

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

MODULATION APOPTOTIQUE DE PARAMÈTRES ÉPIGÉNÉTIQUES
- Implication de l'histone désacétylase 5 et des histones H3 -

Par
Charles Dupras

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Présidente du jury
et examinatrice interne

Dre. Cathy Vaillancourt
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Dr. Laurent Poliquin
Université du Québec à Montréal

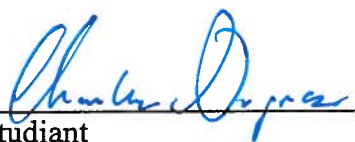
Directeur de recherche

Dr. Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de *Charles Dupras*, 2009

Résumé

Plusieurs inhibiteurs d'histone désacétylases (HDI) non-spécifiques sont présentement en essais cliniques comme adjuvants à la chimiothérapie pour le traitement de certains cancers. Des études préalables ont démontré une capacité des HDI à induire l'apoptose avec une spécificité accrue pour les cellules tumorales. Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer le mode d'action par lequel les HDI non-spécifiques peuvent renverser la résistance à la mortalité, sans toutefois qu'aucun consensus ne soit encore clairement avoué. Une compréhension plus fine des voies signalétiques empruntées par ces inhibiteurs pour l'induction de l'apoptose permettrait de cibler encore plus précisément les cellules tumorales et de minimiser les effets secondaires encourus par les HDI à large spectre. En ce sens, nos travaux cherchaient à établir des liens entre la modulation des paramètres épigénétiques pouvant survenir durant l'apoptose *normale* induite par des inducteurs non-HDI et la modulation de paramètres épigénétiques pouvant être induits par les HDI. En premier lieu, nous avons voulu vérifier si l'hyperacétylation des histones est réellement une caractéristique propre aux cellules apoptotiques. En second lieu, nous avons analysé la modulation de l'expression de plusieurs histones désacétylases (HDAC) durant l'apoptose. En troisième lieu, nous avons observé l'influence du traitement des cellules avec la trichostatine A (TSA), un HDI bien caractérisé, sur certains paramètres épigénétiques comme l'acétylation des histones, la phosphorylation des histones et l'expression des HDAC. Ces travaux sur l'implication des mécanismes épigénétiques durant l'apoptose ont permis de démontrer la modulation caspase-3-dépendante de l'expression de l'histone désacétylase 5 (HDAC5) et la déphosphorylation massive des histones H3 lorsque les cellules sont traitées avec différents inducteurs de l'apoptose. Bien que l'hyperacétylation des histones ne soit pas une caractéristique des cellules apoptotiques, la TSA entraîne aussi et de façon précoce, bien avant l'induction de l'apoptose, la déphosphorylation des histones H3. Selon nos travaux, il est donc possible que les HDI agissent, soit en reproduisant la modulation apoptotique de l'expression de la HDAC5, soit en reproduisant la déphosphorylation apoptotique des histones H3.


Étudiant


Directeur de recherche

Remerciements

Le présent ouvrage n'aurait pu être complété sans l'accord, la participation et le soutien de plusieurs personnes et j'aimerais profiter de l'occasion pour souligner mon plus grand respect pour l'engagement et la dévotion dont ils ont fait preuve tout au long de ma maîtrise.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Bernier, pour son sens critique, pour son calme réconfortant et pour son grand sens de l'humour. La recherche est parsemée de hauts et de bas. Jacques, tu es resté rigoureux dans les moments forts et optimiste dans les moments moins glorieux. Merci d'avoir compris mes idées comme mes doutes.

À mes collègues de laboratoire, Geneviève Dupéré-Minier, Julie Patenaude et Michele D'Élia, merci d'avoir partagé avec moi vos connaissances, votre méthodologie et votre quotidien. J'ai beaucoup appris de chacun de vous et je vous en serai toujours reconnaissant. Je vous souhaite le meilleur de vos aspirations pour le futur.

Merci à la Fondation Armand-Frappier et à ses contributeurs, la Fondation J. Armand-Bombardier et le Ministère du développement durable, de l'environnement, et des parcs, pour le soutien financier qui m'a été alloué durant ces années de recherche.

À ma famille, que j'aime de tout cœur, merci pour votre support de tous les instants. À mon entourage, mes amis et mes amours, vous êtes ma motivation. Un clin d'œil spécial à Nat et Héloïse, pour ces heures de covoiturage thérapeutique, à mon coloc Fab aka Manolo, pour ton esprit déjanté, à toute la clique de Trois-Rivières, pour notre passé et notre futur et à Annabelle, pour cette belle saison.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des tableaux et figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Introduction.....	1
SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1 MORTALITÉ CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L' APOPTOSE	5
1.1 Introduction	5
1.1.1 Contexte historique de la découverte.....	5
1.1.2 Rôle physiologique de l'apoptose.....	7
1.1.3 Caractéristiques des cellules apoptotiques.....	9
1.1.4 Voies d'induction de l'apoptose	11
1.2 Signalisation apoptotique	12
1.2.1 Les récepteurs de mort.....	12
1.2.2 Les protéines apoptogéniques de la mitochondrie.....	14
1.2.3 Régulation de la perméabilité mitochondriale par la famille de Bcl-2	16
1.2.4 Les caspases.....	20
1.2.5 Cycle cellulaire, voies métaboliques et expression <i>de novo</i>	22
1.3 Fragmentation apoptotique de l'ADN génomique.....	24
1.3.1 Les endonucléases apoptotiques	24
1.3.2 Le DFF40: Facteur de fragmentation de l'ADN.....	25
1.3.3 Le DFF45: Protéine chaperonne et inhibitrice du DFF40	26
1.3.4 Régulation de l'activité du DFF40.....	27
1.4 Modèles d'étude de l'apoptose.....	28
1.4.1 Inducteurs d'apoptose	29
2 LES MÉCANISMES DE RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE	30
2.1 Introduction	30
2.1.1 Contexte historique de la découverte.....	30
2.1.2 Biologie de la chromatine	30
2.1.3 Rôle physiologique de la régulation épigénétique	32
2.2 Modifications post-traductionnelles des histones	33
2.2.1 Méthylation de l'ADN et des histones.....	33
2.2.2 Phosphorylation des histones.....	34
2.2.3 Acétylation des histones	35
2.2.4 Autres modifications post-traductionnelles	35
2.2.5 Transrégulation entre modifications	36
2.3 Enzymes associées au remodelage de la chromatine	36
2.3.1 Méthyltransférases et déméthylases.....	36
2.3.2 Kinases et phosphatases.....	37
2.3.3 Histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC).....	38
2.4 Les histones désacétylases (HDAC)	39
2.4.1 Subdivision en classes	39
2.4.2 Régulation de l'expression et de l'activité des HDAC	40

2.4.3	Modifications post-traductionnelles des HDAC.....	41
2.4.4	Localisation cellulaire des HDAC	42
3	RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE L' APOPTOSE.....	44
3.1	Modifications post-traductionnelles apoptotiques	44
3.1.1	Introduction à l'épigénétique du cancer.....	44
3.1.2	Méthylation de l'ADN lors de l'apoptose.....	45
3.1.3	Méthylation des histones lors de l'apoptose.....	45
3.1.4	Phosphorylation des histones lors de l'apoptose	46
3.1.5	Acétylation des histones lors de l'apoptose.....	46
3.2	Modulation apoptotique des histones désacétylases	47
3.2.1	Dégradation des HDAC par les protéases apoptotiques	47
3.2.2	Localisation cellulaire des HDAC lors de l'apoptose.....	47
3.2.3	Complexes transcriptionnels régulés par les HDAC sensibles à l'apoptose ..	48
3.3	Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDI)	50
3.3.1	Influences pro-apoptotiques et anti-prolifératives des HDI.....	50
3.4	Contrôle épigénétique de la fragmentation de l'ADN	54
3.4.1	Importance des histones de liaison H1 pour le DFF40.....	54
3.4.2	Modifications épigénétiques et condensation de la chromatine	54
	SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	56
	Discussion générale et conclusion	92
	Liste des références.....	99

Liste des tableaux et figures

Figure 1: Homologies de séquence et fonctionnelle entre les membres de la machinerie apoptotique du nématode <i>C. elegans</i> et ceux des mammifères.....	7
Figure 2: Applications de l'apoptose lors du développement et pour le maintien de l'homéostasie chez les organismes matures.	9
Figure 3: Acteurs principaux de la voie apoptotique des récepteurs de mort (extrinsèque) et de la voie apoptotique mitochondriale (intrinsèque).....	12
Figure 4: Membres pro-/anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 classés en fonction des domaines fonctionnels qu'ils contiennent.	17
Figure 5: Arbre phylogénique des caspases (A) et quelques exemples de substrats des caspases avec leur sites de clivage (B).	21
Figure 6: La protéine DFF45 sert à la fois de chaperonne et d'inhibiteur à l'endonucléase DFF40.....	27
Figure 7: Structure du nucléosome (a) et sites des modifications post-traductionnelles sur les queues N-terminales des histones (b).	31
Figure 8: Modèle de régulation de la localisation cellulaire par phosphorylation des HDAC de classe IIa comme la HDAC5.	43
Figure 9: Gènes réprimés par le facteur de transcription MEF2 via la désacétylation par les HDAC sensibles à l'apoptose.....	49
Figure 10 : Liste des HDAC (classe I, II et IV) et quelques inhibiteurs de HDAC (HDI) à spécificité variable.	51

Liste des abréviations

AIF	Facteur d'induction de l'apoptose "Apoptosis-inducing factor"
AIP	Peptide inhibiteur relié à l'autocamide-2 "autocamide-2-related inhibitory peptide"
AML	Lymphome myélomateux aigu "Acute myelogenous lymphoma"
ANT	Transporteur de nucléotides adénines "Adenine nucleotide transporter"
APAF	Facteur d'activation des protéases apoptotiques "Apoptosis protease activating factor"
APL	Lymphome promyélocytaire aigu "Acute promyelocytic lymphoma"
ARN	Acide ribonucléique
ASK	Kinase régulatrice du signal apoptotique "Apoptosis signal regulating kinase"
ATM	Protéine ataxie-telangiectasie mutée "Ataxia-telangiectasia-mutated protein"
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Protéine reliée à l'ataxie-telangiectasie "Ataxia-telangiectasia-related protein"
BAPTA	Acide 1,2-bis(o-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique "1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid"
BCL	Lymphome de cellules B "B cell lymphoma"
BIR	Répétition inhibitrice de l'apoptose du baculovirus "Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat"
CAD	ADNase activée par les caspases "Caspase-activated DNase"
CaMK	Calmoduline kinase
CARD	Domaine de recrutement des caspases "Caspase recruitment domain"
CBP	Protéine se liant à CREB "CREB-binding protein"
CDK	Kinase dépendante des cyclines "Cyclin-dependant kinase"
CHX	Cycloheximide
CIDE	Effecteur induisant la mort similaire à DFF45 "Cell death-inducing DFF45-like effector"
CIIA	Inhibiteur de la CAD qui interagit avec ASK1 "Caspase-activated DNase (CAD) inhibitor that interacts with ASK1"
CK	Créatine kinase
CpG	Ilots symétriques cytosines-guanines (sites de méthylation)
CREB	Protéine se liant à l'élément de réponse cAMP "cAMP response element binding protein"
DAD	Domaine d'activation des désacétylases
DD	Domaine de mort "Death Domain"
DED	Domaine effecteur de mort "Death effector domain"
DFF	Facteur de fragmentation de l'ADN "DNA fragmentation factor"
DIABLO	Protéine de liaison directe aux IAP à faible pI "Direct IAP binding protein with low pI"
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort "Death-inducing signaling complex"
DLBCL	Lymphome de cellules B large et diffus "Diffuse large B-cell lymphoma"
DNA-PK	Kinase dépendante de l'ADN "DNA-dependant protein kinase"
DNMT	Méthyltransférase d'ADN "DNA methyltransferase"
DR	Récepteur de mort "Death receptor"
EndoG	Endonucléase G
ERK	Kinase activée par un signal extracellulaire "Extracellular signal-regulated kinase"
FADD	Protéine adaptatrice associée à Fas via un domaine de mort "Fas-associated death domain"
FAP	Phosphatase associée à Fas "Fas-associated phosphatase"

FKHRL1	Facteur de transcription homologue de la tête fourchue commune au rhabdomyosarcome du drosophile 1. "Forkhead (Drosophila) homolog (rhabdomyosarcoma) like 1" Protéine énorme associée à FLICE "FLICE-associated huge protein"
FLASH	
FLICE	Enzyme de conversion de l'interleukine-1B similaire à FADD "FADD-like interleukin-1B converting enzyme"
FLIP	Protéine cellulaire inhibitrice de FLICE "cellular FLICE-inhibitory protein"
FPM	Clivage de faible poids moléculaire
GAAD	ADNase activée par la granzyme A "Granzyme A-activated DNase"
GMCSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HDI	Inhibiteurs de histone désacétylases "Histone deacetylase inhibitors"
HMG	Groupe de protéines à haute mobilité "High mobility group protein"
HMT	Histone méthyltransférase
HPM	Clivage de haut poids moléculaire
HSP	Protéines de choc thermique "Heat shock protein"
HSS	Sites hypersensibles aux ADNases "Hypersensitive sites"
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose "Inhibitors of apoptosis proteins"
ICAD	Inhibiteur de la CAD
ICE	Enzyme de conversion des interleukines "Interleukine converting enzyme"
IL	Interleukine
JNK	Kinase de Jun "Jun kinase"
kDa	Kilodaltons
LMB	Leptomycine B
MAC	Canal mitochondrial induit par l'apoptose "Mitochondria apoptosis-induced channel"
MAPK	Kinase activée par les mitogènes "Mitogen-activated protein kinase"
MCP	Mortalité cellulaire programmée
MEF	Facteur d'amplification des myocytes "Myocyte enhancing factor"
NaBu	Butyrate de sodium
NES	Signal d'exportation nucléaire "Nuclear exportation signal"
NF-kB	Facteur nucléaire kB "Nuclear facteur kB"
NGFIB	Facteur de croissance des nerfs IB (aussi connu comme Nur77) "Nerve growth factor IB (also known as Nur77)"
NLS	Signal de localisation nucléaire "Nuclear localization signal"
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
pb	paires de bases
PCAF	Facteur associé à p300/CBP "p300/CBP binding protein"
PHA	Phytohémagglutinine
pl	Point isoélectrique
PK(A/G/D)	Protéine kinase (A/G/D)
PMA	Acétate de phorbol myristate "Phorbol myristate acetate"
PP	Phosphatase de protéines
PPAR	Récepteur activé par le proliférateur du peroxisome "Peroxisome proliferator-activated receptor"
pRb	Protéine du rétinoblastome
PTP	Pores de transition de la perméabilité
RAIDD	Protéine homologue à ICH-1/Ced-3 et associée à RIP via un domaine de mort "RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with death domain"

RIP	Protéine interagissant avec les récepteurs "Receptor-interacting protein"
ROS	Espèces réactives oxygénées "Reactive oxygen species"
SAHA	Acide suberoylanilide hydroxamique "Suberoylanilide hydroxamic acid"
SAPK	Kinase activée par les stress "Stress-activated protein kinase"
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIRT	Sirtuines (Histone desacétylases de classe III)
Smac	Deuxième activateur mitochondrial de l'apoptose "Second mitochondrial activator of caspases"
SMRT	Méiateur silencieux des récepteurs rétinoïdiens et thyroïdiens "Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors"
STO	Staurosporine
SUMO	Modificateur reliée à la petite ubiquitine "Small ubiquitin-related modifier"
TBT	Tributylétain "Tributyltin"
TNF(R)	(récepteur) Facteur de nécrose tumorale "Tumour necrosis factor (receptor)"
TRADD	Protéine adaptatrice associée au TNFRSF1A via le domaine un domaine de mort "TNFRSF1A-associated via death domain"
TRAF	Facteur associé au récepteur TNF "TNF receptor associated factor"
TRAIL	Ligand inducteur de l'apoptose reliée au TNF "TNF-related-apoptosis-inducing-ligand"
TSA	Trichostatine A
VA	Acide valproïque "Valproic acid"
VDAC	Canal à anions dépendants du voltage "Voltage-dependant anion channel"
WD-40	Domaine de répétition "Repeat region"

Introduction

L'apoptose est un mécanisme d'autodestruction cellulaire génétiquement programmé nécessaire au développement des organismes et au maintien de l'homéostasie des systèmes biologiques. La mort par apoptose se distingue de la mort par nécrose grâce à un contrôle finement régulé de dégradation des molécules intracellulaires permettant la minimisation des voies d'induction de l'inflammation. Une dérégulation de l'apoptose peut être source de nombreuses pathologies comme certaines maladies neurodégénératives, les affections auto-immunes, le SIDA ou le cancer. Initiées par l'activation des récepteurs de mort, par la perturbation mitochondriale ou par un stress du réticulum endoplasmique, les voies signalétiques impliquées dans la régulation de l'apoptose sont nombreuses, mais convergent lors de l'activation des caspases effectrices et de la fragmentation de l'ADN. L'étude de l'apoptose peut être menée *in vitro* grâce à des modèles d'induction de la mortalité de cellules en culture par certains inducteurs connus comme le tributylétain (TBT), la cycloheximide, la staurosporine ou l'activation du récepteur Fas par un anticorps dirigé contre lui ou par l'utilisation de son ligand naturel (FasL). Ces modèles nous permettent de mieux comprendre les mécanismes régulateurs de l'apoptose et les anomalies pouvant entraîner leur déséquilibre.

L'épigénétique peut être définie comme l'étude de tout ce qui modifie la structure de la chromatine et l'expression des gènes. En effet, la conformation tridimensionnelle et la densité de la chromatine, variables dynamiques et héréditaires induites par la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones aux sites de gènes précis, peuvent avoir une influence cruciale sur le niveau d'expression de ces gènes. La méthylation, la phosphorylation, l'acétylation et bien d'autres modifications biochimiques survenant sur les queues N-terminales des histones entraînent un remodelage de la chromatine associé à une variation des interactions électrostatiques au sein du nucléosome et à une variation de l'accessibilité de l'ADN pour les facteurs de transcription et l'ARN polymérase. Parmi les nombreuses enzymes responsables du remodelage de la chromatine, les histones désacétylases (HDAC) sont les plus étudiées et les mieux caractérisées à ce

jour. Par opposition aux histones acétyltransférases (HAT), qui favorisent l'expression des gènes par décondensation de la chromatine, les HDAC sont de façon générale des répresseurs de l'expression des gènes. L'activité des HDAC peut être modulée par leur niveau d'expression, par des modifications post-traductionnelles, par dégradation protéolytique ou par leur localisation cellulaire.

Ces dernières années, plusieurs inhibiteurs de HDAC (HDI) sont entrés en essais cliniques comme adjuvants à la chimiothérapie pour le traitement des cancers. Les HDI ont démontré une habilité particulière comme inducteur de l'apoptose de façon spécifique chez les cellules tumorales. Cependant, les voies signalétiques par lesquelles ces composés renversent la résistance à la mortalité chez les cellules transformées ne sont pas encore bien définies. Certaines études suggèrent qu'ils favorisent l'expression de gènes pro-apoptotiques, alors que d'autres proposent surtout une influence issue de la modulation de l'activité de facteurs pro- ou anti-apoptotiques grâce à la modification post-traductionnelle de protéines non-histones.

Le travail ici présenté porte sur la modulation de paramètres épigénétiques durant l'apoptose induite par des inducteurs non-HDI. Nous avons pu identifier deux nouvelles caractéristiques épigénétiques des cellules apoptotiques : la modulation de l'expression et du ratio cytosol/noyau de la HDAC5 et la déphosphorylation massive des histones H3. En parallèle, nous voulions associer certains des paramètres épigénétiques normalement modulés par les inducteurs non-HDI aux impacts directs du traitement des cellules par les HDI comme la trichostatine A (TSA). Bien que suggéré dans la littérature, l'hyperacétylation des histones observée suite à un traitement à la TSA ne semble pas être une caractéristique marquante des cellules apoptotiques. Par ailleurs, nous avons démontré que le traitement des cellules avec la TSA est associé à une forte diminution du taux de phosphorylation des histones H3, préalablement à l'induction de l'apoptose. Nous suggérons donc que les HDI puissent induire l'apoptose via la modulation de l'activité de la HDAC5 ou via la déphosphorylation massive des histones H3.

