**) (Mousli et coll., 2003; Unoki et coll., 2004).



Figure 8 : Un schéma représente les mécanismes de la régulation transcriptionnelle du gène *DNMT1*. Dans les différentes phases du cycle cellulaire, il y a une expression basale de *DNMT1* conduite par le site A. Le site E2F modifie la transcription par différents façons, dépendants de la phase du cycle cellulaire. En phase G0/G1, pRB pourrait se fixer à E2F, en recrutant HDAC au complexe, provoquant une répression de la transcription de *DNMT1*. Un facteur de transcription fixée au site A (TFBA) maintient le niveau basal de l'expression de *DNMT1*. En phase G1/S, la transcription de *DNMT1* par le site E2F est réactivée. E2F et TFBA collaborent pour augmenter le niveau de l'expression de *DNMT1*.

Le traitement par trichostatin A, un inhibiteur spécifique de HDAC augmente l'activité promotrice de *DNMT1* dans les cellules NIH 3T3 bloquées en phase G0/G1 (Kimura et coll., 2003). La diminution de l'activité promotrice de *DNMT1* induite par la surexpression d'E2F1 et pRB a été inversée par le traitement de trichostatine A (Kimura et coll., 2003). Les auteurs ont suggéré que la transcription de *DNMT1* est régulée par des voies de signalisation dépendante et indépendante d'E2F-Rb-HDAC (**Figure 8**). Nous avons montré que l'UHRF1

régule l'expression de *DNMT1* (Achour et coll., 2008). On peut imaginer que l'UHRF1 réprime le gène *RB1* qui est un répresseur du gène *DNMT1* ce qui active l'expression de la *DNMT1*. De plus, il a été démontré que l'*UHRF1* est régulée par E2F1 (Mousli et coll., 2003 ; Unoki et coll., 2004). Donc, E2F1 pourrait réguler *DNMT1* via UHRF1 : une hypothèse intéressante à envisager.

3. 3 Rôle de la méthylation de l'ADN dans le cancer

Au cours de la tumorigénèse, il existe deux aberrations de la méthylation de l'ADN : (1) l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs, (2) l'hypométhylation du génome conduisant à une instabilité chromosomique et/ou à l'expression d'oncogènes.

• Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs

Une augmentation de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs conduit à une diminution de leur expression et à une perte de leur effet protecteur face à la dérégulation de la croissance cellulaire (Deplus, 2005). On connaît un nombre grandissant de gènes hyperméthylés associés à la cancérogénèse (Jones et Baylin 2002). Ils concernent les promoteurs de gènes impliqués dans les étapes cruciales de la croissance cellulaire, comme la régulation du cycle cellulaire (*RB1*, $p15^{ARF}$, $p16^{INK4A}$, $p21^{Cip/WAF1}$, p73, $p14^{ARF}$) (Jeanblanc et coll., 2005 ; Gonzalez-Zulueta et coll., 1995 ; Merlo et coll., 1995 ; Herman et coll., 1996 ; Shen et Issa, 2002), l'apoptose (DAPK1 [«] Death-Associated Protein Kinase 1[»]) (Katzenellenbogen et coll., 1999 ; Esteller et coll., 2000).

Un exemple est donné avec le gène *hMLH1* [«] human MutL Homolog[»], impliqué dans la réparation de mauvais appariements nucléotidiques. En effet, le promoteur de *hMLH1* a été montré comme hyperméthylé dans un carcinome colorectal (Nuova et coll., 2006). L'utilisation d'un inhibiteur de DNMT1, la 5-azacytidine conduit à sa réexpression veillant à

l'intégrité du génome et la perte du caractère tumorale des cellules (Kane et coll., 1997 ; Herman et coll., 1998 ; Deplus, 2005).

Une observation importante dans le cancer est l'augmentation de l'expression des DNMTs (Deplus, 2005). En effet, une élévation du taux des DNMTs a été détectée dans différents types de tumeurs (Issa et coll., 1993 ; Xie et coll., 1999 ; Robertson et coll., 1999 ; Girault et coll., 2003 ; Nagai et coll., 2003). La DNMT1 a été montrée comme nécessaire et suffisante pour la transformation induite par l'oncoprotéine fos (Bakin et Curran, 1999). Pourtant aujourd'hui, il n'existe encore aucune corrélation claire entre ces deux constatations car cette surexpression ne paraît pas exister dans tous les cancers (Deplus, 2005). Il semble donc que l'accroissement de l'expression des DNMTs peut être nécessaire mais n'est pas suffisante pour causer les défauts de méthylation observés dans les tumeurs (Deplus, 2005).

• Hypométhylation global du génome

Il est connu depuis longtemps déjà que le matériel génétique des cellules tumorales présente une hypométhylation globale (de 20 à 60% de moins de 5-méthyle-cytosine) (Feinberg et Vogelstein, 1983 ; Goelz et coll., 1985 ; Portela et Esteller, 2010). Il a été proposé que cette diminution de 5-méthyle-cytosine au niveau de régions non régulatrices, des séquences répétitives, et d'éléments structuraux comme l'ADN centromérique augmente l'instabilité chromosomique, la translocation, la délétion et la réactivation des séquences parasitaires, favorisant les réarrangements chromosomiques (Gaudet et coll., 2003 ; Eden et coll., 2003 ; Portela et Esteller, 2010). Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation du taux de délétions dans les cellules embryonnaires invalidées pour l'expression de DNMT1 et le lien établit entre l'hypométhylation et l'instabilité génomique dans les cancers du sein (Tsuda et coll., 2002) ou de la prostate (Schulz et coll., 2002 ; Deplus, 2005).

Cependant l'hypométhylation active également l'expression d'oncogènes et provoque une perte de l'empreinte génomique parentale (Portela et Esteller, 2010). Plusieurs gènes codant pour des oncogènes ont été montrés comme hypométhylés dans les cancers comme c-Myc (Ghazi et coll., 1992). D'autre exemple, MASPIN « MAmmary Serine Protease INhibitor » (également connu sous le nom SERPINB5), un gène suppresseur de tumeur qui devient hyperméthylé dans le cancer du sein et les cellules épithéliales de la prostate, semble être hypométhylé dans d'autres types de tumeurs (Portela et Esteller, 2010). L'hypométhylation de MASPIN augmente son expression avec le degré de dédifférenciation de certains types de cellules cancéreuses (Futscher et coll., 2002 ; Bettstetter et coll., 2005). En 2002, Guo et coll., ont montré une diminution de méthylation des régions régulatrices du gène uPA (urokinase Plasminogen Activator) dans différentes lignées de cancers mammaires. uPA est un gène impliqué dans des processus de métastase et exprimé dans les cancers du sein hautement invasifs. L'hypométhylation de ce gène, événement plus tardif lors de la progression tumorale permet l'expression d'uPA et le développement de métastases (Guo et coll., 2002). Missaoui et coll., (2011) ont montré que l'hyperméthylation des promoteurs des gènes CDH13, DAPK1, et TWIST1 est un événement précoce dans l'initiation et la progression néoplasique du col utérin suggérant que les gènes CDH13, DAPK1, et TWIST1 sont des biomarqueurs potentiels de risque de cancer du col de l'utérus (Missaoui et coll., 2011). Fait intéressant, il a été démontré que la transition de lésions néoplasiques cervicales intra-épithéliales vers un cancer invasif semble être étroitement liée à l'hypométhylation de l'ADN globale, qui pourrait être un marqueur utile des lésions cervicales invasive de l'utérus (Missaoui et coll., 2010).

Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN comme un traitement anti-cancéreux

Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN les plus connus et utilisés sont les analogues de nucléosides comme la 5-azacytidine et la 5-aza-deoxycitidine. Ces drogues ne diffèrent de la cytosine que par le fait qu'elles possèdent un azote à la place d'un carbone à la position 5 du cycle pyrimidine : l'azote ne pouvant pas accepter de groupement méthyle, il s'ensuit une séquestration de l'enzyme méthylant. Ainsi, incorporé à l'ADN, après quelques cycles de réplication, de nombreux sites sont déméthylés. De part leur mécanisme d'action, ces analogues nécessitent la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire (Gowher et Jeltsch 2004). Plusieurs études cliniques ont été réalisées, depuis les années 70 pour le traitement de divers types de cancers (Lomen et coll., 1975 ; Shnider et coll., 1976). Malheureusement, une réduction de la tumeur est accompagnée de beaucoup d'effets secondaires indésirables comme une toxicité hématologique (Egger et coll., 2004). Aujourd'hui, les équipes médicales travaillent donc sur les schémas curatifs afin d'éviter le maximum d'effets néfastes de ces traitements en conservant l'activité de déméthylation nécessaire à la régression des cancers (Aparicio et Weber, 2002).

La zébularine, [1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one] est un autre analogue nucléosidique. Grâce à sa pharmacocinétique favorable, il semble un très bon candidat pour le traitement déméthylant dans les tumeurs comme par exemple, le carcinome de la vessie humaine (Cheng et coll., 2003 ; Vandermeers et coll., 2008), et le cancer du pancréas (Neureiter et coll., 2007; Vandermeers et coll., 2008).

D'autre molécules, plus spécifiques comme des oligonucléotides antisens dirigé contre les DNMTs sont en cours de développement et sont un autre espoir de diminuer les effets secondaires néfastes d'une déméthylation globale de l'ADN (Deplus, 2005).

3.4 Méthylation de novo

La DNMT2 n'est pas impliquée dans l'élaboration des patrons de méthylation de l'ADN qui est en accord avec sa faible capacité à méthyler l'ADN (Hermann et coll., 2003 ; Okano et coll., 1998b). En revanche, il a été démontré que la DNMT2 serait capable de méthyler l'Asp38 de tRNA avec une haute spécificité (**Figure 7B**) (Goll et coll., 2006) et il a été proposé que la DNMT2 serait impliquée dans la régulation épigénétique en associant les ARN interférants avec les modifications des histones (Kuhlmann et coll., 2005 ; Kunert et coll., 2003 ; Bronner et coll., 2011a) (**Figure 9**) mais il reste à déterminer si cela passe par la méthylation de l'ADN ou de l'ARN (Jeltsch et coll., 2006).



Figure 9 : Mécanisme de RdDM (RNA directed DNA Methylation).

Les ARN doubles brins, pouvant provenir de la transcription de séquences répétées et inversées, sont découpés par le complexe multiprotéique Dicer. Les siRNA, en résultant, semblent capable de diriger les DNMTs vers les séquences répétées, conduisant à la méthylation de celles-ci et donc à leur répression. D'après Deplus, 2005.

Les DNMT3s montrent une forte homologie dans leurs séquences primaires et méthylent les dinucléotides CpGs sans réelle préférence pour l'ADN hémi-méthylé et sont responsable de la méthylation de novo dans l'euchromatine (DNMT3a) et les satellites pericentromériques (DNMT3b) jouant ainsi un rôle important dans la stabilité génomique (Tableau 2). Les DNMT3a et DNMT3b sont présentes en très petite quantité dans les cellules somatiques, mais leurs expressions sont élevées dans les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales où il y a une méthylation de novo active importante (Tableau 2). Par conséquent, les DNMT3a et DNMT3b sont régulées au cours de l'embryogénèse (Okano et coll., 1998a; Okano et coll., 1999 ; Xu et coll., 1999). La DNMT3a2 est la forme prédominante dans les cellules souches embryonnaires et les cellules de carcinome embryonnaire mais pourrait également être détectée dans la rate, le thymus, le testicule et l'ovaire (Chen et coll., 2002) (détaillé dans le chapitre du livre Bronner et coll., 2011a). De plus, Gallais et coll., (2007) ont montré que les DNMT3a/b peuvent renforcer l'activation d'un gène rapporteur méthylé en parallèle avec le recrutement de la thymine DNA glycosylase et p68 ARN hélicase, deux composants d'un complexe putatif de déméthylation. La DNMT3a a également été constatée pour être associée à la thymine DNA glycosylase in vivo (Gallais et coll., 2007).

La DNMT3L est une cytosine-like 5-méthyltransférase mais il lui manque les motifs de l'activité de méthyltransférase et elle aurait besoin de collaborer avec les autres DNMTs (Margot et coll., 2000). En fait, la DNMT3L interagit avec DNMT3a et DNMT3b améliorant ainsi leurs activités mais pas celle de la DNMT1 (détaillé dans le chapitre du livre Bronner et coll., 2011a) (Suetake et coll., 2004 ; Bronner et coll., 2011a). La DNMT3L est capable de s'associer avec la famille de la DNMT3 pour établir une empreinte génomique parentale chez la souris (**Figure 10**) (Hata.et coll., 2002).



Figure 10: Modèle de la participation de DNMT3L à l'établissement du profil de méthylation. Au sein des régions régulatrices des gènes d'empreinte génomique parentale, DNMT3L stimulerait l'activité catalytique de la DNMT3a. Cette stimulation conduit à un taux élevé d'ADN méthylé. Les DNMT3a et DNMT3L recrutent une activité désacétylase des histones par interaction avec HDAC, ce qui renforce la répression transcriptionnelle. D'après Deplus, 2005

4. Modifications post-traductionnelles des histones

À l'inverse de la méthylation de l'ADN qui conduit à la répression génique, les modifications des histones exercent des effets plus diversifiés et plus réversibles sur la transcription. Les histones sont de petites protéines (11 à 22 kDa) qui régulent la formation de la chromatine (Bronner et coll., 2011a). Les histones sont composées d'une partie C-terminale globulaire et d'une queue N-terminale flexible. La capacité des résidus de lysines à exister en un de ces trois états méthylés (mono-, di- et triméthylation) en s'associant avec d'autres modifications comme l'acétylation, l'ubiquitination et la phosphorylation ainsi que l'interaction avec les protéines de fixation aux lysines méthylées est le fondement de l'hypothèse du [«] code histone [»] (Jenuwein et Allis, 2003 ; Bronner et coll., 2011a). La nomenclature commune des modifications des histones est la suivante:

- Le nom de l'histone (par exemple, H3)
- L'abréviation à une lettre d'acides aminés (par exemple K pour la lysine) et la position des acides aminés dans la protéine.
- Le type de modification (Me: méthyle, P: phosphate, Ac: acétyle, Ub: ubiquitine)

Alors H3K9me3 désigne la triméthylation du résidu neuf (une lysine) dès le début (par exemple, la N-terminale) de la protéine H3 (http://en.wikipedia.org/wiki/Histone).

L'euchromatine est caractérisée par des niveaux élevés d'acétylation et de la triméthylation de l'H3K4, H3K36 et H3K79. De l'autre côté, l'hétérochromatine est caractérisée par des niveaux faibles d'acétylation et des niveaux élevés de la méthylation de l'H3K9, H3K27 et H4K20 (Li et coll., 2007). Des études récentes ont démontré que les niveaux des modifications des histones sont prédictifs de l'expression génique (Portela et Esteller, 2010). Des gènes activement transcrits sont caractérisés par des niveaux élevés de l'H3K4me3, H3K27ac, H2BK5ac et H4K20me1 dans le promoteur et H3K79me1 et H4K20me1 le long du [«] gene body [»] (Karlic et coll., 2010; Portela et Esteller, 2010).

Il y a au moins 150 modifications des histones connues (**Figure 11**), dont certaines ne répondent pas à la définition du code épigénétique puisque les modifications épigénétiques sont supposées d'être transmises à la descendance dans les cellules ou dans un organisme (Bronner et coll., 2011a).

Les histones formant le nucléosome peuvent avoir chacune plusieurs modifications, donnant lieu à un [«] cross-talk [»] entre les différentes marques (Portela et Esteller, 2010). La [«] communication [»] entre les modifications des histones peut se produire dans la même terminaison d'histone ou entre les différentes terminaisons des histones (Wang et coll., 2008 ; Duan et coll., 2008 ; Nakanishi et coll., 2009). Ainsi, une seule marque d'histone ne détermine pas le résultat, mais plutôt, elle participe à la combinaison de toutes les marques dans une région du nucléosome qui détermine le résultat final (Portela et Esteller, 2010).



Figure 11 : Les modifications post-traductionnelles majeures (les plus documentées) des histones. Me, méthylation, Ac, acétylation, Ub, ubiquitination, P, phosphorylation. En vert et en rouge sont les modifications qui sont connues pour avoir des effets activateurs ou répresseurs sur l'expression génique, respectivement. En bleu sont représentées les modifications qui requièrent plus d'investigations. D'apès Bronner et coll., 2011a

Une étude récente a décrit l'existence de 51 [«]états de la chromatine[»] distincts fondée sur l'enrichissement des combinaisons spécifiques de modifications des histones (Portela et Esteller, 2010). Des rôles biologiques distincts sont proposés pour ces différents états de la chromatine (Ernst et Kellis, 2010). Un cas intéressant concernant des modifications des histones co-habitant se trouve dans les cellules souches embryonnaires ES dans les [«]domaines bivalents [»], lorsque la marque active H3K4me3 se trouve en présence de la marque répressive H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes importants pour le développement. Ces [«] domaines bivalents [»] permettent aux cellules souches embryonnaires d'activer rapidement l'expression des gènes au cours de différents processus de développement (Mikkelsen et coll., 2007; Bernstein et coll., 2006).

Les acteurs et les marques épigénétiques peuvent interagir les uns avec les autres (Portela et Esteller, 2010). Un exemple intéressant de l'interaction entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN est la relation entre la DNMT3L et H3K4. La DNMT3L interagit spécifiquement avec les terminaisons des histones H3, induisant la méthylation *de novo* de l'ADN par le recrutement de DNMT3a, mais cette interaction est fortement inhibée par la H3K4me (Ooi et coll., 2007). En outre, les méthyltransférases des histones et les déméthylases peuvent aussi modifier la stabilité des DNMTs, régulant ainsi les niveaux de méthylation de l'ADN (Estève et coll., 2009 ; Wang et coll., 2009 ; Du et coll., 2010 ; Bronner, 2011b). De l'autre côté, la méthylation de l'ADN peut aussi commander les modifications des histones. Par exemple, la méthylation de l'ADN régule la méthylation de la H3K9 par le recrutement de MeCP2 (Fuks et coll., 2003).

Les nucléosomes sont un obstacle pour la transcription qui bloque l'accès des activateurs et des facteurs de transcription à leurs sites sur l'ADN, dans le même temps, ils inhibent l'élongation de la transcription par les polymérases. L'emballage de l'ADN dans les nucléosomes semble affecter tous les stades de la transcription, ainsi que la régulation de l'expression génique (Portela et Esteller, 2010). En particulier, la position précise des nucléosomes dans les sites d'initiation de la transcription a une influence importante sur l'initiation de la transcription. Ainsi des déplacements des nucléosomes 30 bp de sites d'initiation de la transcription ont été impliqués dans les changements de l'activité de l'ARN polymérase II (Portela et Esteller, 2010). La perte d'un nucléosome directement en amont des sites d'initiation de la transcription est fortement corrélée avec l'activation de gènes, alors que l'occupation des sites d'initiation de la transcription par un nucléosome est associée à la répression génique (Schones et coll., 2008; Cairns, 2009).

Les histones ont des fortes affinités pour l'ADN via les forces électrostatiques des acides aminés (lysines et arginines) chargés positivement des histones et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Par conséquent, tout changement de la charge des histones est susceptible de modifier l'affinité de l'ADN avec les histones et permettre l'accès aux facteurs de transcription (Bronner et coll., 2011a).

4.1 Méthylation et déméthylation

La méthylation des histones sur plusieurs résidus lysines et arginines a été trouvée pour jouer un rôle positif ou négatif sur la transcription (Lee et coll., 2005a; Santos-Rosa et Caldas, 2005 ; Shilatifard, 2006 ; Spotswood et Turner, 2002). Les histones les plus fortement méthylées sont les histones H3 suivit par l'histone H4 leur permettant de jouer un rôle central dans la répression et l'activation des gènes. La méthylation des lysines se produit en trois états distincts, soit par un, deux ou trois groupements méthyles attachés au groupement amine de la lysine. Les mono-, di- et tri- méthylations des histones sont considérées comme des marques épigénétiques centrales pour la régulation de la structure chromatinienne. Les histones peuvent être méthylées soit sur leurs lysines ou arginines (Murray, 1964 ; DeLange et coll., 1969 ; Patterson et coll., 1969 ; Gershey et coll., 1969). Les résidus de lysines peuvent être mono-, di- et tri- méthylés, alors que les résidus de arginines peuvent être seulement mono- ou di- méthylés. Douze lysines-histones-méthyltransférases (HKMTs) et trois arginines-histonesméthyltransférases ont été identifiées chez l'homme dont certaines sont mutées dans le cancer (Santos-Rosa et Caldas, 2005). Les patrons de di- et tri- méthylation des histones H3 et H4 produisent des marques héritables qui sont utilisés pour recruter des complexes protéiques activateurs ou répresseurs (Breiling et Orlando, 2002). La méthylation des lysines est la modification post-traductionnelle des histones la plus stable (Zhang et Reinberg, 2001).

Plusieurs enzymes sont capables de méthyler la lysine 9 de H3 selon l'état de la chromatine, *i.e.*, hétérochromatine ou euchromatine (Bronner et coll., 2011a). Au moins cinq méthyltransférases sont capable de méthyler H3K9 : Suv39H1 et Suv39H2 (Rea et coll.,

64

2000, Peters et coll., 2001), G9a (Tachibana et coll., 2001), ESET/SETDB1 (Schultz et coll., 2002) et EuHMTase1 (**Tableau 5**) (Ogawa et coll., 2002). Ces enzymes ont différentes affinités pour les lysines mono- ou di- méthylées.

Tableau 5

Histones méthyltransférases des lysines (HKMTs)

et leurs spécificités

НКМТ	Fonction	Influence sur la transcription	Références
Suv39H1 Suv39H2	Н3К9	Répression	Rea et coll., 2000 Lachner et coll., 2001 Peters et coll., 2001
ESET/SETDB1	НЗК9	Répression	Jenuwein, 2001 Schultz et coll., 2002
EuHMTase1	НЗК9	Répression	Ogawa et coll., 2002
G9a	H3K9 H3K27	Répression Répression	Tachibana et coll., 2001 Tachibana et coll., 2008
SET9	Н3К4	Activation	Wang et coll., 2001 Nishioka et coll., 2002 Zegzerman et coll., 2002
ALL/MLL1	H3K4	Activation	Hess, 2004
SET1	H3K4	Activation	Wysocka et coll., 2003 Bryk et coll., 2002
EZH2	H3K27	Répression	Cao et coll., 2002
NSD1	H3K36	Répression	Rayasam et coll., 2003
Dot1L	H3K79	Répression	Feng 2002 Leeuwen 2002
PR-SET7	H4K20	Répression	Nishioka et coll., 2002
Elongation-specific H3K9 histone methyltransferase	H3K9me2/3	Activation	Vakoc et coll., 2005
SMYD3	H3K4	Activation	Hamamoto et coll., 2004
Murine ortholog Disruptor of Telomeric Silencing-1-like (mDOT1L) methyltransferase	Н3К79	Activation	Guenther et coll., 2007 Im et coll., 2003 Vakoc et coll., 2006

D'après Deplus, 2005

Quelques enzymes HKMTs agissent sur les lysines préalablement méthylées alors que d'autres assurent des méthylations de novo. Ainsi chacun des trois états de méthylation de H3K9 assume une fonction différente (Wu et coll., 2005). Par exemple, Suv39H1 et Suv39H2 triméthylent préférentiellement H3K9 lorsque elle est monométhylée (Rice et coll., 2003) alors que ESET triméthyle préférentiellement H3K9 lorsque elle est diméthylée (Wang et coll., 2003). Les histones méthyltransférases G9a et Suv39H1 pourraient catalyser in vivo la diméthylation de H3K9 dans l'euchromatine et la triméthylation de H3K9 dans l'hétérochromatine péricentromérique, respectivement (Rice et coll., 2003 ; Peters et coll., 2001). Les di- et tri- méthylations de H3K9 sont généralement faibles dans les gènes actifs et plus élevées dans les gènes non-actifs (Noma et coll., 2001; Litt et coll., 2001). La méthylation de H3K9 interagit spécifiquement avec le chromodomaine de l'hétéroprotéine 1 (HP1) (Figure 12A), un événement qui est requis pour établir et maintenir l'hétérochromatine (Lachner et coll., 2001; Nakayama et coll., 2001; Jacobs et Khorasanizadeh, 2002; Jeltsch, 2006). Également, la méthylation de H3K27 est reconnue par la protéine PC (Figure 12B) démontrant l'importance d'une marque épigénétique pour la fixation des protéines cellulaires. Cependant, il a été suggéré que la méthylation de H3K9 ne correspond pas forcément à la répression des gènes. En fait, la di- et la tri- méthylation de H3K9 ont été trouvées dans des régions de transcription active (Tableau 5) (Vakoc et coll., 2005). La méthylation de H3K9 est inhibitrice de la méthylation de H3K4 (Nishioka et coll., 2002) et ces marques sont inversement corrélées l'une avec l'autre dans la chromatine inactive et la chromatine active, respectivement (Noma et coll., 2001; Litt et coll., 2001; Nady et coll., in press). La méthylation de H3K4 est catalysée par l'histone méthyltransférase SET9, et est liée à l'activation de la transcription (Nishioka et coll., 2002). La méthylation de H3K79 est aussi liée à l'activation de la transcription et est considérée comme une marque de l'euchromatine
(**Tableau 5**) (Guenther et coll., 2007 ; Im et coll., 2003 ; Vakoc et coll., 2006) (plus de détails dans le chapitre du livre Bronner et coll., 2011a).



Figure 12: Le « CODE HISTONE » : Méthylation des histones et reconnaissance de la marque. A: Le couple Suv39H/HP1: Suv39H1 méthyle de manière spécifique la lysine 9 de l'histone H3, ce qui crée un site de liaison pour la protéine HP1. **B:** Le couple EZH2 / PC: La protéine EZH2 méthyle la lysine 27 de l'histone H3 et la protéine PC peut des lors lier l'histone modifiée. D'après Deplus, 2005.

Plusieurs études ont aidé à comprendre le rôle de l'UHRF1 dans la méthylation des histones. Karagianni et coll., (2008) ont montré que l'UHRF1 est capable d'interagir avec H3K9me3 via son domaine PHD et que la co-localisation de l'UHRF1 avec l'hétérochromatine péricentromérique dépend de ses interactions avec l'ADN hémi-méthylé et avec l'H3K9me3. Leurs résultats montrent le domaine PHD comme un acteur fondamental

pour la liaison de l'UHRF1 à l'H3K9me3, avec également une contribution du domaine SRA. De plus, il a été proposé que l'interaction UHRF1-H3K9me3 favorise l'ubiquitination de la chromatine (Karagianni et coll., 2008). En outre, le domaine TTD de l'UHRF1 reconnaît préférentiellement les extrémités N-terminales de H3 associées à la lysine 9 triméthylée et à la lysine 4 non modifiée (H3K4me0/K9me3) (Nady et coll., in press). De plus, l'UHRF1 est capable d'interagir avec l'histone lysine méthyltransférase G9a (Kim et coll. 2009). L'ensemble de ces travaux suggère que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones répressives sont fortement coordonnées par le biais de l'UHRF1, probablement par le recrutement des enzymes modificatrices de la chromatine HDAC1, DNMT1, Suv39H1 et G9a (Nady et coll., in press).

Les mono- et di- méthylations peuvent être enlevées par des enzymes spécifiques mais des enzymes capables à enlever les groupements méthyles des histones triméthylées n'ont pas été identifiés jusqu'à présent (Bronner et coll., 2011a). La tri- méthylation des histones semble être une marque épigénétique plus irréversible que la mono- et di- méthylation (Bronner et coll., 2011a). En fait, seulement une seule lysine déméthylase a été identifiée qui est la LSD1 (Lysine Specific histone Demethylase 1), une enzyme capable d'enlever des groupements méthyles de H3K4 mono- et di- méthylée (Shi et coll., 2004 ; Shi et all ; 2005 ; Metzger et coll., 2005). Donc, nous pouvons dire que, comme les autres modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation des histones est un phénomène dynamique et réversible excepté peut-être pour la tri- méthylation (Bronner et coll., 2011a).

4.2 Acétylation et désacétylation

4.2.1 Les Histones Acétyles Transférases (HATs, Tip60)

L'acétylation des histones est corrélée à une transcription active. Pourtant, l'acétylation est aussi impliquée dans la réplication de l'ADN, l'assemblage du nucléosome et l'interaction

entre les nucléosomes et les protéines non-histones (Strahl et Allis, 2000 ; Turner, 2002). L'acétylation des histones se produit à différents sites mais toujours sur les résidus de lysines. Il a été suggéré que l'acétylation des histones neutralise les charges positives de résidus de lysines provoquant ainsi une diminution de l'affinité de l'ADN avec les extrémités Nterminales des histones et avec d'autres nucléosomes ou protéines régulatrices menant à la décondensation de la chromatine et facilitant l'accessibilité de la machinerie transcriptionelle (Figure 13).



Figure 13: Équilibre entre l'acétylation et la désacétylation des histones gouverné par les enzymes HATs et HDACs. Les acétyltransférases utilisent l'acétyle coenzyme A [«] Ac COA [»] comme cofacteur pour le transfert de groupements acétyles, ce qui mène à une structure chromatinienne relâchée et une transcription active. Les désacétylases des histones ôtent le groupement acétyles ce qui conduit à une structure compacte et à une répression transcriptionnelle. OCCH3 : Groupement acétyle. D'après Deplus, 2005.

L'acétylation active la transcription par au moins deux mécanismes principaux. Le premier est lié à l'acétylation de la K9, K14 de l'histone H3 et à l'acétylation de la K4 de l'histone H4 qui est un signal pour le complexe de la décondensation de la chromatine SWI/SNF [«] mating type SWItching/Sucrose Non-Fermenting [»] (**Figure 14A**). Le deuxième mécanisme suppose la présence préalable de la méthylation de H3K4 permettant le recrutement d'un complexe comportant les protéines du remodelage de la chromatine et les HATs (**Figure 14B**) (Santos-Rosa et Caldas, 2005).

L'acétylation des histones est catalysée par cinq familles de protéines appelées les Histones AcétylTransférases (HATs) : La famille de p300/CBP et la famille de Gcn5/PCAF sont les deux familles majeures, la famille MYST est caractérisée par la présence d'un domaine conservé appelé MYST, la famille de facteurs de transcription (ATF2, TAF1, TFIIIC90), la famille des co-facteurs aux hormones nucléaires et une famille contenant les HATs non classifiées (**Tableau 6**) (Santos-Rosa et Caldas, 2005). En fait, les HATs appartiennent à un grand complexe multiprotéique et catalysent la fixation d'un groupement acétyle au groupement ɛ-aminé de résidus de lysines utilisant l'acétyle coenzyme A comme un cofacteur (**Figure 13**) (Santos-Rosa et Caldas, 2005).

Nous allons maintenant nous focaliser sur une HAT que nous avons identifié comme un partenaire de l'UHRF1. Tip60 (Tat interacting protein, 60kDa) a été identifiée comme une protéine à une activité acétyltransférase, interagissant avec la protéine Tat de HIV-1 (Sapountzi et coll., 2006). Le rôle de Tip60 dans la transcription a été très étudié. Il a été démontré que Tip60 a des fonctions très diversifiées dans plusieurs processus, comme les voies de signalisation, la réparation de l'ADN endommagé, le cycle cellulaire, les points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose (Ikura et coll., 2000 ; Tang et coll., 2006 ; Eymin et coll., 2006 ; Sapountzi et coll., 2006). Il a été suggéré que Tip60 est co-régulateur transcriptionnel, qui fonctionne dans un complexe comportant des facteurs de transcription

comme Myc, STAT3, NF- κ B, E2F1 et p53 (Sapountzi et coll., 2006). Cela nécessite forcément le recrutement de l'activité acétyltransférase de Tip60 à la chromatine. Dans les réponses aux cassures double brin de l'ADN, Tip60 est recrutée aux points endommagés où elle participe dans les étapes initiales ainsi que aux étapes finales de la réparation (Sapountzi et coll., 2006).



Figure 14: L'acétylation devrait activer la transcription au moins par deux mécanismes principaux. A: Le premier est lié à l'acétylation de K9, K14 de l'histone H3 et à l'acétylation de K4 de l'histone H4 qui est un signal pour le complexe de la décondensation de la chromatine SWI/SNF. B: Le deuxième mécanisme suppose la présence de la méthylation H3K4 auparavant permettant le recrutement d'un complexe comportant les protéines du remodelage de la chromatine et les HATs. D'après Deplus, 2005.

Tableau 6

Histones acétyltransférases (HATs) humaines

et leurs spécificités

НАТ	SUBSTRAT	Rôle		
La famille de GNAT				
PCAF	H3/H4, TAT, E1A, p53, PCAF, AR	Co-activateur transcriptionnelle		
GCN5L	H3/H4, TAFs	Co-activateur transcriptionnelle		
ELP3	H3/H4	Elongation de la transcription		
La famille de P300/CBP		Co-activateur transcriptionnelle		
P300	H2A/H2B/H3/H4, p53, EIA, TAT, AR	Co-activateur transcriptionnelle		
СВР	H2A/H2B/H3/H4, TFs, EIA	Co-activateur transcriptionnelle		
La famille de MYST				
Tip60	H3/H4/H2A, AR	Activation transcription		
MOF (MYST1)	H3/H4/H2A	Activation transcription		
MOZ (MYST3)	H3/H4	Activation transcription		
MORF (MYST4)	H3/H4	Activation transcription		
HBO1 (MYST2)	H3/H4	Corépresseur transcriptionnelle DNA réplication		
Facteurs de transcription				
ATF2	H4/H2B	Activateur transcriptionnelle		
TAF1 (TAFII250)	H3/H4	Facteur de transcription		
TFIIIC90(GTF3C4)	НЗ	Initiation de la transcription		
Hormones Nucléaires				
SRC-1 (NCOA1)	H3/H4	Co-activateur transcriptionnelle		
ACTR	H3/H4	Co-activateur transcriptionnelle		
Autres				
CIITA (HMC2TA)	H4			
CDYL	H4	Protamine \rightarrow histone		
HAT1	H4/H2A	Déposition des histones		

D'après Santos-Rosa et coll., 2005. Eur J Cancer 41, 2381-2402

Tip60 est capable d'acétyler les histones H2AK5, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12 et H4K16 (Bhaumik et coll., 2007). Tip60 est également capable d'acétyler phospho-H2Av sur

la Lys5 (Kusch et coll., 2004) suggérant que l'acétylation et la phosphorylation des histones agissent ensemble pour permettre la transcription des gènes (Bronner et coll., 2011a). Récemment, il a été démontré que Tip60 est capable d'acétyler la DNMT1 (Du et coll., 2010). L'UHRF1 reconnaîtra alors la DNMT1 acétylée et ajoutera des groupements ubiquitines dirigeant la DNMT1 vers le protéasome pour y être dégradée (Du et coll., 2010 ; Qin et coll., 2011 ; Bronner, 2011b). De plus, nous avons montré que Tip60 est présente dans le même complexe macromoléculaire avec l'UHRF1, la DNMT1 et l'HDAC1 (Achour et coll., 2009). Le « knockdown » de l'expression de l'UHRF1 ou de la DNMT1 par RNA interférence, augmente l'expression de Tip60 mais diminue significativement le niveau de l'acétylation de l'H2AK5 suggérant que l'UHRF1 et la DNMT1 sont requises pour acétyler l'H2AK5 (Achour et coll., 2009). D'un côté, la DNMT1 pourrait être impliquée dans la méthylation du promoteur du gène Tip60 provoquant la répression de ce gène. Lorsqu'on utilise siRNA contre la DNMT1 on constate une augmentation de l'expression de Tip60 cela pourrait correspondre à une déméthylation de la région promotrice du gène *Tip60* et ainsi l'activation de sa transcription. De l'autre côté, lorsque la Tip60 est surexprimée, elle pourrait acétyler la DNMT1 (son répresseur) pour être dégradée par le protéasome suggérant la présence d'une boucle de « feedback » répressive entre Tip60 et DNMT1.

4.2.2 Les Histones DésACétylases (HDACs)

Les HDACs ont plusieurs substrats et sont trouvées dans des complexes multiprotéiques et fonctionnent comme des corépresseurs transcriptionnels (**Tableau 7**) (Cress et Seto, 2000 ; Santos-Rosa et Caldas, 2005). Le rôle des HDACs est d'enlever les groupements acétyles des histones ou d'autres protéines non-histones qui ont été auparavant acétylées par les HATs (**Figure 13**). Les HDACs sont des cibles thérapeutiques intéressantes dans plusieurs maladies surtout le cancer (Minucci et Pelicci, 2006).

Tableau 7

Histones Désacétylases (HDACs) humaines

HDAC	SUBSTRAT	Rôle
Classe I		
HDAC1	Histones, TP53, E2F1	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC2	Histones, YY1	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC3	H4, RELA	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC8	Histones	Corépresseur transcriptionnelle
Class II		
HDAC4	Histones	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC5	Histones	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC6	Histones	
HDAC7	Histones	Corépresseur transcriptionnelle
HDAC10	Histones	Répresseur transcriptionnelle
Classe III (Sirtuins)		
SIRT1	p53	Prolifération cellulaire
SIRT2	Histones, Tubulin	Cycle cellulaire, mobilité cellulaire

et leurs spécificités

D'après Santos-Rosa et coll., 2005. Eur J Cancer 41, 2381-2402

La désacétylation est considérée comme un inhibiteur de l'expression génique. Ainsi l'inhibition des HDACs devrait augmenter l'expression de tous les gènes exprimés dans la cellule. Cependant, l'expression de VEGF, par exemple, est diminuée par les inhibiteurs de HDAC1 (Sawa et coll., 2002). De plus, 20% de tous les gènes sont modifiés en termes d'expression (Glaser et coll., 2003 ; Milsiades et coll., 2004 ; Peart et coll., 2005 : Van Lint et coll., 1996). Théoriquement, le nombre des gènes dont les expressions ont été augmentées est égal au nombre des gènes dont les expressions ont été diminuées. Il a été suggéré que la désacétylation pourrait participer à la répression des gènes qui jouent un rôle répresseur sur les autres gènes (Bronner et coll., 2011a). Ainsi, les inhibiteurs de HDACs sont capables d'activer et de réprimer l'expression des gènes (Bronner et coll., 2011a).



Figure 15: Interconnexion entre la méthylation de l'ADN, la désacétylation des histones et la méthylation des histones. A: Les protéines MBD (ex MeCP2) recrutent une activité désacétylase et une méthyltransférase de la lysine au niveau de séquences méthylées. Après désacétylation, la lysine peut être méthylée ce qui mène à un état transcriptionnel réprimé B: Les DNMT1, 3a et 3b interagissent avec l'HDAC1, Suv39H1 et HP1 conduisant à la répression transcriptionnelle. OCCH3: groupement acétyle. MeK9: Lysine 9 méthylée. D'après Deplus, 2005.

Les HDACs sont impliquées dans la connexion entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Bronner et coll., 2011a). Par exemple, les protéines MBD (exemple la MeCP2) recrutent une activité désacétylase et une méthyltransférase de la lysine au voisinage de séquences méthylées. Après désacétylation, la lysine peut être méthylée ce qui conduit à un état transcriptionnel réprimé (**Figure 15A**) (Bronner et coll., 2011a). La DNMT1 et la DNMT3a/ 3b interagissent avec HDAC1 & 2, HP1β et Suv39H1 (**Figure 15B**) (**Tableau 4**) (Fuks et coll., 2001 ; Bachman et coll., 2001 ; Robertson et coll., 2000 ; Fuks et coll., 2003). Par ailleurs, il a été démontré que la DNMT3b interagit avec HDAC1 & 2, HP1, Suv39H1 et avec l'enzyme du remodelage de la chromatine hSNF2H (Geiman et coll., 2004). Cette co-localisation se passe principalement au niveau de l'hétérochromatine et les HDACs semblent être un composant essentiel dans la machinerie de régulation du code épigénétique en étant impliquées dans la répression permanante des gènes au niveau de l'hétérochromatine (Bronner et coll., 2011a).

4.3 Ubiquitination et déubiquitination

L'ubiquitination est une forme de modification post-traductionnelle dans laquelle un polypeptide de 76 acides aminés (ubiquitine) est conjugué par son côté C-terminal aux lysines des protéines cellulaires qui sont ensuite dégradées, suite à une polyubiquitination, via le protéasome ou destinées à avoir une fonction régulatrice lorsqu'elles sont monoubiquitinées. L'ubiquitination se produit par une cascade enzymatique dans laquelle une E3 ligase catalyse la fixation de l'ubiquitine à la lysine de la protéine cible (Bronner et coll., 2011a). Une relation entre l'ubiquitination de l'H2B et la méthylation de l'H3 a été décrite (Ezhkova et Tansey, 2004). En fait, il a été démontré que le recrutement des sous-unités du protéasome à la chromatine dépend de l'ubiquitination de l'H2B (Ezhkova et Tansey, 2004).

La monoubiquitination des histones est généralement associée à une expression génique active (Bronner et coll., 2011a). En fait, chez la levure, la monoubiquitination de l'histone H2B est requise pour deux événements activateurs, *i.e.*, la méthylation de H3K4 et la méthylation de H3K79 (**Figure 16**) (Sun et Allis, 2002).



Figure 16 : La monoubiquitination de l'histone H2B est généralement associée avec une expression génique active. La monoubiquitination des histones H2B est requise pour deux événements activateurs, c'est à dire, la méthylation de H3K4 et la méthylation de H3K79. D'apès Deplus, 2005.

Mdm2 [«] Murine Double Minute gene 2 [»], qui est une E3 ligase capable d'ubiquitiner le produit du gène suppresseur de tumeur *p53*, a été également démontrée pour être capable de monoubiquitiner l'histone H2B dans les cellules HEK293 (Minsky et Oren, 2004). Cependant, la monoubiquitination de l'H2B pourrait avoir un effet transcriptionnel répressif (Bronner et coll., 2011a). En effet, Mdm2 interagit avec HDAC1 et ce complexe, avec l'ubiquitination des histones, est crucial pour inactiver la transcription (Ito et coll., 2002). Par contre, la monoubiquitination de l'H2A probablement joue un rôle dans la répression génique comme cela est le cas pour le chromosome X chez les mammifères femelles (Fang et coll., 2004). RING1B est l'enzyme E3 ligase majeure impliquée dans la monoubiquitination de l'H2A (Buchwald et coll., 2006).

L'UHRF1 semble remplir la qualité d'une enzyme ayant la capacité d'ubiquitiner les histones (Bronner et coll., 2011a). En effet, l'UHRF1 appartient à une famille d'E3 ligase dont l'expression est modifiée dans les cellules cancéreuses (Mousli et coll., 2003 ; Jenkins et coll., 2005). Il a été démontré que Np95 (mUHRF1) a une activité ubiquitine ligase pour ellemême et pour les histones avec une préférence pour l'histone H3 (Citterio et coll., 2004 ; Jenkins et coll., 2005). Cependant, il est probable qu'à côté de l'auto-ubiquitination, la famille de l'UHRF1 ubiquitine d'autres protéines que les histones, comme par exemple PEST qui est substrat pour NIRF (hUHRF2) (Mori et coll., 2004). De plus, les membres de la famille de l'UHRF sont caractérisés par la présence unique du domaine SRA qui est trouvé seulement dans cette famille des protéines chez les mammifères (Bronner et coll., 2011a). Le domaine SRA est indispensable pour fixer les histones, permettant ainsi de spéculer que ce domaine est particulièrement crucial pour recruter au niveau de la chromatine plusieurs protéines ayant des fonctions régulatrices du code épigénétique (Citterio et coll., 2004). En effet, il a été trouvé que l'UHRF1, via son domaine SRA est capable de se fixer aux promoteurs méthylés des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi qu'avec HDAC1 et DNMT1 (Figure 2) (Unoki et coll., 2004; Achour et coll., 2008), suggérant que l'UHRF1 gouverne l'interconnexion entre la méthylation de l'ADN, l'ubiquitination et la désacétylation des histones (Figure 17) (Bronner et coll., 2011a).

Concernant la déubiquitination des histones les connaissances actuelles sont faibles, surtout chez l'homme (Bronner et coll., 2011a). Par contre, il y a plusieurs évidences que la déubiquitination existe chez la levure. Ainsi, Ubp8 a été trouvée chez la levure comme une enzyme capable de déubiquitiner l'H2B. La déubiquitination par Ubp8 est capable de contrôler la méthylation de H3K4 régulant l'expression des gènes chez la levure (Shukla et coll., 2006). Généralement, la balance entre l'ubiquitination / déubiquitination établit l'équilibre de la méthylation de H3K4 (Wyce et coll., 2004). Ainsi, à l'inverse de l'acétylation

/ désacétylation dont les fonctions sont mutuellement opposées, l'ubiquitination / déubiquitination sont requises pour l'activation de la transcription (Bronner et coll., 2011a).
Des investigations supplémentaires sont requises pour déterminer l'existence de la déubiquitination dans les cellules humaines et comprendre plus précisément leur rôle dans l'expression des gènes (Bronner et coll., 2011a).



Figure 17: L'UHRF1 gouverne l'interconnexion entre la méthylation de l'ADN, l'ubiquitination des histones, la désacétylation des histones et la méthylation des histones. A: L'UHRF1 recrutent une activité désacétylase, une méthyltransférase de l'ADN et une méthyltransférase de lysine au niveau de séquences méthylées. B: Après désacétylation, l'ADN est hyperméthylé, la lysine peut être méthylée, l'UHRF1 ubiquitine les histones ce qui mène à un état transcriptionnel réprimé. MeK9: Lysine 9 méthylée.

4.4 Phosphorylation et déphosphorylation

La phosphorylation est une autre modification covalente des histones qui se passe principalement sur la partie N-terminale de l'histone H3. Les événements de phosphorylation principaux concernent S10, T11 et S28 de l'histone H3 (**Figure 11**) (Bronner et coll., 2011a). La phosphorylation de H3 joue un rôle important pendant le cycle cellulaire particulièrement pendant les mitoses et les méioses comme un événement clef dans l'initiation de la condensation de la chromatine (Nowak et coll., 2004). Cependant, la phosphorylation de l'histone H3 est associée avec l'activation de la transcription (Bronner et coll., 2011a). La phosphorylation de H3S10 a un rôle important dans l'activation de la transcription des gènes eucaryotiques en stimulant l'acétylation de H3K14 ainsi que l'acétylation de H3K9 et la méthylation de H3K4 (**Figure 18**) (Lo et coll., 2001). La phosphorylation de H3K9 par G9a (Lee et coll., 2006) et inversement la méthylation de H3K9 par G9a (Lee et coll., 2006) et inversement la méthylation de H3K9 par Suv39H1 inhibe la phosphorylation de H3S10 (**Figure 18**) (Rea et coll., 2000) démontrant ainsi un exemple d'influences réciproques des différentes modifications post-traductionnelles des histones (Bronner et coll., 2011a).

Pourtant, la phosphorylation de H3S10 est impliquée dans l'initiation de la condensation des chromosomes en recrutant la condensine aux régions péricentromériques supposant que la phosphorylation de H3S10 pourrait avoir des effets opposés en termes d'expression génique (Nowak et coll., 2004). Cela pourrait résulter d'une phosphorylation spécifique de mitoses de H3S28 et H3T11 suggérant que la combinaison de plusieurs acides aminés phosphorylés pourrait avoir des effets transcriptionnels différents d'un seul acide aminé phosphorylé. La phosphorylation de H2AX se passe rapidement après les cassures doubles brins permettant le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN génomique (Celeste et coll., 2003).

Nos connaissances sur les mécanismes de la déphosphorylation des histones sont très limitées (Bronner et coll., 2011a). Cependant, chez *Drosophila melanogaster*, la phosphatase 2A est impliquée dans la déphosphorylation de l'histone H3 (Nowak et coll., 2003).

Bien que la phosphorylation des histones joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes, il n'est pas évident que ces phosphorylations peuvent être considérées comme des marques épigénétiques (Bronner et coll., 2011a).



Figure 18: Le [«] **CODE HISTONE» : Influences réciproques des différentes modifications post-traductionnelles des histones.** La méthylation de l'ADN est capable d'induire la méthylation de H3K9 ou la désacétylation de H3K9. Cela pourrait déclencher des méthylations additionnelles à l'ADN. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 favorise l'acétylation des lysines 9 et 14 ainsi que la méthylation de la lysine 4. D'autre part, elle inhibe la méthylation de H3K9 par G9a. La méthylation de H3K9 par Suv39H1 inhibe la phosphorylation de H3S10 démontrant ainsi un exemple d'influences réciproques des différentes modifications post-traductionnelles des histones. D'apès Deplus, 2005.

4.5 SUMOylation

La SUMOylation est une modification catalysée par plusieurs enzymes en ajoutant SUMO [«] Small Ubiqutin-like MOdifier [»] aux résidus lysines de plusieurs protéines parmi elles, les

histones (Bronner et coll., 2011a). Considérant la taille de SUMO, deux mécanismes

pourraient expliquer ses effets sur l'expression des gènes (Bronner et coll., 2011a). En fait, le premier mécanisme suppose que la structure d'assemblage des nucléosomes est modifiée et cela influence l'accessibilité des facteurs de transcription à leurs ADN cibles. Le deuxième mécanisme suppose que la SUMOylation des histones et des facteurs de transcription est généralement associée à une diminution de l'expression génique en favorisant l'association de HDAC1 ou HDAC2 et HP1 à leurs marques épigénétiques (Yang et Sharrocks, 2004 ; Santos-Rosa et Caldas, 2005). Cependant, le mécanisme majeur a besoin de plus d'investigations et il n'est pas évident, comme pour la phosphorylation, que la SUMOylation est une marque épigénétique (Bronner et coll., 2011a).

4.6 ADP-Ribosylation

La poly-ADP ribosylation des histones H2A et H2B est catalysée par l'ADP-Ribosyl Transférase. La poly-ADP ribosylation augmente en réponse aux dommages de l'ADN mais les conséquences sur l'expression génique sont inconnues (Oommen et coll., 2005).

Il a été démontré que l'inhibition compétitive des poly (ADP-ribose) polymérases (PARP) dans les cellules de mammifères traitées avec la 3-aminobenzamide cause une hyperméthylation de l'ADN dans tout le gènome et plus particulièrement une hyperméthylation anormale des îlots CpGs (Reale et coll., 2005). De plus, il a été démontré que la DNMT1 est capable de se lier au long des polymères d'ADP-ribose d'une manière non covalente. La liaison de la DNMT1 sur des poly ADP-ribose inhibe son activité de méthyltransférase de l'ADN (Reale et coll., 2005). Les expériences de co-immunoprécipitation indiquent que la PARP1 et la DNMT1 sont associées *in vivo*. Il a été suggéré que ce complexe est catalytiquement inefficace sur la méthylation de l'ADN (Reale et coll., 2005). En résumé, l'activité de DNMT1 est régulée et contrôlée par l'acétylation, l'ubiquitination et la poly ADP-ribosylation par l'activité de Tip60, HDAC1, UHRF1 et

82

l'ADP-ribosyl transférase, respectivement (Du et coll., 2010 ; Reale et coll., 2005 ; Bronner, 2011b). Ces modifications post- traductionnelles de la DNMT1 pourraient empêcher la formation du complexe DNMT1/UHRF1/HDAC1 activant l'expression génique. En effet, cette idée est soutenue par le fait que la PARP1 a été trouvée associée à des régions activement transcrites par l'ARN polymérase II (Fakan et coll, 1988). De plus, l'activité de de la chromatine PARP1 est observée dans des régions décondensées et transcriptionnellement très active (Touline et Spradling, 2003).

4.7 Biotinylation

La biotinylation est une modification post-traductionnelle récemment identifiée. Il a été proposé que la biotinylation est impliquée dans la répression génique (Bronner et coll., 2011a). En fait, la biotinylation de K9 et K13 a été trouvée pour l'histone H3 alors que la biotinylation de K8 et K12 a été observée pour l'histone H4 (Oommen et coll., 2005). La biotinylation des histones joue des rôles importants dans les processus de réparation de l'ADN génomique, l'apoptose cellulaire, la répression génique et la prolifération cellulaire (Kothapalli et coll., 2005). La biotinylation des histones est catalysée par la biotinidase et la holocarboxylase (Chew et coll., 2006; Narang et coll., 2004). Comme pour la méthylation de l'ADN et la poly-ADP ribosylation, la biotinylation est influencée par les nutriments. En fait, le tryptophane et la niacine sont transformés en dinucléotides nicotinamide-adénine, qui est un substrat pour la poly-ADP ribosylation alors que la biotine est une vitamine naturellement trouvée dans l'aliment. C'est pourquoi les nutriments jouent des rôles essentiels dans les événements épigénétiques (Oommen et coll., 2005 ; Bronner et coll., 2011a). À nouveau, il est impossible à l'heure actuelle de pouvoir dire si la biotinylation est une marque épigénétique, tout comme l'ADP-ribosylation que nous avons vu précédemment (Bronner et coll., 2011a).

OBJECTIF

L'UHRF1 est surexprimée dans plusieurs lignées cancéreuses dans lesquelles des modifications aberrantes des patrons de méthylation de l'ADN et du code des histones ont été identifiées. L'UHRF1 joue un rôle en tumorigénèse par la dérégulation de l'expression des gènes qui sont connus pour jouer un rôle primordial dans la prolifération cellulaire comme les gènes *topoisomérase IIa*, *RB1*, $p16^{INK4A}$, $p14^{ARF}$ et *RAR* β . L'UHRF1 est requise pour la prolifération cellulaire particulièrement pour la transition G1/S (Jeanblanc et coll., 2005). L'UHRF1 pourrait contribuer à la cancérogénèse par la répression permanente de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs aboutissant à la perte du contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire.

Pour comprendre le rôle de l'UHRF1 dans la régulation du code épigénétique et dans le but de rechercher des protéines qui pourraient interagir avec le domaine SRA (Set and Ring-Associated domain) de l'UHRF1, nous avons fait appel au système du double hybride en collaboration avec la société Hybrigenics (Paris). Plusieurs clones codants pour une séquence de 215 acides aminés ont été isolés, et montrent 100% d'homologie avec une séquence de la DNMT1 humaine. Nous avons appelé ce nouveau domaine de la DNMT1 le "SRA-binding domain" (Publication II). Cette interaction a été confirmée par GST-pull down et coimmunoprécipitation dans les cellules Jurkat et les cellules musculaires lisses immortalisées (SMC1-HVT). Pour comprendre le rôle de ce complexe UHRF1/DNMT1 sur l'expression génique dans le contexte de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs $p16^{INK4A}$ et RB1et l'expression du gène VEGF, nous avons analysé l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs RB1 et $p16^{INK4A}$ et l'expression de l'UHRF1, de VEGF et de DNMT1 dans les cellules " knocked-down " pour l'UHRF1 ou pour la DNMT1 (Publication II).

Nous avons proposé que l'UHRF1, la DNMT1 et des modificateurs des histones soient présentes dans un grand complexe impliqué dans la réplication du code épigénétique qui a été appelé [«] ECREM [»] pour [«] Epigenetic Code REplication Machinery [»], comportant notamment Tip60 (Tat-interactive protein, 60 kDa, histone acétyltransférase) (Publication III). Nous avons ainsi également étudié la présence de Tip60 dans ce complexe par les expériences de coimmunoprécipitation et immunocytochimie. Ensuite nous avons étudié le rôle de cette interaction UHRF1/Tip60 sur l'activité acétyltransférase de Tip60 dans les cellules Jurkat (Publication III).

Le [«] knockdown [»] de l'UHRF1 provoque une diminution du niveau de la méthylation de l'ADN et modifie la structure chromatinienne (Bostick et coll., 2007). La méthylation de l'ADN régule les modifications des histones considérant que la perte de la DNMT1 dans les cellules humaine du cancer du colon résulte en une diminution et distribution de la triméthylation de H3K9 (Espada et coll., 2004). L'UHRF1 est un facteur unique, il est nécessaire pour la maintenance des méthylations de l'ADN et interagit également avec l'histone H3 sur la lysine 9 triméthylée (H3K9me3) d'une manière indéterminée (PublicationV). Nous avons identifié un nouveau domaine dans la structure de l'UHRF1 [«]Tudor Tandem Domain [»] et étudié son rôle dans l'interaction avec l'H3K9me3 (PublicationV).

L'ensemble de ces travaux nous a amené à comprendre le rôle de l'UHRF1 et de ses partenaires DNMT1, HDAC1 et Tip60 dans la régulation du code épigénétique et dans la régulation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs ($p16^{INK4A}$ et RB1).

RESULTATS



DISCUSSIONS

PUBLICATION I

La Famille de l'UHRF1 : Oncogènes qui sont des cibles thérapeutiques dans un futur proche ?

(Pharmacol Ther, 2007, 115: 419-434)

La famille de l'UHRF inclut principalement les gènes de l'UHRF1 et de l'UHRF2. Le gène UHRF3 code pour une protéine correspondant à une version plus courte de UHRF1 mais pour lequel il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée fonctionnelle. Les membres de la famille UHRF jouent un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire par différents domaines structuraux. Ces domaines comprennent l'ubiquitin-like (NIRF_N) domain, le Plant Homeo Domain (PHD), le domaine SRA (Set and Ring Associated) et le domaine RING (Really Interesting New Gene). Le domaine SRA a été uniquement observé dans cette famille probablement lui conférant certainement des caractéristiques très originales.

Les rôles physiologiques de la famille de l'UHRF sont probablement exercés pendant le développement embryonnaire et la prolifération cellulaire chez l'adulte. Phylogénétiquement, nous pensons que cette famille est apparue avec les vertébrés. En effet, l'UHRF1 est retrouvé du poisson zèbre jusqu'à l'homme avec différents pourcentage d'homologie entre l'homme et les différentes espèces.

L'UHRF1 pourrait être un oncogène potentiel régulé par des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53*, mais l'UHRF1 exerce aussi un contrôle sur les gènes suppresseurs de tumeurs tels que *RB1*. Au contraire, UHRF2 exercerait plutôt un rôle de gène suppresseur de tumeurs.

Finalement, nous avons proposé quelques nouveaux rôles pour cette famille, incluant la régulation et la transmission du code épigénétique. Les modifications de ces mécanismes régulateurs pourraient être impliquées dans la carcinogénèse. Les raisons pour lesquelles la

famille de l'UHRF pourrait être une cible intéressante pour les médicaments anticancéreux ont été aussi développées dans cette revue.



Available online at www.sciencedirect.com





Pharmacology & Therapeutics 115 (2007) 419-434

www.elsevier.com/locate/pharmthera

The UHRF family: Oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future?

Christian Bronner^{a,*}, Mayada Achour^a, Yoshimi Arima^b, Thierry Chataigneau^a, Hideyuki Saya^b, Valérie B. Schini-Kerth^a

^a CNRS UMR 7175, Département de Pharmacologie et Pharmacochimie des interactions moléculaires et cellulaires, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch Cedex, France

^b Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan

Abstract

In this paper, we review the current literature about the UHRF family that in particular includes the *UHRF1* and *UHRF2* genes. Its members play a fundamental role in cell proliferation through different structural domains. These domains include a ubiquitin-like domain (NIRF_N), a plant homeodomain (PHD) domain, a SRA domain and a RING domain. The SRA domain has only been observed in this family probably conferring unique properties to it. The unique enzymatic activity so far identified in this family involves the RING finger that contains a ubiquitin E3 ligase activity toward, for instance, histones. The physiological roles played by the UHRF family are most likely exerted during embryogenic development and when proliferation is required in adults. Interestingly, UHRF members are putative oncogenes regulated by tumor suppressor genes, but they exert also a feedback control on these latter. Finally, we propose some new roles for this family, including regulation and/or inheritance of the epigenetic code. Alteration of these regulatory mechanisms, such as those occurring in cancer cells, may be involved in carcinogenesis. The reasons why the UHRF family could be an interesting target for developing anticancer drugs is also developed. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cancer; E3 ligases; ICBP90; Np95; Oncogenes; UHRF

Abbreviations: Dnmt1, DNA methyltransferase 1; HAT, histone acetyltransferase; HDAC1, histone deacetylase 1; ICBP90, inverted CCAAT box binding protein of 90 kDa; NIRF, Np95 ICBP90 ring finger; PHD, plant homeodomain; RING, really interesting new gene; SRA, set and ring associated; UHRF, ubiquitin PHD RING finger.

Contents

1.	Introc	luction .		420				
2.	2. The discovery and nomenclature of the members of the Ubiquitin PHD RING Finger fam							
	2.1.	Nomenc	lature	420				
	2.2.	Discove	ry of the different Ubiquitin PHD RING Finger family members	421				
3.	Struct	ure of the	e Ubiquitin PHD RING Finger members	422				
	3.1.	Sequen	ce alignments and phylogenetic evolution	422				
	3.2.	Role of	Role of the conserved domains of the Ubiquitin PHD RING Finger members					
		3.2.1.	The role of the NIRF_N domain (ubiquitin-like domain)	423				
		3.2.2.	The role of the Plant Homeodomain domain	423				
		3.2.3.	The role of the Set and Ring Associated domain	424				
		3.2.4.	The role of the Really Interesting New Gene finger	424				
		3.2.5.	The role of other particular sites	424				

* Corresponding author. Tel.: +33 390 24 41 95; fax: +33 390 24 43 13. *E-mail address:* Christian.Bronner@pharma.u-strasbg.fr (C. Bronner).

0163-7258/\$ - see front matter @ 2007 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.06.003

4.	Expre	ession patterns of Ubiquitin PHD RING Finger members			
	4.1.	Cellular expression patterns			
	4.2.	Ubiquitin PHD RING Finger members expression in normal and cancer tissues 425			
5.	Regu	lation of the expression of Ubiquitin PHD RING Finger members			
	5.1.	Down-regulation of UHRF1 expression by DNA-damage checkpoint signals 426			
	5.2.	Expression of Ubiquitin PHD RING Finger is important for cell cycle progression			
		at G_1/S transition and G_2/M			
6.	Partn	ers of the Ubiquitin PHD RING Finger members			
7. Functions of the Ubiquitin PHD RING Finger members					
	7.1.	Role during development 428			
	7.2.	Putative role of Ubiquitin PHD RING Finger members: oncogenes or tumor suppressor			
		genes?			
	7.3.	Ubiquitin PHD RING Finger members and the epigenetic code			
8. Ubiquitin PHD RING Finger members as drugable targets for cancer therapy					
9. Conclusion					
Acl	Acknowledgments				
Ref	erences	3			

1. Introduction

It now becomes evident that discrete modifications of the chromatin can regulate gene transcription and that they can be transmitted to the descent (cells or organisms) through as yet unknown mechanisms. These modifications, referred as epigenetic modifications, involve histone post-translational modifications, mainly in the N-terminal tails, small nuclear RNAs and DNA methylation at CpG islands and play fundamental roles in the regulation of gene transcription, particularly during embryonic development, X inactivation in females, genomic imprinting and silencing of retroviral elements (reviewed in Li, 2002; Jaenisch and Bird, 2003). Thus, the term epigenetic refers to the information contained in chromatin other than the DNA sequence.

DNA methylation is mediated by a family of DNA methyltransferases, whereas histone modifications are induced by several families of proteins including histone acetyltransferases (HAT), histones deacetylases (HDAC), phosphorylases of the aurora kinases family, histone ubiquitinases of the E3 ligase family (reviewed in Bronner et al., 2007). As we will see later, members of the UHRF family appear to participate, likely via the E3 ligase activity, in the regulation of the epigenetic code and its inheritance during cell division.

In the last few years, the regulation of these modifications has become a topic of intense interest. Indeed, numerous alterations of gene DNA methylation, particularly in promoters of tumor suppressor genes, have been reported in cancer (reviewed in Jones, 1985; Attwood et al., 2002; Jones and Baylin, 2002; Laird, 2003; Momparler, 2003; Gius et al., 2005; Robertson, 2005; Klose and Bird, 2006). Tumor suppressor genes can be reactivated when using inhibitors of DNA methylation, such as 5-azacytidine in contrast to inhibitors of HDAC (Cameron et al., 1999). Interestingly, it has been reported recently, that re-expression of the tumor suppressor gene p53, reverses tumor growth in mice (Ventura et al., 2007). Also histone modifications participate in gene transcription or silencing of tumor suppressor genes and by this way become now a topic of high therapeutic interest (reviewed in Cress and Seto, 2000; Strahl and Allis, 2000; Bannister et al., 2001; Bachman et al., 2003; Shilatifard, 2006).

As a matter of fact, it becomes now evident that the actors of the epigenetic code are highly interesting drugable targets by allowing re-expression of tumor gene suppressors with subsequent cancer cell growth arrest. This can be a particular interesting feature of future therapies, in that it would selectively target cancer cells without affecting cell growth or cell function of noncancer cells. As we will see, the UHRF members are regulated by tumor-suppressor genes but are also able to regulate the expression of these genes. Thus, UHRF members are likely be targets of pivotal interest for developing new anticancer drugs.

2. The discovery and nomenclature of the members of the Ubiquitin PHD RING Finger family

2.1. Nomenclature

The first 2 members that have been identified are ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein of 90 kDa) and Np95 (nuclear protein of 95 kDa; Muto et al., 1998, Hopfner et al., 2000). Later, the term UHRF was assigned to the corresponding genes by the Human Genome Organization (HUGO) nomenclature committee and is coming from ubiquitin-like domain, plant homeodomain (PHD) domain, RING finger (Fig. 1). In our previous papers, the ubiquitin-like domain was referenced as UBL (Mousli et al., 2003; Jeanblanc et al., 2005), but the Conserved Domain Database at the NCBI (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) renamed it as NIRF_N. The SRA domain (set and ring associated domain, also known as YGD domain) was not characterized at the moment when the name UHRF has been attributed. Initially, we called it the G9a domain since homology of this domain was found in the histone methyltransferase G9a (Mousli et al., 2003). However, taking into account that the existence of the SRA domain, in vertebrates at least, is restricted to the UHRF family, it is a lack that the acronym does not evoke this domain.

The human and mouse members of this family are shown in Fig. 1 because most information is available only for these 2 species. ICBP90 and Np95 are encoded by the *UHRF1* gene,



Fig. 1. Structural features of hUHRF1 (ICBP90), mUHRF1 (Np95), hUHRF2 (NIRF), mUHRF2 (Np97) hUHRF3 (ICBP55), mUHRF3 (Np55) and hUHRF4 (ICBP87). Sequences were obtained with the help of Genbank at http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Accession numbers are AF129507, EAW58743, EAW96409, Q8VDF2, AF274047, XP_993132, for hUHRF1, hUHRF2, hUHRF3, mUHRF1, mUHRF2 and mUHRF3, respectively. hUHRF4 was found in AceView at NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). The lengths of the ubiquitin-like domain (NIRF_N), the PHD finger domain (C3HC4-type), the SRA, the RING finger (C4HC3-type) are delimited by the numerals corresponding to the positions of the amino-acids. The retinoblastoma protein binding sites (RB) are indicated by the presence of hatched boxes with the positioned amino-acids. Values at the C terminal (Ct) of the proteins indicate percentages of identity to hUHRF1 and hUHRF2, respectively, on the length of the concerned proteins. The beginning of the proteins is indicated by Nt (N terminal part of the proteins).

whereas NIRF (Np95/ICBP90 ring finger) and Np97 are encoded by the *UHRF2* gene. Although, no ubiquitin-like domain exists in ICBP55, the corresponding gene name should be UHRF3 in order to show that this gene belongs to the UHRF family. This gene has also been called YDG_SRA.0 (AceView, http://www.ncbi.nlm.nih.gov). In this review, we will use the terms hUHRF1, hUHRF2 and hUHRF3 for human ICBP90, NIRF and ICBP55 proteins, whereas the terms mUHRF1, mUHRF2, mUHRF3 will evoke Np95, Np97 and mouse ICBP55 proteins, respectively. Human ICBP87 may be encoded by another gene that we propose to name *UHRF4*. When italicized the names will evoke the corresponding genes.

2.2. Discovery of the different Ubiquitin PHD RING Finger family members

hUHRF1 was identified (thanks to the one-hybrid system) by using the second inverted CCAAT Box (ICB2) of the human topoisomerase II α gene promoter as the DNA target sequence in the 1-hybrid system (Hopfner et al., 2000). The topoisomerase II α gene was chosen in order to find target genes for developing new proliferation markers as well as new anticancer drugs, considering that modulating the topoisomerase II α gene may enhance the sensitivity to anti-topoisomerase II drugs. So far hUHRF1 seems to give us right in this strategy (see later).

% of identities

mUHRF1 was discovered by engineering antibodies against murin thymic lymphoma (Fujimori et al., 1998). hUHRF2 was found by screening in the two-hybrid system for proteins able to interact with PCNP (PEST containing nuclear protein) (Mori et al., 2002). PEST is an acronym designing the 4 amino acids proline, glutamic acid, serine and threonine. PEST sequences are rich in these 4 amino acids and are found in several shortlived proteins, such as transcription factors and cell cycleassociated proteins. The functions of these PEST-containing proteins are controlled by proteolysis via the proteasome (reviewed in Rechsteiner and Rogers, 1996). The mUHRF2 amino acid and nucleotide sequences have been only deposited in Genbank (accession number AB116653). Parkin has also been proposed as being a member of this family, because it possesses 2 zinc finger domain of the RING-type and a ubiquitin-like domain (Mori et al., 2002, 2004). Further investigations will clarify whether this protein belongs to the UHRF family. The other members, shown in Fig. 1, have been identified by protein sequences prediction and have their cDNA and their nucleotidic sequences deposited in Genbank (accession numbers indicated in the legend of Fig. 1). hUHRF4 has never been reported other than in Genbank but is likely to exist within a cell, considering that double bands were observed in Western blot and that 2 mRNA bands were observed (Hopfner et al., 2001). The mouse counterpart of hUHRF4 may exist and correspond to the sequence deposited in Genbank under the accession number BAE27632. However, we are not sure that it is the corresponding mouse orthologue, since it still exhibits the RING finger domain that is lacking in hUHRF4.

3. Structure of the Ubiquitin PHD RING Finger members

3.1. Sequence alignments and phylogenetic evolution

Table 1 shows sequences of UHRF1 amino acid sequences from various species. The homology search was performed using standard BLAST algorithms on the NCBI BLAST server (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) against the nonredundant databases. Sequence alignments were performed using the software DNA Strider 1.3. It can be observed that the UHRF1 gene is highly conserved throughout evolution. If we consider

Table 1

Percentages of identity between UHRF1 amino acid sequences from various species^a

that mUHRF1 is the mouse orthologue of the hUHRF1 with only a 73.6% identity, the final version of hUHRF1 appears to be a result of a recent evolution further supported by a 98.0% identity with the Rhesus UHRF1. Strikingly, the dog UHRF1 shows higher identity to human and monkey UHRF1 than mouse and rat UHRF1 (Table 1). The hen UHRF1 (fowl) shows weaker identity, comparable to that of the zebrafish.

Surprisingly, no UHRF1 equivalent was found either in the flybase (http://flybase.bio.indiana.edu/) or in the worm database (http://www.wormbase.org) or in the Saccharomyces genome database (http://www.yeastgenome.org). In the same way, UHRF2 shows similar phylogenetic evolution (alignments not illustrated) since NIRF is absent in the 3 databases (fly, worm and yeast) as it is the case for UHRF1. Remarkable percentages of 65.6% and 55.7% identity can be observed with the zebrafish and tetraodon UHRF1, respectively (Table 1). Tetraodon nigroviridis is a freshwater pufferfish, that is living in the rivers and estuaries of Indonesia, Malaysia and India, with the smallest known vertebrate genome. The gene repertoire of T. nigroviridis is very similar to that of other vertebrates. However, its relatively small genome of 385 Mb is 8 times more compact than that of human, mostly because intergenic and intronic sequences are reduced in size compared to other vertebrate genomes. The zebrafish, like humans, has a backbone and has recently emerged as an alternative genetic model for the study of vertebrate development.

Phylogenetically altogether, this suggests that the appearance of the *hUHRF1*, mapped at chromosome 19p13.3 (Hopfner et al., 2001) and *hUHRF2* mapped at chromosome 9p24.1 (Mori et al., 2002) might be linked to vertebrates. Also, *hUHRF3*, mapped at chromosome 12p12.1-12.2, may be concerned by a similar relationship. As a consequence, one might imagine, considering the activity of hUHRF1 as an E3 ligase for histone H3 (see later), that monoubiquitination of histones (at least for histone H3) phylogenetically appeared with vertebrates. We do not exclude that the *UHRF1* gene is thus required for proper backbone development, which could explain why *UHRF1* knockout mice die in midgestation (Muto et al., 2002). This is supported by a putative interaction of hUHRF1 with alpha-NAC that is a co-activator for AP-1 transcriptional activating function in bone during mouse development (Bronner et al.,

0	2		1	1					
	Human 793AA	Rhesus 795AA	Dog 799AA	Mouse 783AA	Rat 829AA	Fowl 760AA	Zebrafi. 776AA	Tetrao. 692AA	Xenop. 656AA
Human	100	98.0	87.6	73.6	75.4	68.3	65.6	55.7	57.5
Rhesus	98.0	100	87.9	74.0	70.9	68.8	67.0	55.5	57.3
Dog	87.6	87.9	100	72.4	73.2	70.0	67.7	54.9	57.1
Mouse	73.6	74.0	72.4	100	93.4	61.8	63.0	53.2	52.7
Rat	75.4	70.9	73.2	93.4	100	57.9	63.3	54.0	50.0
Fowl	68.3	68.8	70.0	61.8	57.9	100	69.0	54.8	57.7
Zebrafish	65.6	67.0	67.7	63.0	63.3	69.0	100	67.1	61.5
Tetraodon	55.7	55.5	54.9	53.2	54.0	54.8	67.1	100	65.6
Xenopus	57.5	57.3	57.1	52.7	50.0	57.7	61.5	65.6	100

^aPercentages correspond to the percentages of amino acids that were identical between 2 sequences analyzed with the software DNA Strider. Sequences were obtained from Genbank at http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Accession numbers were AF129507 (Human), XP_001082893 (Rhesus), XP_868468 (Dog), AAP86266 (Rat), Q8VDF2 (Mouse), XP_418269 (Fowl), AAT68031 (Zebrafish), CAG00621 (Tetraodon) and AAI10934 (Xenopus).

2002; reviewed in St-Arnaud and Quelo, 1998). However, expressed sequence tag (EST) analysis of gene expression in the testis of *Ciona intestinalis* (sea squirt) revealed the putative existence of a hUHRF1 homologue (Inaba et al., 2002). C. intestinalis, which genome has been sequenced (Dehal et al., 2002), phylogenetically belongs to the urochordates that originates from the divergence of chordates into 3 subphyla: urochordates (also known as tunicates), cephalochordates and vertebrates. The presence of UHRF1 in C. intestinalis would mean that the UHRF1 gene might exist in the 3 subphyla of chordates. Nevertheless, we have performed sequence alignments at the Joint Genome Institute (http://genome.igi-psf.org) against the C. intestinalis database and did not identified significant matches. Therefore, so far we are privileging that UHRF members, at least UHRF1 and UHRF2, appeared with vertebrates. Interestingly, the organs that are richest in terms of UHRF1 expression, i.e., thymus, liver and bone marrow (Hopfner et al., 2000) are only present in vertebrates. Of course, all these assumptions clearly require further investigations to be validated.

Two *Arabidopsis thaliana* proteins that resemble hUHRF1 exist (Accession numbers in Genbank NP_176092 and NP_176778), but they differ from it by the fact that they are lacking the NIRF_N domain and by the location of a RING finger domain between the PHD and SRA domain. The first was identified as an unconventional methylcytosine binding protein, called VIM1 (variant in methylation 1), able to bind *in vitro* to methylated DNA and to recombinant histones (Woo et al., 2007). The homology between the 2 proteins (66.9% of identity) allows to hypothesize that they have similar cellular functions. Considering the absence of the NIRF_N domain, these 2 proteins are closer to hUHRF3 than to hUHRF1, suggesting that the gene coding for ICBP55 (mapped at chromosome 12p12.2-p12.1) is phylogenetically more ancient than the *UHRF1* gene or the *UHRF2* gene.

3.2. Role of the conserved domains of the Ubiquitin PHD RING Finger members

3.2.1. The role of the NIRF_N domain (ubiquitin-like domain) The 3D structure of the NIRF_N domain has been reported by the Structural Genomics Consortium (http://sgc.utoronto.ca/). It exhibits the typical alpha/beta ubiquitin fold. Of the 3 surface lysines, i.e., K26, K33 and K52, the 2 latter are structurally conserved with those of ubiquitin (K29 and K48); polyubiquitination of the latter being the key signal for proteosomal protein turnover. The surface of hUHRF1 corresponding to the protein/ protein binding hotspot of ubiquitin (loosely centered on I44 of ubiquitin) is similarly composed of a hydrophobic patch (F48, L74 and M10) surrounded by charged or polar residues.

The NIRF_N domain is found in all members of the UHRF family, except in hUHRF3 and mUHRF3 (Fig. 1), suggesting that these 2 members may have a different role within the UHRF family. This domain is 35% identical with ubiquitin, a 76 amino acid, which is known to play a fundamental role during cell cycle progression, in protein degradation or gene transcription when attached to proteins in several copies or as monomer, respectively (reviewed in Sun, 2003; Kerscher et al.,

2006). Nevertheless, the role of the NIRF_N domain is less clear. This domain is unlikely to be transferable and may thus rather be involved in protein/protein interactions. Indeed, recently, it has been shown that the ubiquitin-like domain (NIRF_N) of PLIC-1 (protein linking IAP to the cytoskeleton) is able to bind to the ubiquitin-interacting motif (UIM) of the proteasomal subunit S5a and is proposed to be involved in transport to aggresomes (Heir et al., 2006). A relationship between H2B ubiquitination and H3 methylation, mediated by proteosomal proteins, has been reported in yeast (Ezhkova and Tansey, 2004). Indeed, it has been shown that recruitment of proteasome subunits to chromatin depends on H2B ubiquitination and that mutations in 2 ATPases subunits of the 19S particle of the proteasome, i.e., Rpt4 and Rpt6, disrupt H3 methylation at K4 and K79 but leave H2B ubiquitination intact (Ezhkova and Tansey, 2004). These 2 ATPases are known to bind to UFD4, an E3 ligase of the yeast Saccharomyces cerevisiae (Xie and Varshavsky, 2002). Interestingly, considering that ubiquitination of histones by UHRF members is a likely key regulatory mechanism of gene transcription and or silencing (Citterio et al., 2004), it is possible that UHRF1 behaves as a bridging molecule linking the proteasome and histone post-translational modifications. The physiologic role of this linking is not yet evidenced but one might imagine that UHRF1 recruits the proteasome to sites where monoubiquitinated histones have to be removed, e.g., at DNA replication forks.

3.2.2. The role of the Plant Homeodomain domain

Initially, we have suggested that this domain might be involved in the interaction with DNA (Hopfner et al., 2000). This becomes less and less evident for several reasons. Indeed, the DNA binding domain of the UHRF members appears to be the SRA domain (see later) and it is unlikely that 2 DNA binding motifs are required for the UHRF family to function, although it is not excluded. In contrast, this domain has been shown as being a highly specialized methyl-lysine binding domain found in a variety of proteins regulating gene expression. Indeed, recent papers describe how PHD finger read part of the histone code (Pena et al., 2006; Shi et al., 2006; Wysocka et al., 2006). The PHD finger may promote gene activation and repression through interactions with trimethylated H3K4, a universal modification at the beginning of active genes (reviewed by Mellor, 2006). The PHD domain exhibits less affinity for dimethylated K4 than trimethylated suggesting that the PHD domain is able to discriminate small chemical differences, a fundamental property to read the epigenetic code. However, the histone code hypothesis predicts the existence of code-reader proteins with double recognition domains, such as PHD+bromodomain, linking methylation and acetylation.

For the UHRF family the double recognition domains might be the PHD domain associated with the SRA domain whose function is to allow binding of hUHRF1 to HDAC1 and to methylated DNA (Unoki et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005). Therefore, the UHRF family might govern the relationships between histone trimethylation, HDAC1 recruitment and DNA methylation and probably histone ubiquitination, considering the activity of the RING finger (see later). The association between hUHRF1 and a histone methyltransferase is likely to occur, considering that hUHRF1 interacts with the maintenance DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) and HDAC1 (Unoki et al., 2004; Achour et al., submitted for publication) and that these 2 latter have been shown to exist in the same macromolecular complex than does SUV39H1, a histone methyltransferase (Macaluso et al., 2003).

3.2.3. The role of the Set and Ring Associated domain

The SRA domain is a 150-170 amino acid long domain characterized by the conservation of up to 13 evenly spaced glycine residues and a VRV(I/V)RG motif (Baumbusch et al., 2001). In the hUHRF1 amino acid sequence this motif is VRVVRN and corresponds to amino acids 533 to 538. This domain is also known as the YDG domain because it contains a YDG motif. Shen (2001) called it SIN for similar to ICBP90 and Np95. It has been proposed that this domain directs a number of heterogeneous proteins to the chromatin (Citterio et al., 2004). Recently it has been proposed that this domain is involved in the chromatin structure by interacting with methylated CpG islands and with HDAC1 (Unoki et al., 2004). In vertebrates, this domain has so far only been identified in the UHRF family. However, this domain is also found in histone methyltransferases of A. thaliana, such as SU(VAR)3-9 homologues SUVH1 and SUVH2 but not in S. cerevisiae, Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster. However, no UHRF member has so far been identified as a histone methyltransferase.

Interestingly, in A. thaliana, the SRA domain is involved in directing DNA methylation to the target sequences (Naumann et al., 2005). It has been shown that such DNA methylation is a prerequisite for consecutive SUVH2-dependent H3 and H4 methylation to establish heterochromatin formation. Consistent with this, it was shown that mUHRF1 plays a pivotal role in the formation of pericentromeric heterochromatin (Papait et al., 2007). In addition, we have observed that the SRA domain is able to bind Dnmt1 (Achour et al., submitted for publication), known to be involved in the heterochromatin formation. We suggest that hUHRF1 and mUHRF1, via the SRA domain, ensure in vertebrates a part of the functions of histone methyltransferases in plants. Furthermore, the SRA domain has been shown to be responsible for that mUHRF1 can be directed to chromatin in vivo by interacting with the tail region of histone H3 (Citterio et al., 2004). The precise role of this domain still remains fragmentary, but considering that the SRA domain allows hUHRF1 or mUHRF1 to bind to HDCA1, methylated DNA and Dnmt1, the SRA domain may set a bridge between DNA methylation and the histone code, a property that may be fundamental in the inheritance of the epigenetic code (see later).

3.2.4. The role of the Really Interesting New Gene finger

Ubiquitination is a form of post-translational modification in which a 76 amino acid long polypeptide (ubiquitin) is conjugated through its C terminus to lysines on cellular proteins that are then targeted for degradation (polyubiquitination) via the proteasome or for a regulatory function (monoubiquitination). Ubiquitination is mediated by a conserved E1-E2-E3 enzymatic cascade in which an E3 ligase catalyses the ultimate step of binding of the C terminus of ubiquitin to a lysine residue present on the targeted protein. There are 2 main types of E3 ligases for ubiquitination, the HECT class and the RING class, including E3 ligases that possess RING finger-like domains, such as U box and PHD (reviewed in Chen et al., 2006; Kerscher et al., 2006). E3 ligases of the RING class bind the ubiquitinthioesther-linked E2 and substrate protein simultaneously and put in position the substrate lysine nucleophile in close proximity to the reactive E2-enzyme thioesther bond, facilitating the transfer of the polyubiquitin polypeptide. Catalysis of substrate modification by the HECT E3 ligases differs from that of the RING class. Indeed, in HECT E3 ligases, the ubiquitin is first transferred from the E2 to an active site cysteine in the conserved HECT domain of the E3 ligase. The thioesther-linked ubiquitin is then transferred to the substrate.

UHRF family members, like many RING finger containing ligases (reviewed in Lorick et al., 1999; Joazeiro and Weissman, 2000; Chen et al., 2002), have an in vitro auto-ubiquitinating activity (Mori et al., 2002; Citterio et al., 2004; Jenkins et al., 2005). The role of such auto-ubiquitinating activity remains intriguing, considering that E3 ligases of the RING type are not supposed to covalently bind the polyubiquitin polypeptide like HECTs do. However, auto-ubiquitination increases drastically the E3 ligase activity of the BRCA1/BARD1 complex, suggesting an autoregulating mechanism (Mallery et al., 2002). In any case, so far no auto-ubiquitination has been reported in situ in the cell for any of the UHRF member and thus the role remains speculative. In contrast, it is likely that histones are the real substrates for the UHRF members, at least for the UHRF1 gene. Indeed, it was shown that mUHRF1 ubiquitinates histones, in vitro and in vivo, with a clear preference for histone H3 (Citterio et al., 2004). However, histones might not be the sole substrates for the UHRF members, since nonhistones proteins have been identified to be ubiquitinated by hUHRF2 (Mori et al., 2002).

The 3D structure of the RING domain of hUHRF2 has recently been reported (http://sgc.utoronto.ca/). The high-resolution crystal structure revealed the zinc-finger as well as a novel associated domain that could be involved in binding to substrates. The zinc ligation system is of the C3HC4 type, referred as the "cross-brace" motif, with metal ligand pairs 1 (C733 and C735) and 3 (C753 and C756) coordinating to bind 1 zinc ion, while pairs 2 (C748 and H750) and 4 (C768 and C771) binding the second. A 60-residue, 4 helical bundles, formed from 3 amino terminal helical elements and an additional carboxy terminal helical element, are closely associated with the zinc finger subdomain. This unique helical bundle could mediate binding with proteins targeted for ubiquitination (http://sgc.utoronto.ca/).

Considering that the UHRF family exhibit ubiquitin E3 ligase activity, it makes sense to consider that this family is a subset of the E3 ligase family that includes a considerable number of members (reviewed in Chen et al., 2006; Kerscher et al., 2006) some of which show deregulated expression patterns in cancer (reviewed in Chen et al., 2006).

3.2.5. The role of other particular sites

Two consensus Rb-binding sequences (LXCXE) were found at positions L331 to E335 and I725 to E729 of hUHRF1 but only the later present in the RING finger is likely to be functional (Jeanblanc et al., 2005). Human and mouse UHRF2 lack the Rb-binding site in the RING finger (Mousli et al., 2003). Does this mean that pRB cannot interact with hUHRF2? Not absolutely, as we suggested the consensus binding site might not be involved in the interaction and it may rather be the RING finger, in its integrity, that is involved as it is for the BRCA1 gene product (Fan et al., 2001; Jeanblanc et al., 2005). Accordingly, it has been shown that pRB can exert its growth arrest property independently upon binding with LXCXE motifs (Chan et al., 2001).

pRB2/p130 might also interact with this family or at least belong to the same macromolecular complex considering that pRB2 and hUHRF1 are 2 proteins interacting with HDAC1 as well as with Dnmt1 (Macaluso et al., 2003; Unoki et al., 2004; Achour et al., submitted for publication).

Also there is an amino acid sequence of 60 amino acids between the PHD and SRA domain (not represented) that is highly conserved among all known UHRF1 sequences (listed in Table 1) with an identity always above 90%, suggesting the existence of an additional domain. Another possibility would be that the SRA domain is larger than expected.

4. Expression patterns of Ubiquitin PHD RING Finger members

4.1. Cellular expression patterns

Two peaks of hUHRF1 expression, in late G_1 and during G_2/M , are observed in normal cells in contrast to cancer cells in which hUHRF1 expression is continuously expressed at a high-constant level (Mousli et al., 2003; Jeanblanc et al., 2005). In contrast, mUHRF1 expression is increased in the S phase of normal thymocytes, while these cells contain low levels of mUHRF1 in the G_1 and G_2 phases (Muto et al., 1995).

Northern blot analysis of several human cancer cell lines revealed the existence of 2 hUHRF1 mRNA species of 5.1 and 4.3 kb that are transcribed from the gene. The relative amounts of these mRNAs depended on the cell type. Indeed, in MOLT-4 cells and Burkitt's lymphoma Raji cells, the 4.3-kb and 5.1-kb transcripts are mainly observed, respectively. In other cell lines, such as HL-60 cells, chronic myelogenous leukaemia K-562, lung carcinoma A549, HeLa or colorectal SW480, both 4.3 and 5.1 kb forms of hUHRF1 mRNA have been detected (Hopfner et al., 2001). The phosphorus 32-labelled nucleotidic probe that we have used corresponds to amino acids 269 to 495 including therefore the PHD domain and a part of the SRA domain (Fig. 1). It is thus likely that 1 of 2 mRNA bands corresponds to ICBP87 or hUHRF3. Muto and collaborators (2006), by using a 2-step PCR, identified a 4327-bp long cDNA in the human testis whereas in human fetal thymus tissue they amplified a 3229-bp long cDNA. Both amplicons contain a single open reading frame encoding a 793 amino acid long polypeptide (Muto et al., 2006). Together, these results suggest that it is rather the 4.3 kb that encodes hUHRF1. In contrast, the 5.1 kb might be related to ICBP87 or hUHRF3 and the shorter form of 3.2 kb might correspond to hUHRF1 but in fetal tissues. The existence of these 3 mRNA is in accordance with the 3 probable alternative promoters (AceView at http://www.ncbi. nlm.nih.gov) and the UHRF1 gene structure (Hopfner et al., 2001).