Ce mémoire est divisé en deux sections dont la première est une revue de littérature sur l'état des connaissances au sujet des grands thèmes abordés au cours de la maîtrise. Nous y

décrivons tout d'abord le mécanisme apoptotique et ses régulateurs. En second lieu, nous aborderons la régulation épigénétique et ses acteurs principaux. Enfin, nous présenterons l'actualité au sujet de la modulation des paramètres épigénétiques durant l'apoptose et leur possible implication durant ce processus. La deuxième section du mémoire sera consacrée au rapport des activités de recherche entreprises au laboratoire durant la maîtrise. Elles seront présentées sous la forme d'un article faisant l'objet d'une publication. Les idées prioritaires seront ensuite résumées et discutées sous la forme d'une conclusion générale.

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

MORTALITÉ CELLULAIRE PROGRAMMÉE : L' APOPTOSE

1.1 Introduction

1.1.1 Contexte historique de la découverte

La mortalité cellulaire programmée (MCP) est un phénomène biologique qui suscite l'intérêt de la communauté scientifique depuis sa mise en évidence par Carl Vogt en 1842, lors de la métamorphose amphibiennne (Seipp *et al.*, 2001). Dès 1858, le pathologiste et biologiste Rudolf Virchow suggère une possible distinction entre deux types de mortalité cellulaire, la *necrosis* et la *necrobiosis*:

"La nérobiosis est la mort apportée par la vie (altérée), un véritable dépouillement des systèmes vivants, la destruction et l'anéantissement conséquents à la vie, naturelle par opposition à la mort violente (mortification) [...] Mais l'idée de nécrosis n'offre vraiment aucune analogie avec ces processus."

En 1885, l'anatomiste Walther Flemming observe pour la première fois ce que nous appelons aujourd'hui les cellules apoptotiques vraies. Ce phénomène, qu'il nomme alors *chromatolysis*, se caractérise par l'apparition de cellules détachées de façon irréversible. Près de 70 ans plus tard, l'importance de la MCP est à nouveau soulevée, cette fois lors du développement normal de l'embryon chez les vertébrés. Glücksmann décrira alors certaines caractéristiques de ce type de mortalité, comme la condensation de la chromatine ou *karyopyknosis* et la fragmentation nucléaire ou *karyorrhexis* (Gerschenson et Geske, 2001). Grâce à ses performances en microscopie électronique dans les années 1960, John Foxter Ross Kerr est invité à se joindre aux chercheurs Alastair R. Currie et Andrew Wyllie, de l'Université d'Aberdeen, pour poursuivre ses recherches. En 1972, le trio publie un ouvrage déterminant, dans lequel on retrouve pour la première fois le terme *apoptosis*

pour désigner la MCP. Par cette nouvelle appellation, suggérée par le professeur James Cormack du département de langue grecque de la même université et signifiant *la chute* des pétales ou des feuilles en automne, les auteurs ont voulu caractériser l'apoptose comme un type de mortalité cellulaire différant en plusieurs points de la nécrose. Jusqu'alors, la mortalité cellulaire programmée (MCP) avait été observée, mais traitée injustement de nécrose acidophile, de nécrose rétrécissante ou encore simplement distinguée par les corps de Councilman (Kerr *et al.*, 1972).

En 1980, Wyllie met en évidence un facteur biochimique relié à la condensation apoptotique de la chromatine. En premier lieu, il démontre la fragmentation régulière de l'ADN en nucléosomes lors de l'apoptose, phénomène observable sur gel d'agarose sous l'aspect de barreaux d'échelles. Ensuite, il explique la fragmentation par l'activation d'une endonucléase intracellulaire non-lysosomale (Wyllie, 1980). Malgré l'importance de ces observations, l'apoptose n'acquiesce à citer que lorsqu'elle fût définie comme un phénomène actif génétiquement programmé, grâce aux travaux d'Horvitz et son équipe sur l'embryogenèse du nématode *Caenorhabditis elegans*. L'étude du développement de *C. elegans* a d'ailleurs permis d'identifier une série de gènes impliqués dans le contrôle des différentes étapes du mécanisme apoptotique. Parmi ceux-ci, on note *egl-1*, *ced-3* et *ced-4*, dont l'expression favorise l'apoptose et *ced-9* dont l'expression inhibe l'apoptose (Ellis et Horvitz, 1986; Hengartner *et al.*, 1992).

Parallèlement à ces travaux, une autre équipe de chercheurs était alors à caractériser le premier acteur véritable du contrôle de l'apoptose chez les mammifères, le facteur anti-apoptotique *Bcl-2* (Vaux *et al.*, 1988). Quelques années plus tard, ils observeront une forte homologie fonctionnelle entre *ced-9* et *Bcl-2* (Vaux *et al.*, 1992), homologie qui figure comme un des premiers indices importants, avec la découverte de la forte homologie entre *ced-3* et la protéase humaine ICE (enzyme de conversion des interleukine : prototype des caspases), de la très haute conservation du mécanisme apoptotique entre les espèces [Figure 1] (Miura *et al.*, 1993; Thornberry *et al.*, 1992). À partir de 1990, l'étude de l'apoptose connaît un essor explosif, jusqu'à ce qu'en décembre 2002, la reconnaissance de l'importance de l'apoptose en physiologie et en médecine vaille un prix Nobel aux chercheurs Brenner, Sulston et Horvitz, pour leur découverte, extrapolable aux organismes

supérieurs, des gènes régulateurs de l'apoptose chez *C. elegans*. (Jacobson *et al.*, 1997; Marchetti, 2005; O'Reilly et Strasser, 1999)

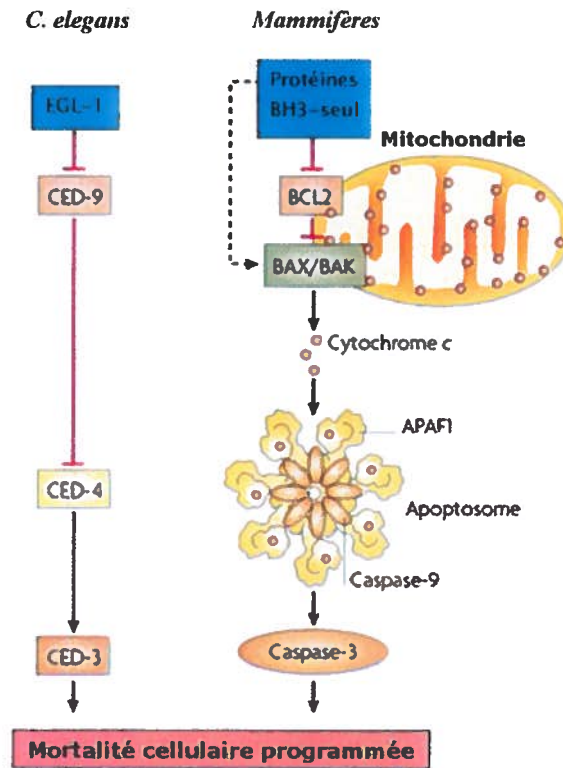


Figure 1: Homologies de séquence et fonctionnelle entre les membres de la machinerie apoptotique du nématode *C. elegans* et ceux des mammifères.

(Modifiée de Degterev et Yuan, 2008)

1.1.2 Rôle physiologique de l'apoptose

L'aspect suicidaire de l'apoptose est représentatif d'un sacrifice nécessaire au maintien de l'homéostasie des populations cellulaires, des tissus, des organismes. La figure qui suit illustre différentes étapes du développement animal au cours desquelles l'apoptose entre en jeu pour l'élimination des cellules corrompues ou excédentaires [Figure 2]. Un exemple courant de l'importance de l'apoptose pour le développement de l'embryon est la formation des espaces interdigitales lors de la sculpture des doigts chez les vertébrés supérieurs [2A]. Une grande partie des cavités lumenales de certains organes apparaissent aussi grâce à

l'élimination apoptotique de cellules [2B]. Chez plusieurs espèces, l'élimination complète de structures désuètes passe par l'apoptose [2C et 2D]. Certains organes produisent un excès de cellules qui doit être compensé par l'élimination de cellules [2E]. Par exemple, dans le système nerveux des vertébrés, les neurones et les oligodendrocytes sont générés en excès et près de la moitié de ces cellules est condamnée par apoptose. Le système immunitaire des vertébrés compte lui aussi sur l'élimination d'une grande quantité de cellules par apoptose pour son bon fonctionnement. Les lymphocytes T ou B en développement qui échouent à l'expression d'un récepteur spécifique d'un antigène étranger au soi ou qui expriment un récepteur spécifique d'un antigène du soi doivent être éliminés efficacement par apoptose. Durant leur développement, 95 % des thymocytes subiront l'apoptose [2F]. Enfin, les cellules dont l'intégrité aura été atteinte de façon irréparable par quelque facteur chimique ou physique devront également être supprimées [2G] (Jacobson *et al.*, 1997; Nagata, 1997; Penalosa *et al.*, 2006; Vaux et Korsmeyer, 1999). En regard de l'importance de l'apoptose pour le développement d'un organisme et pour le maintien de l'intégrité d'un organisme mature, l'étude de ce mécanisme et de ses dysfonctionnements est le début de la compréhension de certaines pathologies associées à la transformation ou la dégénérescence cellulaire.

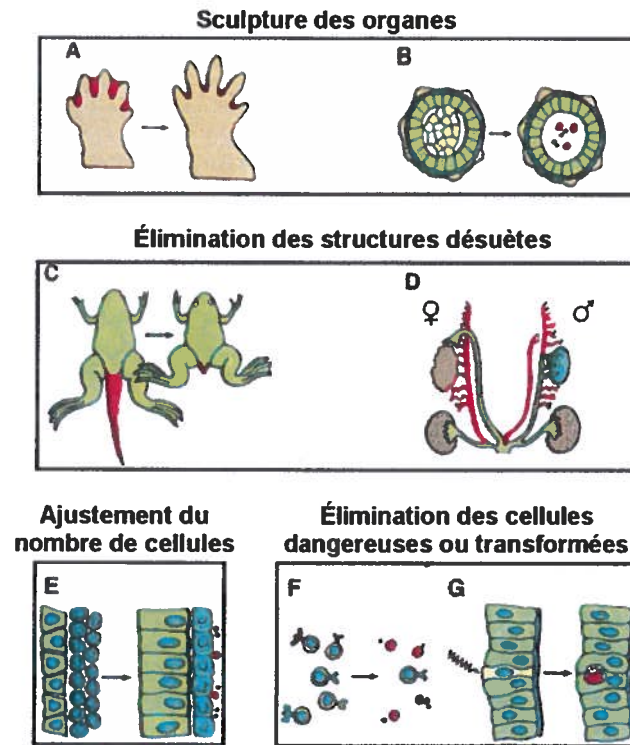


Figure 2: Applications de l'apoptose lors du développement et pour le maintien de l'homéostasie chez les organismes matures.

(Modifiée de Jacobson *et al.*, 1997)

1.1.3 Caractéristiques des cellules apoptotiques

Les principales caractéristiques des cellules entrant en apoptose ont été obtenues par comparaison avec les cellules subissant la nécrose, une mort cellulaire beaucoup plus chaotique et dommageable pour les cellules avoisinantes et pour l'homéostasie du tissu qu'elles constituent. (Marchetti, 2005). Un marqueur extracellulaire important des cellules en apoptose est l'exposition, à leur surface membranaire, de résidus phosphatidylsérines qui leur permettent d'être reconnus et phagocytés par les macrophages ou autres cellules avoisinantes (Fadok *et al.*, 1992). Les cellules en apoptose exhibent plusieurs changements morphologiques au niveau cytoplasmique et certains changements encore davantage significatifs au niveau nucléaire. La fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine et la marginalisation de la chromatine aux pourtours de la membrane nucléaire sont des caractéristiques importantes des cellules apoptotiques. La membrane

cytoplasmique subit quant à elle une reconfiguration en forme de protubérances menant à l'assemblage de vésicules, ou corps apoptotiques. Ces structures mini-cellulaires qui contiennent organites, fragments de noyaux et fragments de cytosol, entourés d'une membrane plasmique, ne présentent aucun trouble majeur de perméabilité (Wyllie, 1980). Contrairement à l'apoptose, la mort par nécrose survient lorsque les cellules sont brusquement endommagées et lorsque par gonflement et rupture de la membrane cytoplasmique, il y a libération du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire. Une réaction inflammatoire locale est alors déclenchée, mettant en péril l'environnement de la cellule nécrotique (Marchetti, 2005). L'élimination propre d'une cellule par apoptose est donc nécessaire à la minimisation des réactions inflammatoires (Vaux et Korsmeyer, 1999).

L'identification claire de l'état apoptotique n'est pas simple. Malgré les caractéristiques générales communes aux cellules en proie à l'apoptose, ou mort cellulaire programmée de type 1 (MCP-1), quelques exceptions compliquent le verdict. Par exemple, il est possible d'associer faussement quelque observation à l'apoptose alors qu'elle est plutôt reliée à la MCP de type 2 (MCP-2), ou autophagie lysosomale. D'ailleurs, certains signes apoptotiques ne sont pas parfaitement spécifiques à l'apoptose. Typiquement, les caspases peuvent être activées lors de l'inflammation, mais aussi lors de la différenciation des cellules épithéliales du cristallin, des kératinocytes ou des hématies, qui perdent leurs noyaux et certains organites pendant la différenciation terminale tout en demeurant métaboliquement actives. Chez les spermatozoïdes, des remaniements de lipides membranaires sont observables en dehors de l'apoptose, donnant lieu à l'externalisation aberrante de phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Oehninger *et al.*, 2003). Quelques altérations fonctionnelles mitochondriales peuvent aussi être rencontrées à la fois lors de l'apoptose et de la nécrose. Il a été démontré que la surexpression du produit du gène *bcl-2* peut inhiber aussi bien l'apoptose que la nécrose (Martinou *et al.*, 1994). À l'inverse, l'apoptose peut survenir indépendamment des ses régulateurs ou effecteurs classiques. Par exemple, il peut à l'occasion y avoir progression apoptotique sans activation des caspases et sans fragmentation nucléaire apparente. L'étude de la mortalité cellulaire doit donc s'appuyer sur une approche multiparamétrique. Il est d'ailleurs préférable de concevoir l'apoptose et la nécrose comme les visages extrêmes et opposés d'un unique processus de mort cellulaire. La progression vers l'un ou l'autre type

de mort dépendra par exemple de l'intensité du stimulus initial de mort ou encore de la quantité d'ATP disponible pour l'alimentation des voies signalétiques. Entre l'apoptose et la nécrose, on pourrait imaginer de nouvelles appellations telles que nécrapoptose, parapoptose ou abortose, qui partageraient, à des degrés divers, des caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Lemasters *et al.*, 2002; Marchetti, 2005; Nagata *et al.*, 2003; Parrish et Xue, 2006; Widlak et Garrard, 2005).

1.1.4 Voies d'induction de l'apoptose

La signalisation apoptotique se divise en deux grandes voies d'induction caspases-dépendantes : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est aussi appelée voie des récepteurs de mort. Ces récepteurs sont activés suite à leur liaison à un ligand de mort comme le facteur de nécrose tumorale (TNF) ou le ligand de Fas (FasL). Ce type d'interaction peut survenir entre autres lors de la détection par les cellules du système immunitaire d'une cellule infectée, d'une cellule étrangère au soi ou d'une cellule négativement sélectionnée au niveau du thymus, lors de la sélection des thymocytes. La voie intrinsèque de l'induction de l'apoptose, ou voie mitochondriale, peut être activée par une multitude de stress cellulaires incluant la privation de sérum, l'absence de cytokines, l'exposition à certains toxiques de type perturbateurs mitochondriaux ou lors de dommages génotoxiques. Dans les deux cas, les voies signalétiques d'induction de l'apoptose se rejoignent à l'activation des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) par les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) [Figure 3] (Scoltock et Cidlowski, 2004).

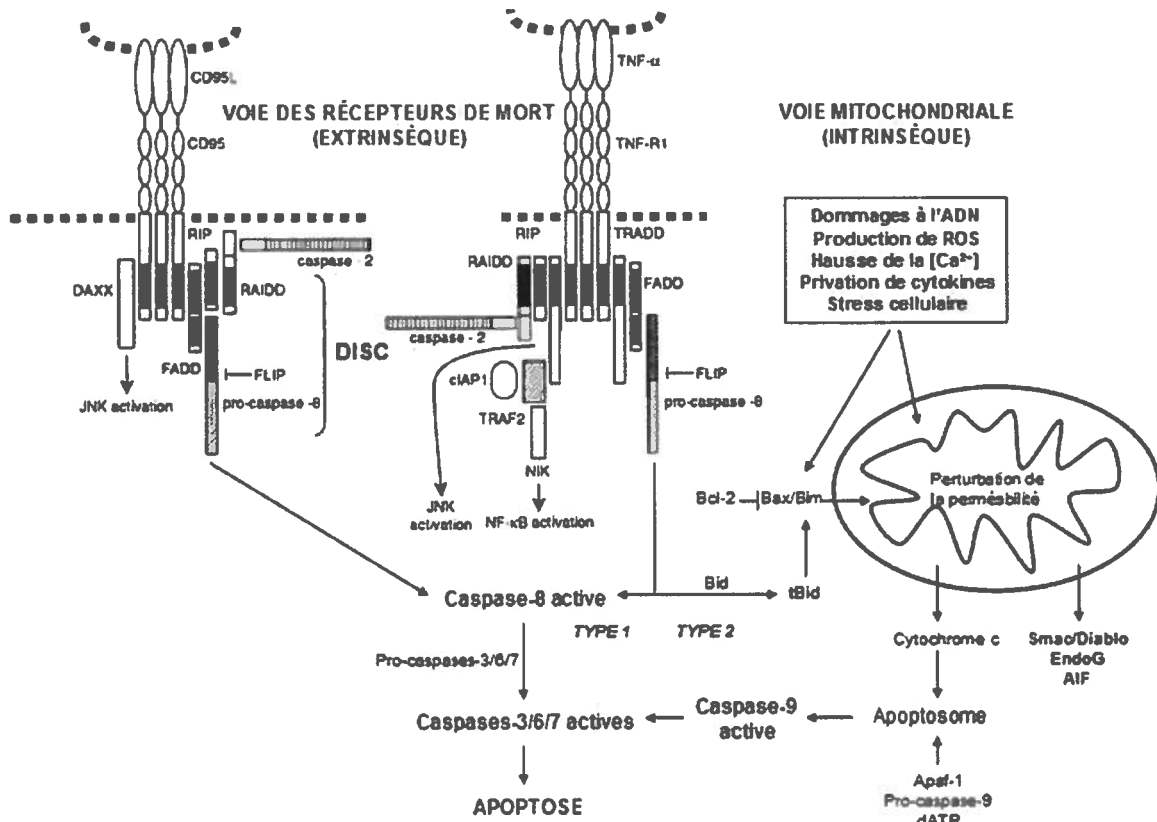


Figure 3: Acteurs principaux de la voie apoptotique des récepteurs de mort (extrinsèque) et de la voie apoptotique mitochondriale (intrinsèque).

(Modifiée de O'Reilly et Strasser, 1999; Wilson et Merckenschlager, 2006)

1.2 Signalisation apoptotique

1.2.1 Les récepteurs de mort

Les récepteurs Fas (CD95), TNFR1, DR3, DR4 et DR5 sont les principaux récepteurs de la voie extrinsèque et font partie de la superfamille des récepteurs de facteur de nécrose tumorale (TNF). Ils s'associent avec leurs ligands respectifs de la façon suivante : Fas/FasL (Fas ligand; CD95L), TNFR1/TNF, DR3/APO3-L, DR4/TRAIL et DR5/TRAIL. Les récepteurs de cette voie possèdent un domaine de liaison extracellulaire riche en cystéine, ainsi qu'un prolongement intracytoplasmique qui comporte une région conservée de 80 acides aminés, formant le domaine de mort (DD) (Itoh *et al.*, 1993; Tartaglia *et al.*,

1993). Les ligands de cette voie sont des trimères transmembranaires de type II, pouvant être libérés de la membrane cytoplasmique par des métalloprotéinases (Ashkenazi et Dixit, 1998; Siegel *et al.*, 2000).

L'interaction extramembranaire entre le récepteur de mort TNFR1 et son ligand, le TNF entraîne le recrutement coordonné, à son domaine intracytoplasmique, de deux protéines adaptatrices : la protéine associée au TNFR1 via son DD (TRADD) et la protéine associée à Fas via son DD (FADD). La liaison TNFR1-TRADD-FADD se produit grâce à des interactions homotypiques entre les DD de chacun des membres du complexe (Hsu *et al.*, 1995). L'activation des récepteurs Fas, DR3, DR4 et DR5 ne requière pas la protéine TRADD, puisque le DD de FADD peut se lier directement au DD de ces récepteurs (Kischkel *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997). Dans tous les cas, la liaison de FADD entraîne le recrutement de la procaspase-8 par une seconde interaction homotypique entre les domaines effecteurs de mort (DED) présents à la fois sur FADD et sur la procaspase-8. Le complexe ainsi formé est appelé le complexe signal d'induction de la mort (DISC) et permet l'activation autocatalytique de la caspase-8. La protéine géante associée à FLICE (FLASH) est un élément important de l'activation de la caspase-8. (Imai *et al.*, 1999). La caspase-10, qui possède comme la caspase-8 deux DED, peut aussi se lier à FADD, mais son rôle semble plus modeste et est moins bien caractérisé. La caspase-8 est donc la protéine centrale de transmission du signal pro-apoptotique de la voie des récepteurs de mort (Peter et Krammer, 2003). Une autre protéine possédant un DD, la protéine homologue à Ich-1/CED et associée à RIP via un DD (RAIDD) peut se lier au domaine intracytoplasmique de tous les récepteurs de mort via la protéine d'interaction à un récepteur (RIP). Le RAIDD est responsable du recrutement et de l'activation subséquente de la caspase-2, une caspase reconnue pour sa capacité à activer les caspases effectrices (Duan et Dixit, 1997).

L'activation directe des caspases effectrices par la caspase-8 (induction extrinsèque de *TYPE 1*) est parfois insuffisante à l'exécution du processus apoptotique. La caspase-8 peut alors entraîner l'activation d'un signal amplificateur (induction extrinsèque de *TYPE 2*) impliquant la voie mitochondriale de l'apoptose [voir Figure 3]. En clivant le domaine N-terminal de la protéine Bid, un facteur pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, la caspase-8

génère un fragment tBid qui est transloqué vers la mitochondrie et induit la chute du potentiel mitochondrial ($\Delta\psi_m$), activant ainsi la voie mitochondriale de l'apoptose. La capacité de la caspase-8 à induire les caspases effectrices indépendamment de la mitochondrie serait relié au nombre de DISC induits par le stimulus extrinsèque (Bossy-Wetzel et Green, 1999; Green, 2000; Matsuzawa et Ichijo, 2001; Rudner *et al.*, 2001; Scaffidi *et al.*, 1998; Stennicke *et al.*, 1998).

La transmission du signal apoptotique par le DISC peut être inhibée par la protéine cellulaire inhibitrice similaire à FLICE (c-FLIP) et l'inhibiteur cellulaire de l'apoptose (cIAP), qui entrent en compétition avec la procaspase-8 pour la liaison au domaine de liaison de FADD et empêchent l'activation de la caspase-8. Un complexe différent du DISC peut aussi se former lors de l'activation des récepteurs de mort TNFR1, via la liaison de TRADD avec la RIP et le facteur associé à TNFR1 2 (TRAF2). Ce complexe peut ensuite favoriser l'activation du facteur de transcription pro-survie NF- κ B et jouer un rôle dans l'induction de la voie pro-apoptotique de la kinase N-terminale de c-jun (JNK). Chez les récepteur Fas et DR, la voie JNK peut être induite par la protéine associée au domaine de mort 6 (Daxx). Récemment, un rôle important a été attribué aux mécanismes d'internalisation endosomale des récepteurs de mort activés lors du choix de signalisation pro- ou anti- apoptotique. La phosphorylation des récepteurs de mort peut aussi influencer leur fonction. Par exemple, l'association de Fas à la phosphatase associée à Fas 1 (FAP-1) entraîne sa déphosphorylation et la résistance à l'induction de l'apoptose par Fas en présence du stimulus FasL (Foehr *et al.*, 2005; Schutze *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2000).

1.2.2 Les protéines apoptogéniques de la mitochondrie

La voie mitochondriale de l'apoptose est caractérisée par la perturbation de la membrane externe mitochondriale et par la libération de facteurs apoptogéniques préalablement séquestrés dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le cytochrome c est un composant de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui une fois libéré de la membrane mitochondriale sous l'influence d'un stimulus apoptotique, permet l'initiation d'une voie métabolique menant à l'activation des caspases (Liu *et al.*, 1996). Une fois transloqué au

niveau cytosolique, le cytochrome c se lie à APAF-1, une protéine cytosolique possédant un domaine de recrutement des caspases (CARD), un domaine de liaison aux nucléotides et plusieurs répétitions de type WD-40 (Zou *et al.*, 1997). La liaison du cytochrome c à APAF-1 a pour effet d'accroître significativement l'affinité de APAF-1 pour dATP/ATP (Jiang et Wang, 2000). La liaison du nucléotide entraîne alors la formation de l'apoptosome, par oligomérisation du complexe APAF-1/cytochrome c (Zou *et al.*, 1999). Au sein de l'apoptosome, les domaines CARD des APAF-1 sont rendus accessibles, favorisant le recrutement de la procaspase-9 pour son autoactivation ultérieure. La caspase-9 active peut ensuite activer les caspases effectrices comme la caspase-3 (Rodriguez et Lazebnik, 1999).

Smac/DIABLO, une protéine mitochondriale plus volumineuse que le cytochrome c, est aussi transloquée de la mitochondrie vers le cytosol lors de la perturbation apoptotique de la membrane externe mitochondriale (Verhagen *et al.*, 2000). Smac/DIABLO possède à son extrémité N-terminale une séquence de 55 acides aminés permettant sa localisation mitochondriale. Une fois dans l'espace intermembranaire mitochondrial, la séquence de localisation est clivée. La nouvelle portion N-terminale de Smac/DIABLO, en particulier les quatre premiers acides aminés, auront la capacité de se lier aux IAP au niveau d'un domaine répétitif commun au baculovirus (BIR) (Chai *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000). Les IAP sont une famille de protéines intracellulaires contenant un ou plusieurs domaines BIR, un domaine connu pour sa capacité à inhiber la fonction des caspases actives (Deveraux *et al.*, 2000). Les IAP peuvent donc agir à titre de facteurs anti-apoptotiques. Ils permettent l'inhibition de l'apoptose dans le cas d'une perturbation légère de la mitochondrie et de la libération seule du cytochrome c. Le fragment de 36-kDa résultant du clivage autocatalytique apoptotique de la sérine protéase HtrA2 (Omi) joue d'ailleurs un rôle important dans l'activation de l'apoptosome, en favorisant l'inhibition de la fonction anti-apoptotique des IAP (Seong *et al.*, 2004). Le système Smac/DIABLO, en contrant les inhibiteurs des caspases par séquestration, apparaît quant à lui comme un mécanisme de rétroaction positive favorisant l'apoptose lorsque les dommages infligés à la membrane mitochondriale sont plus sévères et que la libération d'une protéine de la taille de Smac/DIABLO est encourue (Chai *et al.*, 2000). Ce mécanisme de régulation par Smac/DIABLO et les IAP est aussi observable lors de l'induction de l'apoptose par la voie

des récepteurs de mort (Green, 2000; Srinivasula *et al.*, 2000). Dans le cas où une concentration trop grande d'IAP empêche l'action des caspases effectrices, la voie des récepteurs de mort pourra compter sur l'activation de Bid, un membre de la famille BH3-seul, pour induire un signal d'amplification mitochondriale permettant la libération de Smac/DIABLO (Riedl *et al.*, 2001).

Le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) est une flavoprotéine de 57 kDa de type oxydoréductase située dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Lors de la perturbation apoptotique de la membrane externe mitochondriale, AIF est transloqué de la mitochondrie vers le noyau, où elle entraîne la condensation de la chromatine et participe à la fragmentation de haut poids moléculaire de l'ADN. Le mécanisme par lequel AIF participe à la fragmentation de l'ADN est mal connu. On soupçonne la participation conjointe d'une autre protéine, considérant l'absence d'activité nucléasique de AIF (Susin *et al.*, 1999). De façon similaire, l'endonucléase G (endoG), une protéine de 30 kDa possédant une activité nucléasique, est transloquée de la mitochondrie vers le noyau durant l'apoptose. La fragmentation nucléosomale par l'endoG est, tout comme l'action de l'AIF, indépendante de l'activation des caspases. Cette observation met en relief une voie d'induction de l'apoptose indépendante des caspases (Li *et al.*, 2001).

1.2.3 Régulation de la perméabilité mitochondriale par la famille de Bcl-2

La famille de Bcl-2 peut être divisée en trois groupes selon le nombre de domaines BH homologues à Bcl-2 présents (domaines 1-4). Les protéines de signalisation apoptotique BH3-seul (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, bNip3, Hrk, Noxa et Puma) présentent seulement le domaine BH3, les protéines pro-apoptotiques effectrices (Bak et Bax) possèdent les domaines BH 1-3 et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1 et MCL-1) contiennent tous les domaines BH 1-4. Chacun des membres des trois groupes possède un domaine d'insertion transmembranaire (TM) [Figure 4]. (Chipuk et Green, 2008; Youle et Strasser, 2008)

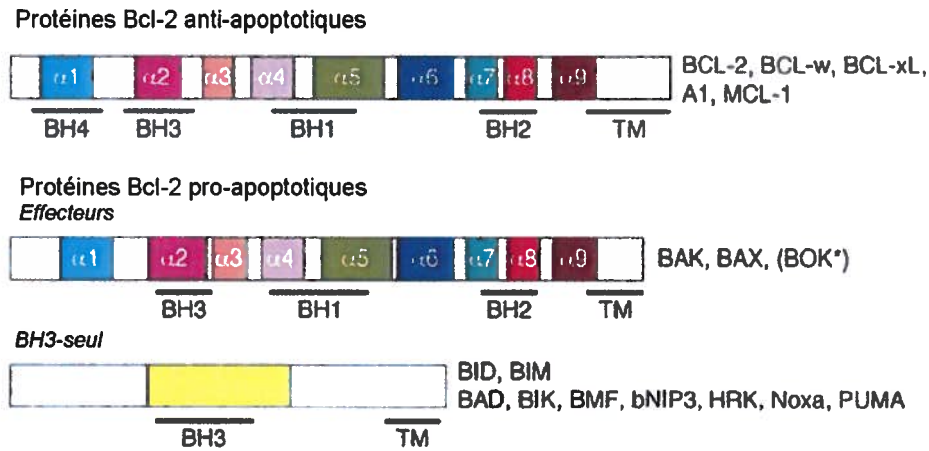


Figure 4: Membres pro-/anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 classés en fonction des domaines fonctionnels qu'ils contiennent.

(Modifiée de Chipuk et Green, 2008)

Les membres BH3-seul de la famille Bcl-2 sont distribués dans divers compartiments cellulaires à l'état normal et sont transloqués vers la mitochondrie lors de l'induction de l'apoptose. Cette translocation entraîne ultérieurement la rupture de la membrane mitochondriale et la libération d'autres membres de la famille Bcl-2. Une fois les protéines BH3-seul transloquées à la membrane mitochondriale, une multitude d'interactions entre les membres de la famille Bcl-2 se produit et est déterminante pour le reste du processus de relargage des protéines apoptogéniques. Plusieurs protéines de type BH3-seul sont nécessaires puisque chacune d'elles ne neutralise qu'un sous-ensemble des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Par exemple, Bad intervient auprès de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, alors que Noxa séquestre Mcl-1 et A1 (Youle et Strasser, 2008). Le domaine BH3 est une hélice amphiphatique nécessaire à l'interaction entre les membres de la famille Bcl-2. Les protéines pro-apoptotiques BH3-seul sont subdivisées en deux groupes, selon leur fonction. Les protéines Bad, Bik, Bmk, bNip3, Hrk, Noxa et Puma font partie du groupe des dérépresseurs-sensibilisateurs, qui exercent leur fonction pro-apoptotique lorsqu'ils lient et inhibent les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Fletcher et Huang, 2006; Youle et Strasser, 2008). Bad, un membre important de la famille BH3-seul, est régulé principalement par phosphorylation (Zha *et al.*, 1997). En absence de signal de

survie cellulaire, Bad est déphosphorylé. Le domaine BH3 de Bad se lie alors aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 situé dans la membrane mitochondriale externe de façon à inhiber leur action. Ainsi, la déphosphorylation de Bad promouvoit l'apoptose. À l'opposé, en présence de facteurs trophiques, Akt et la protéine kinase A (PKA) ancrée à la mitochondrie procèdent à la phosphorylation de Bad. Bad phosphorylé peut ensuite se lier à la protéine chaperonne 14-3-3, ce qui favorisera sa présence cytosolique (Datta *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1999). Cette phosphorylation entraîne aussi la dissociation des liens entre Bad et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, la phosphorylation de Bad favorise l'inhibition de l'apoptose (Virdee *et al.*, 2000). Il a été démontré que la calcineurine, PP1 ou PP2A, peuvent déphosphoryler Bad *in vitro*. Le mécanisme de régulation apoptotique de ces phosphatases reste à être élucidé (Ayllon *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001; Chipuk et Green, 2008; Wang *et al.*, 1999).

Le second groupe de protéines BH3-seul, des activateurs directs, est constitué des membres Bid et Bim. Ces deux protéines peuvent directement activer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, selon un mécanisme encore mal défini. Elles peuvent aussi lier et inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce qui contraint momentanément leur fonction d'activateurs directs. Cette liaison peut être rompue par les membres du groupes des dérépresseurs-sensibiliseurs (Fletcher et Huang, 2006). Chez les cellules normales, Bid est situé dans le cytosol et après induction extrinsèque de l'apoptose, Bid est clivé par la caspase-8. Le fragment tBid est alors transloqué à la mitochondrie et induit la libération du cytochrome c (Luo *et al.*, 1998). La spécificité de tBid pour la mitochondrie est expliquée par l'affinité de ses hélices 4-6 pour la cardiolipine, un lipide spécifique de la mitochondrie (Lutter *et al.*, 2000). Le clivage de Bid n'est pas limité à la caspase-8. En effet, il a été démontré que la caspase-3, la granzyme B et d'autres protéases lysosomales peuvent aussi cliver et activer Bid. Bid peut donc servir d'amplificateur du signal apoptotique pour diverses voies d'induction. Pour sa part, Bim s'associe aux complexes de microtubules en se liant à la chaîne légère 8 (LC8) de la dynéine (Lutter *et al.*, 2000). Lors du signal apoptotique, Bim/LC8 se dissocie du complexe et est transloqué vers la mitochondrie. Il a été démontré que Bim recombinant peut être aussi efficace que tBid pour induire la libération du cytochrome c et de l'endoG, lorsque incubé *in vitro* en présence de

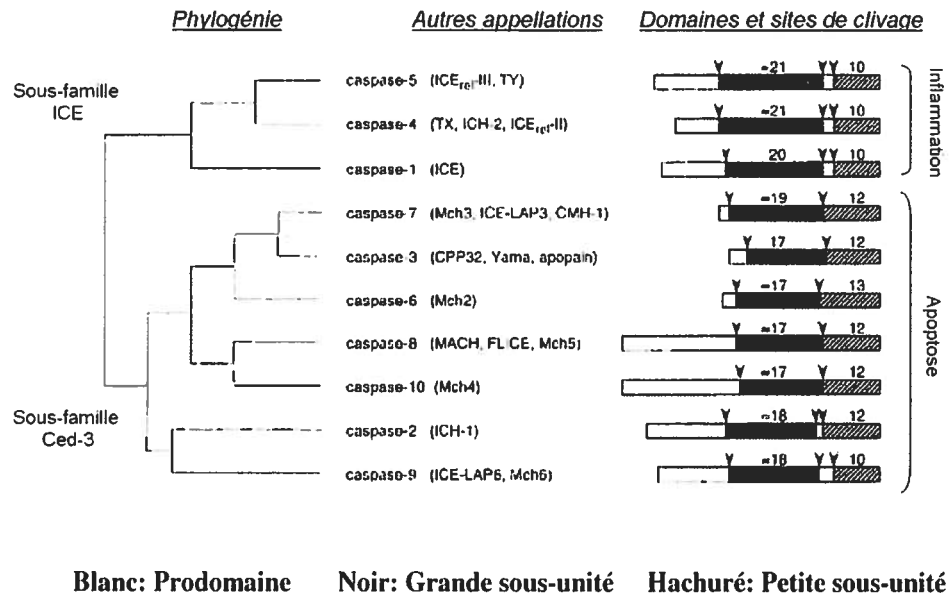
mitochondries. Les mécanismes régulant la dissociation de Bim demeurent toutefois méconnus (Youle et Strasser, 2008; Chipuk et Green, 2008).

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale est donc favorisée par les facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak qui peuvent être inhibés par la présence des facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XL. La mécanique de perméabilisation apoptotique de la membrane mitochondriale par Bak et Bax est encore mal définie. L'oligomérisation de Bax et Bak faciliterait la formation de pores, qui insérés dans la membrane mitochondriale, pourraient faciliter le passages des protéines apoptogéniques ou tout simplement favoriser la perturbation mitochondriale grâce à un mécanisme encore méconnu (Wang, 2001). Malgré la probable importance des canaux à anions dépendants du voltage (VDAC), des translocases de nucléotides adénines (ANT) et de la cyclophyline D pour la formation de ces pores de transition de la perméabilité (PTP), l'implication possible d'autres acteurs comme les canaux céramides, les canaux mitochondriaux induits par l'apoptose (MAC) ou simplement la rupture non-spécifique de la membrane mitochondriale, pourrait également être déterminante pour la libération des facteurs apoptogéniques (Belizario *et al.*, 2007; Crompton *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 1999). La perméabilisation de la membrane peut aussi être causée par une augmentation de la concentration cytosolique des cations Ca^{2+} . À l'état basal, la présence de Ca^{2+} est maintenue relativement faible grâce à la régulation dynamique d'un ensemble de canaux et de transporteurs membranaires. Il semble qu'un bon nombre de toxiques environnementaux interfèrent dans cette régulation et induisent de cette façon l'apoptose. La mitochondrie peut réagir à une hausse du Ca^{2+} intracellulaire par relargage du cytochrome c ou encore par augmentation de la production de radicaux libres (ROS) pouvant induire l'ouverture de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe. Le Ca^{2+} peut aussi favoriser l'apoptose via l'induction de l'expression de ligands nécessaires à l'activation des récepteurs de mort comme le récepteur Fas (Kass et Orrenius, 1999). Enfin, un débalancement de l'homéostasie du Ca^{2+} ou une accumulation de protéines non-repliées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) peut entraîner le stress du RE et mener éventuellement à la mort cellulaire (Rao *et al.*, 2002).

1.2.4 Les caspases

Les caspases sont des *cystéinyl aspartate protéinases*, ou protéases à cystéines, clivant leur substrat directement en aval d'un résidu aspartate (D). Onze caspases ont été identifiées chez l'humain, dix chez la souris, sept chez la drosophile et quatre chez le poulet, le poisson-zèbre et *C. elegans* (Lamkanfi *et al.*, 2002). Chez les mammifères, l'étude de la fonction et de la régulation des caspases apoptotiques est complexe et rendue davantage compliquée par la publication d'une quantité d'ouvrages sur l'impact de l'inhibition des caspases utilisant des inhibiteurs dont la spécificité peut être remise en question. Malgré la confusion qui peut en découler, on considère les caspases-2, -8, -9 et -10 comme des caspases initiatrices de l'apoptose, alors que la caspase-3 et plus modérément les caspases -6 et -7, sont considérées comme des caspases effectrices. Tel que vu précédemment, la caspase-8 est la caspase centrale de la signalisation apoptotique par la voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque de l'apoptose, alors que la caspase-9 est la caspase centrale de la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque de l'apoptose. (Degterev *et al.*, 2003; Fuentes-Prior et Salvesen, 2004). La fonction des caspases-2 et -10 est moins bien définie. Elles pourraient être impliquées, au même titre que la caspase-8, dans l'activation de tBid et la perméabilisation mitochondriale ou encore dans la régulation de la réponse inflammatoire médiée par le facteur de transcription anti-apoptotique NF- κ B [Figure 5]. Enfin, les caspases 4 et 12 sont impliquées lors de l'induction de l'apoptose reliée au stress du réticulum endoplasmique (Kumar, 2007; Hitomi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2000).