Whatever the case maybe, this could explain why 2 bands are often observed in Western blotting experiments for hUHRF1 (Hopfner et al., 2000; Mousli et al., 2003; Jeanblanc et al., 2005). hUHRF1 mRNA is most abundant in thymus, fetal tissues, bone marrow, but mUHRF1 is non-existing in differentiated tissues, suggesting that the UHRF family (at least *UHRF1*) is related to cell proliferation (Fujimori et al., 1998; Hopfner et al., 2000). Indeed, Western blot analysis showed that hUHRF1 and topoisomerase II α share a similar expression pattern in proliferating and quiescent human lung fibroblasts (Hopfner et al., 2000). Over-expression of hUHRF1 in human pulmonary fibroblasts resulted in an increased expression of topoisomerase II α and enhanced cell proliferation (Hopfner et al., 2000, 2002).

Expression of UHRF2 is growth dependent in normal fibroblasts, whereas in serum-starved cancerous cells, such as fibrosarcoma cells (HT-1080) or hepatoma cells (HepG₂), its expression is still abundant (Mori et al., 2002).

4.2. Ubiquitin PHD RING Finger members expression in normal and cancer tissues

Expression of the members of the UHRF family is extremely variable according to the tissues and the species. Human hUHRF1 mRNA is found most abundantly in adult and fetal thymus, fetal liver, lung, testis and to a lesser extent in testis, lung, heart, bone marrow, fetal kidney and fetal spleen (Hopfner et al., 2000). No hUHRF1 mRNA could be detected in differentiated tissues. In mouse tissues high expression of UHRF1 is observed in testis, spleen, lung and thymus whereas it was not detectable in heart, brain, liver and kidney (Fujimori et al., 1998). Embryonic tissues, such as liver and skin, also strongly express mUHRF1 in proliferating cells (Muto et al., 1995).

Concerning cancer tissues, increased expressions of UHRF members have been observed in breast cancer, cervical lesions, rhabdomyosarcoma, pancreatic adenocarcinoma, prostate cancer, lung cancer and gliomas. The number of hUHRF1-positive cells is dependent upon the grade of the breast cancer (Mousli et al., 2003). Interestingly, Unoki and collaborators (2004) showed with their own cDNA microarrays hUHRF1 mRNA up-regulation in 22 of 32 moderately and poorly differentiated tissues, whereas 12 scirrhous exhibited enhanced hUHRF1 expression. UHRF1 is among the most frequent genes that are found to be up-regulated in astrocytomas (Oba-Shinjo et al., 2005). Only a few genes, among which UHRF1, were found to be exclusively up-regulated in rhabdomyosarcoma when compared to normal muscle tissues (Schaaf et al., 2005). These authors suggested that high levels of hUHRF1 keep the cells in a proliferation state and thus hinder them to differentiate. Quantitative analysis of UHRF1 mRNA of lung, breast and prostate primary tumors revealed that UHRF1 expression was elevated in the tumor tissue versus the corresponding normal tissue (Jenkins et al., 2005). We have recently shown that hUHRF1 labels proliferating cells in

cervical lesions with an efficiency comparable to that obtained with Mib-1 (Lorenzato et al., 2005), and we proposed that this labeling in the upper two-thirds of the epithelium with the association of a suspect DNA profile allows to distinguish lowgrade from high-grade squamous intraepithelial lesions (Lorenzato et al., 2005). In gastric cancers, several chromosomal regions are more frequently gained in young patients (Buffart et al., 2007). Among these regions, the chromosomal region 19p13.3-13.2 has been identified. This region is important since it harbors a gene encoding a serine/threonine kinase (STK11 gene) for which a germline mutation causes the Peutz-Jeghers syndrome, an autosomal dominant disorder increasing risk of multiple cancers (reviewed in McGarrity and Amos, 2006). Additionally, this region contains the UHRF1 gene (Hopfner et al., 2001), thus representing an interesting gene candidate as a marker for aggressive gastric in young individuals, when the UHRF1 is duplicated. Recently an up-regulation of the UHRF1 gene been observed in pancreatic adenocarcinoma but not in chronic pancreatitis and normal pancreas (Crnogorac-Jurcevic et al., 2005). Considering this differential expression, the authors proposed that analysis of UHRF1 expression could provide a useful additional diagnostic tool in case of pancreatic adenocarcinomas. In a transgenic animal model of prostate cancer, UHRF1 and topoisomerase IIa genes were up-regulated (Glinsky et al., 2005). Further UHRF1 gene expression patterns in normal and cancerous tissues can be consulted on AceView (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Altogether these studies indicate that the UHRF1 gene is over-expressed in all types of primary cancers that have been studied.

So far no literature is available on the *UHRF2* expression in normal or cancerous tissue, but several transcripts have been reported in databases for various normal and cancerous tissue (see AceView at http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. Regulation of the expression of Ubiquitin PHD RING Finger members

5.1. Down-regulation of UHRF1 expression by DNA-damage checkpoint signals

Both *mRNA* and protein levels of hUHRF1 are downregulated in response to DNA damage in human tumor cell line HCT116 (Arima et al., 2004) and A549 (Jenkins et al., 2005). Similar down-regulation at the protein level has also been observed in noncancerous cells, such as human normal fibroblast MRC-5 (Fig. 2A). Given that reduction of hUHRF1 expression is inhibited by ATM kinase inhibitor and does not occur in p53^{-/-} cells or p21^{-/-} cells, DNA damage-induced hUHRF1 reduction is dependent on ATM/p53/21^{Cip1/WAF1}mediated DNA damage checkpoint signal (Arima et al., 2004).

Checkpoints, which monitor DNA damage and regulate cell cycle progression, ensure genomic integrity and prevent the propagation of transformed cells (Hartwell and Kastan, 1994). DNA damage activates the p53-dependent checkpoint pathway that induces expression of $p21^{Cip1/WAF1}$, resulting in cell cycle arrest at G₁/S transition by inhibition of cyclin-dependent kinase (Cdk) activity and DNA replication (Waga et al., 1994;



Fig. 2. hUHRF1 expression after DNA damage and effect of ICBP90 downregulation on cell cycle progression. (A) DNA damage induces hUHRF1 downregulation in normal human fibroblasts, MRC-5 cells. MRC-5 cells were treated with adriamycin at final concentration of 500 ng/mL to induce DNA doublestrand breaks. After 48 h adriamycin treatment, MRC-5 cells were subjected to indirect immunofluorescence staining with anti-hUHRF1 monoclonal antibodies (FITC, green) as described elsewhere (Arima et al., 2004). DNA was visualized by staining with propidium iodide (PI, red). The merged images are shown. (B) Depletion of ICBP90 induces cell cycle arrest at G₁/S transition. Nocodazole "trap" assay were performed to determine the relationship between ICBP90 depletion and cell cycle control. HeLa cells were transfected with control or hUHRF1 siRNAs for 24 h and then incubated with or without nocodazole (100 ng/mL) for an additional 12 h. Thereafter, when they were harvested for FACS analysis. Nocodazole treatment of control HeLa cells induced prometaphase (4N) arrest. In contrast, G1 (2N) peak appeared in cells depleted hUHRF1, suggesting that a significant number of cells arrested at G1 phase. Experimental conditions were described elsewhere (Arima et al., 2004). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Chen et al., 1995; Luo et al., 1995; Sherr and Roberts, 1995). hUHRF1 reduction correlates with p21^{Cip1/WAF1} expression after DNA damage (Arima et al., 2004). There are several lines of evidence supporting the fact that DNA damage-induced reduction of hUHRF1 protein is not a result of cell cycle arrest but is directly regulated by the expression of $p21^{Cip1/WAF1}$:

- Microarray analysis showed that adenoviral expression of p21^{Cip1/WAF1} down-regulates hUHRF1 in a human ovarian cancer cell line (Wu et al., 2002).
- hUHRF1 is not detected in most p53^{+/+} cells expressing p21^{Cip1/WAF1} by DNA damage signals (Arima et al., 2004).
- The down-regulation of hUHRF1 by DNA damage is not observed in p21^{-/-} cells although p53 is activated (Arima et al., 2004).
- Adenoviral expression of p21^{Cip1/WAF1} but not that of p27^{Kip1} induces hUHRF1 reduction in p53^{-/-} cells without DNA damage (Arima et al., 2004).

Approximately half of the human malignancies harbor p53 mutations. Accordingly, the p53/p21^{Cip1/WAF1}-dependent checkpoint pathway is inactivated in those tumors, resulting in a loss of G₁ arrest after the DNA damage. In HeLa cells whose p53 is inactivated by the human papilloma virus 16 (HPV16) E6 protein, G₁ arrest is not induced by DNA damages. However, depletion of hUHRF1 expression by siRNA transfection induced G₁ arrest in a significant population of HeLa cells when the cells were treated with adriamycin to induce DNA damage (Arima et al., 2004). These findings suggest that the down-regulation of hUHRF1 is a crucial factor for G1 arrest of the cells in which DNA damage signals are activated. It should be noted that reduction of hUHRF1 expression solely can suppress proliferation of cancer cells whose p53 are inactivated. Thereby, hUHRF1 is a potential downstream target of p53/ p21^{Cip1/WAF1}-dependent DNA damage-induced checkpoint and the down-regulation of hUHRF1 is an important mechanism for cell cycle arrest at G₁/S transition.

Biochemical data, which indicate the direct relationship between the DNA damage signals and the expression of mUHRF1, has not yet been reported. However, it has been shown that mUHRF1-null mouse embryonic stem (ES) cells are more sensitive to DNA damage induced by ionizing radiation, UV light and *N*-methyl-*N*"-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) than wild-type or $mUHRF1^{+/-}$ cells (Muto et al., 2002), suggesting that UHRF1 functions as a component in the DNA damage response pathways and that it plays a role in the maintenance of genomic stability.

5.2. Expression of Ubiquitin PHD RING Finger is important for cell cycle progression at G_1/S transition and G_2/M

Depletion of hUHRF1 using siRNA induced G_1 arrest in HeLa cells without DNA damage (Fig. 2**B**). In support of this finding, abrogation of hUHRF1 expression using an hUHRF1-specific shRNA resulted in markedly enhanced growth defects in not only HeLa cells but also A549 (wild-type p53) and H1299 (p53 null) cells (Jenkins et al., 2005). In addition, NIH3T3 cells treated with antisense oligonucleotides to mUHRF1 did not enter S phase (Bonapace et al., 2002) and mUHRF1 functional impairment resulted in abrogation of DNA synthesis (Sakai et al., 2003). All these data suggest that hUHRF1 and mUHRF1 are

essential for S-phase entry. On the other hand, overexpression of hUHRF1 increased the S and G₂/M phase cell fractions of serum-starved lung fibroblasts (Jeanblanc et al., 2005), and mUHRF1-induced S-phase entry in terminally differentiated myotubes (Bonapace et al., 2002). Thus, both mUHRF1 and hUHRF1 appear to have G_1/S promoting potency. The role of hUHRF1 in the G₁/S transition appears to be controlled by the E2F family members. Indeed, it has been shown that the hUHRF1 expression is dependent upon the expression of E2F1, a transcription factor essential for S-phase entry (Mousli et al., 2003; Unoki et al., 2004). Furthermore, mUHRF1 expression appears to be under the control of the E2F4 gene (another member of the E2 family) during mouse fetal erythropoiesis (Kinross et al., 2006). Regulation of hUHRF1 expression is also critical during G₂/M transition considering that in normal human fibroblasts hUHRF1 peaks during the G₂/M transition and that inhibition of hUHRF1 expression increases cell number in G₁ and G₂/M (Mousli et al., 2003; Jenkins et al., 2005). Interestingly, Yoshizuka and co-workers (2005) showed that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr protein induced a down-regulation of a number of genes including the UHRF1 gene. Such down-regulation has been proposed to be responsible for the G₂/M cell cycle arrest probably via an up-regulation of p21^{Cip1/WAF1} (Yoshizuka et al., 2005), considering that this latter is targeted by the Vpr protein (Chowdhury et al., 2003; Vazquez et al., 2005). Therefore, regulation of the expression level as well as ubiquitin ligase function of hUHRF1 and mUHRF1 are critical for regulating G₁/S as well as G₂/M transition via a dependence upon p21^{Cip1/WAF1}.

Contrary to hUHRF1 and mUHRF1, overexpression of hUHRF2 induced an increase in G_1 phase cells, and cell cycle regulation by hUHRF2 appears to be executed through the mechanism regulating Cdk2 activity (Li et al., 2004). Accordingly, although hUHRF2 and hUHRF1 are homologous human RING proteins, they may have opposite effects regarding G_1 /S control. Li and co-workers (2004) suggested that this relationship is similar to that between Mdm2 and Mdmx, 2 structurally related RING proteins involved in the regulation of p53. Mdmx appears to promote the Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation. However, Mdmx conversely suppressed the Mdm2-mediated pRB ubiquitination and degradation (Uchida et al., 2006). Thus, it will be extremely interesting to determine the functional association between hUHRF2 and hUHRF1.

6. Partners of the Ubiquitin PHD RING Finger members

By partners we understand proteins that may be present in the same macromolecular complex as UHRF members and therefore will not include their substrates and regulatory kinases (Bronner et al., 2004; Trotzier et al., 2004). As it is the case for the E3 ligase BRCA1/BARD1 (reviewed in Starita and Parvin, 2003), hUHRF1 appears to have many partners. Indeed, in a previous study we have employed the two-hybrid system and isolated several proteins putatively able to interact with hUHRF1 (Bronner et al., 2002). Among these proteins, we found the HAT Tip60 (Tat Interactive Protein), alpha-NAC (Nascent polypeptide associated complex and co-activator alpha) and RbAp48 (a retinoblastoma

binding protein; Qian et al., 1993). Alpha-NAC is a co-activator for AP-1 transcriptional activating function in bone during mouse development (reviewed in St-Arnaud and Ouelo, 1998). Considering that Tip60 is a co-activator of the androgen receptor (Brady et al., 1999), it is not excluded that hUHRF1 could be a nuclear receptor itself, since it has a leucine zipper domain (Hopfner et al., 2000), or could be a co-activator of the androgen receptor. The interaction of RbAp48 with hUHRF1 is likely to occur in vivo, since it has been reported that HDAC1 interacts with hUHRF1 and RbAp48 (Nicolas et al., 2001; Unoki et al., 2004). RbAp48 could favor the deacetylation of histones since it binds directly to histone H4 (Nicolas et al., 2001). Such an association may link H3 ubiquitination and H4 deacetylation to DNA methylation considering that mUHRF1 interacts with histone H3 and hUHRF1 interacts with Dnmt1 (Achour et al., submitted for publication).

Unoki and collaborators (2004) have immunoprecipitated hUHRF1 and analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectroscopy the proteins that were co-immunoprecipitated. The authors identified a new protein interacting with hUHRF1, which they called UHRF1BP1 for UHRF1 binding protein 1. Strong evidence suggests that the interaction of UHRF1BP1 and hUHRF1 causes the relocation of the latter and by this way might represent a negative regulator of cell growth (Unoki et al., 2004). Therefore, hUHRF1 may participate in a protein complex involved in acetylation and deacetylation of histones and by this way regulate gene transcription and/or in more general the epigenetic code. The activity and functions of this complex may be targeted by UHRF1BP1. Concerning the *UHRF2* gene, except substrates for its enzymatic activity and a regulatory kinase (Cdk2), no partner has so far been identified.

7. Functions of the Ubiquitin PHD RING Finger members

7.1. Role during development

mUHRF1 expression is indispensable for proper mice development since $mUHRF1^{-/-}$ null mice died in midgestation (Muto et al., 2002). The reasons for the midgestational death are not known but *mUHRF1* expression patterns in fetal tissues suggest that this gene is involved in the formation of several vital tissues among which liver, thymus and bone marrow (Hopfner et al., 2000). Accordingly, mUHRF1 expression has been shown to be dependent upon E2F4 expression during mouse fetal erythropoeisis (Kinross et al., 2006). Furthermore, backbone development may depend upon UHRF1 expression since phylogenetically UHRF1 appeared with vertebrates and that alpha-NAC, a putative partner of hUHRF1 (Bronner et al., 2002), plays a role during bone development in mice (reviewed in St-Arnaud and Quelo, 1998). Evenly, Sadler and co-workers (2007) showed that UHRF1 is indispensable for liver growth in zebrafish embryos but also in adult embryos after partial hepatectomy. It has been reported that the transcript of the *mUHRF1* gene is present until the zygote stage and is then significantly reduced as the mouse embryo undergoes its first cleavage (Wang et al., 2004). In this study, the authors suggested that mUHRF1 might play an important role in the resumption of oocyte meiosis after arrest and/or in the initiation of the first mitosis of the embryo. However, the requirement of *mUHRF1* rather appears to occur in mid-gestation (Muto et al., 2002), and thus questions its role during the first mitosis of the embryo. *UHRF1* repression was proposed to be involved in oligodendrocyte differentiation as assessed by cell culturing of oligodendrocytes harvested from 7 days-old rats (Dugas et al., 2006). In addition, it was shown that *mUHRF1* gene expression decreased during mouse cochlea development probably as a result of cell differentiation and a global decrease in the number of proliferating cells (Gong et al., 2006).

One additional example of a role of *UHRF1* in development is the lens of zebrafish, in which *UHRF1* mutations are leading to severe lens disorganization as well as expansion of epithelial-like tissue into the marginal zones (Gross et al., 2005). However, the authors do not exclude that it may reflect rather a degeneration than a morphogenesis defect (Gross et al., 2005).

The molecular mechanisms that confer a role to UHRF members during development remain unclear. However, some interesting areas of investigations can be evoked hereafter. Heterochromatinization by means of histone H3 methylation take place in differentiating embryonic cells in culture but also in vivo during development, both at promoter as well as at coding regions (Feldman et al., 2006). Methylation at K9 of histone H3, via SUV39H1, with heterochromatinization was suggested to be a highly specific mechanism for epigenetic silencing of embryonic genes (Feldman et al., 2006; reviewed in Lachner and Jenuwein, 2002). Since mUHRF1 was reported to be involved in heterochromatin replication (Papait et al., 2007) and that hUHRF1 is likely to participate in a complex containing the SUV39H1, it would be possible that *UHRF1* participates in gene targeted inactivation during embryonic development.

7.2. Putative role of Ubiquitin PHD RING Finger members: oncogenes or tumor suppressor genes?

An oncogene is a gene that contributes to the appearance of a transformed cell that corresponds to the basis of cancerogenesis. In contrast, tumor suppressor genes have opposite roles in that their contribution is to maintain a cell in a nontransformed state. Oncogenes are found in the oncogenically activated state in retroviruses and transformed cells and in their normal nononcogenically activated state, in nontransformed cells, are called protooncogenes (reviewed in Mikkers and Berns, 2003; Varmus et al., 2005). So far no mutation has been identified for the UHRF family. Several lines of evidence suggest that *UHRF1* might be an oncogene but possibly also as a tumor suppressor gene depending upon its subcellular location. Such hypothesis is supported by the fact that some E3 ligases behave as oncogenes whilst others exhibit tumor suppressor gene properties (reviewed in Chen et al., 2006).

Oncogenic processes exert their effect by targeting particular regulators of G_1 and G_2 phase progression (Hunter, 1997). In accordance with putative oncogenic properties, expressions patterns of hUHRF1 show peaks at late G_1 as well as in the G_2/M transition (Mousli et al., 2003; Jenkins et al., 2005).

Indeed, by blocking hUHRF1 expression with siRNA in HCT116 cells (colon cancer cell line) and in H1299 cells, an increased number of cells was observed in G₁ and G₂/M phases. indicating that hUHRF1 functions are critical during multiple phases of the cell cycle (Arima et al., 2004; Jenkins et al., 2005). In addition, overexpression of hUHRF1 is able to overcome cell contact inhibition in human lung fibroblasts (Hopfner et al., 2002). Consistently with this study, it has been shown that E1Ainduced S-phase re-entry of terminally differentiated myotubes is dependent upon reexpression of mUHRF1 (Bonapace et al., 2002). The terminal differentiation of a cell is characterized by its functional specialization accompanied by its loss of proliferation capability. Thus, mUHRF1 is likely to be involved in the E1A-induced activation of a complementary pathway to that of the E2F1, which is essential for the reentry of cells in the S phase (Bonapace et al., 2002).

Alternatively, UHRF members might behave as tumor suppressor genes. Indeed, mUHRF1 appears to play a role in the genome integrity (Muto et al., 2002) but is enhanced in tumor promoting agents-stimulated cells (Sakai et al., 2003) suggesting that an increase in mUHRF1 expression might be a defense of cells upon DNA damages. mUHRF1 might maintain genome integrity after DNA damage by chasing DNA replication sites (Uemura et al., 2000; Miura et al., 2001). Furthermore, 2 studies have shown that hUHRF1 and mUHRF1 confer resistance to X radiation in HEK293 cells and in ES cells, respectively (Muto et al., 2002, 2006). mUHRF1 also played a role in the pericentromeric heterochromatin replication via acetylation of specific lysine residues (Papait et al., 2007). Heterochromatin is particularly rich in DNA repeats called satellites. Deficiency, in this replication process is known to favor sister chromatid exchanges. Interestingly, *mUHRF1^{-/-}* null mouse ES cells are not deficient in cell proliferation but exhibit sister chromatid exchanges suggesting that mUHRF1 exerts a role in genome integrity stabilization by controlling heterochromatin replication (Muto et al., 2002). This control is essential for maintaining the phenotype in noncancerous cell but appears to be nonessential for cell proliferation whereas for cancer cells or transformed cells, this control is essential for both phenomena considering that down-regulation of hUHRF1 or mUHRF1 leads to growth arrest (Bonapace et al., 2002; Arima et al., 2004; Unoki et al., 2004; Jenkins et al., 2005). Thus, UHFR members may be tumor suppressor genes by maintaining the genome integrity and putatively by repairing or transmitting the epigenetic code (DNA methylation and histone code) to the descent (see later). Nevertheless, we are privileging the possibility that UHRF1 behaves as a protooncogene since it has the faculty of downregulating tumor suppressor genes, probably with the help of partners as described in Fig. 3, and this repression might become permanent if a self-activating mutation of UHRF1 occurs.

In contrast, *UHRF2* might rather behave as a tumor suppressor gene considering that its overexpression leads to growth arrest and is down-regulated during partial hepatectomy, that is known to promote carcinogenesis (Pound and McGuire, 1978; Ogawa et al., 1980). Accordingly, the *UHRF2* gene is down-regulated in liver from female mice treated with 1,4-bis2-(3,5-



Fig. 3. Mechanism of regulation of tumor suppressor genes by hUHRF1. Interactions of hUHRF1 with some of its partners, including Dnmt1, HDAC1 and SUV39H1 are depicted. This macromolecular complex is proposed to be involved in gene silencing of tumor suppressor genes such as *RB1*, $p16^{INK4A}$ or $p14^{ARF}$, by ubiquitinating (Ub) histone(s) H3 and/or H2B (H3, H2B) that underwent methylation (Me) after deacetylation, catalyzed by SUV39H1 and HDAC1, respectively. This series of events is accompanied by DNA methylation (O), mediated by Dnmt1, leading to gene silencing.

dichloropyridyloxy)benzene, a strong tumor-promoting agent (Locker et al., 2003).

7.3. Ubiquitin PHD RING

Finger members and the epigenetic code

Obviously, considering the above information of the different structural domains, hUHRF1 and mUHRF1 have a relationship with histone post-translation modifications and perhaps DNA methylation. Histories are small proteins of 11–22 kDa. The ability of individual histone lysine residues to exist in 1 of 3 methylated states combined with other modifications such as acetylation, ubiquitination, biotinylation, ADP ribosylation and phosphorylation as well as binding of methyl lysine-interacting proteins is the core of the "histone code" hypothesis (reviewed in Jenuwein and Allis, 2001; Bronner et al., 2007). A direct effect of the UHRF members on the histone code may arise from their enzymatic activity (E3 ligase) whilst an indirect effect may result from the association with their partners, such as HDAC1 for instance (Unoki et al., 2004). mUHRF1 has been reported to interact with histone H3, H2A, H2B and H1 with subsequent ubiquitination (Citterio et al., 2004). Although, all 4 histones can be ubiquitinated by mUHRF1, in vivo in the cell, a clear preference for histone H3 has emerged (Citterio et al., 2004).

Histone monoubiquitination is generally associated with enhanced gene expression (reviewed in Bronner et al., 2007). Indeed, based on studies in yeast, monoubiquitination of histone H2B is required for 2 activating events, i.e., H3K4 and H3K79 methylation (Sun and Allis, 2002). Ubiquitination of histone H3 is much less studied and thus understood. However, recently it has been shown in HeLa cells that monoubiquitination of histone H3 and H4 occurs in vivo and requires the ubiquitin ligase CUL4-DDB1-ROC1 complex (Wang et al., 2006). Interestingly, in these cells UV radiation quickly induces H3 and H4 ubiquitination. Knockdown of CUL4 impairs cellular response to DNA damage, suggesting that histone H3 and H4 ubiquitination is involved in DNA repair mechanism. In addition, H3 and H4 ubiquitination has been shown to weaken histonesDNA interactions (Wang et al., 2006), an effect which might favor then accessibility of transcription factors and thus enhance or repress gene transcription. Nevertheless, monoubiquitination of histones may also lead to gene repression, mostly by targeting histone H2A and H2B. Indeed, Mdm2 associates with HDAC1 and its combination with histone H2B ubiquitination may be important if not crucial for transcriptional shutoff (Ito et al., 2002). Accordingly, monoubiquitination of H2A is enriched on the inactive X-female chromosome (Fang et al., 2004) and H2A monoubiquitination is required for *Hox* gene silencing (Wei et al., 2006).

The monoubiquitination of histones, after DNA damages, is likely to occur in vivo for the UHRF members, at least for *UHRF1*, and this for several reasons:

- double-strand breaks down-regulates *hUHRF1* expression (Arima et al., 2004; Jenkins et al., 2005) through a p53dependent mechanism;
- hUHRF1 interacts with Dnmt1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA; Arima et al., 2004; Achour et al., submitted for publication), both known to be involved in DNA repair mechanism and likely in the epigenetic code repair mechanism (Mortusewicz et al., 2005);
- *hUHRF1* has been proposed to be a radiosusceptibility gene, considering that its knockdown increases the sensitivity of ES cells to X-rays, UV light, as well as to hydroxyurea (Muto et al., 2006; Un et al., 2006).

The UHRF1-mediated monoubiquitination of histones, might occur, in cancerogenesis, in the vicinity of methylated tumor suppressor genes, such as RB1, $p16^{INK4A}$ or $p14^{ARF}$ according to the cell type, considering that hUHRF1 binds to methylated promoters of these genes in cancer cells (Unoki et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005). We hypothesize that tumor suppressor gene silencing by UHRF members occurs via monoubiquitination of histones H2A and/or H2B whilst gene expression induction, e.g., that of the *topoisomerase* $II\alpha$ gene, requires monoubiquitination of histone H3 and/or H4. In noncancer cells, such a mechanism can also occur during the Sphase entry of the cell cycle. Thus, the monoubiquitination may permanently silence tumor suppressor genes in cancer cells whereas in noncancer cells such silencing may be temporary. So far it is not yet known whether, beside UHRF1, other members of the UHRF family can ubiquitinate histones. Considering, the high homology between the different members, it is likely to occur but they might have different affinities in respect to the histone variant.

PCNA has also been reported to interact or to localize in the proximity of hUHRF1 and mUHRF1, respectively (Uemura et al., 2000; Arima et al., 2004) but the direct participation of mUHRF1 in the DNA replication machinery is unlikely to occur (Miura et al., 2001). In contrast, the proposal that *UHRF1* intervenes immediately after the DNA replication machinery in order to duplicate the epigenetic code is an attractive idea. Such a possibility is supported by the fact that the involvement of hUHRF1 or mUHRF1 is undoubtedly not limited to the regulation of the above mentioned tumor suppressor genes and that

Dnmt1 is able to interact with hUHRF1 and PCNA (Iida et al., 2002; Achour et al., submitted for publication). Furthermore, mUHRF1 is localized in DNA replication sites and this is compatible with a role in the epigenetic code inheritance. Indeed, we have recently proposed that hUHRF1 may participate in a huge complex beside PCNA that we called "ECReM" for epigenetic code replication machinery, which is likely to be involved in the replication of the epigenetic code (Bronner et al., 2007). Here, we propose to extend such a role to all UHRF family members, considering that they share high homology in terms of structures. Such a function may extend to other E3 ligases, e.g., BRCA1.

Indeed, although, no amino acid and no structural similarities, except the presence of a RING finger a parallel between BRCA1 and hUHRF1 can be drawn. Indeed, BRCA1 is involved in transcription, ubiquitination and DNA repair (reviewed in Starita and Parvin, 2003). BRCA1 can form a complex with BARD1 and mediate the monoubiquitination of the nucleosome core histones, including the variant H2AX that co-localizes with BRCA1 at sites of DNA damage (Mallery et al., 2002). BRCA1 has been shown to facilitate topoisomerase II α -dependent DNA decatenation that is likely to occur via ubiquitination of topoisomerase II α (Lou et al., 2005). Similarly, we also reported a positive regulatory mechanism by showing that hUHRF1 enhances topoisomerase II α expression (Hopfner et al., 2000, 2002; Mousli et al., 2003).

BRCA1 binds to DNA with no sequence specificity but rather with a preference for abnormal structure (Paull et al., 2001). The same lack of specificity might occur for hUHRF1, since it binds to CCAAT sequences but also to methylated DNA (Hopfner et al., 2000; Unoki et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005). Interestingly, no yeast equivalent exists for the BRCA1 gene, as it is the case for the UHRF1 and UHRF2 genes. BRCA1 has been proposed to exert its function via genome stability (reviewed in Starita et al., 2003) similarly to mUHRF1, probably through heterochromatin replication (Muto et al., 2002; Papait et al., 2007). Furthermore, BRCA1 is involved in chemoresistance like hUHRF1 (Jenkins et al., 2005; Un et al., 2006; Wiltshire et al., 2007). However, although BRCA1 appears to prevent the entry of S and G₂/M phases, a stimulatory effect has been observed for hUHRF1 that favors such entries (Arima et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005). Thus, BRCA1 seems to be more closely related to hUHRF2, which has been shown to block entry into the S phase (Li et al., 2004).

8. Ubiquitin PHD RING Finger members as drugable targets for cancer therapy

There are 3 main reasons to support this point of view. First of all, as seen before, inhibition of *UHRF1* expression has been shown to prevent cells from entering into the S phase and thus to cause growth arrest (Arima et al., 2004; Unoki et al., 2004; Jenkins et al., 2005). On the other hand, overexpression of hUHRF1 is able to overcome cell contact inhibition in human lung fibroblasts (Hopfner et al., 2002). Consistently with this study, it has been shown that E1A-induced S-phase re-entry of NIH 3T3 cells is dependent upon re-expression of mUHRF1
(Bonapace et al., 2002). However, as mentioned above the product of the *UHRF1* gene is not absolutely required for cell proliferation in noncancerous cells, considering that down-regulation of mUHRF1 in mouse ES cells does not lead to inhibition of cell proliferation (Muto et al., 2002). This may be an interesting drug-candidate feature of hUHRF1, considering that targeting this protein may not affect cell viability of ES cells or more generally in noncancerous cells. Nevertheless, increased sensitivity to chemotherapeutic agents was nevertheless observed in mouse ES cells (Muto et al., 2002).

Secondly, UHRF members are ubiquitin E3 ligases and in general inhibiting the proteasome pathways are interesting strategies for anti-cancer drug development (Sun, 2003). Targeting E3 ligases for cancer therapy has gained increasing attention which is further stimulated by the recent approval by the FDA of a general proteasome inhibitor, bortezomib (Velcade, Millenium, MA) for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma (reviewed in Roccaro et al., 2006). Another molecule, namely NPI-0052, showed interesting properties in terms of inhibition of the proteasome NPI-0052 and multiple myeloma treatment (reviewed in Chauhan et al., 2006; Roccaro et al., 2006; Anderson, 2007). However, in contrast to general proteasome inhibitors, targeting a specific E3 ligase would selectively stabilize a specific cellular protein regulated by a particular E3 ligase, thus avoiding unwanted effects on other cellular proteins such as oncogenes. As suggested by Sun (2006), this would achieve a high level of specificity with lessassociated toxicity or undesirable effects. Indeed, E3 ubiquitin ligases determine the specificity of protein substrates through a specific E3-substrate binding. They, therefore, represent a group of attractive and potentially "drugable" molecular targets for disease intervention in mechanism-driven drug discovery (reviewed in Sun, 2003). Although E3 ligases are believed to be ideal drug targets, targeting these enzymes is still in its infancy because no E3 ligase inhibitor has yet reached the clinic (Chen et al., 2006). Nevertheless, 2 inhibitors of Mdm2, the E3 ligase that admits p53 as the substrate (Momand et al., 1992), have been reported to have substantial p53-dependent antitumor effects in vivo (Vassilev et al., 2004; Issaeva et al., 2004).

Thirdly, E3 ligases, including UHRF1, are overexpressed in many human cancers and their inhibition leads to growth arrest and/or apoptosis in cancer cells (reviewed in Sun, 2003; Chen et al., 2006; Sun et al., 2006). In the case of UHRF members, targeting the E3 ligase activity appears to be interesting. Indeed, by screening a tetracycline-inducible cDNA library in A549 cells for genes that interfere with proliferation, a fragment of the UHRF1 gene acting as a dominant negative effector of cell growth, has been isolated (Jenkins et al., 2005). Interestingly, over-expression of a GFP-fused UHRF1 RING mutant that lacks ligase activity sensitizes cells to treatment with several chemotherapeutic agents, such as etoposide, cis-platinium, hydroxyurea and taxol but did not induce any proliferation defects alone (Jenkins et al., 2005). Surprisingly, deleting the NIRF_N domain conducted to a decrease of the loss of cells in the presence of etoposide (Jenkins et al., 2005).

Regarding modulation of the chemosensitivity of cancer cells, we observed that *hUHRF1* expression was necessary for

dNTP depletion-induced ribonucleotide reductase M2 accumulation (Un et al., 2006). Furthermore, by using siRNA to downregulate *hUHRF1* expression, greater sensitivity to hydroxyurea was obtained in hydroxyurea-resistant cancer cells (Un et al., 2006). It was suggested that modulating *hUHRF1* expression could be an interesting strategy to reverse resistance to hydroxyurea cytotoxicity. A synergistic therapy employing dual drugs, one inhibiting hUHRF1 and the other being hydroxyurea or other ribonucleotide reductase inhibiting drugs, could be envisioned to counter hydroxyurea resistance (Un et al., 2006).

The mechanism by which down-regulation of *hUHRF1* or *mUHRF1* increases chemosensitivity is unknown but some hypotheses can be proposed. Since hUHRF1 has been shown to down-regulate the *RB1* gene (Jeanblanc et al., 2005) and to interact with the promoter of several tumor-suppressor genes among which $p16^{INK4A}$, $p14^{ARF}$ and $RAR\beta$ (Unoki et al., 2004), the increased chemosensitivity may be due to an up-regulation of tumor-suppressor genes thus promoting apoptosis-induced pathways.

hUHRF1 or *mUHRF1* down-regulation leads to growth arrest of numerous cancer cell lines (Bonapace et al., 2002; Arima et al., 2004; Jenkins et al., 2005). However, surprisingly $UHRF1^{-/-}$ mouse ES cells exhibit no differences in general proliferation rate when compared with wild type ES cells (Muto et al., 2002), suggesting that noncancerous cells (at least ES cells) are not sensitive to down-regulation of *UHRF1* gene expression. If this is correct for all noncancerous cells, then this would indicate that *UHRF1* targeting is an excellent strategy to find selective anticancer drugs considering that they would specifically target cancer cells. Clearly, this requires further investigations.

The reasons why *UHRF1* expression is indispensable for cancer cell growth but not for ES cell proliferation, remains unknown. Some explanations might reside in the fact that other members of the UHRF family, e.g., mUHRF3, can compensate the lack of *UHRF1* during early development and therefore may not be critical for cell proliferation at this stage. In contrast, in more differentiated cells, *UHRF1* appears to be indispensable to maintain the right epigenetic code, especially in cancer cells, in which tumor-suppressor genes are usually repressed. However, Muto and collaborators (2002) observed, in *UHRF1^{-/-}* mouse ES cells, increased sister chromatid exchanges, that is in accordance with its role in heterochromatin replication (Papait et al., 2007).

It would be interesting to find a specific inhibitor of *UHRF1* that allows inhibition of cancer cell growth without hindering *UHRF1* to exert its genome stability role in non cancer cells. One possibility is to inhibit the E3 ligase activity of the RING finger that, to our knowledge, so far has not yet been involved in heterochromatin replication for proper genome stability. In this scheme, the ideal small molecule would let the SRA domain to recruit HDAC1 to deacetylate histones at the pericentromeric heterochromatin but would hinder the RING finger to allow cell proliferation of cancer cells.

Targeting the *UHRF2* gene product could also be interesting but the strategy would suppose to enhance its expression and/or activity since it rather behaves as a tumor suppressor gene (see above). However, no loss of *UHRF2* functions have been reported so far in cancer cells, but it is a likely possibility since it is present in high amounts in various cancer cell lines (Mori et al., 2002). Such point of view would then be consistent with the suggestion of Chen and co-workers (2006) that E3 ligases with tumor suppressor function could be promising targets for small-molecule activators.

Whatever the most interesting target maybe, the challenge is to discover small molecule drugs that selectively activate or inhibit the UHRF members. Emerging technologies, such as bioinformatics, high-throughput screening, structure-based drug design, and virtual library screening, will enhance the future UHRF-based drug discovery. There are 2 methodologies for high throughput screening for small molecular weight chemical inhibitors of E3 ligases. These 2 techniques are ECL-based high throughput screening assay and fluorescence resonance energy transfer (FRET). A future promising strategy also appears now to be dsRNA that allows activation of gene via loss of methylation at lysine 9 of histone H3 (Li et al., 2006). Considering that hUHRF1 may participate in a complex putatively regulating the methylation of this amino acid residue, targeting hUHRF1 expression and or activity may putatively allow gene re-expression, among which most likely are tumor-suppressor genes.

9. Conclusion

The present review exposes the actual knowledge of the UHRF family and proposes for the first time novel features and functions for its members. This family, although it is probably a subset of the E3 ligases family, is unique in that it appeared with vertebrates and within this class is the sole family that possesses the SRA domain. This domain interacts with actors of the epigenetic code, including HDAC1, Dnmt1 and methylated CpG, thus linking histone ubiquitination, deacetylation and DNA methylation. UHRF members appear to be localized in huge macromolecular complexes involved in the epigenetic code repair and/or inheritance. Altered expression of UHRF members affects tumor suppressor gene expression and hence represents highly interesting targets for the future development of new anticancer drugs designed to favor re-expression of tumor suppressor genes, such as *RB1*, $p16^{INK4A}$ or $p14^{ARF}$.

Acknowledgments

Studies concerning hUHRF1 (ICBP90) have been supported by grants of the Ligue contre le Cancer, Comité du Haut-Rhin, France. Mayada Achour is a fellow from the Syrian High Education Ministry. Christian Bronner is Chargé de Recherches at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

References

- Anderson, K. C. (2007). Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Exp Hematol* 35, 155–162.
- Arima, Y., Hirota, T., Bronner, C., Mousli, M., Fujiwara, T., Niwa, S., et al. (2004). Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G₁/S transition. *Genes Cells 9*, 131–142.

- Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci 59*, 241–257.
- Bachman, K. E., Park, B. H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J. G., Baylin, S. B., et al. (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 3, 89–95.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., et al. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature 410*, 120–124.
- Baumbusch, L. O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., et al. (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res 29*, 4319–4333.
- Bonapace, I. M., Latella, L., Papait, R., Nicassio, F., Sacco, A., Muto, M., et al. (2002). Np95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of terminally differentiated cells and is essential for S phase entry. *J Cell Biol 157*, 909–914.
- Brady, M. E., Ozanne, D. M., Gaughan, L., Waite, I., Cook, S., Neal, D. E., et al. (1999). Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* 274, 17599–17604.
- Bronner, C., Hopfner, R., & Mousli, M. (2002). Transcriptional regulation of the topoisomerase IIalpha gene. *Anticancer Res* 22, 605–612.
- Bronner, C., Trotzier, M. A., Filhol, O., Cochet, C., Rochette-Egly, C., Scholler-Guinard, M., et al. (2004). The antiapoptotic protein ICBP90 is a target for protein kinase 2. Ann N Y Acad Sci 1030, 355–360.
- Bronner, C., Chataigneau, T., & Schini-Kerth, V. B. (2007). Chapter III. Epigenetic control of gene transcription. In A. Giordano (Ed.), *From the control of cell growth to cancer* Chichester: Wiley and Sons publisher.
- Buffart, T. E., Carvalho, B., Hopmans, E., Brehm, V., Kranenbarg, E. K., Schaaij-Visser, T. B., et al. (2007). Gastric cancers in young and elderly patients show different genomic profiles. *J Pathol* 211, 45–51.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103–107.
- Chan, H. M., Smith, L., & La Thangue, N. B. (2001). Role of LXCXE motifdependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Onco*gene 20, 6152–6163.
- Chauhan, D., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2006). A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. Br J Cancer 95, 961–965.
- Chen, A., Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T., & Pan, Z. Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. J Biol Chem 277, 22085–22092.
- Chen, C., Seth, A. K., & Aplin, A. E. (2006). Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Mol Cancer Res* 4, 695–707.
- Chen, I. T., Smith, M. L., O'Connor, P. M., & Fornace, A. J., Jr. (1995). Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene 11*, 1931–1937.
- Chowdhury, I. H., Wang, X. F., Landau, N. R., Robb, M. L., Polonis, V. R., Birx, D. L., et al. (2003). HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G₂/M cell cycle arrest. *Virology* 305, 371–377.
- Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., et al. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 24, 2526–2535.
- Cress, W. D., & Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. J Cell Physiol 184, 1–16.
- Crnogorac-Jurcevic, T., Gangeswaran, R., Bhakta, V., Capurso, G., Lattimore, S., Akada, M., et al. (2005). Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 129, 1454–1463.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science 298*, 2157–2167.
- Dugas, J. C., Tai, Y. C., Speed, T. P., Ngai, J., & Barres, B. A. (2006). Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci 26*, 10967–10983.
- Ezhkova, E., & Tansey, W. P. (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell 13*, 435–442.
- Fan, S., Yuan, R., Ma, Y. X., Xiong, J., Meng, Q., Erdos, M., et al. (2001). Disruption of BRCA1 LXCXE motif alters BRCA1 functional activity and regulation of RB family but not RB protein binding. *Oncogene 20*, 4827–4841.

- Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E., & Zhang, Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* 279, 52812–52815.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., et al. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 8, 188–194.
- Fujimori, A., Matsuda, Y., Takemoto, Y., Hashimoto, Y., Kubo, E., Araki, R., et al. (1998). Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation. *Mamm Genome 12*, 1032–1035.
- Gius, D., Bradbury, C. M., Sun, L., Awwad, R. T., Huang, L., Smart, D. D., et al. (2005). The epigenome as a molecular marker and target. *Cancer 104*, 1789–1793.
- Glinsky, G. V., Berezovska, O., & Glinskii, A. B. (2005). Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. J Clin Invest 115, 1503–1521.
- Gong, T. W., Karolyi, I. J., Macdonald, J., Beyer, L., Raphael, Y., Kohrman, D. C., et al. (2006). Age-related changes in cochlear gene expression in normal and shaker 2 mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 7, 317–328.
- Gross, J. M., Perkins, B. D., Amsterdam, A., Egana, A., Darland, T., Matsui, J.I., Sciascia, S., et al. (2005). Identification of zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function. *Genetics* 170, 245–261.
- Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821–1828.
- Heir, R., Ablasou, C., Dumontier, E., Elliott, M., Fagotto-Kaufmann, C., & Bedford, F. K. (2006). The UBL domain of PLIC-1 regulates aggresome formation. *EMBO Rep* 7, 1252–1258.
- Hopfner, R., Mousli, M., Garnier, J. M., Redon, R., du Manoir, S., Chatton, B., et al. (2001). Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of the topoisomerase IIα gene expression. *Gene 266*, 15–23.
- Hopfner, R., Mousli, M., Jeltsch, J. M., Voulgaris, A., Lutz, Y., Marin, C., et al. (2000). ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIα expression. *Cancer Res 60*, 121–128.
- Hopfner, R., Mousli, M., Oudet, P., & Bronner, C. (2002). Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase IIα expression. *Anticancer Res* 22, 3165–3170.
 Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333–346.
- Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, C., et al. (2002). PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* 7, 997–1007.
- Inaba, K., Padma, P., Satouh, Y., Shin-I, T., Kohara, Y., Satoh, N., et al. (2002). ST analysis of gene expression in testis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod Dev* 62, 431–445.
- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L. G., Masucci, M., et al. (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med* 10, 1321–1328.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., et al. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J 21*, 6236–6245.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet 33*, 245–254.
- Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., Abbady, A.Q., et al. (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G₁/S transition during the cell cycle. Oncogene 24, 7337–7345.
- Jenkins, Y., Markovtsov, V., Lang, W., Sharma, P., Pearsall, D., Warner, J., et al. (2005). Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell* 16, 5621–5629.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science 293*, 1074–1080.
- Joazeiro, C. A., & Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell 102*, 549–552.
- Jones, P. A. (1985). Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation. *Pharmacol Ther 28*, 17–27.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415–428.