A



B

Site de clivage DXXD			Site de clivage XXXD		
Site	protéine		Site	protéine	
DEVD	G	PARP	MSLD	G	STAT1
DEVD	N	DNA-PKcs	NSPD	A	Sp-1
DVLD	N	Rad51	SELD	A	SRP p72
DELD	Y	Acinus	VFTD	L	NF-κB
DETD	S	DFF45/CAD site I	YVFD	S	PITSLRE Kinase
DAVD	T	DFF45/CAD site I	SHVD	G	PAK-2
DEVD	G	DNA-RFC140	EEVD	G	p50 ^{PKM}
DEAD	G	Rb	PAPD	A	CaMK-IV
DVFD	C	HDN2/MDN2	AAVD	G	p28 Sap31
DHVD	L	p21 ^{CIP1/WAF1}	ELFD	G	Actin
DSL D	L	NuMA	SRVD	G	Gas2
DYFD	S	ATM	VEID	N	Lamin A
DGFD	G	U1-70K enRNP	VEVD	N	Lamin B
DXXD	X	hnRNP-C1/C2	HLAD	S	Bcl-X _L
DEFD	S	SREBP	LQTD	G	BID
DRGD	S	IκB-α	VEVD	A	β-APP
DELD	S	D4-GDI	SSTD	S	proIL-16
DELD	A	αPLA ₂	DGDD	X	pro-Caspase
DMOD	N	PKC α			

Figure 5: Arbre phylogénique des caspases (A) et quelques exemples de substrats des caspases avec leur sites de clivage (B).

(Modifiée de Thornberry 1997; Nicholson 1999)

La caspase-3 est la caspase effectrice centrale et principale responsable du clivage des substrats cellulaires nécessaire au processus apoptotique. Elle est activée lorsque clivée par les caspases -8 et -9. La caspase-7 est similaire à la caspase-3 et clive le même type de substrat avec une préférence pour la séquence d'acides aminés DEVD. Malgré la similarité de structure de la caspase-6, celle-ci préfère la séquence VEDH comme site de clivage (Thornberry, 1997)). Le rôle apoptotique de la caspase-6 est controversé puisque certains stimuli apoptotiques fonctionnent aussi bien lorsque la caspase-6 est inhibée. Il semble que la caspase-6 puisse favoriser l'activation de la caspase-3 (Hirota, Otabe et al. 2006). Les caspases effectrices activées peuvent participer à l'amplification du signal pro-apoptotique en clivant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Youle et Strasser, 2008). Elles participent d'ailleurs au clivage d'un nombre sans cesse croissant de substrats, estimé récemment comme étant supérieur à 200. Elles clivent entre autres les lamines, les topoisomérases, la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et quelques régulateurs du cycle cellulaire (Pucci *et al.*, 2000). Le clivage des substrats apoptotiques par les caspases effectrices entraîne ensuite une série de modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose comme la condensation de la chromatine, la fragmentation internucléosomale de l'ADN, la perméabilisation de la membrane nucléaire, l'externalisation des phosphatidylsérines et la formation des corps apoptotiques (Hengartner, 2000). L'activité protéolytique des caspases peut être modulée non seulement par les IAP comme décrit précédemment, mais aussi par plusieurs autres régulateurs tels que le FLIP, la p35 commune au baculovirus, la calpaïne et les ions calcium (Chowdhury *et al.*, 2008). Entre autres, la protéine sérine/thréonine kinase Akt peut, par phosphorylation des caspases, inhiber l'activité des caspases (Cardone *et al.*, 1998).

1.2.5 Cycle cellulaire, voies métaboliques et expression *de novo*

L'entrée des cellules en phase apoptotique est précédée d'un arrêt du cycle cellulaire. Plusieurs liens ont été établis entre les systèmes régulateurs du cycle cellulaire et la machinerie apoptotique. L'apoptose est régulée par certains gènes qui sont aussi impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Par exemple, plusieurs stimuli apoptotiques tels

que l'endommagement de l'ADN relié aux UV ou encore l'exposition aux agents chimiothérapeutiques induisent l'activation du facteur de transcription p53. Une fois la protéine p53 activée, elle entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via l'expression de p21^{WAF1/CIP1}, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Suivant cette inhibition, pRb ne peut être phosphorylée et les cellules ne peuvent progresser du stade G1 à la phase S. Le stade cellulaire et le contexte cellulaire général peuvent aussi influencer fortement la sensibilité d'une cellule au signal apoptotique (Pucci *et al.*, 2000). Le facteur de croissance des nerfs IB (NGFIB), aussi connu sous le nom de Nur77, est une protéine impliquée à la fois dans le cycle cellulaire et dans l'apoptose. Lorsque transloquée du noyau vers le cytosol, Nur77 favorise l'apoptose par désactivation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Zhang, 2007).

Le destin des cellules est guidé par deux voies majeures de signalisation intracellulaire : la voie MAPK/ERK et la voie SAPK/JNK. Ces deux grandes voies signalétiques sont initiées par la protéine Ras et conduisent à l'activation de facteurs de transcription majoritairement anti-apoptotiques par la voie proliférative MAPK/ERK ou pro-apoptotiques par la voie associée à la réponse cellulaire au stress SAPK/JNK (Xia, Dickens *et al.* 1995; Denis, Rheaume *et al.* 1998). La voie SAPK/JNK est donc sollicitée lors de l'induction de l'apoptose, pour l'activation de voies signalétiques permettant l'amplification du signal apoptotique. L'expression *de novo* de protéines comme celles de la famille BH3-seul peut aussi jouer un rôle important lors de l'apoptose. Dans ce cas, il est possible que les protéines nouvellement produites puissent être directement dirigées vers la mitochondrie pour influencer rapidement l'apoptose. Il a été démontré que la privation de cytokines chez les neurones en culture entraîne une hausse significative de l'ARNm et de la quantité de Bim exprimée (Dijkers, Medema *et al.* 2000; Putcha, Moulder *et al.* 2001; Shinjyo, Kuribara *et al.* 2001). Il semble que c-jun et le facteur de transcription à tête fourchue (FKHRL1) participent à l'activation de la transcription de Bim (Dijkers, Medema *et al.* 2000; Whitfield, Neame *et al.* 2001). HRK, une autre protéine BH3-seul dont l'expression est accrue suivant l'induction de l'apoptose due à la privation de cytokines chez les cellules souches hématopoïétiques (Sanz, Benito *et al.* 2000). La régulation de la transcription des protéines BH3-seul semble particulièrement impliquée lors de l'apoptose induite par les dommages génotoxiques. Enfin, l'expression de deux autres protéines BH3-seul de la

famille de Bcl-2, Noxa et Puma, est induite de façon p53-dépendante lorsque des cellules murines primaires sont exposées aux rayons X (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001).

1.3 Fragmentation apoptotique de l'ADN génomique

La fragmentation internucléosomale de l'ADN et la condensation de la chromatine figurent parmi les indices les plus spécifiques et les mieux caractérisés de l'accomplissement du processus apoptotique. La programmation apoptotique de dégradation du matériel nucléaire par activation d'endonucléases permet de minimiser les risques de transferts génétiques aux cellules avoisinant la cellule détruite (de la Taille *et al.*, 1999). Aussi, la fragmentation de l'ADN favorise la réduction de l'activation d'auto-anticorps contre l'hétérochromatine des cellules détruites, parfois associée à certaines pathologies auto-immunes (Nagata, 2000). Le découpage complet de l'ADN en segment de 180-200 pb, ou découpage de faible poids moléculaire (FPM), est initié relativement tard, lorsque les voies signalétiques de l'apoptose sont bien enclenchées. Une fragmentation de haut poids moléculaire (HPM) peut aussi être observée lors des étapes précoces d'initiation de l'apoptose. De longs fragments de 50-300 kb sont alors créés grâce au clivage de sites hypersensibles. Les mécanismes du clivage de HPM sont moins bien caractérisés compte tenu de sa détection plus complexe qui requiert l'utilisation d'un gel d'électrophorèse à champs pulsés (Nagata, Nagase et al. 2003; Samejima and Earnshaw 2005; Widlak and Garrard 2005).

1.3.1 Les endonucléases apoptotiques

Les endonucléases apoptotiques peuvent être classées en trois groupes selon leur besoin pour les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Le premier groupe comprend les endonucléases acides indépendantes des cations comme la nucléase DNase II et la L-DNase II, enzyme dérivée de l'inhibiteur de l'élastase du leucocyte (LEI). Le deuxième groupe réunit les endonucléases dépendantes du cation du Mg^{2+} telles que le DFF40, l'endonucléase G,

l'endonucléase apurinique-apyrimidinique-1 (Ape-1) et la DNase activée par la granzyme A (GAAD). Enfin, le troisième groupe intègre les nombreuses nucléases NUC de tailles variables (NUC18, NUC58, NUC97, NUC260) et les endonucléases DNase I-like (DNase γ , DNase X/Xib et DNase1L2). Ces dernières nucléases sont biologiquement actives strictement lorsqu'en présence de cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Dans le cas de l'endonucléase G et de la DNase γ , le cation Mn^{2+} peut parfois remplacer le cation Mg^{2+} (Counis and Torriglia 2000; Counis and Torriglia 2006).

1.3.2 Le DFF40: Facteur de fragmentation de l'ADN

Bien qu'identifiée pour la première fois seulement en 1997 par Liu et al., la DNase activée par les caspases/facteur de fragmentation de l'ADN 40 (CAD/DFF40) est aujourd'hui l'endonucléase apoptotique endogène autonome la mieux caractérisée. Le DFF40 humain présente une forte homologie de séquence avec la CAD de plusieurs espèces dont le poulet, la drosophile, le poisson-zèbre, le rat et la souris. Les CAD/DFF40 font environ 40 kDa et sont des protéines basiques dont le pI oscille autour de 8.7-9.5 d'une espèce à l'autre (Nagata *et al.*, 2003). La présence de plusieurs histidines, tyrosines et lysines fortement conservées en sa région C-terminale et nécessaires à son activité catalytique explique en partie la charge globale fortement positive de cette protéine. Le DFF40 est spécifique à l'ADN double brin et clive préférentiellement les régions riches en A/T présentes dans les régions internucléosomales de l'ADN (Khodarev *et al.*, 2000). Il s'agit d'une endonucléase de type b, qui génère principalement des fragments à bouts carrés 3'OH/5'P détectables par l'analyse de type marquage biotine-d'UTP de bouts carrés avec la transférase desoxynucléotidyl terminale (TUNEL) (Widlak *et al.*, 2000). L'obtention du cristal du DFF40 a permis de démontrer que les résidus actifs du site catalytique résident dans un motif similaire au doigt $\beta\beta$ -Me qui fait face au petit sillon de l'ADN. Les protéines du groupement à haute mobilité (HMG) 1 et 2, l'ADN topoisomérase II et Hsp70 sont des co-activateurs importants du DFF40 (Widlak 2000; Nagata, Nagase et al. 2003; Samejima and Earnshaw 2005).

1.3.3 Le DFF45: Protéine chaperonne et inhibitrice du DFF40

L'inhibiteur de la DNase activée par les caspases/facteur de fragmentation de l'ADN 45 (ICAD/DFF45), est à la fois une molécule chaperonne et un inhibiteur de l'endonucléase CAD/DFF40. Chez l'humain et la souris, on retrouve deux formes de l'inhibiteur, qui résultent de l'épissage alternatif du même ARNm : le DFF45-L (long: 45 kDa) et l'ICAD/DFF45-S (court:30 kDa). Les deux formes sont des protéines acides et possèdent un pouvoir d'inhibition du DFF-40. Chez l'humain, la forme longue du DFF45 fait 331 acides aminés alors que la courte, privé de l'extrémité C-terminale, fait 265 acides aminés. Le DFF45 contient deux sites de clivage pour la caspase-3 aux résidus Asp117 et Asp224. Ces sites sont aussi reconnus par la caspase-7 et la granzyme B, mais sont clivés moins efficacement par celles-ci. Le DFF40 et le DFF45 présentent une homologie de séquence dans un domaine conservé d'environ 80 acides aminés en leur extrémité N-terminale (CIDE-N : effecteur N-terminal similaire à DFF45 inducteur de la mortalité cellulaire). Chez les cellules en prolifération, le DFF45 inhibe le DFF40 en s'associant avec lui via leurs CIDE-N respectifs. Il semble possible que l'hétérodimère formé puisse se lier à l'ADN sans activité catalytique de l'endonucléase et que l'enzyme soit plus tard activée directement dans un état lié à l'ADN. L'effet inhibiteur du DFF45 proviendrait du blocage de l'homo-oligomérisation du DFF40 (Lugovskoy *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 1999; Lechardeur *et al.*, 2000; Widlak, 2000; Nagata *et al.*, 2003; Korn *et al.*, 2005). Lechardeur *et al.* (2005) ont récemment suggéré une stoechiométrie différente du complexe DFF40/45. Selon ces derniers résultats et ceux d'autres équipes, le complexe contiendrait deux molécules du DFF40 et deux molécules du DFF45, formant ainsi le complexe (DFF40/45)₂ d'un poids moléculaire apparent de 160-190 kDa [Figure 6] (Lechardeur *et al.*, 2005).

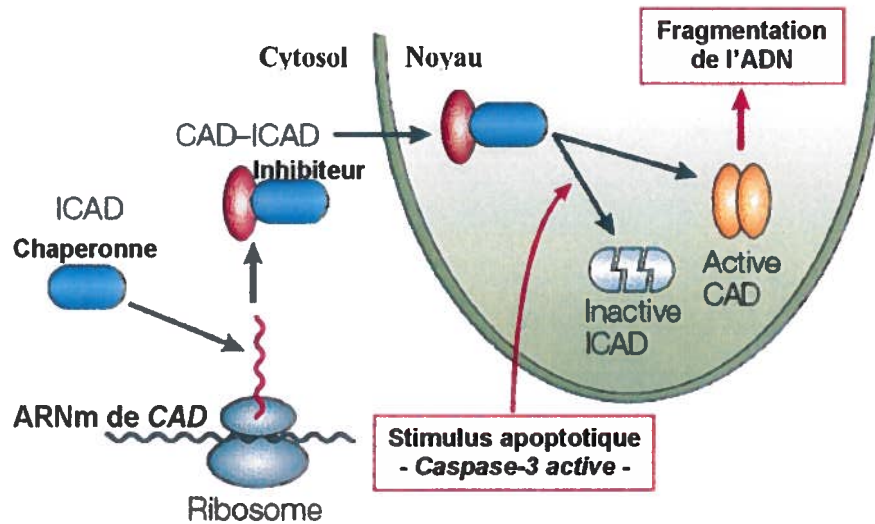


Figure 6: La protéine DFF45 sert à la fois de chaperonne et d'inhibiteur à l'endonucléase DFF40.

(Modifiée de Samejima et Earnshaw, 2005)

1.3.4 Régulation de l'activité du DFF40

Les mécanismes de régulation de l'activité fonctionnelle du DFF40 sont encore aujourd'hui mal compris. La dynamique précise de localisation cellulaire du complexe DFF40/45 est d'ailleurs controversée. Un peptide signal de localisation nucléaire (NLS) est présent à l'extrémité C-terminale du DFF40 et du DFF45, mais les deux protéines peuvent être observée à l'état basal aussi bien dans le cytosol que dans le noyau. En effet, chez les cellules non-apoptotiques, le complexe DFF40/45 serait particulièrement libre de diffuser, de façon passive, à travers la membrane nucléaire et n'interagirait que très faiblement avec les composants nucléaires statiques. Après induction de l'apoptose, l'immobilisation caspase-3-dépendante du DFF40 au niveau nucléaire surviendrait progressivement grâce à l'homo-oligomérisation du DFF40 en complexes pouvant atteindre 1 MDa. (Nagata, Nagase et al. 2003; Lechardeur, Xu et al. 2004; Samejima and Earnshaw 2005; Widlak and Garrard 2005)

Quelques propriétés du DFF40/45 font office de soupape de sécurité contre l'activation indésirée de la nucléase en des circonstances inappropriées. Il a été démontré qu'il existe un fort excès stoechiométrique du DFF45 par rapport au DFF40. Le clivage caspase-3-dépendant du DFF45 doit donc être soutenu afin que la libération du DFF40 soit déterminante. Le DFF40 peut aussi être inhibé par l'inhibiteur du CAD et collaborateur d'ASK1 (CIIA) (Cho *et al.*, 2003). Chez certaines cellules, il peut être inhibé par la protéine nucléolaire B23 (Ahn *et al.*, 2005a). Récemment, il a été démontré que plusieurs polyanions, qui ne sont pas des substrats de l'enzyme, comme l'ARN, l'ADN simple brin, l'héparine ou l'acide poly-glutamique, peuvent inhiber l'activité du DFF40. Le mécanisme d'inhibition des polyanions semble provenir de la neutralisation des charges positives de la face formée par 4 hélices- α d'un homodimère du DFF40, annihilant la capacité de liaison de cette surface avec le grand sillon de l'ADN (Widlak et Garrard, 2006). Le curcuma a aussi été identifié comme un inhibiteur compétitif du DFF40 en se liant au centre actif de l'endonucléase, sans toutefois affecter la liaison entre l'enzyme et son substrat (Sikora *et al.*, 2006). Le DFF40 requiert la présence de Mg^{2+} pour être actif et est inhibé par la présence de Zn^{2+} ou de Cu^{2+} . La force ionique influence aussi grandement l'activité du DFF40, laquelle est optimale à une concentration K^+ de 50-125 mM. (Widlak 2000; Korn, Scholz et al. 2005; Samejima and Earnshaw 2005)

1.4 Modèles d'étude de l'apoptose

L'étude du fonctionnement des mécanismes régulateurs et effecteurs de l'apoptose est nécessaire à la compréhension des perturbations responsables de plusieurs pathologies. En effet, un désordre au sein de ces mécanismes peut être à la source d'un bon nombre de maladies telles que les cancers, les infections virales, les affections auto-immunes, les maladies neurodégénératives, l'accident cérébrovasculaire, l'anémie et les SIDA (Wyllie, 1997). Une quantité d'investigations *in vitro* sont donc menées, grâce à la culture de cellules immortalisées et de composés chimiques inducteurs de l'apoptose, afin de mieux comprendre les différentes facettes de la mortalité cellulaire programmée.

1.4.1 Inducteurs d'apoptose

L'actidione, ou cycloheximide (CHX), est un antibiotique produit par *Streptomyces griseus* dont la toxicité provient de sa capacité à inhiber la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes. L'effet inhibiteur du CHX est double, affectant à la fois l'élongation des peptides par l'enzyme aminoacyltransférase II et l'agrégation polysomiale lors de la traduction (Baliga *et al.*, 1969; Kerridge, 1958). Le CHX peut être employé à des concentrations oscillant autour de 170 μM comme inducteur de l'apoptose et de la fragmentation de l'ADN chez plusieurs types cellulaires comme les cellules leucémiques humaines HL-60 (Martin *et al.*, 1990). La staurosporine (STO) est un inhibiteur des protéine kinases. Elle provoque l'apparition des changements morphologiques typiques de l'apoptose lorsque utilisée à des concentrations de l'ordre de 10-200 nM (Bertrand *et al.*, 1994; Falcieri *et al.*, 1993). Le tributylétain (TBT) est un composé chimique immunosuppresseur de type organostannique qui a longtemps été utilisé comme additif anti-salissure dans la peinture des coques de bateaux. Le TBT est aussi utilisé comme inducteur de l'apoptose. Lorsque des thymocytes sont en présence de TBT à des concentrations de l'ordre du micromolaire, les taux de Ca^{2+} cytosoliques augmentent et la viabilité cellulaire chute significativement. Cette perturbation est corrélée à l'activation d'endonucléases apoptotiques qui entraîne la fragmentation de l'ADN. Le prétraitement des cellules avec les chélateurs de Ca^{2+} Quin-2 ou l'acide 1,2-bis(2-amino-phénoxy)éthane-N',N',N',N',-tétra-acétique (BAPTA) entraîne la résistance des cellules à l'induction de l'apoptose par le TBT (Aw *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1996). L'étude de l'apoptose par induction extrinsèque peut être menée grâce à l'anticorps anti-Fas, qui induit la voie des récepteurs de mort et entraîne aussi les changements morphologiques typiques de l'apoptose et la fragmentation de l'ADN (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996)

CHAPITRE 2

LES MÉCANISMES DE RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE

2.1 Introduction

2.1.1 Contexte historique de la découverte

L'apparition du terme *épigénétique* a souvent été attribuée au généticien et philosophe Conrad Waddington qui en 1942, l'utilisait pour désigner la « *branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype* ». Depuis la moitié du 20^e siècle, une série d'étapes importantes ont été franchies en biologie moléculaire, de la représentation en double hélice de l'ADN par Watson et Crick en 1953, au séquençage complet du génome humain achevé en 2004 par un consortium international public. Outre l'étude des séquences nucléotidiques de l'ADN, l'étude progressive des mécanismes de contrôle de l'expression génique aura éventuellement conduit à une conception plus élargie de l'épigénétique, qui rassemble aujourd'hui l'implication coordonnée de facteurs de transcription et l'organisation tridimensionnelle locus-spécifique de la chromatine. Désormais, il semble plus approprié de réunir « *tout ce qui modifie la structure de la chromatine et l'expression des gènes* » au domaine de l'épigénétique (Mager et Bartolomei, 2005). Ces modifications, à la fois réversibles et héréditaires, sont le fondement de nouveaux paradigmes soulignant l'importance de l'environnement dans la justification de la variabilité de la réponse biologique.