- Kerscher, O., Felberbaum, R., & Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159–180.
- Kinross, K. M., Clark, A. J., Iazzolino, R. M., & Humbert, P. O. (2006). E2f4 regulates fetal erythropoiesis through the promotion of cellular proliferation. *Blood 108*, 886–895.
- Klose, R. J., & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89–97.
- Lachner, M., & Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. Curr Opin Cell Biol 14, 286–298.
- Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer 3*, 253–266.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662–673.
- Li, L. C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., Urakami, S., et al. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 103*, 17337–17342.
- Li, Y., Mori, T., Hata, H., Homma, Y., & Kochi, H. (2004). NIRF induces G₁ arrest and associates with Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun 319*, 464–468.
- Locker, J., Tian, J., Carver, R., Concas, D., Cossu, C., Ledda-Columbano, G. M., et al. (2003). A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology* 38, 314–325.
- Lorenzato, M., Caudroy, S., Bronner, C., Evrard, G., Simon, M., Durlach, A., et al. (2005). Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol 36*, 1101–1107.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., & Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A 96*, 11364–11369.
- Luo, Y., Hurwitz, J., & Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159–161.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., & Chen, J. (2005). BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 589–593.
- Macaluso, M., Cinti, C., Russo, G., Russo, A., & Giordano, A. (2003). pRb2/ p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene* 22, 3511–3517.
- Mallery, D. L., Vandenberg, C. J., & Hiom, K. (2002). Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J 21*, 6755–6762.
- McGarrity, T. J., & Amos, C. (2006). Peutz-Jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. *Cell Mol Life Sci 63*, 2135–2144.
- Mellor, J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. Cell 126, 22-24.
- Mikkers, H., & Berns, A. (2003). Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways. Adv Cancer Res 88, 53–99.
- Miura, M., Watanabe, H., Sasaki, T., Tatsumi, K., & Muto, M. (2001). Dynamic changes in subnuclear NP95 location during the cell cycle and its spatial relationship with DNA replication foci. *Exp Cell Res 263*, 202–208.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237–1245.
- Momparler, R. L. (2003). Cancer epigenetics. Oncogene 22, 6479-6483.
- Mori, T., Li, Y., Hata, H., & Kochi, H. (2004). NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Lett* 557, 209–214.
- Mori, T., Li, Y., Hata, H., Ono, K., & Kochi, H. (2002). NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 530–536.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA 102*, 8905–8909.
- Mousli, M., Hopfner, R., Abbady, A. Q., Monte, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., et al. (2003). ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer 89*, 120–127.
- Muto, M., Fujimori, A., Nenoi, M., Daino, K., Matsuda, Y., Kuroiwa, A., et al. (2006). Isolation and Characterization of a Novel Human Radiosusceptibility Gene, NP95. *Radiat Res 166*, 723–733.
- Muto, M., Kanari, Y., Kubo, E., Takabe, T., Kurihara, T., Fujimori, A., et al. (2002). Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem

cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem* 277, 34549–34555.

- Muto, M., Utsuyama, M., Horiguchi, T., Kubo, E., Sado, T., & Hirokawa, K. (1995). The characterization of the monoclonal antibody Th-10a, specific for a nuclear protein appearing in the S phase of the cell cycle in normal thymocytes and its unregulated expression in lymphoma cell lines. *Cell Prolif* 28, 645–657.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmler, K., et al. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* 24, 1418–1429.
- Nicolas, E., Ait-Si-Ali, S., & Trouche, D. (2001). The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Res* 29, 3131–3136.
- Oba-Shinjo, S. M., Bengtson, M. H., Winnischofer, S. M., Colin, C., Vedoy, C.G., de Mendonca, Z., et al. (2005). Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Brain Res Mol Brain Res 140*, 25–33.
- Ogawa, K., Solt, D. B., & Farber, E. (1980). Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res* 40, 725–733.
- Papait, R., Pistore, C., Negri, D., Pecoraro, D., Cantarini, L., & Bonapace, I. M. (2007). Np95 Is Implicated in Pericentromeric Heterochromatin Replication and in Major Satellite Silencing. *Mol Biol Cell* 18, 1098–1106.
- Paull, T. T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S. J., & Gellert, M. (2001). Direct DNA binding by Brca1. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 6086–6091.
- Pena, P. V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K. L., Verkhusha, V. V., Gozani, O., et al. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING₂. *Nature* 442, 100–103.
- Pound, A. W., & McGuire, L. J. (1978). Repeated partial hepatectomy as a promoting stimulus for carcinogenic response of liver to nitrosamines in rats. *Br J Cancer 37*, 585–594.
- Qian, Y. W., Wang, Y. C., Hollingsworth, R., Jones, D., Ling, N., & Lee, E. A. (1993). A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* 364, 648–652.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci 21*, 267–271.
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 6, 597–610.
- Roccaro, A. M., Hideshima, T., Richardson, P. G., Russo, D., Ribatti, D., Vacca, A., et al. (2006). Bortezomib as an antitumor agent. *Curr Pharm Biotechnol* 7, 441–448.
- Sadler, K. C., Krahn, K. N., Gaur, N. A., & Ukomadu, C. (2007). Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrfl. *Proc Natl Acad Sci U S A 104*, 1570–1575.
- Sakai, A., Kikuchi, Y., Muroi, M., Masui, T., Furihata, C., Uchida, E., et al. (2003). Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol Pharm Bull 26*, 347–351.
- Schaaf, G. J., Ruijter, J. M., van Ruissen, F., Zwijnenburg, D. A., Waaijer, R., Valentijn, L. J., et al. (2005). Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries. *FASEB J* 19, 404–406.
- Shen, W. H. (2001). NtSET1, a member of a newly identified subgroup of plant SET-domain-containing proteins, is chromatin-associated and its ectopic overexpression inhibits tobacco plant growth. *Plant J 28*, 371–383.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G₁ cyclindependent kinases. *Genes Dev 9*, 1149–1163.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., et al. (2006). ING₂ PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96–99.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243–269.
- Starita, L. M., & Parvin, J. D. (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol 15*, 345–350.
- St-Arnaud, R., & Quelo, I. (1998). Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci 3*, D838–D848.

- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Sun, Y. (2003). Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. Cancer Biol Ther 2, 623–629.
- Sun, Y. (2006). E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia* 8, 645–654.
- Sun, Z. W., & Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104–108.
- Trotzier, M. A., Bronner, C., Bathami, K., Mathieu, E., Abbady, A. Q., Jeanblanc, M., et al. (2004). Phosphorylation of ICBP90 by protein kinase A enhances topoisomerase IIalpha expression. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 590–595.
- Uchida, C., Miwa, S., Isobe, T., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., et al. (2006). Effects of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. *FEBS Lett* 580, 1753–1758.
- Uemura, T., Kubo, E., Kanari, Y., Ikemura, T., Tatsumi, K., & Muto, M. (2000). Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells. *Cell Struct Funct 25*, 149–159.
- Un, F., Oi, C., Prosser, M., Wang, N., Zhou, B., Bronner, C., et al. (2006). Modulating ICBP90 to suppress human ribonucleotide reductase M2 induction restores sensitivity to hydroxyurea cytotoxicity. *Anticancer Res* 26, 2761–2767.
- Unoki, M., Nishidate, T., & Nakamura, Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23, 7601–7610.
- Varmus, H., Pao, W., Politi, K., Podsypanina, K., & Du, Y. C. (2005). Oncogenes come of age. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 70, 1–9.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Vazquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N. J., Swaim, W. D., Nares, S., Ott, D. E., et al. (2005). Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J Virol* 79, 4479–4491.
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., et al. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661–665.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574–578.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., et al. (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, Q. T., Piotrowska, K., Ciemerych, M. A., Milenkovic, L., Scott, M. P., Davis, R. W., et al. (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell 6*, 133–144.
- Wei, J., Zhai, L., Xu, J., & Wang, H. (2006). Role of Bmi1 in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *J Biol Chem* 281, 22537–22544.
- Wiltshire, T., Senft, J., Wang, Y., Konat, G. W., Wenger, S. L., Reed, E., et al. (2007). BRCA1 contributes to cell cycle arrest and chemoresistance in response to anticancer agent, irofulven. *Mol Pharmacol* 71, 1051–1060.
- Woo, H. R., Pontes, O., Pikaard, C. S., & Richards, E. J. (2007). VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev* 21, 267–277.
- Wu, Q., Kirschmeier, P., Hockenberry, T., Yang, T. Y., Brassard, D. L., Wang, L., et al. (2002). Transcriptional regulation during p21^{WAF1/CIP1}-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 277, 36329–36337.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86–90.
- Xie, Y., & Varshavsky, A. (2002). UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat Cell Biol 12*, 1003–1007.
- Yoshizuka, N., Yoshizuka-Chadani, Y., Krishnan, V., & Zeichner, S. L. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol* 79, 11366–11381.

PUBLICATION II

L'interaction du domaine SRA de l'UHRF1 avec un nouveau domaine de la DNMT1 est impliquée dans la régulation de l'expression du gène VEGF (Oncogene, 2008, 27 : 2187-2197)

L'UHRF1 (ICBP90) est surexprimée dans plusieurs lignées cancéreuses et contient dans sa structure le domaine SRA qui ne se trouve que dans la famille de l'UHRF. Pour chercher les protéines qui interagissent avec le domaine SRA de l'UHRF1, nous avons utilisé le système du double hybride. Nous avons isolé plusieurs clones codant à une séquence de 215 acides aminés qui montrent 100% d'homologie avec une séquence d'un nouveau domaine de la DNMT1 humaine que nous avons appelé le SRA-Binding Domaine (SRA-BD). L'interaction entre le domaine SRA de l'UHRF1 et le domaine SRA-BD de la DNMT1 a été confirmée par les expériences de GST-pull down. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que l'UHRF1, la DNMT1 et l'HDAC1 sont présentes dans les mêmes complexes dans les cellules Jurkat et les cellules musculaires lisses immortalisées (SMC1-HVT). Cela a été confirmé par immunocytochimie à l'aide d'expériences de co-localisation. Dans les cellules [«] knocked-down [»] pour l'UHRF1 (ou pour la DNMT1), nous avons observé une réactivation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs *RB1* et *p16^{INK4A}* et une diminution de l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

L'ensemble de ces résultats montre que le complexe UHRF1/DNMT1 est impliqué dans l'activation de l'expression du gène *VEGF*, par le biais de la répression de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs $p16^{INK4A}$ et *RB1*, probablement par une interaction du domaine SRA de l'UHRF1 avec un nouveau domaine de la DNMT1 (**Figure 19**). Ces résultats suggèrent un nouveau rôle de l'UHRF1 dans l'interconnexion entre l'ubiquitination, l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN dans le contexte de l'angiogénèse tumorale et la répression de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs.



Figure 19: Régulation des gènes suppresseurs de tumeurs et du gène *VEGF* par l'UHRF1. $p16^{INK4A}$ est un régulateur négatif de l'expression du gène *VEGF*, suggère que le complexe UHRF1/DNMT1 contrôle positivement l'expression du gène *VEGF* en réprimant l'expression du gène $p16^{INK4A}$.

www.nature.com/onc

The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of *VEGF* gene expression

M Achour¹, X Jacq², P Rondé¹, M Alhosin¹, C Charlot¹, T Chataigneau¹, M Jeanblanc¹, M Macaluso^{3,4}, A Giordano^{3,4}, AD Hughes⁵, VB Schini-Kerth¹ and C Bronner¹

¹Institut Gilbert-Laustriat, UMR 7175 CNRS/Université Louis Pasteur (Strasbourg I), Départment de Pharmacologie et Physicochimie, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France; ²Hybrigenics, 3-5 impasse Reille, Paris, France; ³Sbarro Institute of Cancer Research and Molecular Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, USA; ⁴Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Siena, Italy and ⁵Clinical Pharmacology, National Heart and Lung Institute, Imperial College of Science, Technology and Medicine, St Mary's Hospital, London, UK

Inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) is over-expressed in several types of cancer, including breast, prostate and lung cancers. In search for proteins that interact with the set and ring-associated (SRA) domain of ICBP90, we used the two-hybrid system and screened a placental cDNA library. Several clones coding for a new domain of DNMT1 were found. The interaction, between the ICBP90 SRA domain and the DNMT1 domain, has been confirmed with purified proteins by glutathione-Stransferase pull-down experiments. We checked whether ICBP90 and DNMT1 are present in the same macromolecular complexes in Jurkat cells and immortalized human vascular smooth muscle cells (HVTs-SM1). Coimmunoprecipitation experiments showed that ICBP90 and DNMT1 are present in the same molecular complex, which was further confirmed by co-localization experiments as assessed by immunocytochemistry. Downregulation of ICBP90 and DNMT1 decreased VEGF gene expression, a major pro-angiogenic factor, whereas those of p16^{INK4A} gene and RB1 gene were significantly enhanced. Together, these results indicate that DNMT1 and ICBP90 are involved in VEGF gene expression, possibly via an interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 and an upregulation of p16^{INK4A}. They further suggest a new role of ICBP90 in the relationship between histone ubiquitination and DNA methylation in the context of tumoral angiogenesis and tumour suppressor genes silencing.

Oncogene (2008) **27**, 2187–2197; doi:10.1038/sj.onc.1210855; published online 15 October 2007

Keywords: ICBP90; DNMT1; methylation; UHRF1; vascular endothelial growth factor; yeast two-hybrid system

E-mail: Christian.Bronner@pharma.u-strasbg.fr

Introduction

ICBP90 (inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa, gene symbol UHRF1) is overexpressed in several cancer cell lines and cancer tissues including breast cancers (Hopfner et al., 2000; Mousli et al., 2003; Unoki et al., 2004; Jenkins et al., 2005), cervical lesions (Lorenzato et al., 2005), rhabdomyosarcomas (Schaaf et al., 2005), pancreatic adenocarcinomas (Crnogorac-Jurcevic et al., 2005), prostate cancers (Jenkins et al., 2005) and gliomas (Oba-Shinjo et al., 2005). There are several lines of evidence that ICBP90 plays a role in tumorogenesis by deregulating the expression of genes involved in cancerogenesis. Among these genes, we can find topoisomerase IIa (Hopfner et al., 2000, 2002), RB1 (Jeanblanc et al., 2005) and putatively p16^{INK4A}, p14^{ARF} and $RAR\beta$ (Unoki et al., 2004). ICBP90 and its mouse orthologue Np95 are required for cell proliferation particularly for the G_1/S transition (Bonapace *et al.*, 2002; Arima et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005; Jenkins et al., 2005). Considering that ICBP90 interacts with the RB1 gene product (Jeanblanc et al., 2005) which cooperates with the heterochromatin protein 1 and the histone methylase SUV39H1 to repress the cyclin E promoter (Nielsen et al., 2001), ICBP90 is likely to play a role in gene silencing. Consistently with this, it has been shown that Np95 is involved in the pericentromeric heterochromatin replication (Papait et al., 2007), a region known to be silenced. Furthermore, ICBP90 appears to be involved in the regulation of epigenetic events occurring during embryonic development and also in cancerogenesis (Bronner et al., 2007; Macaluso et al., 2007). Consequently, one proposed function of ICBP90 is that it permanently represses tumour suppressor gene expression leading to loss of control of G_1/S transition and therefore contributes to the cancerogenesis phenomenon (Bronner et al., 2007). In addition, ICBP90 may also transiently repress tumour suppressor gene expression under physiological conditions (noncancerous) during the G_1/S transition, as shown during fibroblast cell proliferation (Jeanblanc et al., 2005).

The identification of ICBP90 partners would permit a significant breakthrough in the knowledge about its contribution to the cancerogenesis process. There are

Correspondence: Dr C Bronner, CNRS UMR 7175, Département de Pharmacologie et Pharmacochimie, 74 route du Rhin, BP 60024, Illkirch 67401, France.

Received 8 May 2007; revised 11 September 2007; accepted 19 September 2007; published online 15 October 2007

several domains in ICBP90 (Figure 1) that can bind putative partners. Indeed, ICBP90 contains an ubiquitinlike domain (NIRF_N), a SRA (set and ring-associated domain, also known as G9a or YDG domain) and two zinc finger domains, a plant homeo domain (PHD) and a really interesting new gene (RING) domain, both of which are hallmarks of E3 ligases (Ingham *et al.*, 2004; Ohta and Fukuda, 2004). The RING finger of ICBP90 exhibits E3 ligase activity (Jenkins *et al.*, 2005) as does that of the mouse ICBP90 orthologue, Np95 (Citterio *et al.*, 2004).

To elucidate the role of ICBP90, we hypothesized that one of the key roles must rely on the SRA domain since in vertebrates only the UHRF family members contain such a domain (Bronner *et al.*, 2007). The SRA domain is a 150–170 amino acid long domain characterized by the conservation of up to 13 evenly spaced glycine residues and a VRV(I/V)RG motif (Baumbusch *et al.*, 2001). In the ICBP90 amino acid sequence this motif is VRVVRN and corresponds to amino acids 533–538. This domain is also known as the YDG domain because it contains a conserved YDG motif. The SRA domain of ICBP90 shows affinity for methylated CpG and HDAC1 (Unoki *et al.*, 2004). It has been proposed that

ICBP90



Figure 1 Structural organization of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) and DNMT1. The lengths of the ubiquitin-like domain (NIRF N), the plant homeo domain (PHD) finger domain (C4HC3-type), the set and ring-associated (SRA) and the really interesting new gene (RING) finger (C3HC4-type) of ICBP90 are delimited by numerals corresponding to the positions of the amino acids. The bait protein of ICBP90, used for the twohybrid system, extends from amino acid 356 to 635 and comprises the SRA domain. The domains of DNMT1 are delimited by numerals and correspond to the positions of the amino acids (GenBank accession number P26358). The yeast two-hybrid preys are represented by black bars beneath the schematic representation of DNMT1 and the attached numerals correspond to the shortest amino acid sequences found in all preys. DMAP-1, DNMT1associated protein 1; RFTS, replication foci targeting sequence; BAH, bromo-associated homology; SRA-BD, SRA binding domain

Oncogene

this domain directs a number of heterogeneous proteins to the chromatin (Citterio *et al.*, 2004).

In searching for proteins interacting with the SRA domain of ICBP90, we used the two-hybrid system and a bait domain encompassing the SRA domain from amino acids 356-635. Interestingly, among the preys we found several clones that have in common a sequence of 215 amino acids, which showed 100% homology with the amino acid sequence of human DNMT1 extending from amino acids 401-615. DNMT1, a 1616 amino acid long protein, is the most abundant DNA methyltransferase. In somatic cells, it has a preference for hemimethylated DNA and by this way is believed to be the main enzyme responsible for copying and maintaining methylation patterns from the parental to the daughter strand after DNA replication (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). We named the domain of DNMT1 interacting with ICBP90, the 'SRA-binding domain' (SRA-BD).

It has been shown that the tumour suppressor gene p53 negatively regulates ICBP90 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression (Mukhopadhyay *et al.*, 1995; Arima *et al.*, 2004) and that the $p16^{INK4A}$ gene, whose promoter is targeted by DNMT1 and ICBP90 (Suzuki *et al.*, 2004; Unoki *et al.*, 2004), is a negative regulator of the *VEGF* gene expression (Miki *et al.*, 2001). Consequently, one of the goals of the present study was also to check whether both DNMT1 and ICBP90 could be involved in *VEGF* gene expression.

Results

Identification of a novel domain in DNMT1 that interacts with ICBP90

In order to identify proteins that interact with ICBP90 in the yeast two-hybrid system, we screened a human placenta library using a fragment encompassing the SRA domain of ICBP90 (that is, amino acids 356-635; Figure 1 and 'Materials and methods'). We identified 154 clones by histidine nutritional selection and β -galactosidase (β -gal) activity. The inserts from the isolated clones were sequenced, leading to the identification of 11 overlapping clones that encode a region of a protein named DNMT1 for DNA methyltransferase 1. The overlapping sequences of the yeast two-hybrid DNMT1 preys encompass a peptide that extends between residues 401-615 of human DNMT1. DNMT1 contains several domains (Figure 1) among them the Replication Foci Targeting Sequence (RFTS) was the closest to the preys since it overlaps the 55 first amino acids of the overlapping peptides.

We have confirmed the interaction of the SRA domain of ICBP90 with DNMT1 by glutathione-S-transferase (GST) pull-down assays. For this, we have produced the 401–615 polypeptide of DNMT1 fused to GST (GST-SRA-BD, 48 kDa) and the polypeptide AA 400 to AA 660 of ICBP90 encompassing the SRA domain (SRA, 29 kDa). Figure 2 shows that the SRA domain was pulled down in the presence of GST-SRA-BD but not with GST alone. These results show that purified SRA



Figure 2 Glutathione-S-transferase (GST) pull-down assays were performed with purified GST or with the GST-SRA binding domain (GST-SRA-BD; AA 401 to AA 615) and with the set and ring-associated (SRA) domain of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90; AA 400 to AA 660). All proteins were incubated overnight at 4° C at a final concentration of 0.5 μ M. Staining of proteins has been realized with coomassie blue. Results are representative of three separate experiments.

interacts with GST-SRA-BD but not with GST alone and demonstrate that the interaction of the two proteins is specific. Altogether, these results suggest that DNMT1 is a likely candidate to fulfil the requirements of an ICBP90 partner. The following experiments were carried out to check whether ICBP90 and DNMT1 will cooperate *in vivo* in a same macro-molecular complex to regulate *VEGF* gene expression.

ICBP90 and DNMT1 co-immunoprecipitate

Further experiments were carried out on Jurkat cells, leukaemic T lymphocytes, and conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells (HVTs-SM1) (Hsieh et al., 2000) to demonstrate that ICBP90 colocalises with DNMT1. Jurkat cells were selected due to the fact that ICBP90 was first isolated via a Jurkat cDNA library screen in the one-hybrid system and that they have a high ICBP90 expression level (Hopfner et al., 2000; Jeanblanc et al., 2005). The HVTs-SM1 cells were used as a vascular smooth muscle model since immortalized cells can be produced in large amounts and exhibit a uniform cell phenotype. Vascular smooth muscle cells are of particular interest as they are the most important source of VEGF from non-cancerous cells (Oak et al., 2005). Furthermore, HVTs-SM1 have inactivated p53 (Hsieh et al., 2000), thus allowing higher expression of ICBP90 since p53 is a negative regulator of ICBP90 (Arima et al., 2004).

Figure 3 shows the expression patterns of DNMT1, ICBP90 and HDAC1 in proliferating and confluent Jurkat cells before and after immunoprecipitation with anti-ICBP90 or anti-HDAC1 or anti-DNMT1 or with control antibodies (mouse IgG or anti-Ki67). Jurkat cells were treated with mimosine to block cells in late G_1 and prevent entry into S phase (Mousli *et al.*, 2003; Jeanblanc *et al.*, 2005). DNMT1 shows higher expression in proliferating or mimosine-treated Jurkat cells than in confluent Jurkat cells (Figure 3a). ICBP90 expression

ICBP90 interacts with DNMT1 and regulates VEGF expression M Achour et al



Figure 3 Co-immunoprecipitation of inverted CCAAT boxbinding protein of 90 kDa (ICBP90), DNMT1 and HDAC1 in Jurkat cells. (a) Immunoprecipitations were performed on whole Jurkat cell extracts with 10 µg ml⁻¹ of anti-ICBP90 or mouse IgG followed by immunoblotting. Immunoblot analysis was performed with $2\mu g m l^{-1}$ of anti-DNMT1, with $0.2 \mu g m l^{-1}$ of anti-ICBP90, with $0.25 \,\mu g \,ml^{-1}$ of anti-HDAC1, or with of anti- β -tubulin (1:25 000). The cells were harvested under proliferating conditions (P) or after 24 h of confluence (C). As input, 20 µg of protein before immunoprecipitation were deposited. (M) indicates proliferating Jurkat cells treated with L-mimosine $(100 \,\mu g \,m l^{-1})$ for 20 h. (b) Immunoprecipitations were performed on whole proliferating Jurkat cell extracts without immunoprecipitating antibody (without Ab), or 5µg of anti-HDAC1, or 10µg of anti-DNMT1 or with 10 µg of anti-Ki-67 followed by immunoblotting. Immunoblot analysis was performed as described in 'Materials and methods'. Results are representative of three separate experiments.

was quite similar in proliferating and in confluent Jurkat cells but was slightly more pronounced in mimosinetreated cells. HDAC1 was slightly increased in mimosine-treated Jurkat cells. Immunoprecipitation with the anti-ICBP90 mAb (Figure 3a) or anti-HDAC1 or with anti-DNMT1 (Figure 3b) showed bands for DNMT1, ICBP90 and HDAC1 in all experimental conditions, with the highest amount found in mimosine-treated cells (Figure 3a). Negative controls were performed in the absence of precipitating antibody or with mouse IgG or with anti-Ki-67 that also detects a nuclear protein. In these conditions, no bands were observed for ICBP90, DNMT1 and HDAC1 (Figure 3a and b). These results suggest that, in Jurkat cells, ICBP90 is present in the same molecular complexes as DNMT1 and HDAC1. 2189



Figure 4 Co-immunoprecipitation of inverted CCAAT boxbinding protein of 90 kDa (ICBP90), DNMT1 and HDAC1 in human vascular smooth muscle cells HVTs-SM1. (a) Western blotting and immunoprecipitations were performed with whole proliferating (P) or mimosine-treated (M) HVTs-SM1 cell extracts as described in the legend of Figure 3. As input, 20 μ g of protein before immunoprecipitation were deposited. (b) Immunoprecipitations and immunoblot analysis were performed as described in legend of Figure 3 and were carried out with proliferating cells. Results are representative of two separate experiments.

In HVTs-SM1, similar results were observed (Figure 4). Indeed, DNMT1 and HDAC1 were present in immunoprecipitates obtained with anti-ICBP90 mAb, with higher amounts found in mimosine-treated cells (Figure 4a). Conversely, ICBP90, DNMT1 and HDAC1 were found co-immunoprecipitated by anti-HDAC1 and anti-DNMT1 Abs (Figure 4b). As for the Jurkat cells, no bands were found for all negative controls. Considering the mimosine blocks cells in late G_1 by enhancing levels of p27 (Kip1); (Wang *et al.*, 2000), our results prove that DNMT1 and ICBP90 are already partners before entering into the S phase and suggest that their interaction is a prerequisite for such entry.

The presence of HDAC1 and ICBP90 and of ICBP90 and DNMT1 in the same macro-molecular complexes was confirmed in non-transformed primary human vascular smooth muscle cells (VSMCs) and human lung fibroblasts. Indeed, when using the anti-ICBP90 mAb as the precipitating antibody, DNMT1 and HDAC1 were found to be co-immunoprecipitated in proliferating VSMCs but not in confluent cells as a consequence of the lack of ICBP90 expression at confluency (Supplementary Figure

Oncogene

2190

S1B). When using the anti-DNMT1 mAb, ICBP90 and HDAC1 were co-immunoprecipitated in proliferating VSMCs (Supplementary Figure S1C). The anti-Ki-67 mAb did not co-immunoprecipitate ICBP90 or HDAC1 or DNMT1 in VSMCs (Supplementary Figure S1A).

The presence of DNMT1 and ICBP90 in the same complex was further confirmed in normal human lung fibroblasts but only while proliferating (Supplementary Figure S2). ICBP90 and DNMT1 showed weak expression in fibroblasts at confluence, whereas they appeared in large amounts during proliferation. Using the anti-DNMT1 mAb as the precipitating Ab, ICBP90 was found in the pellets of proliferating fibroblasts (Supplementary Figure S2). Altogether, these results suggest that the interaction of these two proteins is a crucial event during cell proliferation.

Immunocytochemistry was carried out on Jurkat cells (Figure 5) and HVTs-SM1 cells (Figure 6). Control labelling was performed in the absence of either the polyclonal anti-DNMT1 or the primary monoclonal anti-ICBP90. No labelling was detected for each negative control in either Jurkat cells or HVTs-SM1 (data not shown). In Jurkat cells, ICBP90 (Figure 5a) was localized in the entire nucleoplasm with DNMT1 showing a similar distribution (Figure 5b). The merged picture (Figure 5c) showed that ICBP90 and DNMT1 were in general colocalized in discrete regions in the nucleus, and that the interaction between ICBP90 and DNMT1 is a highly frequent event. The labelling with both antibodies was restricted to the nucleus as assessed by phase contrast analysis. As a positive control, we confirmed that ICBP90 and HDAC1 are also co-localized in Jurkat cells (data not shown). In HVTs-SM1 cells, ICBP90 (Figure 6a) and DNMT1 (Figure 6b) were also co-localized in the entire nucleoplasm (Figure 6c). The labelling was restricted to the nucleus. The less labelled areas correspond to the nucleolus.

The ICBP90/DNMT1 complex is involved in the regulation of the VEGF gene expression in Jurkat cells and HVTs-SM1

To investigate the role of the ICBP90/DNMT1 interaction and in order to show whether the ICBP90/DNMT1 complex could be involved in transcriptional regulatory pathways of the VEGF gene, we studied the effect of acute knockdown of ICBP90 and DNMT1 by using RNA interference (RNAi) in Jurkat and HVTs-SM1 cells. Transfection of Jurkat cells with small interfering RNAs (siRNA) specific for ICBP90 (ICBP90-408 siRNA, ICBP90-990 siRNA or the combination of ICBP90-408 siRNA and ICBP90-990 siRNA), but not with scramble siRNA, resulted in a large reduction in levels of ICBP90 protein (Figure 7a). The knockdown of ICBP90 was accompanied by a downregulation of VEGF and DNMT1 expression in association with an upregulation of pRB and p16^{INK4A} (Figure 7a). We further examined whether the VEGF gene expression is also dependent upon the DNMT1 expression. Transfection of Jurkat cells with siRNA specific for DNMT1 (DNMT1-517 siRNA), but not with the scramble siRNA, resulted in an

ICBP90 interacts with DNMT1 and regulates VEGF expression M Achour et al



Figure 5 Co-localization of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) and DNMT1 in Jurkat cells. Immunocytochemistry was performed with anti-ICBP90 ($2 \mu g m l^{-1}$) and anti-DNMT1 ($2 \mu g m l^{-1}$) and revealed with secondary Abs coupled to Alexa488 (green) and Phycoerythrin (red), respectively. Images are representative of five separate experiments. Scale bar: $10 \mu m$.



Figure 6 Co-localization of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) and DNMT1 in HVTs-SM1 cells. Immunocytochemistry was performed with anti-ICBP90 ($2 \mu g m l^{-1}$) and anti-DNMT1 ($2 \mu g m l^{-1}$) and revealed with secondary Abs coupled to Alexa488 (green) and Phycoerythrin (red), respectively. Images are representative of four separate experiments. Scale bar: 10 µm.

efficient inhibition of DNMT1 expression (Figure 7a). The DNMT1-517 siRNA provoked a significant diminution of VEGF and ICBP90 expression (Figure 7a) concomitantly with an increase in pRB and p16^{INK4A} expression. All these results have been confirmed by analysing the mRNA expression of *ICBP90*, *DNMT1*, *VEGF*, *pRB* and *p16^{INK4A}* (Figure 7b). The data show that the variation,that is increase or decrease of expression, are due to changes in the mRNA amounts of each gene

which can result from effects on the transcription or on the mRNA stability.

In HVTs-SM1 cells, the use of the same siRNAs to knockdown ICBP90, also led to a strong VEGF expression inhibition but had no effect on either HDAC1 or DNMT1 expressions (Figure 8a). As in Jurkat cells, the ICBP90 knockdown was accompanied by an increase in pRB and p16^{INK4A} expressions. DNMT1-517 siRNA caused a dramatic decrease in VEGF and ICBP90 expressions accompanied by increases in pRB and p16^{INK4A} expressions (Figure 8a). These results have also been confirmed by analysing the mRNA expression of ICBP90, DNMTI, VEGF, pRB and p16^{INK4A} (Figure 8b) showing that the variations in proteins are a consequence of mRNA changes. Together, these results suggest that ICBP90 and DNMT1 are involved in the expression of the VEGF gene in Jurkat cells as well as in HVTs-SM1 cells.

Discussion

In order to find putative partners of ICBP90, we screened a placenta cDNA library using the double hybrid system to search for proteins able to interact with the SRA domain of ICBP90. Among the preys, we isolated several clones that all encompass a common polypeptide sequence extending from amino acid 401–615 of the human DNMT1. This sequence partially overlaps the RFTS domain (Leonhardt *et al.*, 1992) that extends from amino acid 207 to 455 (Figure 1). It nevertheless seems unlikely that the 55 overlapping amino acids are sufficient for interaction with the SRA domain of ICBP90, since all preys extended at least to amino acid 615 that were largely over the end of the RFTS of DNMT1. This 55 amino acid polypeptide may

ICBP90 interacts with DNMT1 and regulates VEGF expression M Achour et al



Figure 7 Effect of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) and DNMT1 knockdown on the expression of pRB, VEGF, DNMT1, HDAC1 and $p16^{1NK4A}$ protein and mRNA levels in Jurkat cells. (a) Control Jurkat cells were handled as for the transfected cells but without Lipofectamine or small interfering RNA (siRNA). Cells were transfected (three times at 0, 24 and 48 h) for 72 h with 100 pmol of the ICBP90 scramble siRNA, or ICBP90-408 siRNA, or ICBP90-900 siRNA, or the combination of ICBP90-408 siRNA and ICBP90-990 siRNA (100 pmol, ratio 1:1), or the scramble siRNA of DNMT1 or with the DNMT1 siRNA followed by immunoblotting. Immunoblot analysis was performed as described in 'Materials and methods'. Results are representative of three separate experiments. (b) The histograms show the quantification data of mRNA expressions of *DNMT1*, *ICBP90*, *VEGF*, *pRB* and *p16*^{1/NK44}, as assessed by real-time PCR. Results are means of three separate experiments performed in triplicate.

however bind to the SRA domain but may not be sufficient to confer maximal affinity of the SRA-BD for the ICBP90 SRA domain. Consequently, we propose that DNMT1 contains a new domain, called SRA-BD, for set and ring-associated binding domain. In mouse, it has been very recently reported that it is the PHD of

2192



Figure 8 Effect of inverted CCAAT box-binding protein of 90 kDa (ICBP90) and DNMT1 downregulation on the expression of pRB, VEGF, DNMT1, HDAC1 and $p16^{INK4A}$ protein and mRNA levels in HVTs-SM1 cells. (a) Experimental conditions are those described in the legend of Figure 7. Western blot analysis was performed as described in the legend of Figure 7 and are representative of three separate experiments. (b) The histograms show the quantification data of mRNA expressions of *DNMT1, ICBP90, VEGF, pRB* and $p16^{INK4A}$, as assessed by real-time PCR. Results are means of two separate experiments performed in triplicate.

Np95 that is interacting with a DNMT1 domain located between AA 1081 and AA 1408 and another located between AA 1 and AA 446 (Bostick *et al.*, 2007). The interaction between the SRA domain of ICBP90 and the SRA-BD of DNMT1 has been demonstrated in our study by two different techniques, but we cannot exclude that other parts of the two proteins may also interact. Nevertheless, it appears that the interactions are different in mouse compared to human.

The importance of the SRA domain for DNA methylation has already been reported, but so far only in plants. Indeed, in *Arabidopsis thaliana*, the SRA

ICBP90 interacts with DNMT1 and regulates VEGF expression M Achour *et al*

2193

domain of histone methyltransferases is involved in directing DNA methylation to the target sequences (Naumann et al., 2005). It was shown that such DNA methylation is a pre-requisite for consecutive SUVH2 (a histone methyltransferase)-dependent histones H3 and H4 methylation to establish heterochromatin formation (Naumann et al., 2005). Consistently with this and our results, it has been shown very recently that the mouse SRA domain has a sevenfold higher affinity for hemimethylated DNA than for fully methylated DNA (Bostick et al., 2007). Furthermore, we have proposed that ICBP90 helps to tether DNMT1 to chromatin (Macaluso et al., 2007). The SRA domain of ICBP90 has been previously shown to interact with HDAC1 and histones (Citterio et al., 2004; Unoki et al., 2004). In accordance with this, it has been observed that Np95 (the mouse orthologue of ICBP90) plays a crucial role during heterochromatin replication by involving deacetylation of histones (Papait et al., 2007). HDAC1 is also known to associate with DNMT1 (Fuks et al., 2000; Robertson et al., 2000; Macaluso et al., 2003). It is thus likely that the SRA domain of ICBP90 binds at the same time HDAC1 and DNMT1. Considering that Np95 has ubiquitinating activity towards histones H3, H2A and H2B (Citterio et al., 2004), such interaction may link histone ubiquitination, histone deacetylation and DNA methylation. Therefore, we hypothesize that heterochromatin replication requires the ICBP90/DNMT1 couple and that this complex induces mono-ubiquitination, methylation and deacetylation of histories and DNA methylation. Expression of DNMT1 is required for entry into the S phase and/or during its progression (Milutinovic et al., 2003; Chen et al., 2006). This is in accordance with the demonstration that the interaction of DNMT1 with ICBP90 precedes S phase entry (present study).

In the present study, we report that the presence of ICBP90 and DNMT1 are essential for VEGF expression in Jurkat cells and in HVTs-SM1. Consequently, our results suggest that VEGF gene expression may require cells to enter the S phase and that this leads to production of transcription factors that induce transcription of the VEGF gene. This is in accordance with the p53 dependence of VEGF gene expression and the role of p53 in regulation of S phase entry (Levine, 1997). Indeed, it has been previously shown that wild-type p53 downregulates endogenous levels of VEGF mRNA, as well as VEGF promoter activity, in a dose-dependent manner, whereas mutant forms of p53 had no effect (Mukhopadhyay et al., 1995). These data suggest that wildtype p53 may play a role in suppressing angiogenesis. Interestingly, the fact that p53 is a negative regulator of ICBP90 expression (Arima et al., 2004) and that the VEGF gene promoter lacks any p53 binding site (Salimath et al., 2000) suggest that the role of p53 in angiogenesis can be mediated via a downregulation of ICBP90, thereby hindering the formation of the ICBP90/DNMT1 complex and preventing entry into S phase.

We have previously shown that ICBP90 associates with pRB and is a downregulator of the *RB1* gene (Jeanblanc

et al., 2005). We hypothesized that the widely demonstrated anti-angiogenic properties of pRB (Gabellini et al., 2006) is due to downregulation of the VEGF gene expression. When we used siRNAs to downregulate ICBP90 and DNMT1 expressions, we observed that pRB expression was increased in Jurkat cells and HVTs-SM1. Nevertheless, since HVTs-SM1 have inactivated pRB, due to the interaction with large T antigen (Caracciolo et al., 2006; Giacinti and Giordano, 2006), a direct involvement of pRB in the mechanism of action of ICBP90 on VEGF gene expression seems unlikely. Interestingly, downregulation of ICBP90 (present results) and DNMT1 (Fournel et al., 1999 and present results) enhance *p16^{INK4A}* gene expression. Considering that *p16^{INK4A}* is a negative regulator of the VEGF gene expression (Miki et al., 2001), we propose that the ICBP90/DNMT1 complex can control VEGF expression via a downregulation of the p16^{INK4A} gene.

DNMT1 has a preference for hemimethylated CpG sites generated during DNA replication by direct binding to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and thus maintains DNA methylation patterns in the newly synthesized strand after DNA replication (Leonhardt et al., 1992; Chuang et al., 2000). DNMT1 is also involved in DNA repair machinery at sites of DNA damages (Mortusewicz et al., 2005). The recruitment of DNMT1 at such sites appears to be mediated by PCNA (Mortusewicz et al., 2005). Interestingly, ICBP90 or Np95 and PCNA also appear to be partners (Uemura et al., 2000; Arima et al., 2004). In the present study, we observed that the DNMT1 expression is dependent upon ICBP90 expression in Jurkat cells but not in HVTs-SM1. In contrast, ICBP90 expression is dependent upon DNMT1 in both cell lines. This result is in accordance with our previous study in which inhibition of DNMT1 with 5-azacytidine has been shown to inhibit ICBP90 expression (Jeanblanc et al., 2005). The mechanism by which these two proteins mutually control their expression is not yet investigated. However, an inhibition of DNMT1 expression by pRB is not excluded since ICBP90 increases the expression of this latter and that DNMT1 can be downregulated through the formation of E2F-pRB complexes (Kimura et al., 2003; McCabe et al., 2005). Such inhibitory effect could not occur in HTVs-SM1 cells probably because they have inactivated pRB. Whatever the case maybe, these results suggest that DNA methylation controls histone ubiquitination and conversely histone ubiquitination controls DNA methylation. Consistently with this, it has been shown that DNMT1 is required for maintaining the histone H3 modification patterns in terms of acetylation and methylation (Espada et al., 2004). The ICBP90 mediated mono-ubiquitination of histones and DNMT1 induced DNA methylation, might occur, in cancerogenesis, in the vicinity of tumour suppressor genes such as RB1, $p16^{INK4A}$ or $p14^{ARF}$ according to the cell type, considering that ICBP90 binds to methylated promoters of these genes (Unoki et al., 2004; Jeanblanc et al., 2005). Interestingly, ICBP90 and DNMT1 are found overexpressed in several types of cancer (see Introduction; Peng et al., 2006; Vallbohmer et al., 2006). We suggest that abnormal expression of the ICBP90/DNMT1

complex acts to downregulate tumour suppressor genes, which may be a key event in carcinogenesis.

In conclusion, the present study shows that the SRA domain of ICBP90 interacts with a novel domain of DNMT1 called the SRA-BD. This interaction occurs before the cells enter the S phase and is a pre-requisite for *VEGF* gene expression via a plausible downregulation of the $p16^{INK4A}$ gene.

Materials and methods

Yeast two-hybrid screening

Bait was PCR amplified (Pfu, Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and cloned into the pB27 plasmid derived from the original pBMT116 (Vojtek and Hollenberg, 1995). The ICBP90 SRA domain encoded by the bait plasmid comprises residues 356 to 635 from human ICBP90. Random-primed cDNA library from human placenta poly (A) + RNA was constructed into the pP6 plasmid derived from the original pGADGH (Bartel et al., 1993). The library was transformed into the Y187 yeast strain and 10 million independent yeast colonies were collected, pooled and stored at -80 °C. The mating protocol has been described elsewhere (Rain et al., 2001). The selectivity of the HIS3 reporter gene was modulated with 0.5 mM 3-aminotriazole. For the ICBP90 screen 72 million interactions (diploid yeast) were tested and 154 clones were picked. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions on the PE3700 sequencer. The resulting sequences were used to identify the corresponding gene in the GeneBank database by using a fully automated procedure.

Chemicals and antibodies

The mouse monoclonal antibody (clone 1RC1C-10) raised against ICBP90 was engineered as described elsewhere (Hopfner et al., 2000). Horseradish peroxydase-conjugated anti-mouse antibodies (for mAbs) were from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA). Horseradish peroxydase-conjugated anti-rabbit antibodies (for polyclonal antibodies) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Tween 20 and the protease inhibitor cocktail were purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The anti-Ki-67 (clone Mib-1) antibody was obtained from Dako SA (Trappes, France). L-mimosine and the mouse anti-\beta-tubulin Ab were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The mouse anti-pRB mAb (clone MAB3186) was from Chemicon International (Temecula, CA, USA). The mouse anti-DNMT1 monoclonal antibody (clone 60B1220.1) was purchased from Stressgen (Victoria, BC, Canada) whereas the anti-DNMT1 polyclonal antibody was engineered by Proteogenix (Oberhausbergen, France). The rabbit polyclonal anti-p16^{INK4A} was from DeltaBiolabs (Gilroy, CA, USA). The mouse IgG used as a control in the immunoprecipitation experiments was obtained from Active Motif (Rixensart, Belgium). The rabbit anti-HDAC1 polyclonal antibody was from USBiological (Massachusetts, MA, USA). The rabbit anti-VEGF polyclonal antibody was from Tebu-Bio (Le Perray en Yvelines, France).

Pull-down assays

The DNMT1 SRA-BD cDNA (AA 401 to AA 615) was synthesized by PCR amplification using primers flanked with *Eco*RI and *Xho*I restriction sites with the following sequences; sense, 5'-ACGT<u>GAATTCGCGCTTCCCCAGCACAAA-3'</u>; antisense 5'-GT<u>GACTCGAGTTAGGGTCCCCTGTCCTT</u>

CT-3': A cDNA library of the Jurkat cell line has been used as the template (Hopfner et al., 2000). The cDNA was cloned into the pGEX-6P-1 vector (GE Healthcare, Munich, Germany) in order to obtain a GST-SRA-BD fusion protein. The GST-SRA-BD was over-expressed in Escherichia coli (E. coli) (BL21) and purification of the fusion protein was carried out by using glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare). The cDNA of the SRA domain of ICBP90 (AA 400 to AA 660) was amplified by PCR, using the pSG5/ICBP90 plasmid as the template (Hopfner et al., 2000). The primers were flanked with HindIII and EcoRI restrictions sites and have the following sequences: sense 5'-GGTAAAGCTTATGGCCTGTGTGGG CCGCA-3'; antisense 5'-CGTGAATTCTCACCCGGCCCT GCTCGG-3'. The cDNA was cloned into the pT7MAT vector (Sigma). The his-tag protein was overexpressed in E. coli (BL21) and purified on Ni⁺ columns according the manufacturer's instructions (Sigma). GST pull-down assays were performed as described elsewhere (Jeanblanc et al., 2005). Proteins were separated on 15% acrylamide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and subsequently stained with Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Cell cultures and cell synchronisation

The human T lymphocyte cell line Jurkat was obtained from the America Type Culture Collection (Mannassa, VA, USA) and was grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin and 50 µg ml⁻¹ streptomycin. Immortalized human vascular smooth muscle cells (HVTs-SM1) were generated as described elsewhere (Hsieh et al., 2000) and subcultured in DMEM containing 15% FCS. The aortic human VSMCs were obtained from BioWhittaker (Cambrex, NY, USA) and were cultured in MCDB131 (Gibco, Carlsbad, NY, USA) containing 10% FCS, 0.5 ng ml^{-1} EGF, 2 ng ml^{-1} bFGF (Peprotech, Cell Concepts, Umkirch, Germany) and 5µg ml⁻¹ Insulin (Euromedex, Mundolsheim, France). Human lung fibroblasts in primary culture were prepared and cultured as described elsewhere (Hopfner et al., 2000). To synchronize Jurkat and HVTs-SM1, cells were treated with L-mimosine $(100 \,\mu g \,m l^{-1})$ for 20 h to arrest cells in the G_1 phase (Cheng and Kuchta, 1993). All cultures and treatments were carried out at 37 °C.

Immunocytochemistry

Immunofluorescence staining of Jurkat cells and HVTs-SM1 was carried out as described elsewhere (Hopfner et al., 2000). Briefly, cells were seeded at 20000 cells per cm² and cultured on sterile glass slide with cover for 24h. Fixed cells were first incubated with either $2 \,\mu g \, m l^{-1}$ of the mouse anti-ICBP90, $2 \mu g m l^{-1}$ of a polyclonal anti-DNMT1 or $2 \mu g m l^{-1}$ of the polyclonal anti-HDAC1 in phosphate-buffered solution, supplemented with 20% FCS overnight at 4°C. Then, cells were washed and incubated with $4\,\mu g\,ml^{-1}$ of a secondary antibody conjugated with Alexa488 (Goat anti-mouse, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and $2 \mu g m l^{-1}$ of a biotinylated anti-rabbit Ab for 2h. Polyclonal anti-DNMT1 Ab was revealed by sequentially using 2µg ml⁻¹ of R-Phycoerythrin conjugated Streptavidin (EXBIO, Prague, Czech Republic). After three washes with phosphate-buffered solution, the coverslips were mounted on slides with Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed with confocal laser scanning microscopy (Bio-Rad 1024, Kr-Ar laser 488 nm; Nikon Eclipse TE300, $\times 40$ oil-immersion CFI Plan-Fluor na 1.3 objective). Alexa488 and R-Phycoerythrin were excited at 488 and fluorescence was collected at 522 (green) and 585 nm

2196

(red). For fluorescence intensities and co-localization analysis, images were treated with Image J software.

Co-immunoprecipitation assays

For co-immunoprecipitation of DNMT1 and ICBP90, 1000 μ g of Jurkat, HVTs-SM1, human vascular smooth muscle cells and human lung fibroblasts whole cell extracts were incubated with protein G beads coupled to either anti-ICBP90, anti-DNMT1, anti-HDAC1, anti-Ki-67 or mouse IgG (negative control) in phosphate-buffered solution supplemented with protease inhibitors for 2 h at 4 °C (Jeanblanc *et al.*, 2005). Beads were washed five times in 1 ml of phosphate-buffered solution and bound proteins were removed from the beads and denatured by Laemmli solution and separated on acrylamide SDS–PAGE as described hereafter.

Western blot

Whole-cell extract preparations were described elsewhere (Hopfner *et al.*, 2000). Proteins from cell lysates or from coimmunoprecipitates were loaded for one-dimensional electrophoresis on SDS–PAGE; 6% for the detection of DNMT1 and pRB, 10% for ICBP90, HDAC1, VEGF, and β -tubulin and 15% for p16^{INK4A}. Blots were probed with anti-ICBP90 mAb (0.2 µg ml⁻¹), anti-DNMT1 (2 µg ml⁻¹), anti-PRB (2 µg ml⁻¹), anti-HDAC1 (0.25 µg ml⁻¹), anti-VEGF (1:5000), anti- β -tubulin (1:25 000) or anti-p16^{INK4A} (1:250). Secondary peroxidaseconjugated antibodies were diluted to 1:10 000. Signals were detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Saclay, France).

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was isolated by a Rneasy Micro KIT (Qiagen; Courtaboeuf, France). Total RNA (1µg) was reverse transcribed by a modified Moloney murine leukaemia virus-derived reverse transcriptase using the iScript cDNA synthesis kit according to the manufacture's instructions (Bio-Rad). Realtime PCR was performed using the protocol recommended for the iQ SYBR Green Supermix from Bio-Rad in a MyIQ thermocycler (Bio-Rad). The results were normalized to those

References

- Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S et al. (2004). Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/ p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G₁/S transition. *Genes Cells* 9: 131–142.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14: 920–924.
- Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R et al. (2001). The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. Nucleic Acids Res 29: 4319–4333.
- Bonapace IM, Latella L, Papait R, Nicassio F, Sacco A, Muto M *et al.* (2002). Np95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of terminally differentiated cells and is essential for S phase entry. *J Cell Biol* **157**: 909–914.
- Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760–1764.
- Bronner C, Achour M, Arima Y, Chataigneau T, Saya H, Schini-Kerth VB. (2007). The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol Ther* 115: 419–434.
- Caracciolo V, Reiss K, Khalili K, De Falco G, Giordano A. (2006). Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene* **25**: 5294–5301.

obtained with GAPDH mRNA. The sequences of the primers for PCR amplification were: (1) DNMT1 (sense: 5'-GGACA AACTGACCTGCTTCA-3'; antisense: 5'-GGCCTTTTCACC TCCATCAA-3'); (2) ICBP90 (sense: 5'-GTCGAATCATCTT CGTGGAC-3'; antisense: 5'-AGTACCACCTCGCTGGCAT-3'); (3) GAPDH (sense: 5'-GGTGAAGGTCGGA-GTCAAC-3', antisense: 5'-AGAGTTAAAAGC-AGCCCTGGTG-3'); (4) p16^{INK4A} (sense: 5'-TCCTGGACACGCTGGTGGT-3'; antisense: 5'-GG ACCTTCCGCGGCATCTA-3'); (5) pRB, (sense: 5'-TGCATGG CTCTCAGATTCAC-3'; antisense: 5' AGTGTGATTATTCTG GAGAGG-3'); (6) β -tubulin (sense: 5'-GCCAAGTTCTGGGA GATGAT-3'; antisense: 5'-TTCTAGGTCCACCAAGACTG-3'). Amplicons were size controlled on agarose gel and purity was assessed by analysis of the melting curves at the end of the real-time PCR reaction.

siRNA transfection

The sequences of the siRNA were as follows: ICBP90, 5'-GGUC AAUGAGUACGUCGAUdTdT-3' (corresponding to nucleotides 408–426 relative to the start codon), 5'-GCUCAUGUGCG AUGAGUGCdTdT-3' (nucleotides 990–1008) and DNMT1, 5'-AACGGUGCUCAUGCUUACAACdTdT-3' (nucleotides 517–537). The sequences of the scramble siRNA for ICBP90 and DNMT1, designed by and obtained from Sigma-Aldrich, were GGACUCUCGGAUUGUAAGAdTdT and GAUGGUC UACCGCUACAAACUdTdT, respectively. Transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. All experiments described in this paper were carried out on cells 72 h after siRNA (100 pmol) transfections at 0, 24 and 48 h.

Acknowledgements

This study has been supported by grants of the Ligue contre le Cancer, Comité du Haut-Rhin, France. Mayada Achour is a fellowship from the Syrian Higher Education Ministry. Christian Bronner is Chargé de Recherches at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

- Chen DR, Wang PL, Huang AL, Zhang BQ. (2006). Effects of dnmt1 gene silencing on cell cycle, proliferation, and apoptosis of gastric cancer cell line AGS. *Ai Zheng* **25**: 308–314.
- Cheng CH, Kuchta RD. (1993). DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry* **32**: 8568–8574.
- Chuang JL, Davie JR, Wynn RM, Chuang DT. (2000). Production of recombinant mammalian holo-E2 and E3 and reconstitution of functional branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex with recombinant E1. *Methods Enzymol* **324**: 192–200.
- Citterio E, Papait R, Nicassio F, Vecchi M, Gomiero P, Mantovani R et al. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* **24**: 2526–2535.
- Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, Capurso G, Lattimore S, Akada M *et al.* (2005). Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* **129**: 1454–1463.
- Espada J, Ballestar E, Fraga MF, Villar-Garea A, Juarranz A, Stockert JC *et al.* (2004). Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* **279**: 37175–37184.
- Fournel M, Sapieha P, Beaulieu N, Besterman JM, MacLeod AR. (1999). Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms. *J Biol Chem* **274**: 24250–24256.

- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24: 88–91.
- Gabellini C, Del Bufalo D, Zupi G. (2006). Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis. *Oncogene* **25**: 5326–5332.
- Giacinti C, Giordano A. (2006). RB and cell cycle progression. Oncogene 25: 5220–5227.
- Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C *et al.* (2000). ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIα expression. *Cancer Res* **60**: 121–128.
- Hopfner R, Mousli M, Oudet P, Bronner C. (2002). Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase IIα expression. *Anticancer Res* **22**: 3165–3170.
- Hsieh JK, Kletsas D, Clunn G, Hughes AD, Schachter M, Mason CM. (2000). p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in the proliferation and apoptosis in an *in vitro* model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 973–981.
- Ingham RJ, Gish G, Pawson T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23: 1972–1984.
- Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, Abbady AQ *et al.* (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G_1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* **24**: 7337–7345.
- Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, Sharma P, Pearsall D, Warner J *et al.* (2005). Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell* **16**: 5621–5629.
- Kimura H, Nakamura T, Ogawa T, Tanaka S, Shiota K. (2003). Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and -independent pathways. *Nucleic Acids Res* **31**: 3101–3113.
- 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 AJ. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323–331.
- Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A *et al.* (2005). Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* **36**: 1101–1107.
- Macaluso M, Cinti C, Russo G, Russo A, Giordano A. (2003). pRb2/ p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/ 5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene* 22: 3511–3517.
- Macaluso M, Montanari M, Noto PB, Gregorio V, Bronner C, Giordano A. (2007). Epigenetic modulation of estrogen receptor-\{alpha\} by pRb family proteins: a novel mechanism in breast cancer. *Cancer Res* **67**: 7731–7737.
- McCabe MT, Davis JN, Day ML. (2005). Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res* 65: 3624–3632.
- Miki K, Shimizu E, Yano S, Tani K, Sone S. (2001). Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) of p16INK4A gene results in downregulation of vascular endothelial growth factor expression in human lung cancer cell lines. *Oncol Res* 12: 335–342.
- Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. (2003). Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. J Biol Chem 278: 14985–14995.
- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8905–8909.

- Mousli M, Hopfner R, Abbady AQ, Monte D, Jeanblanc M, Oudet P *et al.* (2003). ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* **89**: 120–127.
- Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. (1995). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* **55**: 6161–6165.
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmler K et al. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* 24: 1418–1429.
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D *et al.* (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561–565.
- Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 16: 1–8.
- Oba-Shinjo SM, Bengtson MH, Winnischofer SM, Colin C, Vedoy CG, de Mendonca Z *et al.* (2005). Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Brain Res Mol Brain Res* **140**: 25–33.
- Ohta T, Fukuda M. (2004). Ubiquitin and breast cancer. Oncogene 23: 2079–2088.
- Papait R, Pistore C, Negri D, Pecoraro D, Cantarini L, Bonapace IM. (2007). Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication and in major satellite silencing. *Mol Biol Cell* 18: 1098–1106.
- Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S et al. (2006). DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27: 1160–1168.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S et al. (2001). The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211–215.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338–342.
- Salimath B, Marmé D, Finkenzeller G. (2000). Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* 19: 3470–3476.
- Schaaf GJ, Ruijter JM, van Ruissen F, Zwijnenburg DA, Waaijer R, Valentijn LJ *et al.* (2005). Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries. *FASEB J* 19: 404–406.
- Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. (2004). RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene reexpression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 64: 3137–3143.
- Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**: 631–647.
- Uemura T, Kubo E, Kanari Y, Ikemura T, Tatsumi K, Muto M. (2000). Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells. *Cell Struct Funct* 25: 149–159.
- Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23: 7601–7610.
- Vallbohmer D, Brabender J, Yang D, Schneider PM, Metzger R, Danenberg KD *et al.* (2006). DNA methyltransferases messenger RNA expression and aberrant methylation of CpG islands in nonsmall-cell lung cancer: association and prognostic value. *Clin Lung Cancer* **8**: 39–44.
- Vojtek AB, Hollenberg SM. (1995). Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* 255: 331–342.
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK. (2000). Mimosine arrests cells in G₁ by enhancing the levels of p27(Kip1). *Exp Cell Res* 254: 64–71.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc).

PUBLICATION III

L'UHRF1 recrute l'histone acétyltransférase Tip60 et contrôle son expression et son activité

(Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390 : 523-528)

Il existe une forte relation entre la méthylation de l'ADN et les modifications posttraductionnelles des histones responsables de l'établissement du code histone. Dans le but de trouver une histone acétyltransférase présente dans le complexe UHRF1/DNMT1, nous avons émis l'hypothèse que Tip60 pouvait être un candidat tout à fait pertinent. Tip60 est une histone acétyltransférase avec une spécificité vers la lysine 5 de l'histone H2A (H2AK5) et joue plusieurs rôles dans les processus du remodelage de la chromatine et dans la stabilité du génome.

Dans les cellules Jurkat, nous avons testé si l'UHRF1 et Tip60 sont présentes dans les mêmes complexes macromoléculaires. Les expériences de co-immunoprécipitation montrent que Tip60 est présente dans le même complexe que l'UHRF1, la DNMT1 et l'HDAC1. Les expériences d'immunocytochimie ont confirmé la co-localisation entre l'UHRF1, DNMT1, Tip60 et HDAC1. La diminution de l'expression de l'UHRF1 ou de la DNMT1 par RNA interférence augmente l'expression de Tip60 mais d'une manière inattendue il diminue significativement le niveau de l'acétylation de H2AK5. Également, le [«] knock-down [»] de l'expression de Tip60 diminue le niveau de l'acétylation de H2AK5.

L'ensemble de ces résultats suggère que Tip60 est un nouveau partenaire de l'UHRF1, de la DNMT1 et de l'HDAC1 dans un complexe macromoléculaire impliqué dans la réplication du code épigénétique. De plus, les résultats suggèrent que Tip60 requiert l'UHRF1 pour être recrutée à la chromatine et ainsi pour exercer le rôle de la stabilisation du génome par l'acétylation de H2AK5. Depuis nos travaux, la littérature a éclairci le rôle de la présence de UHRF1, DNMT1, Tip60 et de HDAC1 dans le même complexe. En effet, son rôle serait de contrôler la quantité de la DNMT1 durant le cycle cellulaire en fonction d'un environnement local déterminé probablement par le code histone. Contents lists available at ScienceDirect



Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity

Mayada Achour^a, Guy Fuhrmann^a, Mahmoud Alhosin^a, Philippe Rondé^a, Thierry Chataigneau^a, Marc Mousli^b, Valérie B. Schini-Kerth^a, Christian Bronner^{a,*}

^a CNRS UMR 7213, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France ^b EA4438 Physiopathologie et Médecine translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 September 2009 Available online 2 October 2009

Keywords: DNMT1 Epigenetic Histone H2A Tip60 UHRF1

ABSTRACT

Tat-interactive protein, 60 kDa (Tip60) is a histone acetyltransferase with specificity toward lysine 5 of histone H2A (H2AK5) and plays multiple roles in chromatin remodeling processes. Co-immunoprecipitation experiments performed on Jurkat cells, showed that Tip60 is present in the same macro-molecular complex as UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING domain 1), DNMT1 (DNA methyltransferase 1), and HDAC1 (histone deacetylase 1). Furthermore, immunocytochemistry experiments confirmed that Tip60 co-localizes with the UHRF1/DNMT1 complex. Although down-regulation of UHRF1 by RNA interference enhanced Tip60 expression, a significant decrease of the level of acetylated H2AK5 was observed. Consistently, we have observed that down-regulation of Tip60 and DNMT1 by RNA interference, dramatically reduced the levels of acetylated H2AK5. Altogether, these results suggest that Tip60 is a novel partner of the epigenetic integration platform interplayed by UHRF1, DNMT1 and HDAC1 involved in the epigenetic code replication.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Recent studies emphasize that human UHRF1 (also known as ICBP90) and DNMT1 together play a crucial role in gene expression and more generally in the epigenetic code inheritance [1–5]. The cooperation between these two proteins works by the recognition of hemimethylated DNA by UHRF1 that further recruits DNMT1 to methylate the newly synthesized DNA strand [1–3]. This appears as one of the basis of the epigenetic code transmission mechanism, particularly of the DNA methylation patterns. Considering that UHRF1 has ubiquitin ligase activity toward histones [6,7], we have recently suggested that there is a relationship between histone ubiquitination and DNA methylation [2,4], and thus UHRF1 may play a role in the DNA methylation profile inheritance as well as in the histone code inheritance.

DNMT1 and UHRF1 have been shown to be involved in heterochromatin replication [3] as well as in silencing tumor suppressor genes such as *RB1* and $p16^{INK4A}$ [2,8]. In *Drosophila melanogaster*, Tip60 has been shown to control epigenetic inheritance of silent chromatin [9]. Consequently, we hypothesized that the complex, in which DNMT1 and UHRF1 exert their role, may also contain Tip60. This assumption is further supported by the fact that UHRF1 expression peaks in late G1 and is E2F1-dependent [10] and that Tip60 expression is also E2F1 regulated and is recruited to chromatin in late G1 [11].

Tip60 is a histone acetyltransferase that is part of the evolutionarily conserved NuA4 complex [12], which controls the acetylation of histones H2A on lysine 5 (H2AK5) and histone H4 on lysines 5, 8, 12, 16 [13]. Tip60 is involved in key processes of DNA damage responses. DNA repair, cellular growth and apoptosis [14,15]. Recently, it has been shown that mouse UHRF1 is involved in DNA damage response by interacting with Eme1 (essential meiotic endonuclease 1, also known as MMS4) [16]. Interestingly, DNMT1 has also been shown to be a mediator of DNA damage induced genotoxicity [17]. Altogether, these studies suggest that UHRF1, DNMT1 and Tip60 might associate following replication-associated DNA damage. If Tip60 is present in the same macro-molecular complex as UHRF1 and DNMT1, it would suggest that Tip60 is one of the histone acetyltransferase required for proper epigenetic code inheritance from the mother cell to the daughter cell. So far, Tip60 is the unique histone acetyltransferase known to acetylate H2AK5, which, thus, can be considered as an endogenous marker for Tip60 activity [18].

Here we show that Tip60, UHRF1, HDAC1 and DNMT1 are present in the same macro-molecular complex and are partners for the

Abbreviations: DNMT1, DNA methyltransferase 1; H2AK5, lysine 5 of histone H2A; HDAC1, histone deacetylase 1; Tip60, Tat-interactive protein of 60 kDa; UHRF1, Ubiquitin-like PHD, Ringer Finger 1

^{*} Corresponding author. Address: CNRS UMR 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 lllkirch, France. Fax: +33 368 85 4313.

E-mail address: christian.bronner@unistra.fr (C. Bronner).

⁰⁰⁰⁶⁻²⁹¹X/\$ - see front matter \circledcirc 2009 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.131

epigenetic code inheritance. Our results provide a first experimental evidence for a link between the effectors controlling DNA methylation and H2AK5 acetylation, ensured by UHRF1 and Tip60, respectively.

Materials and methods

Chemicals and antibodies. The mouse anti-UHRF1 monoclonal antibody (clone 1RC1C-10) was engineered as described elsewhere [19]. The rabbit anti-Tip60 polyclonal antibody was a kind gift of Dr. Bruno Amati and Dr. Alessandro Verrecchia (Milan, Italy) and the rabbit anti-acetyl-H2AK5 was obtained from Upstate (Lake Placid, NY). The origin of all other chemicals and antibodies is described elsewhere [2,10,20].

Cell cultures and immunocytochemistry. The human T lymphocyte cell line Jurkat was grown in RPMI 1640 supplemented with 15 % FCS, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. To synchronize Jurkat cells in late G1, cells were treated at 37 °C with L-mimosine (100 µg/mL) for 20 h. Immunofluorescence staining of Jurkat cells was carried out as described elsewhere [2,19]. Briefly, cells were incubated with either anti-UHRF1 $(4 \,\mu g/mL)$, or anti-DNMT1 $(4 \,\mu g/mL)$ monoclonal antibodies, with anti-HDAC1 (4 µg/mL), anti-DNMT1 (4 µg/mL), anti-Tip60 (8 µg/ mL), or anti-acetyl H2AK5 (4 µg/mL) polyclonal antibodies in phosphate-buffered saline (PBS), for 4 h at 4 °C. Then, cells were washed and incubated with $4 \mu g/mL$ of a secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Goat anti-mouse, Invitrogen, Eugene, Oregon) or with $2 \mu g/mL$ of a biotinylated anti-rabbit antibody for 2 h at 4 °C followed by an incubation with 4 µg/mL of Alexa 568 conjugated streptavidin (Molecular Probes, Eugene, OR). After three washes with PBS, the coverslips were mounted on slides with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and observed with confocal laser scanning microscopy (Bio-Rad 1024, Kr-Ar laser; Nikon Eclipse TE300, 40× oil-immersion CFI Plan-Fluor n.a. 1.3 objective). Alexa 488 and Alexa 568 were excited at 488 + 568 and fluorescence was collected at 522 (green) and 605 nm (red). For fluorescence intensities and co-localization analysis, images were treated using Image I software. Images were first segmented and a scatter plot was then created. This is a statistical representation that shows color and intensity distributions of pixels in a pair of images (red and green). The Y-axis of the plot corresponds to green pixel intensities and the X-axis to red pixel intensities.

Co-immunoprecipitation assays. For co-immunoprecipitation of Tip60, DNMT1, HDAC1 and UHRF1, 1 mg of Jurkat whole cell extracts were incubated with protein G beads coupled to either anti-UHRF1, anti-DNMT1, anti-Tip60 or anti-Ki-67 (negative control) in PBS supplemented with protease inhibitors for 2 h at 4 °C. Beads were washed five times in 1 mL of PBS and bound proteins were removed from the beads and denatured by Laemmli solution and separated on acrylamide SDS/PAGE gels as described below.

Western blot. Proteins from cell lysates or from co-immunoprecipitates, prepared as described elsewhere [19], were loaded for one-dimensional electrophoresis on 10% or 15% SDS-polyacrylamide gels. Blots were probed with anti-UHRF1 antibody ($0.2 \mu g/$ mL), anti-DNMT1 ($2 \mu g/mL$), anti-HDAC1 ($0.25 \mu g/mL$), anti-Tip60 ($1 \mu g/mL$), anti-H2AK5 (1:5,000) or anti- β -tubulin (1:25,000) antibodies. Secondary peroxidase-conjugated antibodies were diluted to 1:10,000. Signals were detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Saclay, France).

siRNA transfection. The sequences of the siRNA for UHRF1, DNMT1 and Tip60 were as follows: 5'-GGUCAAUGAGUACGUCGAUdTdT-3' (corresponding to nucleotides 408–426 relative to the start codon of UHRF1) or 5'-GCUCAUGUGCGAUGAGUGCdTdT-3' (corresponding to nucleotides 990–1008 relative to the start codon of UHRF1) 5'-AACGGUGCUCAUGCUUACAACdTdT-3' (corresponding to nucleotides 517–537 relative to the start codon of DNMT1) and 5'-AAGAAG AUCCAGUUCCCCAAGdTdT-3' (corresponding to the nucleotides 196–216 for Tip60 relative to the start codon of Tip60). The sequence of the scramble siRNAs for UHRF1, DNMT1 and Tip60, designed by and obtained from Sigma–Aldrich, were 5'-GGACUCUCGGAUUGUA AGAdTdT-3', 5'-GAUGGUCUACCGCUACAAACUdTdT-3' and 5'-GAA AGCGUCACACCCAGA UUAdTdT-3', respectively. Transfections were performed using lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocols. All experiments were carried out on cells 72 h after siRNA transfections (100 pmol).

Real-time RT-PCR analysis. RNA extraction, reverse transcription and PCR experiments were carried out as described elsewhere [2]. Results were normalized to those obtained with ribosomal 18S RNA. The sequences of the primers for PCR amplification were: (1) DNMT1 (sense: 5'-GCACAAACTGACCTGCTTCA-3'; antisense: 5'-GGCCTTTTCACCTCCATCAA-3'); (2) UHRF1 (sense: 5'-GTCGAATC ATCTTCGTGGAC-3'; antisense: 5'-AGTACCACCTCGCTGGCAT-3'); (3) Tip60 (sense: 5'-AGGTGGTTTCACCAGCAACT-3', antisense: 5'-TGCACTCAATGTTCTTCATCC-3'); (4) ribosomal 18S RNA (sense: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'; antisense: 5'-ATATACGCTATTG GAGCTGGA-3'). Amplicons were size controlled on agarose gel and purity was assessed by analysis of the melting curves at the end of the real-time PCR reaction.



Fig. 1. Co-immunoprecipitation of UHRF1, Tip60, DNMT1 and HDAC1. (A) Immunoprecipitations were performed on whole Jurkat cell extracts with 10 µg of anti-UHRF1 antibody followed by immunoblotting. The cells were harvested under proliferating conditions (P) or after 24 h of confluence (C). Twenty micrograms of protein before immunoprecipitation were loaded as input. (M) indicates proliferating Jurkat cells treated with L-mimosine (100 µg/ml) for 20 h. (B) Immunoprecipitations were performed on whole proliferating Jurkat cell extracts with 10 µg of anti-Ki-67, anti-DNMT1 and anti-Tip60 antibodies or without immunoprecipitating antibody (Control) followed by immunoblotting. Immunoblot analysis was performed as described in Materials and methods. Results are representative of three separate experiments.

Results

UHRF1, Tip60, DNMT1 and HDAC1 co-immunoprecipitate

The expression patterns of UHRF1, HDAC1 and Tip60 were analyzed in proliferating or confluent Jurkat cells before and after immunoprecipitations with anti-UHRF1, anti-DNMT1, anti-Tip60 antibodies, or with anti-Ki-67 antibody as a negative control antibody (Fig. 1). Cells were treated with the late G1 blocker, L-mimosine to prevent cells entering into the S phase. Cell cycle analysis, assessed by flow cytometry, confirmed that cells were blocked in the G1 phase (data not shown). UHRF1 expression was quite similar in proliferating and in confluent Jurkat cells but was slightly more pronounced in cells treated with L-mimosine (Fig. 1A). L-Mimosine has the advantage to block cells in late G1 without inducing down-regulation of UHRF1 [10]. HDAC1 was also increased in mimosine-treated Jurkat cells. Immunoprecipitation with the anti-UHRF1 antibody, allowed detecting the presence of UHRF1, Tip60, and HDAC1, with the highest amounts found in proliferating and mimosine-treated cells (Fig. 1A). Conversely, immunoprecipitation performed on proliferating cells with anti-DNMT1 or anti-Tip60 antibodies allowed to detect UHRF1, HDAC1 and Tip60 (Fig. 1B). Negative controls were performed without precipitating antibody or with anti-Ki-67 antibody that also detects a nuclear protein. In these conditions, no bands were observed for UHRF1, Tip60 and HDAC1 (Fig. 1B). These results strongly suggest that, in Jurkat cells, Tip60 is present in the same molecular complex as UHRF1, DNMT1 and HDAC1.



Fig. 2. Co-localization of UHRF1, Tip60, DNMT1 and HDAC1. (A, B, C and D) Immunocytochemistry was performed using confocal laser microscopy with anti-UHRF1 (4 μg/mL), mL), anti-Tip60 (8 μg/mL), anti-DNMT1 (4 μg/mL) or anti-HDAC1 (4 μg/mL) and revealed with secondary Ab coupled to Alexa 488 (green) or Alexa 568 (red), respectively. (E) Plot profiles represent the fluorescent intensities along the yellow lines depicted in A, B C and D. (F) For fluorescence intensities and co-localization analysis, images were treated with Image J software. (R) indicates overlap coefficient between pair images. Scatter plots show color and intensity distribution of pixels in a pair of images (green and red). Images are representative of three separate experiments. Scale bar: 5 μm.

UHRF1 co-localizes with Tip60, DNMT1 and HDAC1

Immunocytochemistry analysis on proliferating Jurkat cells showed that UHRF1 co-localized with Tip60 (Fig. 2A), DNMT1 (Fig. 2B) and HDAC1 (Fig. 2C) as visualized by an orange color in the merged pictures. Additionally, Tip60 also co-localized with DNMT1 (Fig. 2D) suggesting that DNMT1 and Tip60 were in general co-localized. The labeling with the antibodies was restricted to the nucleus as confirmed by phase contrast analysis (not shown). Control labeling was performed without primary antibodies, which showed no labeling (data not shown). The different overlap coefficient values vary between 63% and 68% (Figs. 2E, 2F) suggesting that the association between the different proteins is a highly frequent event. Altogether, these results indicate that UHRF1, Tip60, DNMT1 and HDAC1 co-localize in the nucleus of Jurkat cells.

The knockdown of UHRF1, DNMT1 and Tip60 significantly increased Tip60 expression and decreased acetylated H2AK5 levels

We studied the effect of an acute knockdown of UHRF1 on the expression of Tip60. Transfection of Jurkat cells with two siRNAs specific for UHRF1 (UHRF1–408 siRNA, UHRF1–990 siRNA), but not with the scramble siRNA, resulted in a large reduction in UHRF1 protein levels (Fig. 3A). The knockdown of UHRF1 was accompanied by an increase in Tip60 expression and a decrease in DNMT1 expression (Fig. 3A). Similar results were obtained with immunocytochemistry experiments (results not illustrated). These results have been confirmed by analyzing the mRNA expression of *UHRF1, DNMT1* and *Tip60*, normalized for ribosomal 18S rRNA (Fig. 3B). These data show that the variation of Tip60 at the protein level, results from a change in its mRNA amounts.

To study the contribution of UHRF1 on Tip60 activity, we analyzed the levels of acetylated H2AK5 in UHRF1 knocked-down cells. Interestingly, we found that the acetylation of H2AK5 was decreased in UHRF1-depleted Jurkat cells when compared with control cells (Fig. 3A). These results were confirmed by immunocytochemistry experiments (data not shown). Indeed, in the presence of UHRF1-408 siRNA, the decrease in UHRF1 expression correlated with an increase in Tip60 expression, which was accompanied by a decrease of acetylated H2AK5. The overlap coefficient values, obtained with the control cells (results not illustrated), suggest that the association between UHRF1 and acetylated H2AK5 or Tip60 are highly frequent events.

Fig. 4A shows that down-regulating Tip60 by RNA interference has the same effect on the amounts of acetylated H2AK5 as down-regulating UHRF1. Also, down-regulating DNMT1 by RNA interference mimics UHRF1 down-regulation as indicated by the up-regulation of Tip60 and a reduced acetylated H2AK5 level (Fig. 4B). Thus, it appears that Tip60 requires UHRF1 or the UHRF1/DNMT1 complex for the acetylation of H2AK5.

Discussion

In the present study, we show that Tip60 is a novel partner of the epigenetic integration platform interplayed by UHRF1, DNMT1 and HDAC1. This study further supports the participation of Tip60 in the Epigenetic Code REplication Machinery, ECREM [21]. Interestingly, the association of Tip60, UHRF1, DNMT1 and HDAC1 takes place before cells enter the S phase considering that the co-immunoprecipitation could be observed in Jurkat cells treated with L-mimosine, a drug blocking cells in late G1. This means that the complex, containing HDAC1, DNMT1, UHRF1 and Tip60, is already assembled when DNA synthesis begins.

Our results show that acetylation of H2AK5 is dependent upon the presence of UHRF1, thus suggesting that H2A acetylation and



Fig. 3. Regulation of Tip60 expression and acetylation of H2AK5 by UHRF1 assessed by western blotting. (A) Cells were transfected every 24 h for 72 h with either 100 pmol of the UHRF1 scramble siRNA or UHRF1–408 siRNA or UHRF1–990 siRNA. Thereafter, cells extracts were subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis before immunoblotting. Immunoblot analysis was performed as described in "Materials and methods". Control Jurkat cells were handled as for the transfected cells but without lipofectamine or siRNA. Results are representative of three separate experiments. (B). Histograms show the quantification data of mRNA expression of UHRF1, DNMT1 and Tip60 as assessed by real-time PCR. Results are means + SEM of three separate experiments performed in triplicate. Statistical significant, **p < 0.01, ***p < 0.001.

DNA methylation are closely linked. Indeed, acetylation of H2A, as well as Tip60 and UHRF1, has been shown to be involved in genome stability [14,18,22-24]. Therefore, we propose that the role of UHRF1 in the stabilization of the genome involves its capacity to recruit Tip60 in order to regulate H2AK5 acetylation. Our results also highlight a direct control of UHRF1 on Tip60 gene expression. This suggests that UHRF1 acts at different levels of Tip60 activity by recruiting Tip60 to chromatin and by modulating Tip60 levels. As a matter of fact, besides DNMT1 [2] and RB1 [8], this is one additional example showing that UHRF1 has the capacity to control the expression of its direct partners. We have observed in the present study that DNMT1 controls Tip60 expression and H2AK5 acetylation, but considering that UHRF1 is under the transcriptional control of DNMT1 [2], we suggest that the dependence of Tip60 expression upon DNMT1 is mediated by UHRF1.



Fig. 4. Regulation of acetylation of H2AK5 by Tip60 and DNMT1 assessed by western blotting. (A) Cells were transfected every 24 h for 72 h with 80 pmol of the Tip60 siRNA or with the corresponding scramble siRNA. Control Jurkat cells were handled as for the transfected cells but without lipofectamine or siRNA. Immunoblot analysis was performed as described in the "Materials and methods" section. Results are representative of three separate experiments. (B) Cells were transfected every 24 h three times for 72 h with 80 pmol of the DNMT1 siRNA or with the corresponding scramble siRNA. Control Jurkat cells were handled as for the transfected cells but without lipofectamine or siRNA. Immunoblot analysis was performed as described in the "Materials and methods". Results are representative of three separate experiments.

Interestingly, in a mouse model of tumor induction, Tip60 has been shown to function as a haplo-insufficient tumor suppressor, providing a causal link between Tip60 underexpression and tumorigenesis [17]. Accordingly, it has been shown that overexpression of Tip60 in HCT 116 cells leads to increased apoptosis and growth defect, suggesting that Tip60 function in colorectal cancer is rate limiting for apoptosis [25]. Restoring a normal p400/Tip60 ratio is sufficient to promote apoptosis and growth arrest of colon cancer cells [25]. Anti-apoptotic properties have also been observed for UHRF1 [4,26]. Consequently, we do not exclude that the apoptotic effects of Tip60 may be regulated by UHRF1 by controlling its expression and/or activity.

DNA methylation, as well as H2AK5 acetylation and UHRF1 expression patterns, is affected in cancer cells [4,27,28,32]. This suggests that deregulation of UHRF1 expression, observed in cancerogenesis, might influence H2AK5 acetylation via a modulation of Tip60 expression and/or activity. Considering that UHRF1 is frequently over-expressed in many types of cancer [4] and that UHRF1 negatively controls Tip60 expression, we propose that

Tip60 underexpression, observed in cancer [29,30], is governed by UHRF1.

In human lung carcinoma cell lines, it has been shown that the tumor suppressor gene $p14^{ARF}$ up-regulates Tip60 expression [31]. Interestingly, UHRF1 binds to the promoter of $p14^{ARF}$ [32], suggesting that Tip60 expression is regulated by UHRF1 through the control of *p14*^{ARF}. This hypothesis clearly requires further investigations but it allows to propose that UHRF1 might be involved in the Tip60dependent ATM/ATR/CHK activation pathway in response to genotoxic stress [31]. Indeed, DNA damages induce down-regulation of UHRF1 through a P53-dependent-mechanism [33], suggesting that the genotoxic-induced repression of UHRF1 is involved in the upregulation of Tip60. Consequently, we propose that genotoxic stress leads to an up-regulation of Tip60 via a UHRF1 down-regulation, which subsequently induces a loss of H2AK5 acetylation. Therefore, it is possible that p14^{ARF} also participates in the same macro-molecular complex, i.e., ECREM, as does UHRF1 considering that Tip60 physically interacts with p14^{ARF} [31].

Conclusion

The present study shows that Tip60 is present in a large macromolecular complex that contains UHRF1, DNMT1 and HDAC1. This association likely has an important role in the acetylation of H2AK5 and hence in the stability of the genome. The pathophysiological relevance of this association would be to duplicate the histone code that is in close contact to methylated DNA, e.g., methylated promoters of tumor suppressor genes.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This study has been supported by grants of the Ligue contre le Cancer, Comité du Haut-Rhin, France. Mayada Achour and Mahmoud Alhosin are supported by fellowships from the Syrian Higher Education Ministry. We thank Dr. Bruno Amati and Dr. Alessandro Verrecchia (Milan, Italy) for their kind gift of the polyclonal anti-Tip60 antibody.

References

- G.V. Avvakumov, J.R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C.H. Arrowsmith, S. Dhe-Paganon, Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1, Nature 455 (2008) 822–825.
- [2] M. Achour, X. Jacq, P. Rondé, M. Alhosin, C. Charlot, T. Chataigneau, M. Jeanblanc, M. Macaluso, A. Giordano, A.D. Hughes, V.B. Schini-Kerth, C. Bronner, The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression, Oncogene 27 (2008) 2187–2197.
- [3] M. Bostick, J.K. Kim, P.O. Estève, A. Clark, S. Pradhan, S.E. Jacobsen, UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells, Science 317 (2007) 1760–1764.
- [4] C. Bronner, M. Achour, Y. Arima, T. Chataigneau, H. Saya, V.B. Schini-Kerth, The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future?, Pharmacol Ther. 115 (2007) 419–434.
- [5] M. Macaluso, M. Montanari, P.B. Noto, V. Gregorio, C. Bronner, A. Giordano, Epigenetic modulation of estrogen receptor-{alpha} by pRb family proteins: a novel mechanism in breast cancer, Cancer Res. 67 (2007) 7731–7737.
- [6] E. Citterio, R. Papait, F. Nicassio, M. Vecchi, P. Gomiero, R. Mantovani, P.P. Di Fiore, I.M. Bonapace, Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 2526–2535.
- [7] Y. Jenkins, V. Markovtsov, W. Lang, P. Sharma, D. Pearsall, J. Warner, C. Franci, B. Huang, J. Huang, G.C. Yam, J.P. Vistan, E. Pali, J. Vialard, M. Janicot, J.B. Lorens, D.G. Payan, Y. Hitoshi, Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1 a nuclear RING finger protein in tumor cell growth, Mol. Biol. Cell 16 (2005) 5621–5629.
- [8] M. Jeanblanc, M. Mousli, R. Hopfner, K. Bathami, N. Martinet, A.Q. Abbady, J.C. Siffert, E. Mathieu, C.D. Muller, C. Bronner, The retinoblastoma gene and its

product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle, Oncogene 24 (2005) 7337–7345.

- [9] D. Qi, H. Jin, T. Lilja, M. Mannervik, Drosophila reptin and other Tip60 complex components promote generation of silent chromatin, Genetics 174 (2006) 241–251.
- [10] M. Mousli, R. Hopfner, A.Q. Abbady, D. Monté, M. Jeanblanc, P. Oudet, B. Louis, C. Bronner, ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells, Br. J. Cancer 89 (2003) 120–127.
- [11] S. Taubert, C. Gorrini, S.R. Frank, T. Parisi, M. Fuchs, H.M. Chan, D.M. Livingston, B. Amati B, E2F-depedent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 4546–4556.
- [12] Y. Doyon, J. Côté, The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex, Curr. Opin. Genet. Dev. 14 (2004) 147–154.
- [13] A. Kimura, M. Horikoshi, Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro, Genes Cells 3 (1998) 789–800.
- [14] M. Squatrito, C. Gorrini, B. Amati, Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT, Trends Cell Biol. 16 (2006) 433–442.
- [15] T. Ikura, V.V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, Y. Nakatani, Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis, Cell 102 (2000) 463–473.
- [16] H. Mistry, L. Gibson, J.W. Yun, H. Sarras, L. Tamblyn, J.P. McPherson, Interplay between Np95 and Eme1 in the DNA damage response, Biochem. Biophys. Res. Commun. 375 (2008) 321–325.
- [17] H.H. Tan, A.G. Porter, DNA methyltransferase I is a mediator of doxorubicin induced genotoxicity in human cancer cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 382 (2009) 462–467.
- [18] S.R. Bhaumik, E. Smith, A. Shilatifard, Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis, Nat. Struct. Mol. Biol. 14 (2007) 1008–1016.
- [19] R. Hopfner, M. Mousli, J.M. Jeltsch, A. Voulgaris, Y. Lutz, C. Marin, J.P. Bellocq, P. Oudet, C. Bronner, ICBP90 a novel human CCAAT binding protein involved in the regulation of topoisomerase IIa expression, Cancer Res. 60 (2000) 121–128.
- [20] R. Hopfner, M. Mousli, P. Oudet, C. Bronner, Overexpression of ICBP90 a novel CCAAT-binding protein overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase IIa expression, Anticancer Res. 22 (2002) 3165–3170.
- [21] C. Bronner, T. Chataigneau, V.B. Schini-Kerth, Y. Landry, The "Epigenetic Code Replication Machinery", ECREM: a promising drugable target of the epigenetic cell memory, Curr. Med. Chem. 14 (2007) 2629–2641.
- [22] M. Muto, Y. Kanari, E. Kubo, T. Takabe, T. Kurihara, A. Fujimori, K. Tatsumi, Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells

hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks, J. Biol. Chem. 277 (2002) 34549–34555.