2.1.2 Biologie de la chromatine

Chez les cellules humaines, la structure hautement organisée de la chromatine est responsable de l'empaquetage de plus de 2 mètres d'ADN dans un noyau d'environ 6 µm. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, lequel représente l'enroulement de 146-147 pb (± 73 pb x 2 tours) autour d'un octamère d'histones. Les histones sont de petites protéines structurales (11.4 à 21.2 kDa) riches en arginines et en lysines chargées

positivement, qui entrent en interaction ionique avec les groupements phosphates chargés négativement du squelette de l'ADN. Cinq types d'histones sont répertoriés chez l'homme : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 s'organisent donc en un octamère et forment le cœur du nucléosome. L'histone H1 possède trois domaines qui lui permettent de réunir les nucléosomes entre eux tout en s'associant à l'ADN internucléosomal ou ADN de jonction (10 à 60 pb). Les nucléosomes sont ensuite empaquetés dans une structure de type solénoïde composée de six nucléosomes par tours (Kornberg et Lorch, 1999; Horn et Peterson, 2002; Zhang et Dent, 2005).

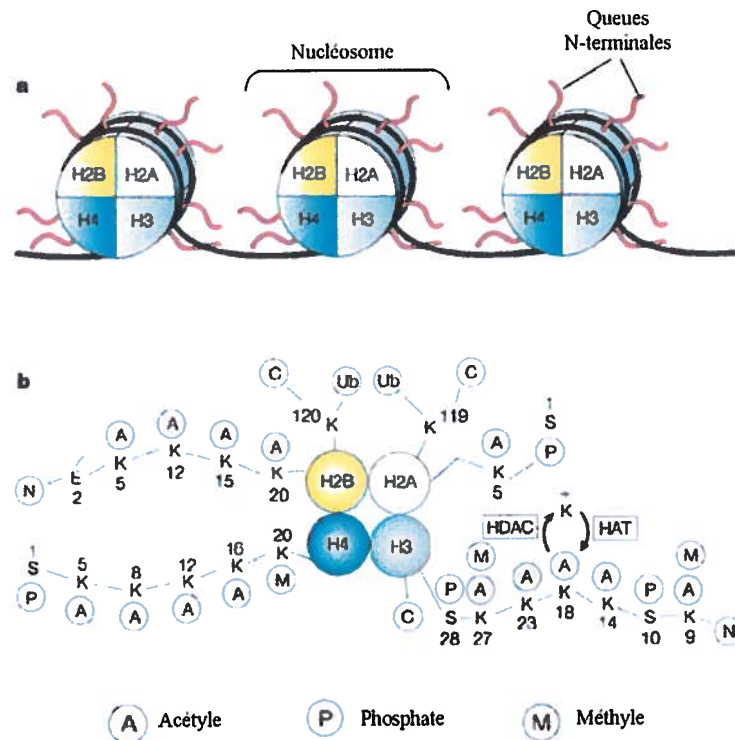


Figure 7: Structure du nucléosome (a) et sites des modifications post-traductionnelles sur les queues N-terminales des histones (b).

(Modifiée de Marks *et al.*, 2001)

2.1.3 Rôle physiologique de la régulation épigénétique

La conformation tridimensionnelle précise de la chromatine peut être remodelée par plusieurs événements moléculaires qui altèrent les interactions histone-ADN, les interactions nucléosome-nucléosome et les interactions entre la chromatine et les protéines régulatrices non-histone (Zhang et Dent, 2005). La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles covalentes des histones contribuent ainsi à la dynamique d'accessibilité de la chromatine et à la régulation de l'expression génique. La valorisation et/ou l'extinction de gènes lors de la différenciation-spécialisation des cellules sont les produits directs d'un remodelage locus-spécifique de la chromatine, permettant respectivement de diminuer ou d'accroître la densité de celle-ci dans la région proximale de gènes spécifiques à certains types cellulaires. Cette densité de la chromatine, régulée par la force de l'interaction entre les histones et l'ADN, est un facteur limitant la transcription des gènes chez les eucaryotes. Lorsque l'interaction est maximale, le complexe nucléoprotéique est condensé et les régions d'intérêt de l'ADN deviennent inaccessibles pour les facteurs de transcription et pour l'holoenzyme ARN polymérase II. L'activation de la transcription d'un gène nécessite donc dans plusieurs cas l'ouverture de la chromatine au promoteur et en aval du promoteur via le recrutement d'enzymes de remodelage de la chromatine au sein du complexe transcriptionnel. Les modifications post-traductionnelles des histones qui suivent le recrutement de ces enzymes sont multiples et variées. La complexité de ces modifications est illustrée non seulement par la diversité des enzymes de remodelage de la chromatine, mais aussi par la diversité des substrats présents sur les queues N-terminales des histones. Les nombreuses études sur la corrélation entre les changements biochimiques au niveau des histones et leur impact au niveau transcriptionnel et phénotypiques se traduisent désormais en l'élaboration fastidieuse d'un *code histone* se voulant une référence pour l'ensemble des investigations menées dans le domaine de l'épigénétique. En outre, l'impact des modifications épigénétiques ne se résume pas simplement au processus transcriptionnel, mais il s'étend aussi à la réplication, la réparation, la recombinaison et la ségrégation chromosomale (Strahl et Allis, 2000). Le remodelage de la chromatine n'est pas non plus strictement dirigé par les modifications biochimiques covalentes des histones, mais aussi par le remplacement des histones communs par des histones variants tels que H3.3 et H2A.X, par la modification de la

structure de base du nucléosome et par certaines modifications directes de l'ADN (Hake *et al.*, 2004).

2.2 Modifications post-traductionnelles des histones

2.2.1 Méthylation de l'ADN et des histones

Bien que la méthylation de l'ADN ne fasse pas partie de l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones, elle demeure une facette importante de la régulation épigénétique. Chez les cellules eucaryotes, l'ADN nucléaire peut subir la conversion de résidus cytosines en 5-méthylcytosines (m^5C), principalement en des régions riches en séquences CG ou CNG. La méthylation de résidus adénines et leur conversion en N^6 -méthyladénines (M^6A) est aussi observée principalement chez les plantes et de façon spécifique au sein de la séquence TGATCA. La méthylation de l'ADN peut varier en fonction de l'espèce, du tissu, des cellules, mais aussi selon l'âge et la régulation hormonale. Elle contrôle la réplication, la transcription, la réparation et la transposition génique en plus d'être un mécanisme important de discrimination/extinction génique lors de la différenciation cellulaire. L'absence de méthylation entraîne la perturbation du développement lors de l'embryogenèse et déclenche l'activation de l'apoptose. Les patrons de méthylation de l'ADN ainsi que les taux d'expression des enzymes reliées à celle-ci varient de façon significative chez les cellules cancéreuses et peuvent être utilisés comme diagnostics précoces de carcinogenèse. La méthylation de l'ADN favorise la stabilité de la double hélice et diminue fortement l'affinité de liaison avec l'ADN de nombreuses protéines telles que certains facteurs de transcription (Vanyushin, 2005). Chez l'humain, 50-60 % des gènes contiennent des îlots CpG (séquences riches en séquences CpG) en leur promoteur. Tous les gènes réprimés ne sont pas nécessairement méthylés, mais inversement, la méthylation des îlots 5'-CpG est très fortement associée à la perte d'expression du gène en aval. Il a été démontré qu'une diminution de la méthylation peut entraîner une augmentation de l'incidence mutationnelle et des réarrangements chromosomiques. L'hyperméthylation des îlots 5'-CpG peut quant à elle mener à

l'extinction de gènes nécessaires à l'intégrité cellulaire comme les gènes suppresseurs de tumeurs (Toyota et Issa, 2000).

La méthylation se produit aussi comme modification post-traductionnelle des histones. Elle peut survenir sur les résidus lysines (mono-, di- ou triméthylés) ou arginines (mono- ou diméthylés) des queues N-terminales des histones. La méthylation des résidus arginines est relativement dynamique et peut être corrélée avec l'activation de l'expression de certains gènes, tandis que la méthylation des lysines, généralement plus stable, ne fait pas l'unanimité quant à son rôle physiologique puisque dans certains cas, elle peut entraîner la répression d'un gène (méthylation des lysines 9 et 27 sur l'histone H3) alors que dans d'autres cas, elle aura pour effet l'activation d'un gène (méthylation de la lysine 4 sur l'histone H3) (Hake *et al.*, 2004).

2.2.2 Phosphorylation des histones

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des histones qui est souvent reliée à la condensation de la chromatine lors de la mitose, de la méiose ou de l'apoptose. Dans d'autres cas, la phosphorylation peut aussi être inversement associée à la décondensation de la chromatine, comme par exemple lors de la réponse précoce aux mitogènes et de l'activation des gènes très précoces: c-jun, c-fos et c-myc. Cette modification peut survenir sur les résidus sérines et thréonines des queues N-terminales des histones. Plusieurs histones et variantes d'histones telles que H1, H3, H2B et H2A.X peuvent devenir l'hôte d'une phosphorylation. Le site de phosphorylation des histones le plus étudié est la sérine 10 sur l'histone H3 (H3S10). L'ajout d'un groupement phosphate à cette sérine semble effectivement avoir un impact controversé, favorisant parfois la décondensation de l'ADN et parfois la condensation de l'ADN (Hake *et al.*, 2004; Strahl et Allis, 2000; Zhang et Dent, 2005). L'hypothèse de l'ajout de charges négatives via les groupements phosphates aux histones chargées positivement et la diminution subséquente de l'attraction entre l'ADN et les queues des histones concernées est retenue pour expliquer la décondensation de la chromatine reliée à la phosphorylation (Roth et Allis, 1992).

2.2.3 Acétylation des histones

L'acétylation des histones est probablement le mécanisme d'ouverture de la chromatine qui est le mieux caractérisé. L'ajout d'un groupement acétyle se fait par transfert à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) vers le groupement $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des résidus lysines des queues amino-terminales des histones. L'addition de cet acétyle aurait donc pour effet la neutralisation d'une charge positive sur la queue de l'histone et entraînerait ainsi la diminution de l'affinité histones-ADN de laquelle découlerait la décondensation de la chromatine, souvent associée aux régions transcrites de l'ADN. De plus, la présence d'un groupement acétyle peut permettre la formation d'un site de liaison spécifique pour les protéines flanquées de bromodomaines, ce qui favorise ensuite le recrutement d'autres facteurs de transcription. L'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est directement associée à l'activation des gènes. Sur l'histone H3 de la majorité des espèces, les sites d'acétylation se retrouvent aux lysines 9, 14, 18 et 23, alors que sur l'histone H4, les sites se retrouvent aux lysines 5, 8, 12 et 16. La périodicité avec laquelle les sites apparaissent le long des queues des histones, c'est-à-dire à tous les 3-4 résidus, rappelle remarquablement le nombre de résidus nécessaire à un tour d'hélice α (3.6 résidus). L'acétylation des histones n'est pas seulement associée à la transcription des gènes, mais aussi à la réplication de l'ADN. Elle permet alors l'incorporation des histones dans l'ADN nouvellement synthétisée (Gregory *et al.*, 2001; Hake *et al.*, 2004; Strahl et Allis, 2000; Tanner *et al.*, 1999).

2.2.4 Autres modifications post-traductionnelles

Outre la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation des histones, d'autres modifications post-traductionnelles moins fréquentes peuvent avoir une influence sur l'organisation de la chromatine. L'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la citrullinisation, la biotinylation, la propionylation, la butyrylation, la carbonylation et la glycosylation font partie de ces modifications secondaires. (Bolden *et al.*, 2006; Smith et Denu, 2009)

2.2.5 Transrégulation entre modifications

La complexité du code histone est exponentiellement amplifiée par le phénomène de trans-régulation qui existe entre certaines modifications post-traductionnelles des histones. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 sur l'histone H3 (H3S10) favorise de façon synergique l'acétylation de la lysine 14 sur l'histone H3 (H3K14). Inversement, cette même phosphorylation antagonise la méthylation de la lysine 9 (H3K9)(Chen *et al.*, 2005). Un second exemple est l'acétylation de l'histone H3 sur sa lysine 9, qui favorise la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4). Chez les levures, l'ubiquitination de la lysine 123 sur l'histone H2B (H2BK123) est nécessaire à la méthylation des lysines 4 et 79 sur l'histone 3 (H3K4/79). La collaboration de deux modifications peut aussi être nécessaire pour qu'un effet soit observable. Par exemple, le couplage de l'acétylation de la lysine 16 sur l'histone H4 (H4K16) et de la phosphorylation de H3S10 crée un signal combiné menant à l'augmentation de la transcription au niveau du chromosome X mâle (Linggi *et al.*, 2005).

2.3 Enzymes associées au remodelage de la chromatine

2.3.1 Méthyltransférases et déméthylases

Trois ADN méthyltransférases, la DNMT1, la DNMT3a et la DNMT3b, ont été clonées chez l'humain (Bestor et Ingram, 1983; Okano *et al.*, 1998). La méthylation des dinucléotides CpG peut réprimer l'expression de gènes de façon directe, en bloquant la liaison de certains facteurs de transcription, mais aussi en favorisant le recrutement de protéines de liaison au méthyl-CpG telles que MeCP2, MBD1 et MBD2. Ces protéines ont la capacité d'exclure certains facteurs de transcription, en plus de recruter certaines histone désacétylases (HDACs) et les H3K9 méthyltransférases, qui auront ensuite un effet supplémentaire sur la répression du gène ciblé via la modification post-traductionnelle des histones. Malgré quelques rapports suggérant une déméthylation active des cytosines, le seul mécanisme démontré de déméthylation est la perte passive des cytosines méthylées durant la réplication de l'ADN (Toyota et Issa, 2000; Wilson et Merckenschlager, 2006).

Les histone méthyltransférases (HMT) ont pour fonction le transfert d'un groupement méthyle de la S-adenosylméthionine (SAM) vers le groupement NH_3^+ des résidus lysines ou arginines. Selon la séquence et la structure de leur domaine catalytique, elles peuvent être séparées en trois classes : les arginine méthyltransférases, les lysines méthyltransférases contenant un domaine SET et les méthyltransférases Dot1-like. Les arginine méthyltransférases sont particulièrement impliquée dans l'activation de la transcription par les récepteurs d'hormones nucléaires, alors que les lysine méthyltransférases participent autant à l'activation qu'à la répression, qu'au processus transcriptionnel lui-même. Le domaine SET est un motif conservé de 130 acides aminés. Basé sur les similarités entre le domaine SET de levures et celui chez l'humain, quatre sous-familles ont été identifiées : la famille de SUV39, la famille de SET1, la famille de SET2 et la famille de RIZ (Kouzarides, 2002). La protéine SUV39, enzyme qui catalyse la méthylation de la lysine 9 sur l'histone H3, fût la première histone méthyltransférase à être identifiée. La prévalence de la méthylation des histones est généralement plus importante que l'acétylation (Zhang et Dent, 2005). En fait, l'identification d'une déméthylase d'histone est assez récente. Il s'agit d'un homologue nucléaire des amine oxidases, la LSD1, qui peut directement déméthyle la lysine 4 sur l'histone H3 (Shi *et al.*, 2004). Il semble cependant exister un déséquilibre entre la quantité d'enzymes connues permettant la méthylation et celles permettant la déméthylation des histones en faveur de la méthylation. Cette observation favorise l'hypothèse du caractère permanent de la méthylation comme modification post-traductionnelle des histones (Zhang et Dent, 2005).

2.3.2 Kinases et phosphatases

La phosphorylation de l'histone de liaison H1 est associée à la progression du cycle cellulaire et a longtemps figuré comme un marqueur des cellules mitotiques. La principale enzyme responsable du niveau maximal de phosphorylation des histones H1 durant la métaphase est CDK2. Un taux élevé de phosphorylation au niveau de la thréonine 3 et de la sérine 10 sur l'histone H3 est aussi observable durant la mitose. Les kinases Aurora sont responsables de la phosphorylation des sérines 10 et 28 sur l'histone H3, alors que la kinase

Haspin contrôle la phosphorylation de la thréonine 3 sur la même histone. La phosphorylation de H2A.X (γ H2A.X) au motif consensus SQE est dirigée par ATM et ses enzymes associées, la ATR et la kinase DNA PK_{cs} et est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome. Enfin, H2B est phosphorylée par la kinase Ste20 chez les levures et par son homologue Mst1 chez l'humain. Cette phosphorylation influence à la fois la division et la mortalité cellulaire via le contrôle des protéines DIAP1 et cycline E. Inversement, la déphosphorylation des histones peut elle aussi jouer un rôle important pour plusieurs processus biologiques. Différentes phosphatases semblent être impliquées selon le stimulus et selon l'histone ciblée. La PP1, la PP2A et la PP4 ont été reliées à la déphosphorylation des histones H1, H3 et H2A.X respectivement. (Nakada *et al.*, 2008; Nowak *et al.*, 2003; Paulson *et al.*, 1996; Zhang et Dent, 2005)

2.3.3 Histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC)

L'acétylation des histones est sans doute la modification post-traductionnelle des histones la plus étudiée. La découverte de nombreuses histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC), qui agissent en opposition et qui sont responsables du taux variable et locus-spécifique d'acétylation des histones, ne cesse d'alimenter la recherche sur le contrôle de l'expression des gènes. L'importance fonctionnelle de l'acétylation des histones réside en grande partie dans sa nature hautement réversible et dynamique. Les protéines ayant une fonction histone acétyltransférase telles que la CREB-binding protein (CBP), p300, PCAF ou Tip60 possèdent des sites de liaison qui leur permettent d'entrer dans la composition de larges complexes multiprotéiques. Outre leur activité HAT, ces co-activateurs peuvent recruter d'autres facteurs de transcription et la ARN polymérase II au sein du complexe (Sun *et al.*, 2003). De façon générale, lorsque l'activité HDAC prime sur l'activité HAT en un site promoteur, la conformation locale fermée de la chromatine maintient le gène proximal silencieux (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995; Spencer et Davie, 2001; Pogo *et al.*, 1966). Le recrutement de co-activateurs possédant une activité HAT est nécessaire au déplacement de l'équilibre et à l'ouverture locale de la chromatine pour l'activation de la transcription du gène en aval. L'activation d'un complexe transcriptionnel peut aussi passer par l'inhibition de l'activité HDAC, entraînant alors un

déplacement de l'équilibre vers une activité HAT supérieure. La diversité des HDAC, des mécanismes par lesquels leur activité est régulée et de leur implication lors de la mort cellulaire nous poussent à mettre un accent particulier sur la description de ces acteurs importants de la régulation épigénétique. (Grunstein, 1997; Sengupta et Seto, 2004; Strahl et Allis, 2000; Sun *et al.*, 2003)

2.4 Les histones désacétylases (HDAC)

2.4.1 Subdivision en classes

Chez l'humain, 18 HDAC ont été identifiées jusqu'à aujourd'hui selon leur degré d'homologie avec les histone désacétylases de levures (Lin *et al.*, 2006). Elles peuvent donc être séparées en quatre classes. Les HDAC de classe I sont des homologues de l'enzyme Rpd3 de *Saccharomyces cerevisiae* et regroupent les HDAC 1, 2, 3 et 8. À l'exception de la HDAC 3, ces HDAC sont considérées strictement nucléaires. Les HDAC de classe II sont homologues de la Hda1 de *S. cerevisiae* et incluent les HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10. Celles-ci peuvent être localisées au niveau cytoplasmique comme au niveau nucléaire. Parmi les HDAC de classe II, les HDAC 4, 5, 7 et 9 forment la sous-classe IIa (1 domaine hdac) et les HDAC 6 et 10 forment la sous-classe IIb (2 domaines hdac). Les HDAC de classe III (Sirtuins 1-7 : homologues de la Sir2 de *S. cerevisiae*) n'ont pas été autant étudiées que les deux premières classes chez l'humain. Elles se distinguent particulièrement par leur faible degré d'homologie avec les autres classes de HDAC et par leur besoin du cofacteur NAD⁺ (Frye, 1999). La classe IV est représentée seulement par la HDAC 11. Sa caractérisation reste encore superficielle vu son identification relativement récente. (de Ruijter *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006; Voelter-Mahlknecht *et al.*, 2005)

2.4.2 Régulation de l'expression et de l'activité des HDAC

Il a été démontré que l'expression de la HDAC 1 de souris peut être stimulée par l'interleukine 2 et que les niveaux d'ARNm de HDAC 1 sont faibles au stade G₀ du cycle cellulaire, puis augmentés lorsque la croissance cellulaire est activée, lors du passage en phases G₁/S. La transcription du gène *HDAC 1* est aussi fortement induite par la TSA (Hauser *et al.*, 2002). Toujours chez la souris, il a été démontré que l'expression de la HDAC 1 est auto-réprimée par recrutement de la HDAC 1 au promoteur de son propre gène (Schuettengruber *et al.*, 2003). La HDAC 1 aurait aussi la capacité de réprimer l'expression des gènes de la HDAC2 et de la HDAC3 puisque les niveaux d'expression de ces deux HDAC augmentent chez les cellules déficientes en HDAC 1 (Lagger *et al.*, 2002). L'expression des histone désacétylases semble donc en partie régulée par rétroaction négative. Enfin, l'expression de la HDAC 3 humaine lors de l'activation des cellules T par la PHA, la PMA et par un anticorps anti-CD3 (Sengupta et Seto, 2004; Dangond *et al.*, 1998).

L'étude de l'activité des HDAC peut être abordée de deux façons : l'activité enzymatique de désacétylation et l'activité fonctionnelle de régulation de la transcription. Les HDAC existent *in vivo* comme composantes de larges complexes multiprotéiques. Chacune des protéines associées à ces complexes ont le pouvoir de moduler différemment l'activité enzymatique des HDAC et ainsi, d'affecter la fonction régulatrice de celles-ci. Par exemple, les HDAC 1 et 2 peuvent être retrouvées ensemble dans au moins trois complexes actifs distincts : Sin3, NurRD/NRD/Mi2 et CoREST. De façon similaire, la HDAC 3 est recrutée vers sa cible éventuelle par les corépresseurs de récepteurs nucléaires comme le médiateur silencieux des récepteurs rétinoïque et thyroïdien (SMRT) et le corépresseur des récepteurs nucléaires (N-CoR) dont les domaines activateurs de désacétylases (DAD) permettent l'activation de la HDAC3 (Sengupta et Seto, 2004). De plus, la liaison de la HDAC 3 à SMRT requiert préalablement une stimulation ATP-dépendante de la HDAC 3 par le complexe TCP-1 en anneau (TriC) (Guenther *et al.*, 2002). La HSP70 est une autre protéine chaperonne ATP-dépendante reconnue pour augmenter l'activité catalytique des HDAC 1, 2 et 3 (Johnson *et al.*, 2002). Les HDAC des classe II quant à elles ne sont pas activées par SMRT/N-CoR. Elles exerceraient plutôt leur activité fonctionnelle par

recrutement subséquent du complexe HDAC3/SMRT/N-CoR (Fischle *et al.*, 2001). La présence d'un domaine de liaison à l'ADN (SANT) sur au moins un des facteurs des complexes multiprotéiques des HDAC serait aussi nécessaires à l'activité de celles-ci (Yu *et al.*, 2003).

2.4.3 Modifications post-traductionnelles des HDAC

Des HDAC comme la SIRT3 humaine peuvent être synthétisées sous une forme inactive, puis transférées à la mitochondrie pour être activées par clivage par une peptidase (Schwer *et al.*, 2002). Inversement, des HDAC comme la HDAC1 peuvent être régulées négativement par dégradation protéolytique médiée par les protéasomes. De façon indirecte, la dégradation protéolytique des coactivateurs des HDAC peut elle aussi contrecarrer l'activité HDAC (Wiper-Bergeron *et al.*, 2003; Sengupta et Seto, 2004). La phosphorylation des HDAC peut aussi influencer leur activité. Il a été démontré que la mutagénèse dirigée des sérines 421 et 423 de la HDAC 1 induit une baisse de son activité enzymatique et de son rôle de répresseur transcriptionnel (Pflum *et al.*, 2001). *In vitro*, HDAC 1 peut être phosphorylée par la CK2, la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG). Les HDAC 2 et 3 sont phosphorylées strictement par la CK2 et la HDAC 8 strictement par la PKA (Sengupta et Seto, 2004). Les HDAC de classe II peuvent aussi être phosphorylés. Cependant, cette modification n'entraîne pas directement une modification de l'activité enzymatique de ces HDAC. Elle régule plutôt leur localisation cellulaire. La calmoduline kinase (CaMK) semble être l'enzyme capable de phosphoryler les HDAC 4 et 5 (McKinsey *et al.*, 2000b). Même si la plupart des études ont été axées sur l'identification des kinases, le rôle des phosphatases pourrait être aussi important pour la régulation des HDAC. Il semble que la protéine phosphatase 1 (PP1) soit la principale phosphatase impliquée dans la régulation des HDAC (Galasinski *et al.*, 2002). La conjugaison du modificateur associé à une petite ubiquitine 1 (SUMO-1) à certaines HDAC peut aussi avoir des effets divers aux niveaux de la localisation cellulaire, des interactions protéine-protéine ou de l'activité enzymatique. La sumoylation des lysines 444 et 476 de la HDAC 1 a été observée *in vivo* et *in vitro*, mais il n'y a toujours pas consensus sur l'influence de cette modification sur l'activité de l'enzyme (Sengupta et Seto, 2004). La

sumoylation de la HDAC 4 a aussi été démontrée. Elle se produirait exclusivement dans le noyau, serait catalysée par la protéine RanBP2 du complexe de pores nucléaires et serait renversée par les voies signalétiques d'export nucléaire telles que celle induite par la CaMK (Kirsh *et al.*, 2002).

2.4.4 Localisation cellulaire des HDAC

Implicitement, les HDAC doivent être situées au noyau pour exercer leur fonction biologique d'acétylation des histones. Les HDAC 1, 2 et 8 sont nucléaires et ne semblent nécessiter aucune régulation au niveau de la localisation cellulaire (Sengupta et Seto, 2004). La HDAC 3 est différente des autres HDAC de classe I puisqu'elle peut être retrouvée dans la fraction cytosolique comme dans la fraction nucléaire. Suite à une stimulation par l'IL-1 β , le complexe répresseur de NF- κ B N-CoR/TAB2/HDAC3 est transloqué du noyau vers le cytosol. Dès lors, plusieurs gènes régulés par le facteur de transcription NF- κ B peuvent être exprimés (Baek *et al.*, 2002). Les HDAC de classe II HDAC 4, 5, 7 et 9 sont réputées être localisées à la fois dans le noyau et dans le cytosol. Elles acquièrent d'ailleurs la propriété de liaison aux protéines chaperonnes 14-3-3 lorsqu'elles sont phosphorylées sur des sérines situées à l'extrémité N-terminale conservée de ces HDAC. Une fois liées à 14-3-3, les HDAC sont séquestrées dans la fraction cytosolique des cellules. La phosphorylation préalable de ces HDAC semble être dirigée par la CaMKII. La présence d'un signal d'export nucléaire (NES) à l'extrémité C-terminale de ces HDAC, ainsi que sa potentialisation par liaison des enzymes avec 14-3-3, sont nécessaires à la séquestration cytoplasmique des HDAC 4, 5 et 7. Une séquence d'import nucléaire (NIS) a aussi été identifiée à l'extrémité N-terminale de ces HDAC et semble être masquée par la liaison à 14-3-3. La liaison entre l'importine- α et la HDAC 4 serait aussi corrompue par la liaison de celle-ci à 14-3-3 (McKinsey *et al.*, 2001; Wang et Yang, 2001). La HDAC de classe II HDAC 6 peut aussi être située dans le noyau ou dans le cytosol. Cependant, cette dernière est marginale puisqu'elle exerce sa fonction première dans le cytosol, où elle désacétyle l' α -tubuline. Sa localisation cellulaire n'est pas non plus dirigée par la liaison à 14-3-3 (Verdel *et al.*, 2000; Hubbert *et al.*, 2002). La désacétylation de protéines non-histones par les HDAC est d'ailleurs courante. Plusieurs protéines sont soumises à

l'acétylation/désacétylation *in vivo*. Parmi celles-ci, on compte une quantité de facteurs de transcription comme p53, YY1, STAT3, les protéines HMG et c-Myc, les récepteurs nucléaires androgènes et oestrogènes et les facteurs GATA, NF- κ B et Smad7. (Glozak *et al.*, 2005; Sengupta et Seto, 2004)

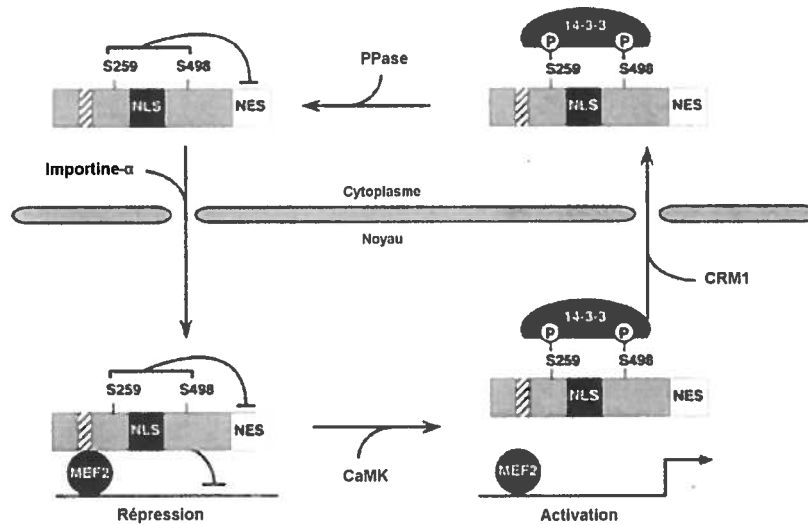


Figure 8: Modèle de régulation de la localisation cellulaire par phosphorylation des HDAC de classe IIa comme la HDAC5.

(Modifiée de McKinsey *et al.*, 2001)

CHAPITRE 3

RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE L'APOPTOSE

3.1 Modifications post-traductionnelles apoptotiques

3.1.1 Introduction à l'épigénétique du cancer

Les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'apoptose par modification de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes pro/anti-apoptotiques, des oncogènes, par inactivation fonctionnelle des membres pro-apoptotiques ou encore par interruption de cascades enzymatiques exécutrices de l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2000). Le cancer et ses altérations ont longtemps été associés à des affections génétiques comme les mutations et délétions ponctuelles, ou encore à certaines aberrations chromosomiques. Cependant, de plus en plus d'indices laissent croire en une influence cruciale des modifications épigénétiques dans l'apparition et la progression du cancer (Bolden *et al.*, 2006). Les mécanismes épigénétiques susceptibles d'influencer l'apoptose et la carcinogenèse peuvent être classés en trois grandes catégories selon le mode d'action affecté: la répression de gènes normalement actifs (gènes suppresseurs de tumeurs contrôlés par les HDAC, les HMT, les DNMT, le SWI/SNF), l'activation de gènes normalement silencieux (oncogènes contrôlés par les HAT, les HMT et SWI/SNF) et le remplacement des histones standards par les variantes d'histones. (Hake *et al.*, 2004). Le complexe SWI/SNF est une ATPase dépendante de l'ADN pouvant moduler la structure tridimensionnelle de la chromatine de façon à réprimer ou activer un gène, selon le contexte (Peterson et Workman, 2000). Un exemple de gène épirégulé lors de l'apoptose est la régulation de l'expression de FasL qui est contrôlée en partie par un remodelage de la chromatine à la région du codon START et du promoteur du gène de cette protéine pro-apoptotique (Escaffit *et al.*, 2007). Cette région hypersensible aux nucléases (HSS1) est en conformation locale ouverte lorsque le gène est transcrit et devient résistante aux nucléases, donc en conformation locale fermée, lorsque le gène est réprimé. L'étude de l'implication des mécanismes de régulation épigénétiques lors de l'apoptose s'avère primordiale pour

une compréhension accrue des voies potentiellement responsables de l'acquisition de résistance à l'apoptose (Castellano, Vire et al. 2006).

3.1.2 Méthylation de l'ADN lors de l'apoptose

Tel que décrit précédemment, la méthylation de l'ADN au promoteur d'un gène est corrélée à une baisse marquée de l'expression du gène en aval. Dans ce cas, l'hyperméthylation de gènes pro-apoptotiques peut être impliquée dans les déséquilibres entre mortalité cellulaire et prolifération cellulaire typiques des cellules cancéreuses. Cette hyperméthylation peut entraîner une perturbation au sein de plusieurs voies signalétiques déterminantes lors du développement de tumeurs comme les voies de suppression de tumeurs, de réparation de l'ADN, de réponse hormonale, d'adhésion cellulaire ou encore du métabolisme des drogues/médicaments. La répression de l'expression par hyperméthylation de l'ADN de gènes impliqués dans la phase initiatrice de l'apoptose (p53, Apaf1, Fas, caspase-8) a été démontrée et peut parfois servir de marqueur pour l'identification de cellules cancéreuses. (Gopisetty *et al.*, 2006)

3.1.3 Méthylation des histones lors de l'apoptose

Plusieurs protéines portant un domaine SET ont été reconnues comme étant potentiellement impliquées dans l'évolution des tumeurs. Des souris porteuses de délétions au niveau des gènes Suv39h1 et Suv39h2 sont susceptibles à une instabilité génomique qui est corrélée avec une forte diminution de la méthylation des lysines 9 des histones H3 (H3K9). Environ 30% de ces souris développent des lymphomes de cellules B. À l'état normal, ces HMT s'associent au suppresseur de tumeur Rb et entraînent la méthylation de type H3K9 aux promoteurs des gènes cibles de Rb tels que E2F, un facteur de transcription favorisant l'expression de cyclines impliquées dans la phase G1/S du cycle cellulaire. D'autres HMT comme RIZ1 (H3K9), EZH2 (H3K27) et hDOT1L (H3K79) sont aussi associées à l'apparition de certains types de cancers. (Zhang et Dent, 2005)

3.1.4 Phosphorylation des histones lors de l'apoptose

La dynamique de phosphorylation des histones durant l'apoptose est relativement peu connue. La phosphorylation de la sérine 139 de la variante H2A.X agit comme détecteur de dommage à l'ADN pouvant survenir durant l'induction de l'apoptose (Rogakou *et al.*, 2000). Chez les vertébrés, la phosphorylation de la sérine 14 de l'histone H2B par la protéine kinase Mst1 est fortement corrélée à l'apoptose (Cheung *et al.*, 2003). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, c'est plutôt la phosphorylation de la sérine 10 sur le même histone qui est reliée à l'apoptose (Ahn *et al.*, 2005b). Une déphosphorylation rapide des histones de liaison H1 a été observée durant l'apoptose (Kratzmeier *et al.*, 2000). La phosphorylation des histones H2A et H3 a été observée dans certains contextes apoptotiques (Waring *et al.*, 1997; Downs *et al.*, 2004), mais aucune généralisation n'a été faite concernant la phosphorylation de ces histones durant l'apoptose (Th'ng, 2001; Prigent et Dimitrov, 2003).

3.1.5 Acétylation des histones lors de l'apoptose

Tel que présenté précédemment, l'acétylation des histones est reliée à la décondensation de la chromatine permettant l'initiation et la progression de la transcription. Une hausse du taux d'acétylation des histones aux promoteurs de gènes pro-apoptotiques devrait donc avoir, de façon générale, une influence favorable sur la progression de l'apoptose, alors qu'une hausse du taux d'acétylation aux promoteurs de gènes anti-apoptotiques entraînerait une résistance à l'induction de l'apoptose. Inversement, une baisse de l'acétylation des histones aux promoteurs de gènes pro-apoptotiques aurait une influence défavorable sur la progression de l'apoptose, alors qu'une baisse du taux d'acétylation aux promoteurs de gènes anti-apoptotiques entraînerait une hausse de la susceptibilité apoptotique. Les inhibiteurs de HDAC (HDI) ont la capacité d'induire l'apoptose. Cette capacité des HDI est parfois associée à leur capacité à entraîner l'hyperacétylation des histones (Lee *et al.*, 1996). Cependant, l'hyperacétylation des histones n'a pas encore été décrite comme caractéristique marquante de l'apoptose lorsqu'elle est induite par d'autres toxiques n'induisant pas l'inhibition des HDAC. Toutefois, il est possible que l'inhibition des HDAC puisse favoriser l'acétylation locus-spécifique d'histones situées dans la région de

promoteurs de gènes précis, nécessaires au processus apoptotique. L'acétylation d'histones précises lors de l'apoptose induite par des toxiques non-HDI n'a pas encore été proposée.

3.2 Modulation apoptotique des histones désacétylases

3.2.1 Dégradation des HDAC par les protéases apoptotiques

Lors de l'induction de l'apoptose, la HDAC 3 est clivée par les caspases et sa forme tronquée est transloquée vers le cytosol. Sa séquestration au niveau cytoplasmique l'empêche d'exercer son rôle fonctionnel de répresseur aux sites de gènes pro-apoptotiques (Escaffit *et al.*, 2007). Les HDAC de classe IIa ont aussi été étudiées pour leur importance dans la régulation et la progression de l'apoptose. La HDAC 4 est très instable en comparaison aux HDAC 1, 2, 3 et 6. L'analyse de mutants tronqués de la HDAC 4 a révélé que cette instabilité provient de la susceptibilité de la HDAC au clivage par les caspases en deux sites distincts. L'acide aminé Asp-289 est essentiel au clivage apoptotique de la HDAC 4 par les caspases et n'est pas conservé chez les autres HDAC de classe IIa HDAC 5, 7 et 9. L'expression de la forme mutée au site Asp-289 de la HDAC 4 chez les cellules HeLa entraîne une diminution relative de l'apoptose, en comparaison à l'induction de l'apoptose chez les cellules normales (Liu *et al.*, 2004; Paroni *et al.*, 2004). Enfin, la HDAC7 est clivée par la caspase-8 durant l'apoptose des thymocytes (Scott *et al.*, 2008). Les HDAC3, 4 et 7 sont donc les trois seules HDAC dont le clivage protéolytique a été observé durant l'apoptose jusqu'à aujourd'hui.