- [23] T. Kusch, L. Florens, W.H. Macdonald, S.K. Swanson, R.L. Glaser, J.R. Yates 3rd, S.M. Abmayr, M.P. Washburn, J.L. Workman, Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions, Science 306 (2004) 2084–2087.
- [24] V. Sapountzi, I.R. Logan, C.N. Robson, Cellular functions of TIP60, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 38 (2006) 1496–1509.
- [25] L. Mattera, F. Escaffit, M.J. Pillaire, J. Selves, S. Tyteca, J.S. Hoffmann, P.A. Gourraud, M. Chevillard-Briet, C. Cazaux, D. Trouche, The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways, Oncogene 28 (2009) 1506–1517.
- [26] A.Q. Abbady, C. Bronner, K. Bathami, C.D. Muller, M. Jeanblanc, E. Mathieu, J.P. Klein, E. Candolfi, M. Mousli, TCR pathway involves ICBP90 gene down-regulation via E2F binding sites, Biochem. Pharmacol. 70 (2005) 570–579.
- [27] D.M. Hellebrekers, A.W. Griffioen, M. Oan Engeland, Dual targeting of epigenetic therapy in cancer, Biochim. Biophys. Acta 177 (2006) 76–91.
- [28] F. Barlési, G. Giaccone, M.I. Gallegos-Ruiz, A. Loundou, S.W. Span, P. Lefesvre, F.A. Kruyt, J.A. Rodriguez, Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer, J. Clin. Oncol. 25 (2007) 4358–4364.
- [29] M.E. LLeonart, F. Vidal, D. Gallardo, M. Diaz-Fuertes, F. Rojo, M. Cuatrecasas, L. López-Vicente, H. Kondoh, C. Blanco, A. Carnero, Y. Ramón, S. Cajal, New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas, Oncol. Rep. 16 (2006) 603–608.
- [30] C. Gorrini, M. Squatrito, C. Luise, N. Syed, D. Perna, L. Wark, F. Martinato, D. Sardella, A. Verrecchia, S. Bennett, S. Confalonieri, M. Cesaroni, F. Marchesi, M. Gasco, E. Scanziani, M. Capra, S. Mai, P. Nuciforo, T. Crook, J. Lough, B. Amati, Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response, Nature 448 (2007) 1063–1067.
- [31] B. Eymin, P. Claverie, C. Salon, C. Leduc, E. Col, E. Brambilla, S. Khochbin, S. Gazzeri, p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/ CHK pathway in response to genotoxic stress, Mol. Cell. Biol. 26 (2006) 4339–4350.
- [32] M. Unoki, T. Nishidate, Y. Nakamura, ICBP90 an E2F-1 target recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain, Oncogene 23 (2004) 7601– 7610.
- [33] Y. Arima, T. Hirota, C. Bronner, M. Mousli, T. Fujiwara, S. Niwa, H. Ishikawa, H. Saya, Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition, Genes Cells 9 (2004) 131–142.

PUBLICATION IV

Contrôle épigénétique de la transcription

Epigenetics and Gene Transcription Section III Cancer Epigenetics: Biomolecular Therapeutic in Human Cancer June 2011

Toute modification covalente au niveau des nucléotides ou des histones, transmissible à la descendance et susceptible d'entraîner une reprogrammation de la cellule, sans altérer la séquence génomique, peut-être qualifiée d'épigénétique. Ces modifications concernent deux catégories principales : la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

La méthylation de la cytosine est la modification épigénétique qui se produit sur les dinucléotides CpG palindromiques sur les deux brins de l'ADN. Cinq méthyltransférases de l'ADN ont été identifiées: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L. Ces enzymes exposent différentes fonctions et acceptent différents substrats. La méthylation de l'ADN est liée à un état transcriptionnel dit [«] silencieux [»] des gènes. Les DNMTs sont capables de réprimer l'expression génique en recrutant les MBDs aux îlots CpGs méthylés qui interagissent avec les histones désacétylases. La désacétylation des histones modifie la charge des histones et l'affinité de l'ADN avec les histones où localement, une structure chromatinienne compacte est générée. La méthylation de l'ADN est nécessaire pour le développement embryonnaire, la différenciation, l'inactivation du chromosome X, l'établissement de l'empreinte génomique parentale et pour conserver l'intégrité génomique.

Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine, qui est composé de l'ADN et des histones. Il constitue le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Le nucléosome est constitué d'un octamère d'histones H3, H4, H2A et H2B, chacune présente sous forme de dimères. Les extrémités N-terminales de ces histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant affecter leurs charges mais aussi l'accessibilité à l'ADN. Il y a au moins 150 modifications des histones connues, dont certaines ne répondent pas forcément à la définition d'une marque épigénétique puisque les modifications épigénétiques sont supposées être transmises à la descendance en termes de cellule ou d'organisme entier. La capacité des résidus lysines à exister en un de ces trois états méthylés (mono-, di- et tri- méthylation) en s'associant avec d'autres modifications comme l'acétylation, l'ubiquitination et la phosphorylation ainsi que l'interaction avec les protéines de liaison aux lysines méthylées est le fondement de l'hypothèse du [«] code histone [»]. Les histones formant le nucléosome peuvent avoir chacune plusieurs modifications, donnant lieu à un « cross-talk » entre les différentes marques. L'acétylation des histones est corrélée à une transcription active, est impliquée dans la réplication de l'ADN, l'assemblage du nucléosome et l'interaction entre les nucléosomes et les protéines non-histones. L'acétylation des histones est catalysée par cinq familles de protéines appelées les Histones AcétylTransférases (HATs). Le rôle des HDACs "Histones DésACétylases" est d'enlever les groupements acétyles des histones ou d'autres protéines non-histones qui ont été auparavant acétylées par les HATs. La monoubiquitination des histones est généralement associée à une expression génique active. L'ubiquitination est une forme de modification post-traductionnelle dans laquelle un polypeptide de 76 acides-aminés (ubiquitine) est conjugué par son côté C-terminal aux lysines des protéines cellulaires qui sont ensuite dégradées, suite à une polyubiquitination, via le protéasome ou destinées à avoir une fonction régulatrice lorsqu'elles sont monoubiquitinées. Il est impossible à l'heure actuelle de pouvoir dire si la biotinylation est une marque épigénétique, tout comme l'ADP-ribosylation, la SUMOylation et la phosphorylation.

PUBLICATION V

Reconnaissance des états multivalents des histones associées à l'hétérochromatine par l'UHRF1

(*J Biol Chem*: in press)

Les modifications des histones et la méthylation de l'ADN représentent deux niveaux de l'information épigénétique héritable qui régulent la structure de la chromatine et l'activité des gènes chez les eucaryotes. La maintenance des profils (patrons) de méthylation de l'ADN est réalisée par la DNMT1 par l'intermédiaire du facteur de fidélité UHRF1, qui reconnaît spécifiquement les dinucléotides CpG hémi-méthylés, le substrat de la DNMT1. Le [«] knockdown [»] de l'UHRF1 provoque une diminution du niveau de la méthylation de l'ADN et modifie la structure chromatinienne. La méthylation de l'ADN régule les modifications des histones considérant que la perte de la DNMT1 dans les cellules humaine du cancer du colon résulte en une diminution et distribution de la triméthylation de H3K9. L'UHRF1 est un facteur unique, il est nécessaire pour la maintenance des méthylations de l'ADN et interagit également avec l'histone H3 sur la lysine 9 triméthylée (H3K9me3) d'une manière indéterminée.

Ici, nous montrons que l'UHRF1 contient un Tandem Tudor Domain (TTD) qui reconnaît les extrémités N-terminales de l'H3 associées à la lysine 9 triméthylée et à la lysine 4 non modifiée (H3K4me0/K9me3). La suppression de H3K4 montre l'importance de l'H3K4 nonmodifiée pour que le domaine TTD de l'UHRF1 puisse reconnaître l'H3K9me3. L'UHRF1 déficiente en termes d'affinité pour l'H3K9me3 montre des localisations modifiées dans l'hétérochromatine et ne parvient pas à maintenir la répression d'un gène cible, *p16^{INK4A}*.

La capacité de TTD d'interagir avec l'histone H3K9me3 et avec l'histone H3K4 nonmodifiée dans le même peptide suggère que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones répressives sont fortement coordonnées par le biais de l'UHRF1, probablement par le
recrutement des enzymes modificatrices de la chromatine HDAC1, DNMT1, Suv39H1 et G9a.

Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1

Nataliya Nady¹, Alexander Lemak^{1,7}, John R. Walker^{2,7}, George V. Avvakumov^{2,7}, Michael S. Kareta^{3,7}, Mayada Achour⁴, Sheng Xue², Shili Duan¹, Abdellah Allali-Hassani², Xiaobing Zuo⁵, Yun-Xing Wang⁵, Christian Bronner⁴, Frédéric Chédin³, Cheryl H. Arrowsmith^{1,2} and Sirano Dhe-Paganon^{2,6}

¹Ontario Cancer Institute, Campbell Family Cancer Research Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 101 College Street, Toronto, Ontario M5G 1L7, Canada

²Structural Genomics Consortium, University of Toronto, 101 College Street, Toronto, Ontario M5G 1L7 Canada

³Department of Molecular & Cellular Biology, University of California, Davis, CA 95616, USA

⁴CNRS UMR7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 74 route du rhin, 67401, Illkirch cedex, France

⁵Protein Nucleic Acid Interaction Section, Structural Biophysics Laboratory, National Cancer Institute at Frederick, National Institutes of Health, Frederick, MD 21702, USA

⁶Department of Physiology, University of Toronto, 100 College Street, Toronto, Ontario M5G 1L5, Canada

⁷Contributed equally to this work

Correspondence and requests for materials: sirano.dhepaganon@utoronto.ca and carrow@uhnres.utoronto.ca Cheryl H. Arrowsmith 101 College Street, Suite 700 Toronto, ON, M5G 1L7 Canada Tel: (416) 946-0881 Fax: (416) 946-0880

Running title: Tandem Tudor Domain of UHRF1 binds multivalent heterochromatin

Histone modifications and DNA methylation represent two layers of heritable epigenetic information that regulate eukarvotic chromatin structure and gene activity. UHRF1 is a unique factor that bridges these two layers; it is required for maintenance DNA methylation at hemimethylated CpG sites which are specifically recognized through its SRA domain and also interacts with histone H3 trimethylated on lysine 9 (H3K9me3) in an unspecified manner. Here we show that UHRF1 contains a Tandem Tudor Domain (TTD) that recognizes H3 tail peptides with the heterochromatin-associated modification state of trimethylated lysine 9 and unmodified lysine 4 (H3K4me0/K9me3). Solution NMR and crystallographic data reveal the TTD simultaneously recognizes H3K9me3 through a conserved aromatic cage in the first Tudor subdomain, and unmodified H3K4 within a groove between the tandem subdomains. The subdomains undergo a conformational adjustment upon peptide binding, distinct from previously reported mechanisms for dual histone mark recognition. protein Mutant deficient UHRF1 for H3K4me0/K9me3 binding shows altered localization to heterochromatic chromocenters and fails to reduce expression of a target gene, p16^{INK4A}, when overexpressed. Our results demonstrate a novel recognition mechanism for the combinatorial readout of histone modification states associated with gene silencing, and add to the growing evidence for coordination of, and cross-talk between the modification states of H3K4 and H3K9 in regulation of gene expression.

Histone modifications and DNA methylation represent two layers of heritable epigenetic information that regulate chromatin structure and gene activity in eukaryotic organisms. Methylated DNA sequences are generally associated with long term transcriptional silencing through the recruitment of repressor complexes including methyl-binding histone deacetylases, and chromatin proteins. remodeling machinery (1,2). Likewise, specific histone methylation states can recruit multivalent adaptor proteins, which lead to chromatin condensation, further inhibiting gene expression. Accumulating evidence shows that these two methylation systems act cooperatively to establish the epigenetic state of the cell (3-5), however, the mechanisms of this cooperation remain vague.

During replication, CpG methylation patterns are maintained in mammals bv the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) with hemi-methylated CpG dinucleotides serving as a substrate. This enzyme is aided by UHRF1 (Ubiquitin-like, PHD and RING Finger containing 1, also known as ICBP90 in humans and NP95 in mouse), which interacts with DNMT1 and specifically recognizes hemi-methylated CpG dinucleotides through its SRA domain (6,7). UHRF1 has also been implicated in histone methylation-associated activities related to pericentric heterochromatin (6-12). For example, UHRF1 is found in a complex with both methylated histones (8,13) and histone-modifying enzymes such as HDAC1 and KMT1C/G9a (14,15). UHRF1 also interacts with H3K9me3-containing nucleosomes and this interaction is potentiated by DNA methylation (3). Thus, it is not surprising that UHRF1 deficiency leads not only to decreased levels of DNA methylation (6,7), but also to impaired maintenance of heterochromatin structure (8,10,16) and increased transcription of major satellites, regions that make up the bulk of pericentric heterochromatin.

UHRF1 has significant affinity for H3K9me3 (8,13), but the mechanism of this interaction remains unclear. In addition to the SRA domain, UHRF1 contains other conserved domains (Fig. 1a), including a ubiquitin-like domain (UBL), a plant homeobox domain (PHD) that has been implicated in the UHRF1 binding to both DNMT1 (6) and H3K9me3 (8), and a RING E3 ligase domain. Here we provide biochemical and cell-based evidence for the mechanism of the UHRF1 binding to histone H3 in which Lys9 is trimethylated and Lys4 is unmodified or monomethylated. Furthermore, our structural analysis revealed a novel mode of interaction enabling combinatorial readout of a multivalent state within a single H3 tail.

Experimental Procedures

Cloning, protein expression, and purification. The cDNA encoding residues 121 – 286 of human UHRF1 protein was cloned into a modified pET28a bacterial expression vector encoding an N-terminal hexahistidine fusion protein with a TEV protease cleavage site. Mutated cDNAs were made by using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene): mutations were confirmed by sequencing complete cDNAs. The protein was expressed in E. coli BL21 (DE3) grown in Terrific Broth (TB) in the presence of 50 μ g/ml of kanamycin, and induced with 0.2 mM isopropyl-1-thio-D-

galactopyranoside. The protein was purified using affinity. gel filtration and ion exchange chromatography, with details provided in the Supplementary Materials. Note that the protein was not stable at low salt concentrations, thus for binding assays and structure determination buffers contained at least 250mM NaCl. Details of sample preparations for crystallographic, solution NMR, and SAXS provided in the Supplementary studies are Information section.

Peptides used for NMR, crystallization and SAXS were purchased in purified form from Tufts University Core Services (Boston, MA, USA). Two peptides were used for these studies, peptide TARK(me3)ST corresponding to the N-terminal histone H3 residues 6-11, hereby referred to as "short peptide" or H3K9me3, and peptide ARTKQTARKme3ST corresponding to the histone H3 residues 1-11, also referred to as the long or H3K4me0/K9me3 peptide.

Crystallization, data collection, structure solution and refinement. Crystals of the selenomethionine derivative of UHRF1 TTD were grown at 18°C using the hanging drop method by mixing 1:1 (v/v) of 23 mg/ml protein solution with well solution consisting of 10% PEG 8000, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M sodium cacodylate, pH 6.5, and 1 mM TCEP. The crystals were cryoprotected by immersion in the well solution mixed in 1:1 ratio with a water solution of 20% (w/v) sucrose, 4% (w/v) glucose, 18% (v/v) glycerol and 18% (v/v) ethylene glycol, frozen and stored in liquid nitrogen. Data from crystals of the selenomethionine derivative of the UHRF1 TTD were collected at NSLS beamline X29 at the selenium peak wavelength (0.97942 Å), and processed using the HKL2000 program suite (17). Solve and Resolve were used to locate the selenium substructure and to build the initial model (18,19). A second data set collected on beamline GM/CA-CAT 23ID-B at the Advanced Photon Source at 1.0000 Å, which extended to higher resolution and with greater completeness, was used for the final refinement of the structure. Data from crystals of selenomethione labeled UHRF1 TTD that had been soaked with a six-residue peptide from H3 (TARKme3ST) were collected at SBC-CAT 19ID at the Advanced Photon Source at 0.99987 Å, and processed using HKL2000. Data from all crystals was collected at 100 K. Manual model building was carried out using the graphics program Coot (20). Refinement was carried out for both the apo and complex structures using the CCP4 program

REFMAC (21). In the later stages of refinement, TLS and restrained refinement was carried out, with the initial TLS parameters obtained from the TLSMD webserver (22). The MolProbity Ramachandran plot showed that 97.58% and 93.23% of the residues were in the most favoured region for apo and liganded structures, respectively, while the rest were in the allowed region.

Histone peptide SPOT-blot peptide array screen and fluorescence-polarization binding assays. Peptides were synthesized directly on a modified cellulose membrane with a polyethylglycol linker using the peptide synthesizer MultiPep (Intavis). The binding reaction was initially performed using a library of 580 membrane-immobilized peptides corresponding to control peptides and 8 - 14 residue-long stretches of histones H2A, H2B, H3 and H4 sequences with either non-modified or variously modified arginine, lysine, serine and threonine residues (one modified residue per peptide) as described previously (23). The subsequent peptide libraries were designed specifically to test the binding preference of UHRF1 TTD domain to H3K4 and K9 marks.

For FP studies, peptides indicated in the figures were synthesized, N-terminally labeled with fluorescein and purified by Tufts University Core Services (Boston, MA, USA). Binding assays were performed in 10 µl volume at a constant labeled peptide concentration of 36 nM, and the protein was used at concentrations at saturation ranging between 800 and 1300 µM in buffer containing 20 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM Benzamidine, 1 mM PMSF, 0.01% Tween-20. FP assays were performed in 384 well plates using Synergy 2 microplate reader (BioTek, Vermont, USA). The excitation wavelength of 485nm and the emission wavelength of 528nm were used. The data was corrected for background of the free labeled peptides. To determine Kd values, the data were fit to a hyperbolic function using Sigma Plot software (Systat Software, Inc., CA, USA). The Kd values represent averages \pm standard error for at least three independent experiments.

NMR spectroscopy and data analysis. Chemical shift mapping on the UHRF1 TTD domain was done by monitoring the ¹H-¹⁵N HSQC spectra of the uniformly ¹⁵N-labeled TTD domain alone (0.45 mM) and with an excess of unlabeled interacting short or long H3 peptides. Aliquots of unlabeled peptides were titrated into the labeled TTD domain in molar ratio 1:35 for

the short peptide and 1:5 for the long peptide until no further changes in chemical shifts were detected in the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum. The HSQC spectra were recorded at 25°C in 20 mM NaPi (pH 7.0), 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1mM benzamidine, 0.5mM PMSF and supplemented with 10% (v/v) D_2O on a Bruker Avance 800-MHz spectrometer. Composite chemical shift perturbation values shown were calculated using the equation $\Delta_{\text{comp}} = [\Delta \delta^2_{\text{HN}} + (\Delta \delta_{\text{N}}/6.5)^2]^{1/2}$. The dissociation constant, K_d, was estimated by fitting the observed chemical shift changes for selected residues to the following equation $\Delta = \Delta_{max} ([L]_T + [P]_T + K_d)$ $-(([L]_T+[P]_T+K_d)^2 - 4[L]_T[P]_T)^{1/2})/(2[P]_T)$, in which Δ is the observed chemical shift change at a given total ligand concentration, $[L]_T$, Δ_{max} is the change in chemical shift at saturation and $[P]_T$ is the total protein concentration. Data was fitted using GraphPad Prism software.

For structure determination, NMR spectra were recorded at 25°C on Varian INOVA 600-MHz spectrometer equipped with triple resonance probe and Bruker Avance 600 and 800-MHz spectrometers equipped with cryoprobes. NMR data were collected at high resolution from nonlinearly sampled spectra and processed using multidimensional decomposition (24,25), and NMRPipe software (26). The data was analyzed with NMRView and Sparky software (27). The details of structure calculation are indicated in the Supplementary Material.

Residual dipolar coupling (RDC) measurements and analysis. Dipolar couplings were measured on isotropic and anisotropic sample containing 0.6mM ¹⁵N, ¹³C TTD protein and 3mM unlabeled H3K4me0/K9me3 peptide. ¹⁵N-¹HN residual dipolar couplings were extracted from two-dimensional IPAP ¹⁵N-¹HN HSQC spectra (28). Pulse sequences that were used for measurement of ¹³C'-¹³Ca couplings have been described earlier (29). Pulse sequences for ¹⁵N-¹³C' are courtesy of Lewis Kay. The aligned sample from which ¹⁵N-¹HN, ¹⁵N-¹³C', and ¹³C'-¹³Ca RDCs were extracted contained 3.3% final sample volume of C12E5 PEG/hexanol media (deuterium splitting, 13.2Hz; linewidth, 1.5Hz) (30), and 219 couplings were used. The aligned sample from which ¹⁵N-¹HN RDCs were extracted contained total volume 6% C12E5 PEG/hexanol media (deuterium splitting, 25 Hz; linewidth, 1.8 Hz) (30), 102 couplings were used and another sample was prepared by adding 10mg/ml Pfl bacteriophage (deuterium splitting, 12 Hz; linewidth, 1.7 Hz) (31), 95 couplings were used. Software FuDA (32) was used to extract peak shape

and intensity parameters from J-evolution ¹⁵N-¹³C', and ¹³C'-¹³Ca RDCs.

Another set of ¹⁵N-¹HN residual dipolar couplings was measured on isotropic and anisotropic sample containing only 0.6mM ¹⁵N, ¹³C TTD protein. The aligned sample contained 3.2% final sample volume of C12E5 PEG/hexanol media (deuterium splitting, 16Hz; linewidth, 1.8Hz) (30), 73 couplings were used.

To obtain goodness of fit (Q) values for experimental RDC values with theoretically back-calculated values for the apo crystal structure and complex (TTD/H3K4me0K9me3) NMR structures, the data was analyzed using PALES (33). The plots were produced with MODULE v1.0 (34).

Cell culture, and immunocytochemistry. Np95^{-/-} ES cells and their wild-type counterpart (E14) were a kind gift from Drs. Haruhiko Koseki and Masahiro Muto. Cells were grown as described (6) and passaged every other day. The overall growth characteristics of the stably expressing cells were not significantly different from the parent Np95^{-/-} cells or from the wild-type E14 cells. Expression vectors carried the *mUhrfl* cDNA under a CAG promoter. The *mUhrf1* cDNA was preceded immediately by an in-frame HA-encoding sequence, thus leading to the expression of an N-terminal HA-tagged UHRF1 protein. An IRES-puromycin cassette was inserted immediately downstream of the Uhrfl coding sequence and allowed selection of UHRF1-expressing clones through Puromycin selection. Cells were transfected using TurboFect (Fermentas) and selected with 1 µg/ml of puromycin starting 36-48 h posttransfection. Clones were picked after 14 days under selection and expanded. Expression levels were determined by Western blots. Transfection of the cells with mUHRF1^{F148A} mutant was similarly performed. The relative expression levels of the wild-type and mutated mUHRF1 proteins were similar to each other and comparable to the expression levels of the endogenous UHRF1 protein in E14 cells as assaved by quantitative Western blots using a direct Anti-UHRF1 monoclonal antibody (1RC1C-10).

Close examination of the $Np95^{-/-}$ cell line revealed that an unexpected splicing event from exons 1 to 8, which immediately flank the region that was targeted for gene replacement, drives the production of a truncated UHRF1 protein lacking coding exons 2 to 7 (Supplementary **Fig. S9**). This truncated UHRF1 remnant, referred to as UHRF1 Δ (2-7), lacks the UBL, TTD and PHD domains, but still carries intact SRA and RING domains. Due to the presence of the SRA domain, it is likely that UHRF1 Δ (2-7) can bind to hemimethylated DNA. Thus, the *Np95^{-/-}* cell line is not well-suited for analyzing the role of UHRF1 in maintenance DNA methylation. The reintroduced UHRF1 proteins carried an N-terminal HA epitope tag allowing for discrimination between the transgene and endogenous UHRF1 Δ (2-7).

For immunocytochemistry, cells were seeded onto glass coverslips coated with 0.1% gelatin. After 24 h of growth, the cells were harvested, washed with PBS, and fixed with 2% formaldehyde in PBS for 10 min. The cells were washed twice with PBS and permeabilized with 1% Triton-X 100 in PBS for 10 min. Cells were then incubated in Blocking Buffer (3% BSA, 0.1% Tween-20, 4X SSC) for 20 min and immunostained with a Rabbit anti-H3K9me3 antibody (Millipore #07-523) at a 1:1000 diluton, and a mouse anti-HA antibody (Covance #MMS-101P) at a 1:750 dilution, both diluted in Blocking Buffer. The cells were further washed in Blocking Buffer, and immunostained with AlexaFluor-555 Goat anti-Rabbit (Molecular Probes #A21430) and AlexaFluor-488 Goat anti-Mouse (Molecular Probes #A11017) secondary antibodies. The cells were again washed in Blocking Buffer, and mounted using Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories #H-1200). The slides were imaged using a Nikon Eclipse E600 microscope and the images processed using the ImageJ software (35). For the colocalization analysis, background was subtracted using WCIF ImageJ, nuclei with adequate HA staining were identified using the Nucleus Counter plug-in and were then processed with the Intensity Correlation Analysis plug-in (36).

Cell culture and Western immnoblotting. Immortalised human vascular smooth muscle cells (HVTs-SM1) were generated as described elsewhere (37) and subcultured in DMEM containing 15% FCS supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. Transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 80,000 cells/well in 24-well plates according to the manufacturer's protocols. All experiments described were carried out on cells 24h after cell transfections with the vector (12 μ g/ml).

Mutant full length human UHRF1 cDNAs, cloned into the pCR-BluntIITOPO, were amplified by PCR using high fidelity Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) and oligonucleotides flanked with the EcoRI (5') and XhoI (3') sites. The PCR products were digested with the corresponding restriction enzymes and further cloned into the pCMV2c vector (Sigma-Aldrich) in order to obtain FLAG-tagged UHRF1 wild-type and mutants. All the constructs were verified by sequencing (Proteogenix, Oberhausbergen, France).

Whole-cell extract preparations were described elsewhere (37). Proteins (4 μ g) from cell lysates were loaded on one-dimensional SDS-PAGE, 8% for the detection of UHRF1 and 15% for p16^{INK4A}. Blots were probed with monoclonal anti-UHRF1 (0.2 μ g/ml) or polyclonal anti-p16^{INK4A} (1:200) antibodies. The anti-UHRF1 antibody was engineered as described elsewhere (38), whereas anti-p16^{INK4A} antibody was obtained from DeltaBiolabs (Gilroy, CA). Secondary HRP-conjugated antibodies were used at 1:5000 dilution. Signals were detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Saclay, France).

RESULTS

UHRF1 contains a Tandem Tudor Domain that binds H3K9me3 in vitro. In order to understand the mechanism by which UHRF1 recognizes H3K9me3, we screened SPOT-blot histone peptide arrays (23) with recombinant UHRF1 and its domains (Fig. 1a,b). In agreement with previous studies (8,13), full length UHRF1 bound to H3K9me3-containing peptides. However, in contrast to earlier reports (8), the PHD, SRA, or tandem PHD-SRA domains did not interact. Recombinant protein encompassing the region between residues 121 and 286 showed robust binding to methylated H3K9me peptides in SPOT-blot screens, but not to other methyl histone marks, consistent with a recent report (39). Fluorescence polarization (FP) studies using labeled H3K9me3 peptides (residues 1-12 of H3) confirmed the SPOTblot results, showing no interaction with either SRA, PHD, or tandem PHD-SRA domains, while the conserved, and until recently uncharacterized region corresponding to residues 121-286 showed reproducible and robust binding (Fig. 1c). Further FP experiments confirmed that this domain favored binding to trimethylated Lys9 H3 peptide compared to peptides corresponding to lower Lys9 methylation states (Fig. 1d).

We determined the 2.4 Å crystal structure of residues 126-285 of human UHRF1 (PDB ID: 3DB4, **Table 1** and Supplementary **Fig. S1**) revealing a tightly

packed pair of Tudor domains (40), each having the signature five-stranded β-barrel fold seen in "Royal" family domains, many of which are involved in the recognition of methylated lysine histone marks (41). The closest structural match is that between the Nterminal subdomain (residues 126-206) and the Nterminal Tudor domain of 53BP1 (PDB entry 2G3R; RMSD of 1.3 Å for 80 Ca positions) including a conserved aromatic cage, which in the case of 53BP1 binds H4K20me2 (42). We therefore hypothesized that recognition of the H3K9me3 mark by UHRF1 could be attributed to the tandem tudor domain (TTD). A second crystal structure of the UHRF1 TTD in complex with a short H3K9me3 peptide (residues 6-11; PDB ID: 3DB3, Table 1 and Fig. 1e), confirmed that the aromatic cage (Phe152, Tyr188 and Tvr191) of the N-terminal Tudor subdomain (TTD_N) , indeed interacts with the trimethylammonium moiety in the canonical fashion seen in 53BP1 and other "Royal" family members (41,42), along with two polar residues, Asn194 and Asp145, which complete the binding pocket and provide countercharge. Interestingly, Asp145 occupies an approximate conserved position that often forms hydrogen bonds with dimethyl ammonium moieties within aromatic cages that recognize lower methylation states such as those of 53PB1 and some MBT domains (42-48). However, in UHRF1 the side chain of both Asn194 and Asp145 are rotated away from the trimethylammonium moiety of H3K9me3, and participate in an alternative H-bond network to effectively widen the binding pocket and accommodate trimethyl lysine (Fig. 1f).

TTD recognizes hallmarks of heterochromatin. The histone code hypothesis emphasizes the combinatorial nature of histone posttranslational modifications (49). For example, pericentric heterochromatin, which is highly methylated at CpG sites, is characterized not only by high levels of H3K9me3 but also by low levels of modified H3K4 (50-52) (Fig. 2a). To explore the possibility that UHRF1 simultaneously recognizes this unique heterochromatic state, an array of doubly-modified and/or mutated H3 peptides was screened for interaction with TTD (Fig. 2b). Results showed that in addition to H3K9me3, binding required H3K4 to be either unmodified or monomethylated while di- and trimethylation of Lys4, its deletion or substitution with an alanine eliminated binding. Binding was not observed for H3K27me3 peptides encompassing residues 21-33, which contains the ARK₂₇S motif (similar to ARK₉S), but lacks the lysine residue equivalent to the K4 position (**Fig. 2b**). FP assays confirmed these data and showed that binding to H3K4me3/K9me3, while still detectable, showed an approximately 5-fold lower affinity compared to the H3K4me0/K9me3 peptide (**Fig. 2c**). Likewise, conversion of Lys4 to alanine reduced the binding affinity by an order of magnitude, highlighting the importance of this residue. Interestingly, T6 phosphorylation also exerted an inhibitory effect on the binding, but S10 phosphorylation did not (**Fig. 2b**).

To confirm the significance of the unmodified K4 residue in the binding specificity of UHRF1, we monitored the NMR spectra of amide resonances of ¹⁵N-labeled TTD upon titration with a short H3K9me3 (residues 6-11) and a longer H3K4me0/K9me3 peptide (residues 1-11). The titration data reinforces several key features of the interaction. Consistent with FP studies and the crystal structure, the short H3K9me3 peptide lacking Lvs4 displayed weak binding with dissociation constant, Kd, over 1mM involving only a cluster of residues in and around the aromatic cage (Fig. 2d, Supplementary Fig. S2, S3). Titration with the longer H3K4me0/K9me3 peptide, on the other hand, resulted in significantly more chemical shift perturbations with greater values compared to the short peptide, reflecting greater affinity (Kd = 22 μ M; Fig. 2c). The two order of magnitude difference in Kd between short and long peptides indicates an important role for residues upstream of Thr6 in the peptide, consistent with our SPOT blot results. Residues affected by addition of the short peptide were a subset of those affected by the addition of the long peptide consistent with the same mode of binding by H3K9me3 in the short and long peptides. The additional residues affected by the long peptide are predominantly those that are at the interface between the TTD_N and TTD_C subdomains and those that link the two subdomains. The extensive nature of the chemical shift changes including buried residues at the interface between TTD_N and TTD_C that are not surface exposed, suggests а conformational adjustment of the two subdomains relative to one another in order to accommodate a multivalent histone tail.

Structural basis for the recognition of the H3K4me0/K9me3 signature. To determine the mechanism by which H3K4 contributes to the interaction between TTD and H3, we attempted to crystallize UHRF1 TTD with H3K4me0/H3K9me3 peptides. Despite repeated attempts, we were unable to obtain crystals in the presence of the longer peptides. As an alternative method we used NMR spectroscopy to obtain the solution structure of the UHRF1 TTD (residues 124-285) in complex with a H3K4me0/H3K9me3 peptide (residues 1-11) (PDB ID: 2L3R; **Table 2, Fig. 3 & 4**). Both Tudor subdomains formed extensive interactions with the peptide involving side chains of K9me3, T6 and K4 (**Fig. 3**), which resembles the cooperation between the two chromodomains of CHD1 that form a single pocket to recognize an extended methylated histone tail (53).

The K9me3 side chain sits within the conserved aromatic cage of TTD_N as seen in our crystal structure with the short peptide (Supplementary Fig. S5b). H3 residues amino-terminal to K9me3 extend along a shallow groove at the interface between the two Tudor subdomains (Fig. 3a). The side chain of K4 is recognized by a network of hydrogen bonds from carboxylates of Asp142 and Glu153 (Fig. 3c.d). This recognition mode of the unmodified H3 K4 is similar that of PHD domains (5,54,55). While to monomethylation can be tolerated. dior trimethylation would be expected to disrupt this hydrogen-bond network and also sterically interfere with binding, consistent with our SPOT-blot and FP results. However, unlike many H3K4 recognition motifs, the TTD does not interact with the N-terminal NH3+ moiety. Interestingly, phosphorylation of T6, which has been shown to prevent the demethylation of H3K4 (56), would be expected to introduce both steric clashes and electrostatic repulsion (Fig. 3b). The extensive interactions with Lys4 and Thr6 upstream of the ARKS motif common to K9 and K27 explain the selectivity of UHRF1 TTD for K9me3 over K27me3. Heteronuclear NOE values showed that in solution the linker between TTD_N and TTD_C does not undergo motions faster than the TTD as a whole, and therefore does not behave as a flexible linker (Supplementary Fig. S4). Thus, the TTD behaves as a single domain to recognize a single histone tail with the H3K4me0/K9me3 modification state as opposed to recognition of two separate H3 tails with the K4me0 and K9me3 states. This suggests that there may be cellular mechanisms for coordination of the modifications at the K4 and K9 sites on individual histone H3 tails.

Reorientation of TTD subdomains upon histone H3 binding. Overlay of the backbone atoms of TTD_N in the apo crystal structure and the lowest energy member of the solution ensemble of the H3K4me0/K9me3 complex revealed a rigid body movement of the second subdomain relative to the first (**Fig. 4b,c**). Although TTD_N in the apo and bound conformations had only minor differences with an RMSD of 0.77Å, superposition of the entire TTD revealed a two-fold greater discrepancy between the structures with RMSD of 1.37Å (Fig. 4e). In the bound form, we observed an adjustment of the TTD_{C} corresponding to a 4.2Å movement of the tip of the α 1' helix, and smaller shifts in the β 1'- β 2' and the β 2'- β 3' loops (Fig. 4c). This difference in subdomain orientations was also observed between the solution structure and the X-ray structure bound to the short H3K9me3 peptide, suggesting that the two TTD subdomains adjust their relative orientation for recognition of the longer optimal bivalent H3K4me0/K9me3 peptide (Supplementary Fig. S5a).

Residual dipolar coupling (RDC) measurements give direct information about the orientation of bond vectors relative to the molecular alignment tensor, and are extremely sensitive to the relative orientations of domains within a protein (57,58). Our solution structure of the H3K4me0/K9me3-bound TTD was refined using five sets of RDCs (3 sets of ¹⁵N-¹HN, and ¹³C'-¹³CA, ¹⁵N-¹³C' data sets) to more accurately determine the relative orientations of the two subdomains. Analysis of these RDC measurements with respect to the apo crystal structure showed that they had a significantly poorer fit with the apo structure, indicating that the bond vectors in the TTD-H3K4me0/K9me3 solution ensemble do not correspond well with the apo crystal structure (Fig. 4d and Supplementary Fig. S6). The apo protein in solution suffers from selective line broadening, especially at the interface between TTD_N and TTD_C , and was less amenable to a detailed RDC analysis. Nevertheless, a single RDC data set collected on the apo protein in solution has a better fit to the apo crystal structure (compared to the RDCs collected on the TTD bound to H3K4me0/K9me3). Similarly, small angle x-ray scattering (SAXS) of the apo and H3K4me0/K9me3 solution complex also showed differences between the apo and H3K4me0/K9me3 structures (Supplementary Fig. S7). Taken together the solution and X-ray data support a conformational adjustment of the two TTD subdomains relative to another upon peptide binding. further one underscoring the importance of the inter-subdomain peptide binding groove.

Mutational analysis confirms localization of TTD to heterochromatin *in vivo*. In order to investigate

the biological relevance of UHRF1 TTD, we generated mutant protein and tested the binding to histone H3 peptides. Mutations within the canonical aromatic cage disrupted the binding greatly and Kd values could not be accurately determined (Fig. 5a). Mutations of Asp142 and Glu153, residues that contribute to the hydrogen bond network with H3K4me0, disrupt the interaction with the H3 tail without affecting the protein folding (Fig. 5b, Supplementary Fig. S8a). Lastly, mutation of TTD residue interacting with H3T6 leads to the diminished interaction observed by FP assays (Fig. 5c, Supplementary Fig. S8b).

UHRF1 localizes to and contributes to the shape and density of pericentric heterochromatin (6-12), which is typically condensed in DAPI-bright chromocenters that are enriched with the H3K9me3 modification (59). In order to determine whether the TTD contributes to the localization of UHRF1 to H3K9me3 enriched regions in cells, we stably expressed cDNAs for the wild-type murine UHRF1 (mUHRF1wt; Np95) and a mutant defective for H3K9me3 binding, mUHRF1^{F148A} (mF148 is equivalent to hF152) in $Np95^{-/-}$ ES cells (6,7,60). The wild-type protein was localized almost exclusively to the DAPI-bright, H3K9me3-rich chromocenters, as expected (Fig. 5d). mUHRF1^{F148A} However, the mutant protein consistently showed a slightly more diffuse localization throughout the nucleus even though staining at the pericentric heterochromatin could often be observed. The extent of co-localization between the wild-type and mutated mUHRF1 proteins and H3K9me3 foci was further quantified and revealed that the mUHRF1^{F148A} mutant protein indeed showed a significantly reduced co-localization with H3K9me3 foci (p-value = 0.0102) (Fig. 5d). This indicates that the TTD domain can assist the localization of UHRF1 to H3K9me3-marked heterochromatin regions in a manner dependent on the integrity of its trimethyllysine-binding aromatic cage.

UHRF1 also participates in macromolecular complexes containing repressive histone factors such as methyltransferases G9a, GLP, and SUV39H1, and HDAC1, and contributes to transcriptional gene silencing, as demonstrated for instance, for the $p16^{INK4A}$ tumour suppressor gene (15,37,61). We therefore investigated whether H3K9me3 binding by the TTD contributes to down-regulation of p16^{INK4A} protein levels by transfecting immortalized human vascular smooth muscle cells with wild-type or TTD-mutated UHRF1 variants and analyzing protein levels

by Western blots. As expected, overexpression of wild type FLAG-tagged UHRF1 protein reproducibly resulted in reduction of p16^{INK4A} levels (**Fig. 5e**). On the other hand, TTD aromatic cage mutants deficient for H3K9me3-binding failed to reduce the levels of $p16^{INK4A}$. These data suggest that H3K9me3 binding by the TTD domain contributes to the regulation of target gene expression by UHRF1.

DISCUSSION

The Tudor domain is found in many proteins involved in epigenetic regulation and can exist in isolation, in tandem, or even as a triad (62,63). Comparison with other proteins that contain tandem Tudor domains suggests that although they all have the canonical five strand β-barrel fold, additional secondary structure elements and the relative orientation and topology of the two domains provide unique features and great versatility among this family (Supplementary Fig. **S10**). To our knowledge interdomain movement accompanying histone peptide recognition by effector domains has not been described before. For example, recognition of histone tails by the double chromodomains of CHD1 (53), tandem tudor domains of FXR2 (64), 53BP1 (42), JMJD2A (65) or Sgf29 (PDB: 3MEU; DOI: 10.2210/pdb3meu/pdb), and tandem PHD fingers of DPF3b (66) does not require the adjustment of the two domains. The recognition of two acetylation marks by a single Brdt (67) seems to preserve the overall fold, and the combinatorial rheostat-like readout of H3K4me3/T6ph by ING2 PHD finger (68) does not appear to involve structural rearrangement within the PHD finger. Thus, previous modes of effector domain-histone peptide binding show minimal structural perturbations and can be described as either "surface recognition" or "cavity insertion" models, but neither involves subdomain rearrangements as observed here (63,69).

Taken together these data support a model in which the simultaneous readout of the H3K4 and H3K9 modification states by the TTD is achieved by a single domain that undergoes a conformational change to accommodate both lysines. There is increasing evidence for coordination of the posttranslational status of H3K4 and H3K9 in mammalian cells. Binda *et al.* (51) recently reported that the H3K9 methyltransferases, SETDB1, SUV39H1, G9a and GLP preferentially methylate Lys9 of H3 histones that are depleted in the K4me2/3 mark. This indicates cross talk between H3K4 and H3K9 in the writing of the H3K9me3 mark, and it therefore stands to reason that "reader" domains may have also evolved to read the status of both K4 and K9. It was recently reported that the ADD domain of ATRX can recognize the H3K4me0/K9me3 signature and may play a role in localizing ATRX to DAPI-dense chromo centers similar to that seen here for UHRF1 (70). Furthermore, Bartke *et al.* recently showed that while UHRF1 from cellular extracts was enriched for binding recombinant nucleosomes containing methyl-CpG (presumably via its SRA domain), UHRF1 was also highly enriched at nucleosomes without CpG methylation, but only if they contained the H3K4me0/K9me3 modification signature (3). There was no enrichment of UHRF1 at H3K4me3 nucleosomes even if the DNA contained methyl-CpG (3). These observations are consistent with an important role for the TTD in contributing to the subnuclear localization of UHRF1 in addition to the SRA domain (39). Given the critical role played by UHRF1 in maintenance DNA methylation, our work suggests that the H3K4me0/K9me3 signature is highly associated with methylated DNA, which is consistent with observations for heterochromatic regions and stably repressed genes. By contrast, other chromatin states associated with transcriptional repression such as bivalent domains (71, 72) or Polycomb-repressed domains (73) are not expected to undergo similar coupling between DNA and histone modifications. thus ensuring more dynamic expression trajectories through development.

REFERENCES

1. Denslow, S. A., and Wade, P. A. (2007) *Oncogene* 26(37), 5433-5438

2. Klose, R. J., and Bird, A. P. (2006) Trends Biochem Sci 31(2), 89-97

3. Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S. C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010) *Cell* **143**(3), 470-484

4. Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., and Lander, E. S. (2008) *Nature* **454**(7205), 766-770

5. Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S. P., Allis, C. D., Cheng, X., and Bestor, T. H. (2007) *Nature* **448**(7154), 714-717

6. Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P. O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S. E. (2007) *Science* **317**(5845), 1760-1764

7. Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M., and Koseki, H. (2007) *Nature* **450**(7171), 908-912

8. Karagianni, P., Amazit, L., Qin, J., and Wong, J. (2008) Mol Cell Biol 28(2), 705-717

9. Miura, M., Watanabe, H., Sasaki, T., Tatsumi, K., and Muto, M. (2001) Exp Cell Res 263(2), 202-208

10. Papait, R., Pistore, C., Grazini, U., Babbio, F., Cogliati, S., Pecoraro, D., Brino, L., Morand, A. L., Dechampesme, A. M., Spada, F., Leonhardt, H., McBlane, F., Oudet, P., and Bonapace, I. M. (2008) *Mol Biol Cell* **19**(8), 3554-3563

11. Papait, R., Pistore, C., Negri, D., Pecoraro, D., Cantarini, L., and Bonapace, I. M. (2007) *Mol Biol Cell* **18**(3), 1098-1106

12. Uemura, T., Kubo, E., Kanari, Y., Ikemura, T., Tatsumi, K., and Muto, M. (2000) Cell Struct Funct **25**(3), 149-159

13. Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., Di Fiore, P. P., and Bonapace, I. M. (2004) *Mol Cell Biol* 24(6), 2526-2535

- 14. Kim, J. K., Esteve, P. O., Jacobsen, S. E., and Pradhan, S. (2009) Nucleic Acids Res 37(2), 493-505
- 15. Unoki, M., Nishidate, T., and Nakamura, Y. (2004) Oncogene 23(46), 7601-7610
- 16. Woo, H. R., Pontes, O., Pikaard, C. S., and Richards, E. J. (2007) Genes Dev 21(3), 267-277
- 17. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Macromolecular Crystallography, Pt A 276, 307-326
- 18. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 4), 849-861
- 19. Terwilliger, T. C. (2003) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 59(Pt 1), 38-44
- 20. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60(Pt 12 Pt 1), 2126-2132
- 21. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53(Pt 3), 240-255
- 22. Painter, J., and Merritt, E. A. (2006) J. Appl. Crystallogr. 39(1)

- 23. Nady, N., Min, J., Kareta, M. S., Chedin, F., and Arrowsmith, C. H. (2008) *Trends Biochem Sci* 33(7), 305-313
- 24. Gutmanas, A., Jarvoll, P., Orekhov, V. Y., and Billeter, M. (2002) J Biomol NMR 24(3), 191-201
- 25. Orekhov, V. Y., Ibraghimov, I., and Billeter, M. (2003) J Biomol NMR 27(2), 165-173
- 26. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J Biomol NMR* 6(3), 277-293
- 27. Goddard, T. D., and Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco
- 28. Ottiger, M., Delaglio, F., and Bax, A. (1998) J Magn Reson 131(2), 373-378
- 29. Mittermaier, A., and Kay, L. E. (2001) J Am Chem Soc 123(28), 6892-6903
- 30. Rückert, M., and Otting, G. (2000) JACS 122(32), 7793-7797
- 31. Hansen, M. R., Mueller, L., and Pardi, A. (1998) Nat Struct Biol 5(12), 1065-1074
- 32. Hansen, F. D. FuDA. In. http://pound.med.utoronto.ca/software, flemming@pound.med.utoronto.ca
- 33. Zweckstetter, M. (2008) *Nat Protoc* **3**(4), 679-690
- 34. Dosset, P., Hus, J. C., Marion, D., and Blackledge, M. (2001) J Biomol NMR 20(3), 223-231
- 35. Abramoff, M. D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. (2004) Biophotonics International 11(7), 36-42
- 36. Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., and Stanley, E. F. (2004) J Neurosci 24(16), 4070-4081
- 37. Achour, M., Jacq, X., Ronde, P., Alhosin, M., Charlot, C., Chataigneau, T., Jeanblanc, M., Macaluso, M., Giordano, A., Hughes, A. D., Schini-Kerth, V. B., and Bronner, C. (2008) *Oncogene* **27**(15), 2187-2197
- 38. Hopfner, R., Mousli, M., Jeltsch, J. M., Voulgaris, A., Lutz, Y., Marin, C., Bellocq, J. P., Oudet, P., and
- Bronner, C. (2000) *Cancer Res* **60**(1), 121-128
- 39. Rottach, A., Frauer, C., Pichler, G., Bonapace, I. M., Spada, F., and Leonhardt, H. (2010) *Nucleic Acids Res* **38**(6), 1796-1804
- 40. Hashimoto, H., Horton, J. R., Zhang, X., and Cheng, X. (2009) Epigenetics 4(1), 8-14
- 41. Maurer-Stroh, S., Dickens, N. J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C. P. (2003) *Trends Biochem Sci* **28**(2), 69-74
- 42. Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J., and Mer, G. (2006) *Cell* **127**(7), 1361-1373
- 43. Grimm, C., de Ayala Alonso, A. G., Rybin, V., Steuerwald, U., Ly-Hartig, N., Fischle, W., Muller, J., and Muller, C. W. (2007) *EMBO Rep* 8(11), 1031-1037
- 44. Grimm, C., Matos, R., Ly-Hartig, N., Steuerwald, U., Lindner, D., Rybin, V., Muller, J., and Muller, C. W. (2009) *Embo J* 28(13), 1965-1977
- 45. Guo, Y., Nady, N., Qi, C., Allali-Hassani, A., Zhu, H., Pan, P., Adams-Cioaba, M. A., Amaya, M. F., Dong, A., Vedadi, M., Schapira, M., Read, R. J., Arrowsmith, C. H., and Min, J. (2009) *Nucleic Acids Res* **37**(7), 2204-2210
- 46. Li, H., Fischle, W., Wang, W., Duncan, E. M., Liang, L., Murakami-Ishibe, S., Allis, C. D., and Patel, D. J. (2007) *Mol Cell* **28**(4), 677-691
- 47. Min, J., Allali-Hassani, A., Nady, N., Qi, C., Ouyang, H., Liu, Y., MacKenzie, F., Vedadi, M., and Arrowsmith, C. H. (2007) *Nat Struct Mol Biol* **14**(12), 1229-1230
- 48. Santiveri, C. M., Lechtenberg, B. C., Allen, M. D., Sathyamurthy, A., Jaulent, A. M., Freund, S. M., and Bycroft, M. (2008) *J Mol Biol* **382**(5), 1107-1112
- 49. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) *Nature* **403**(6765), 41-45
- 50. Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002) Cell 111(3), 381-392
- 51. Binda, O., LeRoy, G., Bua, D. J., Garcia, B. A., Gozani, O., and Richard, S. (2010) *Epigenetics* 5(8), 767-775
- 52. Chen, W. Y., and Townes, T. M. (2000) Proc Natl Acad Sci US A 97(1), 377-382
- 53. Flanagan, J. F., Mi, L. Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K. L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005) *Nature* **438**(7071), 1181-1185
- 54. Lan, F., Collins, R. E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J. R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X., and Shi, Y. (2007) *Nature* **448**(7154), 718-722
- 55. Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M., and Shirakawa, M. (2009) *EMBO Rep* **10**(11), 1235-1241

56. Metzger, E., Imhof, A., Patel, D., Kahl, P., Hoffmeyer, K., Friedrichs, N., Muller, J. M., Greschik, H., Kirfel, J., Ji, S., Kunowska, N., Beisenherz-Huss, C., Gunther, T., Buettner, R., and Schule, R. (2010) *Nature* **464**(7289), 792-796

- 57. Bax, A., Kontaxis, G., and Tjandra, N. (2001) Methods Enzymol 339, 127-174
- 58. Prestegard, J. H., Bougault, C. M., and Kishore, A. I. (2004) Chem Rev 104(8), 3519-3540
- 59. Krauss, V. (2008) Genetica 133(1), 93-106

60. Muto, M., Kanari, Y., Kubo, E., Takabe, T., Kurihara, T., Fujimori, A., and Tatsumi, K. (2002) *J Biol Chem* **277**(37), 34549-34555

61. Suzuki, M., Sunaga, N., Shames, D. S., Toyooka, S., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (2004) *Cancer Res* 64(9), 3137-3143

62. Adams-Cioaba, M. A., and Min, J. (2009) Biochem Cell Biol 87(1), 93-105

63. Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., and Patel, D. J. (2007) Nat Struct Mol Biol 14(11), 1025-1040

64. Adams-Cioaba, M. A., Guo, Y., Bian, C., Amaya, M. F., Lam, R., Wasney, G. A., Vedadi, M., Xu, C., and Min, J. (2010) *PLoS One* **5**(11), e13559

65. Huang, Y., Fang, J., Bedford, M. T., Zhang, Y., and Xu, R. M. (2006) Science 312(5774), 748-751

66. Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A. N., Walsh, M. J., and Zhou, M. M. (2010) *Nature* **466**(7303), 258-262

67. Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A. L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D. J., Krijgsveld, J., Khochbin, S., Muller, C. W., and Petosa, C. (2009) *Nature* **461**(7264), 664-668

68. Garske, A. L., Oliver, S. S., Wagner, E. K., Musselman, C. A., LeRoy, G., Garcia, B. A., Kutateladze, T. G., and Denu, J. M. (2010) *Nat Chem Biol* **6**(4), 283-290

- 69. Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J., and Allis, C. D. (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8(12), 983-994
- 70. Dhayalan, A., Tamas, R., Bock, I., Tattermusch, A., Dimitrova, E., Kudithipudi, S., Ragozin, S., and Jeltsch, A. (2010) *Hum Mol Genet*

71. Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L., and Lander, E. S. (2006) *Cell* **125**(2), 315-326

72. Bilodeau, S., Kagey, M. H., Frampton, G. M., Rahl, P. B., and Young, R. A. (2009) *Genes Dev* 23(21), 2484-2489

73. Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007) *Cell* **128**(4), 735-745

Footnotes. Atomic coordinates for the reported structures have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 3DB4, 3DB3, 2L3R. Accession code for the chemical shift assignments of the NMR structure deposited at the BioMagResBank is 17200. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.H.A. (carrow@uhnres.utoronto.ca) or S.D.P. (sirano.dhepaganon@utoronto.ca).

Acknowledgements. We thank Aled Edwards for valuable discussions, Jinrong Min for suggestions regarding the design of aromatic cage mutations, Yanjun Li for plasmid preparation, Aiping Dong for synchrotron datacollection, and Sigrun Rumpel, Lilia Kaustov, Irina Bezsonova, Rob Laister, Dmitry Korzhnev, and Lewis Kay lab for assistance with NMR data collection and analysis. Use of the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory was supported by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. DE-AC02-98CH10886. Use of the Advanced Photon Source was supported by the U. S. Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. DE-AC02-98CH10886. Use of the Advanced Photon Source was supported by the U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. DE-AC02-06CH11357. The Structural Genomics Consortium is a registered charity (number 1097737) that receives funds from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Canadian Foundation for Innovation, Genome Canada through the Ontario Genomics Institute, GlaxoSmithKline, Karolinska Institutet, the Knut and Alice Wallenberg Foundation, the Ontario Innovation Trust, the Ontario Ministry for Research and Innovation, Merck & Co. Inc., the Novartis Research Foundation, the Swedish Agency for Innovation Systems, the Swedish Foundation for Strategic Research and the Wellcome Trust. This research was funded in part by the Ontario Ministry of Health and Long Term Care (to C.H.A.), the Cancer Research Coordinating Committee (to F.C.), a Stem Cell training grant from the California Institute of Regenerative Medicine (to M.S.K). a Frederick Banting and Charles Best Canada Doctoral Research Award from CIHR (to N.N.). C.H.A. holds a Canada Research Chair in Structural Proteomics from CIHR.

Figure Legends

Figure 1. A novel domain within UHRF1 that corresponds to TTD preferentially binds H3 histone tail with trimethylated H3K9. a) Domain composition of UHRF1 that includes UBL (ubiquitin-like), TTD (Tandem Tudor Domain; TTD_N, N-terminal Tudor subdomain; TTD_C, C-terminal Tudor subdomain), PHD (Plant Homeobox Domain), SRA (SET and RING associated domain), and RING (Real Interesting New Gene). The human UHRF1 protein sequence (aa 119-298) is aligned with that of other species (bt, Bos taurus; cf, Canis familiaris; dr, Danio rerio; fc, Felis catus; gg, Gallus gallus; hs2, Homo sapiens; md, Monodelphis domestica; mm, Mus musculus; pt, Pan troglodytes; rn, Rattus norvegicus; xl, Xenopus laevis); the lower-case sequences are flexible regions in the liganded X-ray structure. The residue numbering corresponds to the human UHRF1 sequence. Drawn above the number line are secondary structure elements and their labels. Residues that are fully conserved (cons), that undergo medium and strong (uppercase) and weak (lowercase) chemical shifts with addition of K4me0/K9me3-containing H3 peptide (NMR) and those that form the K9me3 aromatic cage and K4me0 cage (cage) are shown below. b) SPOT-blot peptides corresponding to the amino-terminal tail of histone H3 with or without modification at the Lys9 position (1-mono; 2-di; 3-trimethylation) were probed for binding with different UHRF1 domains. The full length recombinant UHRF1 and a domain spanning residues 121-286 showed clear binding to the histone tail when Lys9 was methylated. c) FP assays confirm binding of the aa121-286 to a modified peptide corresponding to residues 1-11 of H3 (ARTKQTARKme3ST). d) Binding of the UHRF1 construct spanning aa121-286 to the series of peptides that have different methylation state of Lys9 was measured using fluorescence polarization (FP). The peptides corresponding to residues 1-11 of H3, ARTKQTAR[Kme0/1/2/3]ST with Lys9 unmodified, mono-, di- or tri-methylated were used. e) The Tandem Tudor Domain (TTD) is shown in ribbon format with TTD_N in light-brown and TTD_C in light-blue. A stick representation of the H3K9me3 peptide is shown in magenta; electron density was only observed for three residues $-R_8K_9me3S_{10}$. f) Close-up view of the aromatic cage in the crystal structures of TTD in its apo form (green) and in complex with H3K9me3 (magenta). The Asp145 and Asn194 appear to have some plasticity, since their side-chains rotate to present the apolar faces towards the ligand, consistent with the ability of the domain to interact with lower states of K9 methylation.

Figure 2. Recognition of multivalent histone signatures associated with heterochromatin by UHRF1. a) Schematic representation of the multivalent nature of the histone H3 tail. Residues known to be modified in vivo are numbered. Stably repressed genes and heterochromatic regions are characterized by the K4me0/K9me3 state of H3. By contrast, "poised" genes are marked by the bivalent K4me3/K27me3 state accompanied in some cases by K9me3 (72). The region boxed in red is the key sequence studied here. b) A series of H3 peptides were analyzed for binding by the TTD using SPOT-blot arrays. Unmodified H3 peptide (aa 1-13) showed no binding, while trimethylated H3K9me3 peptide showed strong binding. The effect of dual modifications, alanine replacement and deletion (.) in the background of K9me3 was tested. Arrows indicate peptides for which binding was lost. c) FP assays measuring the binding of the purified TTD to H3 peptides that have Lys9 trimethylated and Lys4 that is either mutated or methylated to different degrees. d) Composite chemical shift changes versus residue number for UHRF1 TTD domain after binding to H3 tail K4me0/K9me3-containing long peptide (aa1-11) is indicated in red, shifts observed upon addition of the short, only K9me3-containing peptide (aa6-11) are indicated in blue. Prolines and residues that could not be assigned were given zero as their chemical shift values. Residues that had a very large shift, but could not be attributed to the corresponding peak in the apo form are represented as bright red bars and given a constant value of 0.21ppm. Residues that were strongly affected are listed on the histogram. A large number of residues (37%) is involved in the interaction with the peptide corresponding to the N-terminal tail of the H3 with trimethylated Lys9 and Lys4 unmodified.

Figure 3. Recognition of multivalent sites at the interface between the two Tudor subdomains. a) Surface representation of the lowest-energy complex NMR structure of TTD bound to the histone H3 tail. The N- and C-terminal Tudor subdomains of UHRF1 are shown in cyan and slate colours, respectively. Key residues on the

peptide are shown as red dots. b) The TTD-H3 binding is stabilized by the interaction between the hydroxyl and backbone carbonyl groups of H3 T6 that hydrogen bond with UHRF1 Asp190 carboxylate and the Arg235 guanidinium groups, respectively. Only protons participating in hydrogen bonding are shown. c) The H3K4me0 pocket is formed by hydrophilic wall (residues from TTD_N : Asp142 and Glu153), an aromatic wall (TTD_C : Trp238 and Phe278), as well as Met224 and residues from the linker between the two subdomains Arg207 and Ala208. d) Detailed interactions between the TTD and K4me0 showing the side chain of K4 is "caged" by two hydrogen bonds.

Figure 4. Structural re-adjustment of TTD_C in order to accommodate the histone tail. a) Solution NMR ensemble (15 structures) of the complex structure showing the polypeptide backbone of TTD (blue) and histone peptide (red). The structures were overlayed over the region within TTD residues 139-161 and 182-279. b) Overlay of the solution TTD ensemble (residues 139-161, 182-206) in the bound form (blue) and X-ray apo structure (red). c) Overlay of the apo crystal structure (green) and complex NMR structure (blue). The N- and C-termini are removed for clarity to better show the linker between the TTD subdomains. The extent of the TTD_C shift relative to TTD_N upon recognition of the H3K4me0/K9me3 peptide is indicated. d) Goodness of the fit between the experimental RDC values measured for either the H3K4me0/K9me3-bound TTD or apo TTD in solution and the predicted values for the NMR solution structure and apo crystal structures. For couplings highlighted in grey the same alignment tensor was used for fitting. e) The r.m.s.d. (Å) between the apo crystal structure of the ensemble of TTD complex solution structures was calculated with MOLMOL.

Figure 5. Mutational analysis confirms localization of TTD to heterochromatin in mouse ES cells. (a,b,c) Binding of wild-type and mutant TTD forms that disrupt H3K9me3 binding cage (a), H3K4me0 binding cage (b) or T6 recognition within the recombinant human TTD. The fluorescence polarization binding assays were performed using long, H3K4me0/K9me3-containing histone peptide (aa1-11). d) Stably integrated mouse $Np95^{-/2}$ ES cell lines expressing HA-tagged wild-type mUHRF1 (top panel) or mUHRF1^{F148A} (lower panel) were stained for HA, H3K9me3 and DAPI. F148A mutation in mouse protein is equivalent to F152A in human protein. The extent of mUHRF1 co-localization with H3K9me3 was quantitatively evaluated using 60 independent nuclei selected in an unbiased manner by the ImageJ Nucleus Counter plug-in. The HA-mUHRF1^{F148A} protein shows a significantly reduced correlation coefficient compared to the wild-type protein (p-value = 0.0102, average and standard deviation are shown). e) Effect of UHRF1 wild type and mutant TTD proteins on p16^{INK4A} protein levels in immortalized human vascular smooth muscle cells (HVTs-SM1). Membranes were probed with an anti-UHRF1 monoclonal antibody, accounting for the presence of an endogenous UHRF1 band in the negative control and vector only transfected cells (Flag). The blot shown here is representative of at least three independent experiments.



0.2

0.0

0.1

1

10 aa121-286 (μM)

100

1000



Figure 2



UHRF1 TTD residues

Figure 3





Figure 5





Table 1

Crystallographic data collection and refinement statistic	Crystallogra	phic data	collection	and refinen	nent statistics
---	--------------	-----------	------------	-------------	-----------------

	TTD apo	TTD-H3K9me3
Data collection		
Space group	P6 ₂	P6 ₂
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	98.65, 98.65, 43.34	99.62, 99.62, 41.23
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Resolution (Å)	38.7 (2.4) *	31.8 (2.4)
$R_{\rm sym}$ or $R_{\rm merge}$	0.10 (0.45)	0.12 (0.50)
Ι/σΙ	25.6 (4.7)	22.5 (3.6)
Completeness (%)	99.7 (97.4)	98.8 (92.9)
Redundancy	11.9 (10.9)	6.9 (5.5)
Refinement		
Resolution (Å)	2.4	2.4
No. reflections	9112	8755
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.22/0.28	0.21/0.28
No. atoms		
Protein	1111	1135
Ligand/ion	1	29
Water	34	73
B-factors		
Protein	85.4	51.6
Ligand/ion	69.8	85.9
Water	71.5	48.9
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.012
Bond angles (°)	1.055	1.298

*Highest resolution shell is shown in parenthesis.

Table 2

.

NMR data and refinement statistics

	TTD-H3K4me0/K9me3
NMR distance and dihedral constraints	
Distance restraints	
Total NOE	3352
Intra-residue	658
Inter-residue	2664
Sequential $(i - j = 1)$	969
Nonsequential $(i-j > 1)$	1695
Hydrogen bonds	71
Protein-peptide intermolecular	30
Total dihedral angle restraints	256
Protein	
φ	130
Ψ	126
Total RDCs	416
Store stores statistics	
Structure statistics Violations (maan and a d.)	
Violations (mean and s.d.) Distance constraints $(\hat{\lambda})$	0.0425 ± 0.0117
Distance constraints (A) Dihadral angla constraints (⁰)	0.0433 ± 0.0117 2 2402 ± 0.4605
May dihadral angle violation (?)	3.3492 ± 0.4003
Max. difference constraint violation (\dot{A})	4.4408
Deviations from idealized geometry	0.0747
Bond longths (Å)	0.0144 ± 0.0002
Dond angles (⁰)	1.2076 ± 0.0002
Donu angles ()	1.2970 ± 0.0233 2.24 ± 0.12
$\frac{1}{4} \frac{1}{2} \frac{1}$	5.24 ± 0.15
Drotoin	
Нории	1.40 ± 0.12
Deelehono	1.40 ± 0.13 0.76 ± 0.18
Dackuolic	0.70 ± 0.18
hoove	1.00 ± 0.25
heakhone	1.99 ± 0.33 0.77 ± 0.10
Complex	0.77 ± 0.19
heavy	1.47 ± 0.13
hackbone	1.47 ± 0.13 0.81 + 0.16
backbone	0.81 ± 0.16

*Ensemble of 15 lowest-energy structures out of 100 used in r.m.s. deviation calculations. For UHRF1 TTD protein, residues 135-160, 183-281 were used; H3K4me0K9me3 peptide, residues 4-10.

CONCLUSION



PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

1. Rôle de l'UHRF1 dans l'expression génique et la modification de la structure chromatinienne :

De nos travaux ainsi que de la littérature, il apparaît que l'UHRF1 exerce dans un premier temps plutôt un rôle de lecteur en ce sens qu'elle est capable de détecter à la fois l'hémiméthylation de l'ADN, via son domaine SRA, et l'état de méthylation des histones plus particulièrement de l'histone H3, via son domaine TTD. Dans un second temps, l'UHRF1 recruterait ou dialoguerait avec l'enzyme capable de réaliser la même modification que celle qui est lue. Il s'agit des acteurs comme l'HDAC1 (Unoki et coll., 2004), la DNMT1 (Achour et coll., 2008; Bostick et coll., 2007), H3K9me3 (Hashimoto et coll., 2009), G9a (Kim et coll., 2009), et Tip60 (Achour et coll., 2009) (**Tableau 8**).

Ainsi l'UHRF1 assure physiquement le lien entre les modifications post-traductionnelles des histones et peut-être la méthylation de l'ADN pour une bonne transmission des marques épigénétiques de la cellule mère aux cellules filles. Néanmoins, il n'est pas exclu que l'activité E3 ligase de l'UHRF1 pourrait influer directement sur le code épigénétique soit en ubiquitinant directement les histones, soit en jouant sur la stabilité de la DNMT1.

Etant donné que l'UHRF1 co-localise avec PCNA (Arima et coll., 2004), il est possible que l'UHRF1 intervienne immédiatement après la machinerie de la réplication de l'ADN pour dupliquer le code épigénétique à l'aide de ses partenaires en constituant une sorte de machinerie à répliquer le code épigénétique appelée [«] Epigenetic Code REplication Machinery ou ECREM [»] (Bronner et coll., 2007b).

Tableau 8

PROTEINES	FONCTIONS	REFERENCES
HDAC1	Histone désacétylase	Unoki et coll., 2004
DNMT1	Méthylation de l'ADN	Bostick et coll., 2007 Achour et coll., 2008
Tip60	Histone acétyltransférase	Achour et coll., 2009
pRB	Gène suppresseur de tumeur	Jeanblanc et coll., 2005
G9a	Histone méthyltransférase	Kim et coll. 2009
H2B, H2A, H3	Histones	Citterio et coll., 2004
H3K4me3	Histone tri-méthylée à la lysine 4	Mellor, 2006
H3K9me3	Histone tri-méthylée à la lysine 3	Hashimoto et coll., 2009 Kim et coll., 2009 Nady et coll., in press
PCNA	Proliferatins Nuclear Cell Antigen	Arima et coll., 2004
RARβ	Récepteurs de l'Acide Rétinoïque	Unoki et coll., 2004
HAUSP	Déubiquitinase « Herpes virus–Associated Ubiquitin Specific Protease »	Du et coll., 2010 Qin et coll., 2011
RbAp48	Désacétylation des histones	Bronner et coll., 2002

Protéines cellulaires interagissant avec l'UHRF1

1.1 Rôle de l'UHRF1 dans la méthylation de l'ADN

Nous avons pu démontrer que l'UHRF1, par le biais de son domaine SRA, est capable d'interagir avec un nouveau domaine de la DNMT1 que nous avons appelé le SRA-Binding Domain (SRA-BD) (Achour et coll., 2008). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux dans lesquels l'UHRF1 est proposée d'être capable de recruter la DNMT1 à l'ADN hémiméthylé pour une duplication fidèle des patrons de méthylation de l'ADN (Bostick et coll., 2007). La structure du domaine SRA montre que ce domaine se comporte comme [«] une main [»], dont deux [«]doigts[»] font basculer une cytosine méthylée dans le grand sillon de l'ADN, permettant ainsi à la [«] paume [»] d'interagir avec le groupement méthyle. Ce mécanisme est appelé méthyle-cytosine-base-flipping mechanism (Avvakkumov et coll., 2008). En français on pourrait l'appeler [«] mécanisme de basculement de la cytosine méthylée [»]. L'originalité de ce mécanisme dans le cadre de l'UHRF1 réside dans le fait que le domaine SRA réalise ce basculement sans modification chimique subséquente de la cytosine méthylée.

L'UHRF1 interagit avec la DNMT1 mais le mécanisme n'est pas encore clair. Nous avons observé que le domaine SRA de l'UHRF1 interagit avec une région de la DNMT1 encore mal caractérisée englobant les acides aminés AA401 à AA615 de la DNMT1 humaine (Achour et coll., 2008); d'autres ont constaté que le domaine PHD ou le domaine NIRF-N de l'UHRF1 de la souris est impliqué dans l'interaction avec la DNMT1 (Bostick et coll., 2007 ; Hashimoto et coll., 2009). Trois régions de la DNMT1 ont été démontrées pour être impliquées dans cette interaction, à savoir les résidus d'acides aminés 1- 446, 1081-1408 et 401-615 (Hashimoto et coll., 2009; Bostick et coll., 2007; Achour et coll., 2008). La raison de ces différences n'est pas encore claire mais cela pourrait provenir des différences spécifiques entre les espèces (Bronner et coll., 2009). Une autre possibilité est que lors de la réaction catalytique de la méthylation de l'ADN, l'UHRF1 interagit avec la DNMT1 par différents domaines (Bronner et coll., 2009). Il a été proposé que l'UHRF1 est un facteur de fidélité de la DNMT1 (Bostick et coll., 2007 ; Bronner et coll., 2009). En effet, l'interaction domaine SRA-ADN pourrait servir d'ancrage pour maintenir l'UHRF1 sur un site CpG hémi-méthylé où elle recruterait la DNMT1 pour la méthylation de l'autre brin de l'ADN (Hashimoto et coll., 2009). Un modèle attrayant est que l'UHRF1 pourrait glisser le long de l'ADN afin de détecter les CpGs hémiméthylés et le cas échéant, un "message" serait transmis à la DNMT1, par un mécanisme encore inconnu, pour que celle-ci entre en action (Bronner et coll., 2009). En effet, il a été suggéré que l'UHRF1 pourrait glisser le long de l'ADN, et que ce glissement est bloqué par le [«] base flipping-mechanism [»] par le domaine SRA (Arita et coll., 2008 ; Hashimoto et coll., 2008). Lorsque la DNMT1 entre justement en action, l'UHRF1 devrait se dissocier des sites CpGs et se préparer à chercher d'autres sites hémi-méthylés (Bronner et coll., 2009). En outre, le fait que ces deux protéines facilement co-immunoprécipitent (Bostick et coll., 2007 ; Achour et coll., 2008) suggèrent que la DNMT1 et l'UHRF1 ne se dissocient pas l'unes de l'autre au cours du cycle catalytique (Bronner et coll., 2009). Il a été proposé que le complexe UHRF1/DNMT1 déplace le long de l'ADN pendant la réplication du code épigénétique à la fourche de la réplication de l'ADN (Bronner et coll., 2009). L'UHRF1 et la DNMT1 utilisent probablement différents domaines d'interaction entre elles et avec d'autres partenaires de manière spatio-temporelle qui pourraient être déterminés par l'UHRF1 si elle est ancrée ou non à la « cytosine-methylated-flipped » (Bronner et coll., 2009). Ces domaines d'interaction pourraient également être influencés par l'activité de ses partenaires ou par leurs modifications post-traductionnelles (e.g. acétylation de la DNMT1). Peut-être, différents domaines d'interactions entre l'UHRF1 et la DNMT1 entrent en jeu selon qui est liée ou non aux CpGs hémi-méthylés, ce qui serait compatible avec des études démontrant différents domaines de la DNMT1 associent avec le domaine PHD ou SRA de l'UHRF1 (Bronner et coll., 2009). Il reste à étudier quels domaines de l'UHRF1 et de la DNMT1 interagissent les uns avec les autres dans la présence ou l'absence de l'ADN hémi-méthylé et complètement méthylé (Bronner et coll., 2009). Compatible avec l'hypothèse d'ECREM « Epigenetic Code REplication Machinery[»], qui propose l'existence d'un mécanisme épigénétique qui duplique les marques (Bronner et coll., 2007b), la DNMT1 et l'UHRF1 pourraient être localisées dans un seul complexe macromoléculaire de façon constitutive (Bronner et coll., 2009).

Cette idée a trouvé récemment un support de poids dans un article de Du et coll., (2010) qui a montré que l'UHRF1, la DNMT1, la Tip60, l'HDAC1, et un nouveau partenaire l'HAUSP [«] Herpes virus–Associated Ubiquitin Specific Protease [»] appartiennent au même complexe macromoléculaire qui régule étroitement le taux de la DNMT1. L'UHRF1 et Tip60 agissent en tant que destructeurs de la DNMT1, tandis que l'HAUSP et l'HDAC1 agissent en tant que protecteurs de la DNMT1 (Figure 20). Plus précisément, d'une part, Tip60 acétyle la DNMT1, qui sert comme déclencheur de l'ubiquitination de la DNMT1 par l'UHRF1. D'autre part, l'HDAC1 et l'HAUSP protégent la DNMT1 par désacétylation et déubiquitination (Figure 20) (Du et coll., 2010). Cette découverte soulève la question si l'UHRF1 contient un domaine structural qui peut détecter la présence d'un ou plusieurs acides aminés acétylés sur la DNMT1 (Bronner, 2011b). L'existence d'un tel domaine ne serait pas surprenante, car l'UHRF1 peut lire les modifications épigénétiques par les domaines SRA et TTD (Bronner, 2011b). Considérant que Tip60 est dans le même complexe macromoléculaire que l'UHRF1, qui contrôle son activité d'acétylation (Achour et coll., 2009), il est probable que l'UHRF1 possède un domaine qui peut détecter la forme acétylée de la DNMT1 (Bronner, 2011b). Du et coll., (2010) décrivent également l'équilibre entre les destructeurs et les protecteurs de la DNMT1 durant le cycle cellulaire. Ils ont proposé que pendant la phase S quand la DNMT1 est nécessaire pour la méthylation des brins de l'ADN nouvellement synthétisés, l'HAUSP agit contre l'activité de l'ubiquitine-ligase de l'UHRF1. Quand la phase S progresse, il semble que l'HAUSP doit être retirée du complexe pour une dégradation ultérieure de la DNMT1 dépendante de l'ubiquitination par le protéasome (Figure 20). La dégradation de la DNMT1 est déclanchée par l'acétylation par Tip60. L'existence de cet équilibre a été confirmée par Qin et coll., (2011). La question qui se pose est, quel signal dit à l'UHRF1 de contrer l'activité de l'HAUSP et, inversement, quel signal indique à l'HAUSP de contrer l'activité de l'UHRF1? Le signal vient probablement de l'environnement dans lequel la machinerie ECREM évolue (Bronner, 2011b). Le signal pourrait venir des modifications post-traductionnelles des histones. On peut imaginer qu'une H3K9 méthylée pourrait freiner l'ubiquitination de la DNMT1 par l'UHRF1, permettant ainsi à l'HAUSP de jouer son rôle de protecteur de la DNMT1. Inversement, en l'absence de la H3K9 méthylée, l'activité de l'UHRF1 surmonte



celle de l'HAUSP et, par conséquent, dirige la DNMT1 vers le protéasome pour la dégradation (Bronner, 2011b).

Figure 20: L'équilibre entre les destructeurs et les protecteurs de la DNMT1 durant le cycle cellulaire. Pendant la phase S quand la DNMT1 est nécessaire pour la méthylation des brins de l'ADN nouvellement synthétisés, l'HAUSP agit contre l'activité de l'ubiquitine-ligase de l'UHRF1. Quand la phase S progresse, il semble que l'HAUSP doive être retirée du complexe pour une dégradation ultérieure de la DNMT1 dépendante de l'ubiquitination par le protéasome. La dégradation de la DNMT1 est déclanchée par l'acétylation par Tip60. D'après Bronner, 2011b.

L'augmentation de l'activité de l'HDAC1 au niveau de la fourche de réplication conserve probablement la DNMT1 sous une forme non-acétylée, empêchant sa dégradation et s'opposant ainsi à l'activité de Tip60 (Bronner, 2011b). Il est possible également que la DNMT1 subisse plusieurs sortes d'ubiquitination, qui ne seraient pas tous des signaux de dégradation et pourraient momentanément réprimer l'activité de la DNMT1 afin d'éviter la méthylation sur des sites non-désirés ou pour empêcher des méthylations inexactes de l'ADN (Bronner, 2011b).

Une étude récente suggère que les îlots CpGs hémi-méthylés sont des intermédiaires dans la déméthylation active au cours de la cancérogénèse et pas seulement dus à une défaillance de la méthylation de maintenance lors de la synthèse de l'ADN (Shao et coll., 2009). Considérant que l'UHRF1 est capable de détecter la présence de l'ADN hémi-méthylé et par la suite à recruter la DNMT1, il est surprenant de constater que les sites de l'ADN hémi-méthylé persistent dans les cellules en considérant que: (i) l'UHRF1 est supposée de les détecter avec le recrutement subséquent de la DNMT1; (ii) l'UHRF1 augmente fortement l'affinité de la DNMT1 pour l'ADN hémi-méthylé pour assurer la transmission fidèle des patrons de méthylation (iii) l'UHRF1 et la DNMT1 sont surexprimées dans les cellules cancéreuses, ce qui devrait réduire le nombre de sites CpGs hémi-méthylés (Bronner et coll., 2009). Une piste intéressante est que dans les cellules cancéreuses, une altération des interactions de l'UHRF1 et la DNMT1 a été observée (Hervouet et coll., 2008). En effet, Hervouetet coll., (2009) ont observé moins de complexes UHRF1/DNMT1 dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non-cancéreuses ce qui pourrait être un mécanisme plausible pour expliquer l'état de l'hypométhylation globale de l'ADN des cellules cancéreuses. Cependant, cela reste à confirmer. Par conséquent, il est possible que la transmission du code épigénétique régulée par l'UHRF1 soit susceptible d'être légèrement « infidèle » au cours de la pathogenèse cancéreuse (Bronner et coll., 2009).

1.2 Rôle de l'UHRF1 dans la méthylation et l'acétylation des histones

Karagianni et coll., (2008) ont montré que l'UHRF1 est capable d'interagir avec H3K9me3 via son domaine PHD suggérant que l'UHRF1 assure un lien physique entre la méthylation des histones via le domaine PHD et la méthylation de l'ADN via son domaine SRA. Leurs résultats définissent le domaine PHD comme facteur déterminant fondamental pour la liaison de l'UHRF1 à l'H3K9me3. La co-localisation de l'UHRF1 avec l'hétérochromatine péricentromérique dépend de ses interactions avec l'ADN hémi-méthylé et avec l'H3K9me3. De plus, il a été proposé que l'interaction UHRF1-H3K9me3 favorise l'ubiquitination de la chromatine (Karagianni et coll., 2008). Cet évènement pourrait être un signal pour recruter les autres acteurs du code épigénétique comme les méthyltransférases et les désacétylases ce qui favorise la formation de l'hétérochromatine (Karagianni et coll., 2008). En outre, le domaine TTD de l'UHRF1 reconnaît préférentiellement H3K4me0/K9me3 dans le même peptide (Nady et coll., in press). L'ensemble de ces travaux montre que l'UHRF1 joue un rôle fondamental dans la méthylation des histones. De plus, plusieurs boucles de «feedback» positives semblent se produire pendant les signalisations épigénétiques. En effet, la méthylation de l'ADN est capable d'induire la méthylation de H3K9 qui pourrait déclencher des méthylations additionnelles de l'ADN (Figure 21). Ce comportement pourrait augmenter l'efficacité de la régulation épigénétique réprimant l'expression génique d'une manière plus efficace c'est-à-dire moins réversible. La méthylation de H3K9 est un signal pour la fixation de HP1 qui recrute la DNMT1 pour méthyler les régions correspondantes de l'ADN (Figure 12A & 15B). Cette coopération est fondamentale dans l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine et plus généralement dans le [«] silencing [»] génique (Lachner et coll., 2001; Nakayama et coll., 2001; Jacobs et Khorasanizadeh, 2002).



Figure 21: Boucle de renforcement entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9. La méthylation de l'ADN conduit au recrutement des protéines MBD (MeCP2 pour être précis) qui interagissent avec une méthyltransférase de la lysine 9 de l'histone H3. La méthylation d'H3 permet la liaison d'HP1 à la lysine 9 méthylée. Par son association aux DNMTs, HP1 boucle le cycle en permettant la méthylation de l'ADN. D'après Deplus, 2005.

Il a été montré que l'UHRF1 interagit avec l'histone lysine méthyltransférase G9a qui catalyse *in vivo* la diméthylation de H3K9 dans l'euchromatine (Kim et coll. 2009). Cela pourrait être par le biais du TTD de l'UHRF1 qui est capable d'interagir avec l'histone H3K9me3 et avec l'histone H3K4 non-modifiée dans le même peptide (Hashimoto et coll., 2009 ; Nady et coll., in press). Il a été proposé que l'UHRF1 est capable de lire H3K9me2/3 dans la molécule d'histone parentale et ensuite de recruter ou diriger la G9a pour générer H3K9me2/3 sur une autre histone nouvellement déposée (Bronner et coll., 2009). Ce mécanisme serait compatible avec les caractéristiques de base de la machinerie de la réplication, à savoir qu'elle peut lire un code spécifique et peut écrire ce même code. Un modèle a été proposé dans lequel une partie de l'UHRF1 travaille à l'interface des histones et

une autre partie travaille à l'interface de l'ADN (Figure 22), en détectant la présence de l'ADN hémi-méthylé et la méthylation de la H3K9 par le domaine SRA et les domaines TTD, respectivement. L'UHRF1 dirige ensuite ses partenaires enzymatiques c'est-à-dire la DNMT1, l'HDAC1, Tip60, Suv39H1 et la G9a pour exercer leurs activités catalytiques sur le brin de l'ADN nouvellement synthétisé ou sur les histones nouvellement déposées au niveau de la fourche de réplication (Bronner et coll., 2009). Si les domaines TTD et SRA lient leurs ligands simultanément, cela suggèrerait que l'UHRF1 sert de guide à la fois pour la G9a et la DNMT1 pour trouver leurs cibles simultanément (Bronner et coll., 2009). Ceci est cohérent avec des travaux montrant que la G9a et la DNMT1 sont dans le même complexe (Estève et coll., 2006). Une autre question intéressante: quel est le rôle de l'activité de l'ubiquitination de l'UHRF1? Est-ce que l'UHRF1 ubiquitine préférentiellement l'histone H3 sous sa forme méthylée ou non méthylée? La réponse à cette question peut révéler un lien entre l'ubiquitination des histones, la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones H3.



Figure 22: Modèle proposé de l'organisation spatiale de l'UHRF1 à l'interface entre l'ADN et les histones. Les interactions entre les domaines de l'UHRF1 avec ses différents partenaires sont illustrées. Les cytosines méthylées et non méthylées sont symbolisées par des cercles noirs et des cercles ouverts, respectivement. Les groupes méthyles sont représentés par des "Me " et la lysine 9 de l'histone H3 par "H3K9". E2 est une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine qui interagit avec le domaine RING de l'UHRF1. D'après Bronner et coll., 2009

L'UHRF1 est impliquée dans tous ces événements et coordonne probablement un complexe macromoléculaire capable de catalyser toutes séries de ces événements, à savoir la désacétylation des histones (via HDAC1), la méthylation des histones (via G9) et la méthylation de l'ADN (via DNMT1) (Bronner et coll., 2009). Une meilleure compréhension de la structure de ce complexe en particulier par rapport à la fourche de la réplication permettra non seulement de révéler des mécanismes épigénétiques de la réplication, mais aussi d'évaluer le modèle de la chronologie actuelle de la transmission à la descendance des marques épigénétiques (Bronner et coll., 2009).

Nos résultats ont montré que Tip60 est un nouveau partenaire à l'UHRF1, DNMT1 et HDAC1 dans le complexe macromoléculaire impliqué dans la réplication du code épigénétique ECREM (Achour et coll., 2009). De plus, l'UHRF1 interagit avec RbAp48 (Retinoblastoma binding protein) (Bronner et coll., 2002). Il a été démontré que RbAp48 interagit avec HDAC1, HDAC2 et HDAC3 (Nicolas et coll., 2001). RbAp48 pourrait favoriser la désacétylation des histones étant donné qu'elle interagit directement avec l'histone H4. Tip60 est une HAT, ce qui suggère que l'UHRF1 participerait à un complexe comportant des HDACs et des HATs avec des fonctions de transmission du code épigénétique et/ou de la réparation de l'ADN génomique (Achour et coll., 2009). On peut imaginer que lors de l'assemblage des nucléosomes, des histones acétylées sont incorporées au niveau de la fourche de la réplication et peut donc déclencher l'activité de l'HDAC1 pour enlever un excès de groupements acétyles (Bronner, 2011b). Le « knock-down » de l'expression de l'UHRF1 ou de la DNMT1 par RNA interférence augmente l'expression de Tip60 alors qu'il diminue significativement le niveau de l'acétylation de H2AK5 (Achour et coll., 2009). Nos résultats montrent que l'acétylation de l'H2AK5 est dépendante de la présence de l'UHRF1 (Figure 23), suggérant que l'acétylation de H2A et la méthylation de l'ADN sont bien corrélées. Tip60 et l'acétylation de H2A sont impliquées dans la stabilité génomique (Squatrito et coll., 2006 ; Bhaumik et coll., 2007 ; Kusch et coll., 2004 ; Sapountzi et coll., 2006). Le rôle de l'UHRF1 dans la stabilisation du génome est donc interprété par sa capacité à recruter Tip60 pour réguler l'acétylation de H2A.



Figure 23: L'UHRF1 recrute Tip60 et contrôle son expression et son activité. Tip60 est un nouveau partenaire de l'UHRF1, de la DNMT1 et de l'HDAC1 dans le complexe macromoléculaire impliqué dans la réplication du code épigénétique [«] ECREM ^{».} L'UHRF1 se fixe au promoteur de $p14^{ARF}$ et contrôle négativement son expression. L'UHRF1 et la DNMT1 contrôlent l'expression de Tip60 et l'acétylation de H2A. Le produit du gène suppresseur de tumeur $p14^{ARF}$ contrôle positivement l'expression de Tip60, suggérant que l'expression de Tip60 est régulée par l'UHRF1/DNMT1 sous le contrôle de $p14^{ARF}$.

Nos résultats ont mis en évidence un contrôle direct de l'UHRF1 sur l'expression du gène *Tip60*. Nous avons observé que la DNMT1 contrôle l'expression de Tip60 et l'acétylation de H2A (Achour et coll., 2009). Considérant que le gène *UHRF1* est sous le contrôle de DNMT1 (Achour et coll., 2008), nous avons suggéré que la DNMT1 contrôle l'expression de Tip60 par l'intermédiaire de l'UHRF1 (**Figure 23**).

La surexpression de Tip60 dans les cellules HCT 116 provoque l'apoptose (Mattera et coll., 2009). Des propriétés anti-apoptotiques ont été observées pour l'UHRF1 (Abbady et coll., 2005). Par conséquent, nous proposons que les effets apoptotiques de Tip60 pourraient être régulés par l'UHRF1 en contrôlant son expression et/ou activité (Achour et coll., 2009). Il a été démontré que le gène suppresseur de tumeur $p14^{ARF}$ contrôle positivement l'expression de Tip60 (Eymin et coll., 2006). L'UHRF1, se fixant au promoteur de $p14^{ARF}$ (Unoki et coll., 2004), on peut raisonnablement suggérer que l'expression de Tip60, régulée par l'UHRF1, serait sous le contrôle du gène $p14^{ARF}$ (Achour et coll., 2009) (Figure 23).

En outre, la dégradation de la DNMT1 est déclenchée par l'acétylation par Tip60 comme c'est décrit plus haut. L'UHRF1 et Tip60 agissent en tant que destructeurs de la DNMT1, tandis que l'HAUSP et l'HDAC1 agissent en tant que protecteurs de la DNMT1 (**Figure 20**). En fait, Tip60 acétyle la DNMT1, qui sert comme déclencheur de l'ubiquitination de la DNMT1 par l'UHRF1. L'HDAC1 et l'HAUSP protégent la DNMT1 par désacétylation et déubiquitination (Du et coll., 2010 ; Qin et coll., 2011).

1.3 Rôle de l'UHRF1 dans l'ubiquitination des histones

L'UHRF1 semble de remplir la qualité d'une enzyme ayant la capacité d'ubiquitiner les histones. En fait, l'UHRF1 appartient à une famille d'E3 ligase dont l'expression est modifiée dans les cellules cancéreuses (Mousli et coll., 2003 Jenkins et coll., 2005). Il est probable que
les histones sont les substrats réels pour les membres de la famille UHRF. Il a été démontré que la Np95 (mUHRF1) possède une activité ubiquitine-ligase pour les histones H2A, H2B, H3, *in vitro* et *in vivo*, avec une préférence pour l'histone H3 (Citterio et coll., 2004). On peut imaginer que l'UHRF1 recrute le protéasome aux sites où les histones mono-ubiquitinées devraient être éliminées et dégradées.