3.2.2 Localisation cellulaire des HDAC lors de l'apoptose

De plus récentes études sur le comportement apoptotique de la HDAC 4 ont permis de lui attribuer un rôle dans l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire associé à la perte d'intégrité de l'ADN. Lorsque l'ADN est endommagé, la HDAC 4 est transloquée du cytosol vers le noyau pour s'associer de façon p53-dépendante aux promoteurs de certains gènes. (Basile *et al.*, 2006). La complexité de la régulation de la HDAC 4 est aussi accrue par la présence de différents sous-types de cette enzyme qui sont issus de la déphosphorylation et du

clivage par les caspases et qui démontrent des habiletés distinctes d'induction de la différenciation et/ou de l'apoptose (Paroni *et al.*, 2007). La HDAC 7 est aussi impliquée dans l'apoptose des thymocytes lors de la sélection négative et positive. Semblable à la HDAC 4, la HDAC7 peut voir son rôle fonctionnel modulé par la translocation nucléocytoplasmique et par le clivage par la caspase-8. Il semble que la contribution apoptotique de la modulation de la HDAC 7 serait reliée avec la diminution de la répression du facteur pro-apoptotique Nur77. (Kasler et Verdin, 2007; Parra *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008)

3.2.3 Complexes transcriptionnels régulés par les HDAC sensibles à l'apoptose

Toutes les HDAC ne sont pas clivées ou transloquées durant l'apoptose. Il devient donc intéressant de trouver des points communs entre les HDAC qui sont modulés durant l'apoptose, soit les HDAC 3, 4 et 7. Contrairement aux autres classes, les HDAC pouvant être localisées au cytosol semblent particulièrement modulées lors de l'apoptose. Un autre point commun intéressant est que les HDAC 3, 4 et 7 ont toutes une influence sur le facteur de valorisation du myocyte 2 (MEF2) (Gregoire et Yang, 2005; Gregoire *et al.*, 2007). Le MEF2 est un facteur de transcription multipotent dont l'activation Ca^{2+} -dépendante a été associée entre autres à l'apoptose des lymphocytes T (Youn *et al.*, 1999). La répression de la transcription via MEF2 est contrôlée par le recrutement et la liaison de MEF2 aux HDAC. L'activation du MEF2 est favorisée par son acétylation par l'acétyltransférase p300. La HDAC3 peut désacétyler et inactiver MEF2, ce qui n'est pas le cas pour les HDAC 4 et 7. Le mécanisme de désactivation du MEF2 par les HDAC 4 et 7, reste moins bien défini, mais il est connu que les HDAC de classe IIa favorisent toutes la sumoylation du facteur de transcription et son inactivation subséquente (Gregoire *et al.*, 2007; Gregoire et Yang, 2005). L'implication du MEF2 dans l'apoptose pourrait être reliée à l'expression du facteur de transcription Nur77 de la famille des récepteurs nucléaires (Youn et Liu, 2000). Durant l'apoptose, ce facteur de transcription peut être transloqué vers le cytosol et activer directement ou indirectement, via la relocalisation de Bax, la voie mitochondriale de l'apoptose (Moll *et al.*, 2006). Le clivage des HDAC agissant comme répresseurs de l'expression de MEF2 ou encore leur translocation nucléocytoplasmique durant l'apoptose peuvent alors induire l'expression de Nur77 et favoriser la voie intrinsèque de l'apoptose.

La HDAC7, relocalisée au niveau du cytosol lors de l'apoptose chez les thymocytes, agit normalement comme répresseur de l'expression de Nur77. Il est connu que les HDAC 5 et 9 participent aussi à la régulation de l'activité de MEF2 (Gregoire et Yang, 2005). Cependant, aucune étude ne fait état d'une quelconque modulation de ces deux HDAC durant l'apoptose. Les HDAC 4, 5 et 7 ont aussi la capacité de se lier au facteur de transcription BCL6. En recrutant ces HDAC au site de promoteurs de gène pro-apoptotique, BCL6 peut réprimer l'expression de ces gènes et ainsi favoriser la survie cellulaire aux dépens de l'apoptose. (Lemercier *et al.*, 2002). Ainsi, il est probable que la perte d'activité HDAC au niveau du noyau entraîne une perte de la fonction oncogène de BCL6. De façon plus individuelle, la HDAC3 fonctionne aussi comme corépresseur de plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans l'apoptose comme E2F, c-jun, PPAR γ et Fas. (Escaffit *et al.*, 2007; Fajas *et al.*, 2002; Panteleeva *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2003)

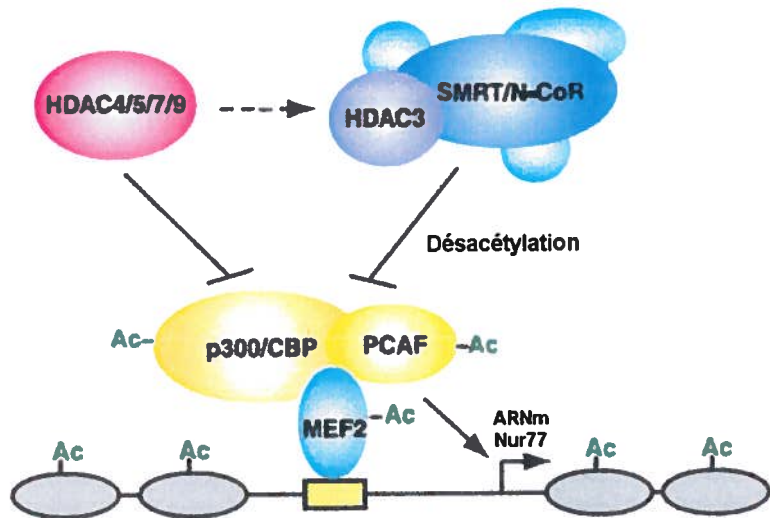


Figure 9: Gènes réprimés par le facteur de transcription MEF2 via la désacétylation par les HDAC sensibles à l'apoptose.

(Modifiée de Gregoire *et al.*, 2007)

3.3 Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDI)

3.3.1 Influences pro-apoptotiques et anti-prolifératives des HDI

Dans la dernière décennie, plusieurs traitements contre le cancer ont été développés en fonction des plus récentes découvertes sur le fonctionnement de l'apoptose. Parmi ces traitements, plusieurs inhibiteurs non-spécifiques d'histone désacétylases (HDI) tels que la trichostatine A (TSA), l'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA) ou l'acide valproïque (VA) ont démontré la capacité de sensibiliser les cellules cancéreuses à entrer en phase apoptotique, voire même une capacité à induire l'apoptose. Certains de ces HDI sont maintenant considérés comme adjuvants potentiels dans le cas de résistance à la chimiothérapie. (Krug *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Parmi les nombreux HDI de provenances naturelle ou synthétique, au moins 11 sont passés à l'étude clinique. Initialement, le butyrate de sodium (NaBu) avait été reconnu pour son pouvoir anti-cancéreux issu de sa capacité à induire la différenciation cellulaire. Ensuite, cette capacité fut reliée à l'hyperacétylation des histones qui suit le traitement des cellules avec le NaBu. Enfin, c'est seulement dans les années 1990 qu'un lien clair fut établi entre l'inhibition des HDAC et l'arrêt de la croissance/survie tumorale (Yoshida *et al.*, 1990; Richon *et al.*, 1998). Malgré une quantité d'études produites et plusieurs hypothèses avancées, les mécanismes par lesquels les HDI non-spécifiques exercent leur action anti-proliférative et pro-apoptotique restent encore mal définis (Bolden *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Dokmanovic et Marks, 2005; Kelly *et al.*, 2002).

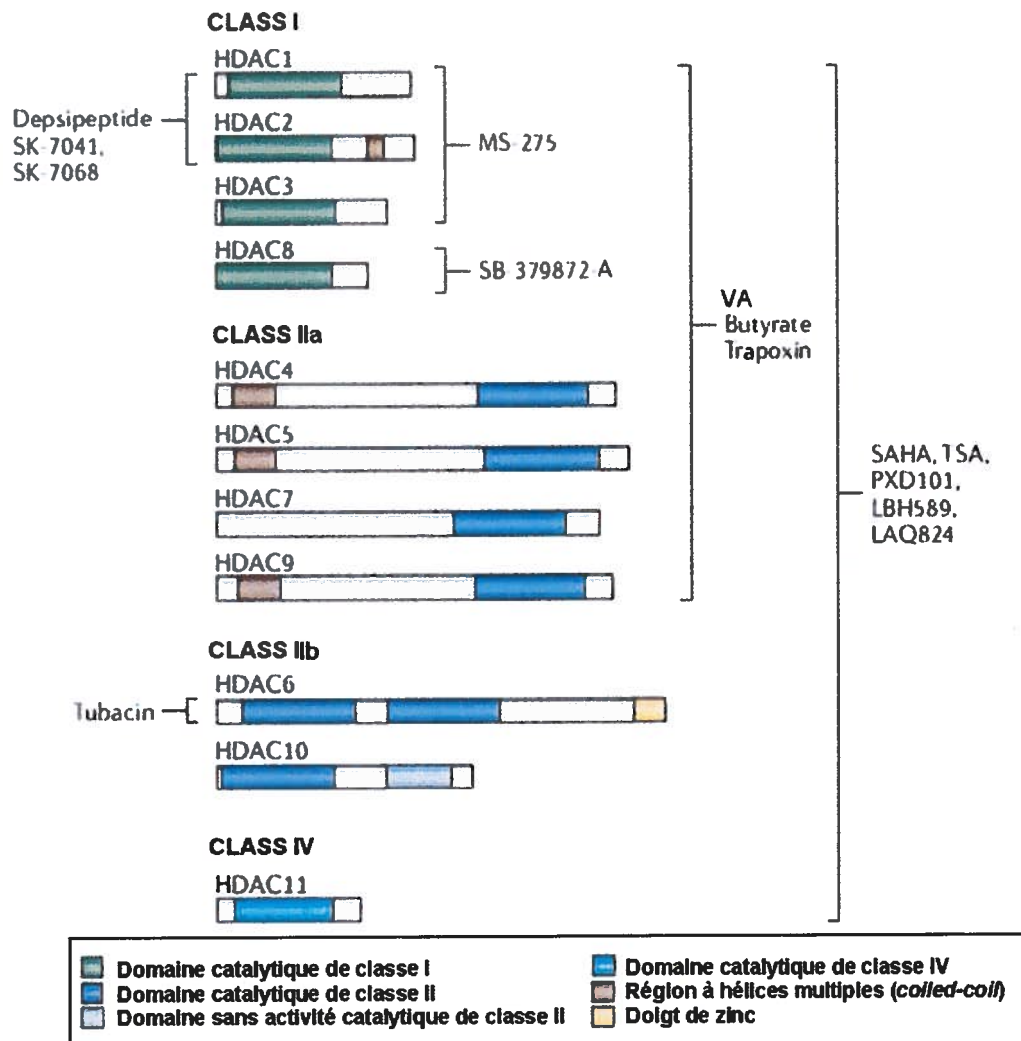


Figure 10 : Liste des HDAC (classe I, II et IV) et quelques inhibiteurs de HDAC (HDI) à spécificité variable.

(Modifiée de Bolden *et al.*, 2006)

Jusqu'à aujourd'hui, l'étude des mécanismes actifs des HDI a été abordée principalement sous deux angles. La première approche est le rétablissement du recrutement aberrant de HDAC à certains promoteurs via leur association avec des protéines de fusion oncogéniques issues de translocations chromosomiques ou de la surexpression de répresseurs de la transcription qui interagissent avec les HDAC (Bolden *et al.*, 2006). En effet, l'induction du recrutement atypique de complexes répresseurs contenant des HDAC par des protéines de fusion oncogéniques comme PML-RAR α , PLZF-RAR et AML1-ETO, dans certains cas de leucémies promyélocytiques (APL) ou myéloïdes aiguës (AML), a pu être renversée par le traitement combiné de rétinoïdes avec certains HDI (Cote *et al.*, 2002; Ferrara *et al.*, 2001). Le facteur de transcription de lymphome de cellules B 6 (BCL6) est surexprimé chez environ 40 % des lymphomes de cellules B diffus (DLBCL). BCL6 a le pouvoir d'inhiber certains gènes régulateurs de la croissance cellulaire comme le gène de p21^{WAF1/CIP1} via le recrutement de la HDAC2. En plus de désinhiber l'expression de facteurs pro-apoptotiques comme la p21^{WAF1/CIP1}, le traitement du DLBCL par les HDI favorise l'acétylation et l'inactivation de BCL6, ce qui mène à la dérégulation de certains gènes régulateurs de l'apoptose chez les cellules tumorales (Bereshchenko *et al.*, 2002; Pasqualucci *et al.*, 2003). La seconde approche aborde plutôt la question du niveau altéré d'expression des HDAC chez certaines lignées tumorales. Par exemple, la HDAC1 est surexprimée au sein des carcinomes de la prostate, gastrique, du colon et du sein; la HDAC2 est surexprimée chez les cellules cancéreuses colorectales, cervicales et gastriques; la HDAC3 est surexprimée lors du cancer du colon; et la surexpression de la HDAC6 est observée chez certains individus atteints du cancer du sein (Bolden *et al.*, 2006). Plus précisément, le cancer colorectal est fortement associé à une baisse d'expression de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p21^{WAF1/CIP1} induite par surrépression par la HDAC 3 (Spurling *et al.*, 2008). Le NaBu peut induire l'expression de p21^{WAF1/CIP1} et entraîner ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1-S du cycle cellulaire (Davie, 2003).

En plus de déréguler les gènes pro-apoptotiques qui sont généralement contraints par les oncogènes, les HDI peuvent aussi favoriser directement l'expression de gènes pro-apoptotiques non-exprimés à l'état basal spécifiquement chez les cellules transformées. Par exemple, l'expression des gènes TRAIL, récepteur de mort 5 (DR5) et Fas, se produit seulement chez les cellules cancéreuses lorsque traitées avec les HDI (Insinga *et al.*, 2005).

La voie mitochondriale de l'apoptose peut elle aussi être impliquée dans l'induction de l'apoptose par les HDI. L'activation de l'expression des protéines BH-only Bim et Bmf, activatrices des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux Bax et Bak, a été reliée à l'induction de l'apoptose par les HDI. L'activation de la transcription de Bmf résulterait de l'augmentation de l'acétylation des histones dans la région de son promoteur, alors que celle de Bim serait associée à l'activation et à la liaison au promoteur de Bim du facteur de transcription E2F1 (Zhang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005). Malgré que le mécanisme d'action ne soit toujours pas identifié, il semble que le traitement des cellules avec les HDI entraîne une hausse précoce du taux d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui précède même la perturbation de la membrane mitochondriale (Rosato *et al.*, 2003). Les HDI peuvent aussi entraîner la répression de certains gènes. Par exemple, la TSA inhibe l'expression de la protéine régulatrice de la phase G1 du cycle cellulaire p57^{KIP2}, une kinase dépendante des cyclines (cdk) qui possède des propriétés anti-apoptotiques (Gray et Ekstrom, 1998). L'hypoacétylation de la lysine 16 des histones H4 est une caractéristique commune des cellules tumorales humaines, qui peut aussi être renversées par le traitement par les HDI (Fraga *et al.*, 2005). Enfin, les HDI peuvent favoriser l'acétylation de protéines non-histones impliquées dans la survie ou la mort cellulaire. Par exemple, les HDI induisent l'acétylation de la protéine chaperonne de Akt (Hsp90) et la dégradation subséquente de cette protéine anti-apoptotique (Di Gennaro *et al.*, 2004). Qu'importe le mécanisme par lequel les HDI exercent leur action, ils induiraient l'apoptose via des voies signalétiques indépendantes de p53 (Bolden *et al.*, 2006).

L'utilisation des HDI non-sélectifs dans le traitement de cancers entraîne rapidement une contrainte au niveau de la toxicité associée à la dose. Des doses trop fortes de HDI entraînent des effets secondaires comme la thrombocytopénie, la nausée, la fatigue et dans certains cas, l'arythmie cardiaque. La non-spécificité des HDI devient donc un problème causant, au-delà de l'activité précise pour laquelle ils sont employés, une série d'activités biologiques indésirables (Bolden *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2002). L'isolation et le développement d'inhibiteurs de HDAC plus spécifiques combinée à une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques régulant la mort et la survie cellulaire permettront sans doute dans l'avenir une approche mieux dirigée et plus sensible pour le traitement du cancer.

3.4 Contrôle épigénétique de la fragmentation de l'ADN

3.4.1 Importance des histones de liaison H1 pour le DFF40

L'expression de l'histone de liaison H1 peut être induite par les inhibiteurs des HDAC comme la TSA (Girardot *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2007). Il semble que l'histone de liaison H1 soit impliqué dans l'apoptose au niveau de la reconnaissance de la région internucléosomale par l'endonucléase DFF40. Cependant, malgré qu'une déphosphorylation significative des histones H1 ait été observée après induction de l'apoptose, il semble qu'elle ne soit ni un pré-requis, ni une conséquence du clivage internucléosomale par le DFF40. Toutefois, il a été démontré que la poly(ADP-ribosyl)ation des histones H1 est corrélée à la fragmentation de l'ADN par le DFF40 (Ausio, 2000; Goebel *et al.*, 2007; Widlak *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 1996)

3.4.2 Modifications épigénétiques et condensation de la chromatine

La condensation de la chromatine est une des caractéristiques communes aux cellules apoptotiques. Il est possible que certaines modifications post-traductionnelles des histones aient un rôle à jouer dans cette modulation de la conformation de la chromatine lors de l'apoptose. Tel que présenté précédemment, le niveau de phosphorylation des histones est modulé au cours de l'apoptose. La déubiquitination de l'histone H2A est également observée lors de l'apoptose de cellules de lymphomes (Marushige et Marushige, 1995). Chez plusieurs lignées cellulaires, les histones se dissocient des nucléosomes suite à l'induction de l'apoptose, au cours de la fragmentation de l'ADN (Wu *et al.*, 2002). Les relations de cause à effet entre la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine et les modifications post-traductionnelles ne sont pas encore bien définies. L'acétylation ou la désacétylation des histones, qui entraînent aussi une perturbation de l'attraction électrostatique entre les histones et l'ADN, pourraient aussi avoir leur influence sur la fragmentation et/ou la condensation de l'ADN. Lee *et al.* (1996) suggèrent d'ailleurs que l'hyperacétylation des histones précédant l'apoptose induite par les HDI pourrait permettre l'augmentation de l'accessibilité à l'ADN pour qu'une endonucléase comme le DFF40 puisse catalyser la fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose. La même

équipe associe du même coup la capacité d'induction de l'apoptose des HDI à l'hyperacétylation apoptotique des histones suivant le traitement des cellules avec TSA et NaBu (Lee *et al.*, 1996).

3.5 Objectifs de la recherche

L'objectif principal de ce travail consiste en l'investigation des voies signalétiques par lesquelles les inhibiteurs des HDAC (HDI) induisent l'apoptose. En effet, nous croyons et tentons de démontrer que les HDI peuvent reproduire une modulation épigénétique survenant au cours de l'apoptose normale, telle que la dégradation de certaines HDAC ou encore la translocation nucléocytoplasmique de celles-ci. L'approche utilisée est indirecte, c'est-à-dire que certains paramètres épigénétiques pouvant être influencés par les HDI seront étudiés lors de l'apoptose induite par des inducteurs standards de l'apoptose comme la cycloheximide, le TBT, la staurosporine ou l'anticorps anti-Fas. Tout d'abord, les modifications post-traductionnelles des histones suivant l'induction de l'apoptose chez les cellules Jurkat seront abordées. Plus précisément, l'influence de l'induction de l'apoptose sur l'acétylation des histones et sur la phosphorylation des histones sera étudiée. Ensuite, l'influence de la TSA sur ces mêmes modifications post-traductionnelles sera analysée et comparée aux modifications caractéristiques de l'apoptose *normale*, ou apoptose induite par les inducteurs standards présentés plus haut. Par ailleurs, la modulation de l'expression des histones désacétylases durant l'apoptose des cellules Jurkat sera aussi étudiée. Les modulations apoptotiques des HDAC de classe I et de classe II seront comparées entre elles. Considérant que les HDI comme la TSA peuvent reproduire l'effet d'une diminution apoptotique de l'expression de certaines HDAC, l'analyse plus approfondie des HDAC dont l'expression est sensible à l'apoptose peut devenir une piste vers la compréhension des mécanismes pro-apoptotiques reliés à l'induction de l'apoptose par les HDI.

SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Jurkat apoptosis is associated with HDAC 5 modulation and histone H3 post-translational modification.

Charles Dupras and Jacques Bernier.

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier,
Department of Human Health, Laboratory of immunomodulation, Université
du Québec, Laval, Québec, Canada.

Keywords : Apoptosis, Epigenetic, Cancer, Histone deacetylase 5, Phosphorylation,
Trichostatin A.