Les membres de la famille UHRF, comme plusieurs ligases comportant RING Finger (Lorick et coll., 1999 ; Joazeiro et Weissaman, 2000 ; Chen et coll., 2002), ont une activité d'auto-ubiquitination *in vitro* (Mori et coll., 2002 ; Citterio et coll., 2004 ; Jenkins et coll., 2005). Le rôle de cette auto-ubiquitination reste inconnu (Bronner et coll., 2011a). Cependant, il est probable qu'à côté de l'auto-ubiquitination, la famille de l'UHRF ubiquitine d'autres protéines que les histones comme PEST qui est un substrat pour NIRF (hUHRF2) (Mori et coll., 2004).

La mono-ubiquitination des histones pourrait se produire, dans la cancérogénèse, dans les environs des gènes suppresseurs de tumeurs, comme RB1, $p16^{INK4A}$ ou $p14^{ARF}$, selon le type cellulaire, étant donné que l'UHRF1 se fixe aux promoteurs méthylés des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses. Il a été proposé que la répression des gènes suppresseurs de tumeurs par la famille de l'UHRF se produise via la mono-ubiquitination des histones H2A et/ou H2B alors que l'activation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs se produise par la mono-ubiquitination des histones H3 et/ou H4 (Bronner et coll., 2007a). Cette hypothèse a naturellement besoin de plus d'investigations.

En conclusion, nous avons trouvé que toutes les machineries de la réplication du code épigénétique se connectent les unes avec les autres pour assurer une duplication fidèle du code épigénétique. On peut imaginer que le complexe UHRF1/DNMT1 est capable à lier tous les acteurs du code épigénétique épigénétique et à les diriger pour jouer leur rôle dans la transmission des informations épigénétiques (**Figure 24**).



Figure 24: Interconnexion des différentes machineries de la réplication du code épigénétique. Les flèches noires représentent les associations bien établies, les flèches gris foncée représentent les associations établies mais à confirmer et les grises claires les associations à établir.

1.4 Transmission du code épigénétique ou transmission de la «mémoire cellulaire »

Les mécanismes de la transmission épigénétique sont d'une importance cruciale (Bronner et coll., 2011a). En effet, l'échec du maintien des états méthylés ou non-méthylés des cytosines pourrait conduire à des épimutations générant ainsi des maladies (Hansen et coll., 1992 ; Hansen et coll., 1999 ; Baylin et coll., 1998).

Il est probable que la méthyltransférase majeure de l'ADN qui est impliquée dans la réplication des patrons de méthylation de l'ADN est la DNMT1 considérant qu'il n'y a pas de méthylation de novo pendant la réplication de l'ADN. La première fonction pour la DNMT1 est d'assurer que les patrons de méthylation de l'ADN soient fidèlement transmis d'une cellule parentale à chaque cellule fille. Cela est assuré par la capacité de la DNMT1, avec l'aide de l'UHRF1 bien sûr, à accepter l'ADN hémi-méthylé comme substrat et par la suite à méthyler le brin de l'ADN nouvellement synthétisé. Tous les deux brins de l'ADN avant la réplication sont symétriquement méthylés donc les doubles brins des cellules filles doivent être symétriquement méthylés (Bronner et coll., 2011a). La DNMT1 participe dans un complexe multi-protéique de la réplication de l'ADN, qui pourrait faire des erreurs, comme cela se produit pour l'ADN polymérase. Il a été posé la question si cela pouvait également arriver pour la DNMT1 (Momparler, 2003). Si c'est le cas, cela pourrait avoir deux conséquences. La première est que derrière ces erreurs il y a un système de réparation de la méthylation de l'ADN. La deuxième est que ces erreurs pourraient participer aux patrons aberrants de la méthylation de l'ADN qui apparaissent avec l'âge (Issa, 1999 ; Macaluso et Giordano, 2004) ou dans une pathologie comme le cancer (Momparler, 2003). Mortusewicz et coll., (2005) ont supposé que la DNMT1 participe à la réparation du code épigénétique. En fait, la DNMT1 et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sont recrutées aux sites endommagés de l'ADN, 20 minutes après l'irradiation utilisant un système de microirradiation (Mortusewicz et coll., 2005). On pourrait imaginer que le recrutement de la DNMT1 au niveau de ces sites impliquerait l'intervention du facteur de fidélité l'UHRF1 (Avvakumov et coll., 2008; Bronner et coll., 2011a)).

Comment peut-on imaginer que le code histone pourrait être répliqué lors de la prolifération cellulaire? L'assemblage des nucléosomes, portant les modifications des histones requises dans les brins nouvellement synthétisés est essentiel pour la transmission du code

épigénétique à la descendance. Cet assemblage est dépendant de l'interaction de la chaperonne de l'histone CAF-1 avec PCNA (Shibahara et Stillman, 1999). Une possibilité est que les patrons de méthylation de l'ADN servent de signaux au code histone tandis que la deuxième possibilité est qu'il existe une matrice du code histone qui serait utilisée pour la duplication (Bronner et coll., 2011a). La première possibilité est improbable considérant la question suivante : comment ces informations simples comme la méthylation de l'ADN pourraient reproduire un code tellement complexe avec une large diversité de plus de 150 modifications des histones (Bronner et coll., 2011a). Les MBDs sont impliquées dans la transmission du code épigénétique comme cela a été proposé par Fatemi & Wade, (2006), mais ne seraient pas suffisantes. La question qu'il reste à répondre est : quelles sont les protéines capables de lire le code des histones et comment peuvent-elles communiquer les informations aux effecteurs épigénétiques (HATs, HDACs, HMTs, Histone déméthylases, Histone phosphorylases, E3 ligases...) ? (Bronner et coll., 2011a).

L'UHRF1 possède un domaine PHD, un domaine TTD, un domaine SRA et un domaine RING Finger avec une activité E3 ligase vers les histones (Mousli et coll., 2003 ; Citterio et coll., 2004; Jenkins et coll., 2005 ; Hashimoto et coll., 2009). De plus, l'UHRF1 est capable de recruter l'HDAC1 et la DNMT1 ainsi que d'interagir avec les CpGs méthylés suggérant que l'UHRF1 pourrait appartenir aux lecteurs et régulateurs du code épigénétique. Par conséquent, l'UHRF1 paraît d'avoir deux aptitudes à lire le code histone et à induire des modifications post-traductionnelles des histones (Bronner et coll., 2011a).

La symétrie est essentielle pour une réplication parfaite de l'ADN mais est-ce que la symétrie est indispensable pour la réplication du code histone ? Un fait intrigant est la composition des nucléosomes en termes de protéines (Bronner et coll., 2011a). Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont présentes comme dimères qui pourrait nous permettre de spéculer que pendant la réplication une molécule du dimère se forme de nouveau alors que la deuxième

sert comme de matrice pour la réplication des modifications post-traductionnelles des histones (**Figure 25**). En fait, l'histone H3 et H4 sont déposées comme nucléosomes vierges formant des hétérodimères (Tagami et coll., 2004). Cela suggère l'existence d'une séparation des dimères H3-H4 aux deux brins filles de l'ADN représentant une pièce du puzzle dans la transmission du code épigénétique (Bronner et coll., 2011a). Pourtant, il n'est pas connu si les deux histones jumelles possèdent les mêmes modifications post-traductionnelles (Bronner et coll., 2011a).



Figure 25: Modèle de la Mémoire Cellulaire. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont présentes sous forme de dimères. Pendant la réplication, une molécule de dimère se forme de nouveau alors que le deuxième sert de matrice pour la réplication des modifications post-traductionnelles des histones. L'histone H3 et H4 sont déposées comme nucléosomes vierges formant des hétérodimères. La machinerie de la réplication du code épigénétique [«] ECREM [»] lit les modifications post-traductionnelles sur les queues des histones matrices et ajoute les modifications équivalentes sur les queues des histones vierges. RbAp48: Retionoblastoma binding protein. D'après Bronner et coll., 2007b.

D'une manière très intéressante, il a été récemment proposé trois modèles différents pour la transmission du code histone (Ray-Gallet et Almouzni, 2011). Ils ont proposé que les dimères H3-H4 se forment à partir de particules H3-H4 nouvellement synthétisées ou complètement anciennes ou encore mélangées entre des particules nouvelles et anciennes en fonction de la localisation subcellulaire (**Figure 26**).



Figure 26: Transmission du code épigénétique : la ^{*}**mémoire cellulaire** ^{*}. Les nouveaux nucléosomes résultent des histones H3 et H4 nouvellement synthétisées sous la forme des deux dimères H3-H4, après l'association avec deux dimères H2A-H2B, le résultat est un nucléosome contenant uniquement les nouveaux dimères H3-H4. Les particules mélangées se forment en utilisant un dimère H3-H4 nouvellement synthétisées et un dimère H3-H4 recyclé à partir d'un nucléosome parental. Des nucléosomes anciens se forment soit par l'autoréassociation de deux dimères H3-H4 recyclés à partir d'un nucléosome parental, ou par l'héritage d'un tétramère H3-H4 à partir d'un nucléosome parental. D'après Ray-Gallet et Almouzni, 2010.

Ces études montrent que tous les modificateurs des histones pourraient coexistés dans un grand complexe à un moment précis du cycle cellulaire, par exemple pendant la réplication de l'ADN ou pendant la réparation de l'ADN. Au vu du nombre d'hypothèses formulées, beaucoup de travail reste encore à accomplir pour mieux comprendre d'une part comment le gène *UHRF1* est régulé et d'autre part les mécanismes par lesquels l'UHRF1 exerce son rôle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbady AQ, Bronner C, Bathami K, Muller CD, Jeanblanc M, Mathieu E, Klein JP, Candolfi E, Mousli M. (2005). TCR pathway involves ICBP90 gene downregulation via E2F binding sites. *Biochem Pharmacol* **70**: 570-579.
- Achour M, Jacq X, Rondé P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB, Bronner C. (2008). The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene* 27: 2187-2197.
- Achour M, Fuhrmann G, Alhosin M, Rondé P, Chataigneau T, Mousli M, Schini-Kerth VB Bronner C. (2009). UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. *Biochem Biophys res Commun* 390: 523-528.
- Anderson KC. (2007). Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. *Exp Hematol* **35**: 155–162.
- Aparicio A, Weber JS. (2002). Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors. *Curr Opin Investig Drugs* **3**: 627-633.
- Arents G, Moudrianakis E. (1995). The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 11170-11174.
- Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S, Ishikawa H, Saya H. (2004). Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* 9: 131-142.
- Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Nakamura Y, Shirakawa M. (2008). Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* **455**: 818–821.
- Auriol E, Billard LM, Magdinier F, Dante R. (2005). Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res* 33: 4243–4254.
- Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S. (2008). Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**: 822-825.
- Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* **276**: 32282-32287.
- Bakin AV, Curran T. (1999). Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* **283**: 387-390.
- Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen RB. (2001). The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res* 29: 4319–4333.
- Baxevanis AD, Arents G, Moudrianakis EN, Landsman D. (1995) A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucl Acids Res* 23: 2685-2691.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res 72: 141-196.
- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1008-1016.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125: 315–326.
- Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rümmele P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstädter F, Dietmaier W. (2005). Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol* **205**: 606–614.
- Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L, Dante R. (2002). MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* **21**: 2704-2712.

Bird A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.

- Bird AP, Wolffe AP. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. Cell 99: 451-454.
- Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**: 1760-1764.
- Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**: 1361-1373.
- Boyes J, Bird A. (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64:** 1123-1134.
- Breiling A, Orlando V. (2002). SET domain proteins reSET gene expression. Nat Struct Biol 9: 894-896.
- Bronner C, Hopfner R, Mousli M (2002). Transcriptional regulation of the topoisomerase IIalpha gene. *Anticancer Res* 22: 605-612.
- Bronner C, Achour M, Arima Y, Chataigneau T, Saya H, Schini-Kerth VB. (2007a). The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol Ther* **115**: 419–434.
- Bronner C, Chataigneau T, Schini-Kerth VB, Landry Y. (2007b). The "Epigenetic Code Replication Machinery", ECREM: a promising drugable target of the epigenetic cell memory. *Curr Med Chem* **14**: 2629-2641.
- Bronner C, Fuhrmann G, Chédin FL, Macaluso M, Dhe-Paganon S. (2009). UHRF1 links the histone code and DNA methylation to ensure faithful epigenetic memory inheritance. *Genet Epigenet* **2** : 29–36.
- Bronner C, Achour M₂ Chataigneau T and Schini-Kerth VB. "Epigenetic control of gene transcription" (Epigenetics and Gene Transcription. Section III). Cancer Epigenetics: Biomolecular Therapeutic in Human Cancer (Editors A. Giordano and M Macaluso), by Wiley-Blackwell Health Sciences, June 2011a.
- Bronner C. (2011b). Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code. *Sci Signal* **4**: 1-3
- Bryk M, Briggs SD, Strahl BD, CurcioMJ, Allis CD, Winston F. (2002) Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in S. cerevisiae by a Sir2- independent mechanism. *Curr Biol* **12**: 165-170.
- Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, Sixma TK. (2006). Structure and E3 ligase activity of the Ring–Ring complex of Polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* **25**: 2465-2474.
- Cairns BR. (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461: 193–198.
- Callebaut I, Mornon JP. (1997) The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in Drosophila melanogaster development. *Biochem J* **321**: 125-132.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**: 103-107.
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043.
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**: 675-679.
- Cheng HL, Chow NH, Tzai TS, Tong YC, Lin JS, Chan SH, Yang WH, Chang CC, Lin YM. (1997). Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Anticancer Res* **17**: 2789-2793.
- Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. (2006). A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* **95**, 961–965.
- Charier G, Couprie J, Alpha-Bazin B, Meyer V, Quéméneur E, Guérois R, Callebaut I, Gilquin B, Zinn-Justin S. (2004). The Tudor tandem of 53BP1: a new structural motif involved in DNA and RG-rich peptide binding. *Structure* **12**: 1551-1562.

- Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, Dante R. (2009). Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. *Carcinogenesis* **30**: 28-34.
- Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16916-16921.
- Chen C, Seth AK, Aplin AE. (2006). Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Mol Cancer Res* **4**: 695–707.
- Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. (2002). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* **277**: 38746-38754.
- Cheng X, Blumenthal RM. (2008). Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* **16**: 341-350.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* **95**: 399-409.
- Chew YC, Camporeale G, Kothapalli N, Sarath G, Zempleni J. (2006). Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase. *J Nutr Biochem* **17**: 225-233.
- Chi AS, Bernstein BE. (2009). Developmental biology. Pluripotent chromatin state. Science 323, 220–221.
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277: 1996-2000.
- Citterio E, Papait R, Nicassio F, Vecchi M, Gomiero P, Mantovani R, Di Fiore PP, Bonapace IM. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 24: 2526-2535.
- Cress WD, Seto E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. J Cell Physiol 184: 1-16.
- Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, Capurso G, Lattimore S, Akada M, Sunamura M, Prime W, Campbell F, Brentnall TA, Costello E, Neoptolemos J, Lemoine NR. (2005). Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* **129**: 1454-1463.
- Dalgarno DC, Botfield MC, Rickles RJ. (1997) SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* **43**: 383-400.
- Daniel JM, Reynolds AB. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc Finger transcription factor. *Mol Cell Biol* **19**: 3614-3623.
- Datta J, Ghoshal K, Sharma SM, Tajima S, Jacob ST. (2003). Biochemical fractionation reveals association of DNA methyltransferase (Dnmt) 3b with Dnmt1 and that of Dnmt 3a with a histone H3 methyltransferase and Hdac1. *J Cell Biochem* **88**: 855-864.
- DeLange RJ, Fambrough DM, Smith EL, Bonner J. (1969). Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of epsilon-N-acetyllysine. *J Biol Chem* 244: 319-334.
- Deplus R. (2005). Étude des mécanismes moléculaires par lesquels les méthyltransférases de l'ADN établissent les profils de méthylation. Directeur de thèse: Dr. François FUKS, Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine, Laboratoire de Virologie Moléculaire.
- Detich N, Theberge J, Szyf M. (2002). Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. J Biol Chem 227: 35791-35794.
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**: 1079-1082.
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Acosta CL, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* **41**: 1350–1353.

- Duan Q, Chen H, Costa M, Dai W. (2008). Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis. *J Biol Chem* **283**: 33585–33590.
- Du LL, Nakamura TM, Russell P.(2006) Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes Dev* **20**:1583-1596.
- Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, Kao HY, Xu Y, Willis J, Markowitz SD, Sedwick D, Ewing RM, Wang Z. (2010). DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* **3**: 1-10.
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**: 455.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**: 457-463.
- Ernst J, Kellis M. (2010). Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol* 28: 817–825.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. (2000). Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**: 1350-1354.
- Esteller M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene 21: 5427–5440.
- Esteller M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286–298.
- Esteller M. (2008). Epigenetics in evolution and disease. Lancet 372: S90-S96.
- Estève PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev* **20**: 3089–3103.
- Estève PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranayake M, Horwitz GA, Jacobsen SE, Pradhan S. (2009). Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 5076–5081.
- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. (2004). Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* **164**: 689-699.
- Eymin B, Claverie P, Salon C, Leduc C, Col E, Brambilla E, Khochbin S, Gazzeri S. (2006). p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **26**: 4339–4350.
- Ezhkova E, Tansey WP. (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* **13**: 435-442.
- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* **279**: 52812-52815.
- Fakan S, Leduc Y, Lamarre D, Brunet G, Poirier GG. (1988). Immunoelectron microscopical distribution of poly(ADP-ribose)polymerase in the mammalian cell nucleus. *Exp Cell Res* **179**: 517–526.
- Fatemi M, Wade PA. (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. J Cell Sci 119: 3033-3037.
- Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**: 89-92.
- Feng Q, Zhang Y. (2001). The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15: 827-832.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ,

Plass C, Esteller M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 10604-10609

- Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M. (2000). Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* **20**: 5107-5118.
- Fujimori A, Matsuda Y, Takemoto Y, Hashimoto Y, Kubo E, Araki R, Fukumura R, Mita K, Tatsumi K, Muto M. (1998). Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation. *Mamm Genome* 12: 1032–1035.
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24: 88-91.
- Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T (2001). Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J* 20: 2536-2544.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. (2003a). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**: 2305-2312.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. (2003b). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J Biol Chem 278: 4035-4040.
- Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* **31**: 175–179.
- Gallais R, Demay F, Barath P, Finot L, Jurkowska R, Le Guével R, Gay F, Jeltsch A, Métivier R, Salbert G. (2007). Dnmt3s associate with the nuclear orphan receptor COUP-TFI during gene activation. *Mol Endocrinol* **21**: 2085-2098.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300**: 489-492.
- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. (2004). DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 544-555.
- Gershey EL, Haslett GW, Vidali G, Allfrey VG. (1969). Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions. *J Biol Chem* **244**: 4871-4877.
- Ghazi H, Gonzales FA, Jones PA. (1992). Methylation of CpG-island containing genes in human sperm, fetal and adult tissues. *Gene* **114**: 203-210.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* **2**: 151-163.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228**: 187-190.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**: 395-398.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**: 395-398.
- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* **55**: 4531-4535.
- Gowher H, Jeltsch A. (2004). Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **3**: 1062-1068.
- Grenon M, Costelloe T, Jimeno S, O'Shaughnessy A, Fitzgerald J, Zgheib O, Degerth L, Lowndes NF. (2007). Docking onto chromatin via the Saccharomyces cerevisiae Rad9 Tudor domain. *Yeast* 24: 105-119.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**: 77-88.

- Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, Rabbani SA. (2002). Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem* **277**: 41571-41579.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Bio* **6**: 731-740.
- Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep* **8**: 851-857.
- Hande KR. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 173-184.
- Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, Laird CD. (1992). Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1: 571-578.
- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. (1999). The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14412-14417.
- Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Cheng X. (2009). UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. *Epigenetics* **4**: 8-14.
- Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, Jacobsen SE, Cheng X. (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455:826-829.
- Heir R, Ablasou C, Dumontier E, Elliott M, Fagotto-Kaufmann C, Bedford FK. (2006). The UBL domain of PLIC-1 regulates aggresome formation. *EMBO Rep* **7**: 1252–1258.
- Hellman A, Chess A. (2007). Gene body-specific methylation on the active X chromosome. Science 315: 1141–1143.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6870-6875.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. (1996). Hypermethylation associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 56: 722-727.
- Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Vallette F, Cartron PF. (2008). Tumor induction by disruption of the Dnmt1, PCNA and UHRF1 interactions. *Nature Precedings*. hdl:10101/ npre.2008.2509.1:Posted 13 Nov 2008.
- Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron PF. (2010). Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One* **5**: e11333.
- Hess JL. (2004). Mechanisms of transformation by MLL. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 14: 235-254.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983-1993.
- Hendrich B, Bird A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-6547.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2571-2587.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278: 31717-31721.
- Hopfner R, Mousli M, Garnier JM, Redon R, du Manoir S, Chatton B, Ghyselinck N, Oudet P, Bronner C. (2001). Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of the topoisomerase IIα gene expression. *Gene* **266:** 15-23.
- Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C, Bellocq JP, Oudet P, Bronner C. (2000). ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIα expression. *Cancer Res* **60**: 121-128.

- Hopfner R, Mousli M, Oudet P, Bronner C. (2002). Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase IIα expression. *Anticancer Res* **22**: 3165-3170.
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**: 406-411.
- Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T. (2002). PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* **7**: 997-1007.
- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y. Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis. *Cell* **102**: 463-473.
- Im H, Park C, Feng Q, Johnson KD, Kiekhaefer CM, Choi K, Zhang Y, Bresnick EH. (2003). Dynamic regulation of histone H3 methylated at lysine 79 within a tissue specific chromatin domain. *J Biol Chem* **278**: 18346-18352.
- Issa JP. (1999). Aging, DNA methylation and cancer. Crit Rev Oncol Hematol 32: 31-43.
- Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* **21**: 6236-6245.
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080-2083.
- Jaenisch R, Bird A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33**: 245-254.
- Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreno L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. (2010). Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* **20**: 170-179.
- Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, Abbady AQ, Siffert JC, Mathieu E, Muller CD, Bronner C. (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* **24**: 7337-7345.
- Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. (2006). Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci* **31**: 306-308.
- Jeltsch A. (2006). Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* **301:** 203-225.
- Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, Sharma P, Pearsall D, Warner J, Franci C, Huang B, Huang J, Yam GC, Vistan JP, Pali E, Vialard J, Janicot M, Lorens JB, Payan DG, Hitoshi Y. (2005). Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell* **16**: 5621–5629.
- Jenuwein T, Allis CD. (2001). Translating the histone code. Science 293: 1074-1080.
- Jenuwein T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. Trends Cell Biol 11: 266-273.
- Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K, Derrick JR, Matthew AI, Thomas S, Holger K, Lena H, George QD, Irving LW, Andrew PF. (2010). Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* **467**: 338–342.
- Joazeiro CA, Weissman AM. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**: 549–552.
- Jones PA, Baylin SB. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 3: 415-428.
- Jones PA, Liang G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. Nat Rev Genet 10: 805–811.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**: 187-191.
- Kacem S, Feil R. (2009). Chromatin mechanisms in genomic imprinting. Mamm Genome 20: 544–556.

- Kachirskaia I, Shi X, Yamaguchi H, Tanoue K, Wen H, Wang EW, Appella E, Gozani O. (2008). Role for 53BP1 Tudor domain recognition of p53 dimethylated at lysine 382 in DNA damage signaling. *J Biol Chem* **283**: 34660-34666.
- Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C. (2009). DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* **41**: 240–245.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repairdefective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57: 808-811.
- Kang ES, Park CW, Chung JH. (2001). Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 862-868.
- Karagianni P, Amazit L, Qin J, Wong J. (2008). ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Mol Cell Biol* **28**: 705-717.
- Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2926–2931.
- Karpf AR, Jones DA. (2002). Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* **21:** 5496-5503.
- Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. (1999). Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* **93**: 4347-4353.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. Annu Rev Cell Dev Biol 22: 159–180.
- Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. (2002). Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* **21**: 4183-4195.
- Kim JK, Estève PO, Jacobsen SE, Pradhan Sriharsa. (2009). UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **37**: 493-505.
- Kimura H, Nakamura T, Ogawa T, Tanaka S, Shiota K. (2003).Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and independent pathways. *Nucleic Acids Res* **31**: 3101–3113.
- Kishikawa S, Murata T, Ugai H, Yamazaki T, Yokoyama KK. (2003). Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. *Nucleic Acids Res Suppl* **3**: 307-308.
- Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A. (2011). Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8: 200-213.
- Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zempleni J. (2005). Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* **16**: 446-448.
- Kraft E, Bostick M, Jacobsen SE, Callis J. (2008). ORTH/VIM proteins that regulate DNA methylation are functional ubiquitin E3 ligases. *Plant J* 56: 704–715.
- Kuhlmann M, Borisova BE, Kaller M, Larsson P, Stach D, Na J, Eichinger L, Lyko F, Ambros V, Soderbom F, Hammann C, Nellen W. (2005). Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res* **33**: 6405-6417.
- Kunert N, Marhold J, Stanke J, Stach D, Lyko F. (2003). A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in Drosophila. *Development* **130**: 5083-5090.
- Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR 3rd, Abmayr SM, Washburn MP, Workman JL.(2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**: 2084-2087.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.

- Lee DY, Northrop JP, Kuo MH, Stallcup MR. (2006). Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors. *J Biol Chem* **281**: 8476-8485.
- Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. (2005a). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* 26: 147-170.
- Lee WJ, Shim JY, Zhu BT. (2005b). Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol* 68: 1018-1030.
- Leeuwen VF, Gafken PR, Gottschling DE. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**:745-756.
- 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.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**: 905-914.
- 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.
- Li B, Carey M, Workman JL. (2007). The role of chromatin during transcription. Cell 128: 707–719.
- Li E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**: 662-673.
- 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.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**: 315-322.
- Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**: 2453-2455.
- 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**: 1142-1116.
- Lomen PL, Baker LH, Neil GL, Samson MK. (1975). Phase I study of 5-azacytidine (NSC-102816) using 24-hour continuous infusion for 5 days. *Cancer Chemother Rep* **59**: 1123-1126.
- Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, et al. (2005). Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* **36**: 1101–1107.
- Lopez-Serra L, Ballestar E, Ropero S, Setien F, Billard LM, Fraga MF, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Guerrero D, Dante R, Esteller M. (2008). Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene* 27: 3556-3566.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. (1999). RING fingers mediate ubiquitinconjugating enzyme (E2)- dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11364–11369.
- Macaluso M, Cinti C, Russo G, Russo A, Giordano A. (2003). pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene* **22**: 3511-3517.
- Macaluso M, Giordano A. (2004). How does DNA methylation mark the fate of cells? Tumori 90: 367-372.
- Margot JB, Aguirre-Arteta AM, Di Giacco BV, Pradhan S, Roberts RJ, Cardoso MC, Leonhardt H. (2000). Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J Mol Biol* **297**: 293-300.
- Mattera L, Escaffit F, Pillaire MJ, Selves J, Tyteca S, Hoffmann JS, Gourraud PA, Chevillard-Briet M, Cazaux C, Trouche D. (2009). The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* **28**: 1506-1517.

- Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP. (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* 28: 69-74.
- McCabe MT, Davis JN, Day ML. (2005). Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res* **65**: 3624–3632.
- McGrath J, Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**: 179-183.
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. (1999). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**: 499-507.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein B E, Nusbaum C, Jaffe DB. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**: 766–770.
- Mellor J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. Cell 126: 22-24.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**: 686-692.
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G. (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45-50.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436-439.
- Mikkelsen TS, 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: 553–560.
- Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, Bird A. (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* **297**: 403-405.
- Minsky N, Oren M. (2004). The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Mol Cell* **16**: 631-639.
- Minucci S, Pelicci PG. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 38-51.
- Missaoui N, Hmissa S, Dante R, Frappart L. (2010). Global DNA methylation in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Asian Pac J Cancer Prev* **11**: 1741-1744.
- Missaoui N, Hmissa S, Trabelsi A, Traoré C, Mokni M, Dante R, Frappart L. (2011). Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous andcancerous lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract* 207: 37-42.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. (2004). Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 540-545.
- Momand J, Zambetti G P, Olson DC, George D, Levine AJ. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**: 1237–1245.
- Momparler RL. (2003). Cancer epigenetics. Oncogene 22: 6479-6483.
- Mori T, Li Y, Hata H, Kochi H. (2004). NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquitinating PCNP, a PESTcontaining nuclear protein. *FEBS Lett* **557**: 209-214.
- Mori T, Li Y, Hata H, Ono K, Kochi H. (2002). NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 530–536.

- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8905-8909.
- Mousli M, Hopfner R, Abbady AQ, Monte D, Jeanblanc M, Oudet P, Louis B, Bronner C. (2003). ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br J Cancer* **89**:120-127.
- Murray K. (1964). The occurence of epsilon-N-methyl lysine in histores. Biochemistry 3: 10-15.
- Muto M, Kanari Y, Kubo E, Takabe T, Kurihara T, Fujimori A, Tatsumi K. (2002). Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem* **277**: 34549–34555.
- Mutskov V, Felsenfeld G. (2004). Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J* 23: 138–149.
- Nady N, Lemak A, Walker JR, Avvakumov GV, Kareta MS, Achour M, Xue S, Duan S, Allali-Hassani A, Zuo X, Wang YX, Bronner C, Chédin F, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S. (2011). Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1. *J Biol Chem.* In press.
- Nagai H, Naka T, Terada Y, Komazaki T, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Kishimoto T, Konishi N, Nakamura M, Kobayashi Y, Emi M. (2003). Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. *J Hum Genet* **48**: 65-69.
- Nakanishi S, Lee JS, Gardner KE, Gardner JM, Takahashi YH, Chandrasekharan MB, Sun ZW, Osley MA, Strahl BD, Jaspersen SL, Shilatifard A. (2009). Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. J Cell Biol 186: 371–377.
- Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292: 110-113.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. (2004). Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet* **13**: 15-23.
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmler K, Hause G, Aurich AC, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* 24: 1418–1429.
- Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, Herold C, Ocker M. (2007). Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol* **42**: 103-116.
- Nicolas E, Ait-Si-Ali S, Trouche D. (2001). The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Res* **29**: 3131-3136.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16: 479-489.
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* **9**: 1201-1213.
- Noma K, Allis CD, Grewal SI. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**: 1150-1155.
- Nowak SJ, Corces VG. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**: 214-220.
- Nowak SJ, Pai CY, Corces VG. (2003). Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol* 23: 6129-3618.
- Nuovo GJ, Nakagawa H, Sotamaa K, Chapelle Ade L. (2006) Hypermethylation of the MLH1 promoter with concomitant absence of transcript and protein occurs in small patches of crypt cells in unaffected mucosa from sporadic colorectal carcinoma. *Diagn Mol Pathol* **15**:17-23.

- Oba-Shinjo SM, Bengtson MH, Winnischofer SM, Colin C, Vedoy CG, de Mendonca Z, Marie SK, Sogayar MC. (2005). Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 140: 25-33.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**: 1132-1136.
- Ohsawa K, Imai Y, Ito D, Kohsaka S. (1996). Molecular cloning and characterization of annexin V-binding proteins with highly hydrophilic peptide structure. *J Neurochem* **67**: 89-97.
- 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.
- Okano M, Xie S, Li E. (1998a). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**: 219-220.
- Okano M, Xie S, Li E. (1998b). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26: 2536-2540.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**: 714–717.
- Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. (2005). Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem* 16: 74-77.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**: 475-478.
- Papait R, Pistore C, Negri D, Pecoraro D, Cantarini L, Bonapace IM. (2007). Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication and in major satellite silencing. *Mol Biol Cell* **18**: 1098–1106.
- Patra SK, Patra A, Zhao H, Dahiya R. (2002). DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Mol Carcinog* **33**: 163-171.
- Patterson BD, Davies DD. (1969). Specificity of the enzymatic methylation of pea histone. *Biochem Biophys Res Commun* 34: 791-794.
- Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3697-3702.
- Pena 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.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**: 323-337.
- Pogribny IP. (2010). Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. Exp Oncol 32: 132–136.
- Ponger L, Li WH. (2005). Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol* 22: 1119-1128.
- Ponting CP. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. Trends Biochem Sci 22: 51-52.
- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **463**: 1101-1105.
- Pradhan S, Kim GD. (2002). The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity. *EMBO J* 21: 779-788.
- Qin W, Leonhardt H, Spada F. (2011). Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1. *J Cell Biochem* **112**: 439-444.

- Rayasam GV, Wendling O, Angrand PO, Mark M, Niederreither K, Song L, Lerouge T, Hager GL, Chambon P, Losson R. (2003). NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO J* 22: 3153-3163.
- Ray-Gallet D, Almouzni G. (2010). Mixing or Not Mixing. Science 328 : 56-57.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.
- Reale A, Matteis GD, Galleazzi G, Zampieri M, Caiafa P. (2005). Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24: 13–19
- Reik W, Dean W, Walter J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293: 1089-1093.
- Reik W, Lewis A. (2005). Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* **6**: 403–410.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* 12: 1591-1598.
- Rideout III WM, Eggan K, Jaenisch R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093–1098.
- Robert D, Vian B. (2004). 3^{éme} édition. "Le territoire nucléaire : Le nocléoïde des Procaryotes et le noyau des Eucaryotes. Chapitre II". (Les compartiments cellulaires et leurs fonctions. Seconde partie). Éléments de biologie cellulaire, by Doin éditeurs, Groupe Liaison SA.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338-342.
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27: 2291-2298.
- Robertson KD. (2005). DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 6: 597-610.
- Roccaro AM, Hideshima T, Richardson PG, Russo D, Ribatti D, Vacca A, Dammacco F, Anderson KC. (2006). Bortezomib as an antitumor agent. *Curr Pharm Biotechnol* **7**: 441–448.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25: 269-277.
- Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bähler J, Allshire RC, Kouzarides T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**: 603-614.
- Santos-Rosa H, Caldas C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **41**: 2381-2402.
- Sapountzi V, Logan IR, Robson CN. (2006). Cellular functions of TIP60. Int J Biochem Cell Biol 38: 1496-1509.
- Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, Murakami M, Yamazaki I, Tamura Y, Mima T, Satone A, Ide W, Hashimoto I, Kamada H. (2002). Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathol* **19**: 77-81.
- Schaaf GJ, Ruijter JM, van Ruissen F, Zwijnenburg DA, Waaijer R, Valentijn LJ, Benit-Deekman J, van Kampen AHC, B Frank, K Marcel. (2005). Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries. *FASEB J* 19: 404–406.
- Schauber C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K. (1998). Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391: 715-718.
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**: 887–898.
- Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callén E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA, Espejo A, Bedford MT, Nussenzweig A, Busslinger M, Jenuwein T. (2008). A chromatin-wide

transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev* 22: 2048–2061.

- 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: 919-932.
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M. (2001). SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol* **8**: 27-31.
- Shao C, Lacey M, Dubeau L, Ehrlich M. (2009). Hemimethylation footprints of DNA demethylation in cancer. *Epigenetics* **4**: 165–175.
- Shen L, Issa JP. (2002). Epigenetics in colorectal cancer. Curr Opin Gastroenterol 18: 68-73.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96-99.
- 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 YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* **19:** 857-864.
- Shibahara K, Stillman B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96:** 575-585.
- Shilatifard A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**: 243-269.
- Shnider BI, Baig M, Colsky J. (1976). A phase I study of 5-azacytidine (NSC-102816). J Clin Pharmacol 16: 205-212.
- Shukla A, Stanojevic N, Duan Z, Sen P, Bhaumik SR. (2006). Ubp8p, a histone deubiquitinase whose association with SAGA is mediated by Sgf11p, differentially regulates lysine 4 methylation of histone H3 in vivo. *Mol Cell Biol* **26**: 3339-3352.
- Spotswood HT, Turner BM. (2002). An increasingly complex code. J Clin Invest 110: 577-582.
- Squatrito M, Gorrini C, Amati B. (2006). Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 16: 433-442.
- Strahl BD, Allis CD. (2000); The language of covalent histone modifications. Nature 403: 41-45.
- Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 16: 564–571.
- 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.
- Sun YV, Turner ST, Smith JA, Hammond PI, Lazarus A, Van De Rostyne JL, Cunningham JM, Kardia SL. (2010). Comparison of the DNA methylation profiles of human peripheral blood cells and transformed B-lymphocytes. *Hum Genet* **127**:651-658.
- Sun, Y. (2003). Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **2** : 623–629.
- Sun ZW, Allis CD. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104-108.
- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysinepreferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. J Biol Chem 276: 25309-25317.

- Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* 27: 2681-2690.
- Taddei A, Ray-Gallet D, Almouzni G. (2000). Assemblage et remodelage : le nucléosome sous influence. *Med Sci* 16 : 603-610.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**: 51-61.
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. (2006). Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Mol Cell* 24: 827-839.
- Taylor BS, Varambally S, Chinnaiyan AM. (2006). Differential proteomic alterations between localised and metastatic prostate cancer. *Br J Cancer* **95**: 425–430.
- Terranova R. (2008). L'hétérochromatine constitutive dans tous ses états The many faces of constitutive heterochromatin. *Med Sci* 24 : 720–724.
- Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, Hirohashi S. (2002). Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol* **161**: 859-866.
- Tulin A, Spradling A. (2003). Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci *Science* **299**: 560–562.
- Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**: 631-647.
- Turner BM. (2002). Cellular memory and the histone code. Cell 111: 285-291.
- Turner BM. (2007). Defining an epigenetic code. Nature Cell Biol 9: 2-6.
- Uemura T, Kubo E, Kanari Y, Ikemura T, Tatsumi K, Muto M. (2000). Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells. *Cell Struct Funct* **25**: 149–159.
- Un F, Oi C, Prosser M, Wang N, Zhou B, Bronner C, Yen Y. (2006). Modulating ICBP90 to suppress human ribonucleotide reductase M2 induction restores sensitivity to hydroxyurea cytotoxicity. *Anticancer Res* 26: 2761–2767.
- Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y. (2004). ICBP90, an E2F1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23: 7601-7610.
- Unoki M, Kelly J D, Neal D E, Ponder B A J, Nakamura Y, Hamamoto R. (2009) UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *Br J Cancer*. **101**: 98–105.
- Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, Tsuchiya E, Hamamoto R, Nakamura Y. (2010). UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer. *Br J Cancer* 103: 217–222.
- Vairapandi M, Duker NJ. (1993). Enzymic removal of 5-methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase. *Nucleic Acids Res* 21: 5323-5327.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* **659**: 40–48.
- Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol* 26: 9185-9195.
- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**: 381-391.
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**: 245-253.
- Vandermeers F, Kettmann R, Willems L. (2008). Implication des modifications épigénétiques dans les cancers : développement de nouvelles approches thérapeutiques. *Biotechnol Agron Soc Environ* **12** : 211-218.

- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**: 149-159.
- Wade PA. (2001). Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* **20**: 3166-3173.
- Wakefield RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, Barlow PN. (1999). The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol* **291**: 1055-1065.
- Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG, Zhang Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell* 12: 475-487.
- Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase, *Mol Cell* 8: 1207–1121.
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G. (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* **41**: 125–129.
- Wang JC. (1996). DNA topoisomerase. Ann Rev Biochem 65: 635-692.
- Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**: 897–903.
- Woodcock CL, Horowitz RA. (1995). Chromatin organization re-viewed. Trends Cell Biol 5: 272-277.
- Wu CS, Zhang Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads leade to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 607–620.
- Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. (2005). Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol Biol Cell* **16**: 2872-2881.
- Wyce A, Henry KW, Berger SL. (2004). H2B ubiquitylation and de-ubiquitylation in gene activation. *Novartis Found Symp* **259:** 63-73; *discussion* 73-77, 163-169.
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. (2006). A PHD Finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**: 86-90.
- Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* **17**: 896-911.
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236: 87-95.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**: 187-191.
- Yang SH, Sharrocks AD. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13: 611-617.
- Yang H, Pesavento JJ, Starnes TW, Cryderman DE, Wallrath LL, Kelleher NL, Mizzen CA. (2008). Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. J Biol Chem 283: 12085-12092.
- Zegerman P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* **277**: 11621-11624.
- Zeise HS. (2009). Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health. *Outcomes Am J Clin Nutr* 89: 1488S–1493S.
- Zhang Y, Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**: 2343-2360.

- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**: 1924-1935.
- Zhang X, Verdine GL. (1996). Mammalian DNA cytosine-5 methyltransferase interacts with p23 protein. *FEBS Lett* **392**: 179-183.

Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* **39**: 61–69.

PUBLICATIONS

&

COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Bronner C, <u>Achour M</u>, Arima Y, Chataigneau T, Saya H and Schini-Kerth VB. The UHRF family: Oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol Ther*, 2007, **115**: 419–434.

<u>Achour M</u>, Jacq X, Rondé P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB and Bronner C. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene*, 2008, 27: 2187–2197.

<u>Achour M</u>, Fuhrmann G, Alhosin M, Rondé P, Chataigneau T, Mousli M, Schini-Kerth VB and Bronner C. **UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **390**: 523-528.

Alhosin M, Abusnina A, <u>Achour M</u>, Sharif T, Muller C, Peluso J, Chataigneau T, Lugnier C, Schini-Kerth VB, Bronner C and Fuhrman G. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79: 1251-1260.

Sharif T, Auger C, Alhosin M, Ebel C, <u>Achour M</u>, Étienne-Selloum N, Fuhrmann G, Bronner C and Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells by inducing a redox-sensitive upregulation of p73 and down-regulation of UHRF1. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 983-994.

Nady N, Lemak A, Walker JR, Avvakumov GV, Kareta MS, <u>Achour M</u>, Xue S, Duan S, Allali-Hassani A, Zuo X, Wang YX, Bronner C, Chédin F, Arrowsmith CH and Dhe-Paganon S. Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1. *J Biol Chem*, 2011, **in press**.

<u>Achour M</u>, Alhosin M, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB and Bronner C.**The methyl** cytosine base flipping induced by the UHRF1 SRA domain is involved in the tumor suppressor gene silencing inheritance. En préparation.

CHAPITRE DE LIVRE

Bronner C, <u>Achour M</u>, Chataigneau T and Schini-Kerth VB. "Epigenetic control of gene transcription" (Epigenetics and Gene Transcription Section III). Cancer Epigenetics: Biomolecular Therapeutic in Human Cancer (Editors A. Giordano and M. Macaluso), by Wiley-Blackwell Health Sciences, June 2011.

COMMUNICATIONS AUX CONGRES

La personne ayant présentée le travail lors du congrès est représentée en italique.

<u>Achour M</u>, Fuhrmann G, Avvakumov GV, Walker RJ, Li Y, Alhosin M, Chataigneau T, Paganon SD, Schini-Kerth VB and Bronner C. **Down-regulation of UHRF1 by** epigallocatechin gallate induces apotosis in Jurkat cells by re-expressing tumor suppressor genes. Illkirch/France, 3^e forum du "Cancéropôle du Grand-Est", Novembre 2009.

Sharif T, Alhosin M, <u>Achour M</u>, Auger C, Étienne-Selloum N, Fuhrmann G, Bronner C and Schini-Kerth VB. **Red wine polyphenols induce apoptosis in Jurkat cells by a redox-sensitive mechanism.** Illkirch/France, 3^e forum du "Cancéropôle du Grand-Est", Novembre 2009.

Alhosin M, Abusnina A, <u>Achour M</u>, Sharif T, Muller C, Peluso J, Chataigneau T, Lugnier C, Schini-Kerth VB, Bronner C and *Fuhrmann G*. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. Illkirch/France, 3^e forum du [«]Cancéropôle du Grand-Est[»], Novembre 2009.

<u>Achour M</u>, Fuhrmann G, Avvakumov GV, Walker RJ, Li Y, Alhosin M, Chataigneau T, Paganon SD, Schini-Kerth VB and *Bronner C*. The methyl cytosine base flipping induced by the UHRF1 SRA domain is involved in the tumor suppressor gene silencing inheritance. Heidelberg/Allemagne, EMBO 2009, mai 2009.

<u>Achour M</u>, Fuhrmann G, Avvakumov GV, Walker RJ, Li Y, Alhosin M, Chataigneau T, Paganon SD, Schini-Kerth VB and Bronner C. The methyl cytosine base flipping induced by the UHRF1 SRA domain is involved in the tumor suppressor gene silencing inheritance. Illkirch/France, Journée scientifique Campus d'Illkirch, avril 2009.

<u>Achour M</u>, Fuhrmann G, Avvakumov GV, Walker RJ, Li Y, Alhosin M, Chataigneau T, Paganon SD, Schini-Kerth VB and *Bronner C*. The methyl cytosine base flipping induced by the UHRF1 SRA domain is involved in the tumor suppressor gene silencing inheritance. Nancy /France, Oncotrans 2009, mars 2009.

<u>Achour M</u>, Rondé P, Alhosin M, Chataigneau T, Mousli M, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB and Bronner C. **Tip60 interacts with the hUHRF1/DNMT1 complex: implications for the chromatin structure and the epigenetic code inheritance**. Luxembourg/ Luxembourg, Apoptosis 2008, janvier 2008.