Adress : INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boul. des Prairies
Laval (Québec), H7V 1B7
Canada

Phone : (450) 687-5010 ext. 8846

FAX : (450) 686-5501

Corresponding Author : Dr Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier
jacques.bernier@iaf.inrs.ca
(514) 687-5010 ext. 8813

Grants and Fellowship : Fondation Armand-Frappier and Conseil de recherche en
sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG)

RÉSUMÉ

Durant la dernière décennie, des inhibiteurs d'histone désacétylases (HDI), comme le SAHA ou l'acide valproïque (VA), ont fait leur preuve comme inducteurs de l'apoptose chez des cellules résistantes à la mortalité et sont maintenant en essais cliniques pour leur utilisation comme adjuvants à la chimiothérapie du cancer. L'acétylation des histones est un mécanisme de régulation épigénétique dynamique et locus-spécifique qui influence fortement l'expression des gènes chez les cellules normales. L'impact du traitement par les HDI non-spécifiques sur la modification post-traductionnelle des histones et sur l'expression des gènes n'est pas encore détaillé et l'investigation du mode d'action par lequel il favorise l'apoptose se poursuit. Les travaux ici présentés mettent en évidence deux nouvelles caractéristiques épigénétiques des cellules apoptotiques : la déphosphorylation massive des sérines 10 sur les histones H3 et le clivage caspase-3-dépendant de l'histone désacétylase 5 (HDAC5). L'hyperacétylation des histones est marquante chez les cellules traitées avec les HDI comme la trichostatine A (TSA). Cependant, elle ne semble pas être une caractéristique apoptotique lorsque les cellules sont traitées avec d'autres inducteurs de l'apoptose comme la cycloheximide (CHX), le tributylétain (TBT) ou la staurosporine (STO). Observation à la fois étonnante et intéressante, la déphosphorylation massive des histones H3 est précocement reproduite sous l'action de la TSA. En deuxième lieu, l'expression et la dynamique de localisation cellulaire des HDAC 1, 2, 3, 4 et 5 ont été étudiées durant l'apoptose. Des comportements spécifiques à chacune d'elles ont été observés. Par exemple, les HDAC 4 et 5 (classe IIa) semblent avoir une dynamique complètement opposée durant l'apoptose, car de façon progressive, la HDAC4 s'accumule davantage au noyau alors que la HDAC5 disparaît rapidement du noyau par rapport à sa fraction cytosolique. La baisse rapide de l'expression de la HDAC5 au niveau du noyau suggère que ce corépresseur de l'expression doit être inactivé rapidement pour permettre la progression de l'apoptose. En bref, cette étude a permis d'identifier la modulation apoptotique de deux voies épigénétiques pouvant être modulées de façon similaire par la TSA. Dans l'avenir, une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques régulateurs de l'apoptose permettra le développement de traitements spécifiques ciblant précisément les déséquilibres épigénétiques associés au cancer.

ABSTRACT

In the last decade, histone deacetylase inhibitors (HDI) like SAHA or valproic acid have entered clinical trials for their use as adjuvants for chemotherapy of cancer due to their demonstrated ability to induce programmed cell death in apoptosis-resistant cells. Histone acetylation is known to have a powerful influence on gene expression and is tightly and locus-specifically regulated in normal cells. Consequences of cell treatment with non-specific HDI on histone post-translational modifications and on gene expression are far from being fully understood, as is the pathway by which it leads to apoptosis. Herein, we present two novel apoptotic features observed with different standard apoptosis inducers that could redefine the investigation on the pathways that are involved in HDI-induced apoptosis: histones H3 massive dephosphorylation of serine 10 and caspase-3-dependant cleavage of histone deacetylase 5 (HDAC5). Histone hyperacetylation is obvious in cells treated with HDI like trichostatin A (TSA). However, it does not seem to be a feature of apoptosis when cells are treated with standard inducers of apoptosis like cycloheximide (CHX), tributyltin (TBT) or staurosporin (STO). Interestingly, we found that hyperdephosphorylation of histones H3 apoptotic feature is rapidly reproduced upon TSA treatment. Secondly, we compared HDAC 1, 2, 3, 4, and 5 intracellular localization dynamics during apoptosis and observed very specific behaviours that can not be generalised to any class or subclass of HDAC. For instance, class IIa HDAC4 and HDAC5 seem to have completely opposite dynamics during apoptosis; HDAC4 becoming progressively predominant in nucleus whereas HDAC5 undergoes a fast clearing from the nucleus in comparison with its cytosolic fraction. HDAC5 rapid decrease in nucleus suggests the inactivation of this corepressor may be required early upon apoptosis progression. Essentially, this study has led to the identification of the modulation of two epigenetic pathways that can be similarly modulated by TSA treatment. In order to minimize side effects related to broad range HDI adjuvants, more specific drugs will have to be developed according to the evolving knowledge of HDAC precise regulation during apoptosis and of the function of histone post-translational modifications in apoptosis assessment.

INTRODUCTION

Programmed cell death (PCD) type I, or *apoptosis*, is required in many biological processes such as embryogenesis and for the maintaining of homeostasis in mature organisms (Jacobson et al., 1997, Nagata, 1997, Penaloza et al., 2006, Vaux and Korsmeyer, 1999). Misregulation of the equilibrium between cell proliferation and apoptosis is a major characteristic of cancer development (Hanahan and Weinberg, 2000). In the last decade, many treatments targeting cancer cells have been developed according with the advances in the understanding of the different features of apoptosis. Among these treatments, non-specific histone deacetylase inhibitors (HDI) such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or valproic acid were shown to potentiate cancerous cell's ability to enter apoptosis, presenting a possible solution for overcoming resistance to chemotherapy (Krug et al., 2006, Xu et al., 2007). However, mechanisms by which non-specific HDI exert their anti-proliferative and pro-apoptotic functions are not fully characterized (Dokmanovic and Marks, 2005, Kelly et al., 2002, Lin et al., 2006).

Histone acetylation is an important mechanism participating in epigenetic regulation of gene expression. Following histone acetylation, chromatin structure is reorganised in a lower-density form which is sterically accessible for transcription machinery (Tanner et al., 1999, Gregory et al., 2001). Histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) are families of enzymes which most of the time act oppositely as coactivators and corepressors of transcription, respectively (Grunstein, 1997). In human, 18 HDACs were identified so far. They can be separated into four classes. Class I HDACs are homologous with *Saccharomyces cerevisiae Rpd3* and include HDACs 1, 2, 3 and 8. With exception of HDAC3, these HDACs are considered strictly nuclear. Class II HDACs are homologous with *S. cerevisiae Hda1* and include HDAC 4, 5, 6, 7, 9 and 10. They can be found in both cytoplasmic and nuclear fractions. Among class II, HDACs 4, 5, 7, and 9 form subclass IIa and HDACs 6 and 10 form class IIb. Class III HDACs (Sirtuins 1-7: Homologous with *S. cerevisiae Sir2*) have not been extensively studied in human. They are different from other classes in sequence homology and in their need for the cofactor NAD^+ (de Ruijter et al., 2003, Lin et al., 2006). Class IV only sets for HDAC11. Its identification

is relatively recent and therefore, HDAC11 has not been extensively studied yet either (Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

Class I HDACs 1, 2 and 3 were shown to be overexpressed in cancerous cells from different tissue origins (Song et al., 2005, Wilson et al., 2006). For example, HDAC3 upregulation is observed in many types of cancers such as colorectal cancers which have been suspected of being linked to over-repression by HDAC3 of the cell cycle inhibitory protein p21 (Spurling et al., 2008). Moreover, HDAC3 functions in normal cells as a corepressor of many transcription factors involved in apoptosis, such as E2F (Panteleeva et al., 2004), c-jun (Weiss et al., 2003), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) (Fajas et al., 2002), and was recently shown to be required for the repression of the Fas-encoding gene. Upon apoptosis induction, HDAC3 is cleaved in a caspase-dependant pathway and its truncated form is translocated in the cytoplasm where it can no longer deacetylate histones on promoters of pro-apoptotic genes (Escaffit et al., 2007). Class IIa HDAC were also studied for their importance in apoptosis regulation and progression. HDAC4 was found to be exceptionnally unstable, in comparison with HDACs 1, 2, 3, and 6. Analysis of truncated mutants of HDAC4 revealed the instability was related to a region that contains two potential caspase cleavage sites. Amino acid residue Asp-289 appeared to be essential for caspase-dependant cleavage of HDAC4 and is not conserved among other class IIa HDACs 5, 7 and 9. The induced expression of caspase-cleavable HDAC4 led to increased apoptosis of HeLa cells when compared to the induced expression of HDAC4 mutated at the caspase cleavage site, relating HDAC4 to the intracellular apoptotic machinery (Liu et al., 2004, Paroni et al., 2004). HDAC4 was later associated to cell cycle G2/M phase delay which is related with DNA loss of integrity. Following DNA damage, HDAC4 shuttles from the cytoplasm to the nucleus, independently of p53 and further associates with DNA in a p53-dependant manner (Basile et al., 2006). The complexity of HDAC4 regulation is also enhanced by the identification of different pools of HDAC4 issued of dephosphorylation and caspase processing, showing distinct degrees of ability to induce differentiation and/or apoptosis (Paroni et al., 2007). Class IIa HDAC7 was recently found to be a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes (Kasler and Verdin, 2007). Showing similarities in mechanisms with HDAC4, HDAC7 gene repression function can be modulated by nucleocytoplasmic

shuttling and/or by rapid extrinsic apoptotic pathway induced caspase-8 processing. HDAC7 contribution to apoptosis progression in thymocytes is thought to be related with loss of repression of the pro-apoptotic factor Nur77 following HDAC7 cleavage (Parra et al., 2007, Scott et al., 2008).

This study seeks to clarify the relation between histone acetylation modulation and apoptosis progression in order to understand better the pathways by which HDI can induce apoptosis. We suggest that HDI do not act as reproducers of any apoptosis-related hyperacetylation of histones, as put forward in another publication (Lee et al., 1996). Actually, despite evident reduced expression of HDAC 3, 4 and even HDAC5 following apoptosis induction by cycloheximide, tributyltin or staurosporine, no hyperacetylation of histones is observed. Hence, we think HDI can induce apoptosis of resistant cells by activating other pathways that are not directly related with histone hyperacetylation.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human thymoma-isolated T lymphocytes cell line Jurkat J77.6 (CD4+, CD3+, CD45+) were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) supplemented with 10 % of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich), HEPES buffer 20 mM pH 7.0-7.6 (Sigma-Aldrich) and 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂.

Apoptosis induction

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5 and seeded in 6-well plates at cell concentration of 5×10^5 cells/ml. Apoptosis initiated by intrinsic pathway was induced by adding 100 µM cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich), 0.8 µM tributyltin (TBT) (tributyltin chloride 96 % purity, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) or 0.2 µM staurosporine (STO) (Sigma-Aldrich), whereas apoptosis initiated by extrinsic pathway was induced by treatment of cells with 10 µg/ml of antibody anti-Fas (a-Fas) (eBiosciences, San Diego, CA, USA). CHX- and TBT-related negative control is Ctrl-1 and stands for ethyl alcohol (EtOH) 0.04 %, whereas STO-related negative control is Ctrl-2 and stands for DMSO 0.03 %. Apoptosis-inducing treatments were conducted in cell culture environment with a lower FBS concentration of 0.1 %. Most of the results presented were obtained by incubating the cells with the latter apoptosis inducers for 4 hours, unless specified differently.

HDAC inhibition using trichostatin-A

Cells were washed twice with ice-cold PBS and seeded in 6-well plates at cell concentration of 5×10^5 cells/ml. Non-specific histone deacetylase inhibitor (HDI) trichostatin-A (TSA) (Sigma-Aldrich) was added to the cells to a concentration of 750 nM. Cells were incubated in cell culture environment with a lower FBS concentration of 0.1 % for 4 hours. TSA was sometimes used on a co-treatment with CHX, meaning both compounds were added simultaneously to the cells.

Caspases inhibition

Cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and seeded in 6-well plates at cell concentration of 2×10^6 cells/ml. Caspase-3 and caspase-6 inhibition assays were performed using respectively peptides Ac-DMQD-CHO and Z-VE(OMe)ID(OMe)-FMK (Calbiochem, San Diego, CA, USA), at different concentrations of 1, 10 and 100 μ M. Both pre-treatments were conducted for 1 hour in cell culture environment, with a lower FBS concentration of 1 %.

HDAC5 nuclear export inhibition

Histone deacetylase 5 (HDAC5) nuclear export inhibition was performed using two different procedures. The first pathway used to escape HDAC5 shuttling from the nuclear to the cytoplasmic fraction was the inhibition of calmodulin kinase II (CaMKII) (Ishida et al., 1998, Chawla et al., 2003). Cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and seeded in 6-well plates at cell concentration of 5×10^6 cells/ml. CaMKII inhibition was performed with 2 μ M myristoylated autocamide-2-related inhibitory peptide (AIP) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA) cell treatment for 3 hours, in cell culture environment, with reduced FBS concentration of 1 %. The second pathway by which we blocked HDAC5 nuclear export was the inhibition of the nuclear membrane receptor CRM1/exportin1. Cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and seeded in 6-well plates at cell concentration of 10^6 cells/ml. Inhibition of CRM1/exportin1 was performed by treating cells with 1 and 10 η g/ml of leptomycin B (LMB) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) for 18 hours in normal cell culture conditions (Kudo et al., 1998).

Apoptosis assessment

Apoptosis assessment was observed with two distinct methods which are commonly used in our laboratory for the detection of apoptotic DNA degradation (Dupere-Minier et al., 2004). Cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and resuspended in 300 μ l/ 10^6 cells of Krishan buffer (sodium citrate 0.1 %, NP-40 0.3 %, 50 μ g/ml propidium iodide (PI) and 20 μ g/ml RNase). Samples were incubated for 1 hour at 37°C, then analysed using FACScan flow cytometry technology (Becton-Dickinson, Oakville, ON, Canada). Analyses were performed using live gates to discriminate the sub-G0/G1 region which corresponds to cells showing reduced DNA content. These cells were defined as apoptotic

cells. Apoptotic internucleosomal DNA fragmentation detection was also performed using agarose gel electrophoresis. Cells (1.5×10^6 /sample) were washed twice with ice-cold PBS buffer and resuspended in 20 μ l of a lysis buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.4; SDS 0.5 %; EDTA 10 mM; proteinase K 0.1 mg/ml) and incubated at 50°C for 16 hours. Proteinase K was heat-inactivated at 70°C for 10 minutes. RNA was later submitted to degradation by addition of 10 μ l of a Tris-HCl 10 mM pH 7.4 buffer containing 0.5 mg/ml of RNase and a 2 hour incubation at 37°C. Samples were then loaded on a 2.5 % agarose gel and electrophoretic migration of DNA fragments was conducted at 100 V for 1.5 hour in TBE buffer 0.5X. The DNA fragments were stained with ethidium bromide (EtBr) and exposed to UV for the detection of the DNA ladder with a Fluor S-MultImager (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Preparation of cytoplasmic and nuclear extracts

Cells were washed twice with ice-cold PBS buffer and resuspended with an ice-cold detergent-free hypotonic buffer (Hepes buffer 10 mM pH 6.5; KCl 10 mM; $MgCl_2$ 2 mM; EDTA 0.1 mM; NaF 0.2 mM; DTT 1 mM, Na^+ -Orthovanadate 0.2 mM; PMSF 0.4 mM; aprotinin 1 μ g/ml, leupeptin 0.3 μ g/ml) (Nuclei isolation buffer from Ito, Barnes et al. (2000) histone extraction protocol) in order to selectively break the cytoplasmic membrane. Cells were incubated on ice for 20 minutes, then vortexed for 20 seconds and left to stand on ice for another 5 minutes. The nucleus was later separated from the cytoplasm by centrifugation at 13000 rpm for 20 minutes at 4°C. Both fractions were then isolated and resuspended to equal final volumes with the same sample buffer used for Western blotting. Fractionation efficiency was confirmed by an accurate separation of cytosolic actin and nuclear lamin B.

Western Blotting

Equal amounts of cell lysates from whole cells or from subcellular fractions were resuspended in sample buffer (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, Glycerol 20 %, SDS 2 %, β -mercaptoethanol 5 % and bromophenol blue 0.025 %) and heated at 100°C for 10 min. Samples were separated using SDS-PAGE at different acrylamide concentrations (7.5-17.5 %) and then transferred onto a nitrocellulose membrane. Proteins were probed with anti-acetyl-H3, anti-acetyl-H4, anti-phospho-H3 (Ser10), anti-H3, anti-HDAC 1, 3, 4 and 5

(Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-H4 (Biovision Inc., Mountain View, CA, USA), anti-caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-DFF40 (IN) and anti-DFF45 (NT) (ProSci Inc., Poway, CA, USA). Histone tails lysines were isolated using a high acrylamide concentration gel and were considered to be localized in the region corresponding to 10-16 kDa. They were probed with anti-acetyl-lysine (Ac-K-103) from Cell Signalling. Protein expression levels were then revealed using a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG and the ECL+ detection system (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA).

RESULTS

Histone H3 apoptotic leakage is linked to its acetylated form, but histone hyperacetylation is not an apoptotic feature.

In order to clarify the pathways by which HDAC inhibitors induce apoptosis, we first wanted to establish the relation between histone post-translational modifications and apoptosis progression. Firstly, we isolate histones from other intracellular proteins, accordingly with a histone extraction protocol suggested in a previous work (Ito et al., 2000). Upon apoptosis induction by CHX, we found that histones H3 leak out of the nucleus and are lost in the supernatant after the nucleus centrifugation step (Fig.1A). Thus, the first step of this protocol, which consists of nuclei isolation, was found to be inappropriate when used with cells treated with an apoptotic stimulus like cycloheximide (CHX). A similar phenomenon had already been observed in a previous publication (Wu et al., 2002). Interestingly, we found that apoptosis-related leakage of histones is positively correlated with histone acetylation (Fig 1B). After three hours of treatment with CHX, once DNA fragmentation is well underway (data not shown), the acetylation level of histones H3 is clearly higher in the supernatant fraction and very few histones left in the nuclear fraction seem to be acetylated. Considering the leaking of histones during apoptosis being closely related to DNA fragmentation (Wu et al., 2002), our results suggest a possible specificity of apoptotic endonucleases for DNA regions where the acetylated form of histones H3 is prominent.

Next, we wanted to clarify whether apoptosis is associated with an increase in the global histone H3 acetylation level or not. Actually, even if histone acetylation seems to be linked to the DNA fragmentation process, we found that the induction of apoptosis by CHX is not followed by histone hyperacetylation (Fig 1C). These results are supported by the observation of unchanged levels of acetylated-H3, acetylated-H4 and acetylated-lysines of histone-size proteins (10-16 kDa) upon apoptosis induction by CHX. Similar observations were made with TBT-induced and staurosporine-induced apoptosis (Fig. 2). Hence, histone hyperacetylation is clearly not a hallmark of Jurkat cells apoptosis.

Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A-related hyperacetylation of histones does not influence cycloheximide-induced apoptosis.

Next, we sought to understand the pathway by which HDI like TSA induce apoptosis. First, we show that histones are strongly hyperacetylated after 4 hours of treatment of Jurkat cells with TSA (Fig. 3A). However, this hyperacetylation does not seem to rapidly induce apoptosis or even to favour apoptosis when used with apoptotic inducer CHX. TSA-induced hyperacetylation of histones H3 and H4 did neither lead to the observation of any apoptotic features like the activation of caspase-3 or to the proteolytic cleavage of the DNA fragmentation factor inhibitor (DFF45), nor enhance the activation of caspase-3 and subsequent activation of the apoptotic endonuclease DNA fragmentation factor (DFF40) when co-treatment with CHX was tested (Fig.3B). Moreover, as revealed by DNA laddering on agarose gel, histone hyperacetylation did not generate any sign of activation or increase of DNA internucleosomal fragmentation (Fig. 3C). The acetylated state of histones H3 may be preferred by the apoptotic endonuclease, we found no evidence the latter hyperacetylation could rapidly and directly induce apoptosis and its associated DNA fragmentation. Hence, increased cleavage susceptibility of DNA regions where histone H3 acetylation is high may not be the pathway by which HDI favour apoptosis.

We then investigated whether histones H3 could undergo other post-translational modifications during apoptosis. Interestingly, we raised a significant hyperdephosphorylation of histone H3 associated with induction of Jurkat cells apoptosis by CHX, TBT and staurosporine (Fig. 4A). Surprisingly, TSA was shown to reproduce that histone H3 dephosphorylation feature after only four hours of treatment with the HDAC inhibitor, when no other apoptotic features are detectable yet (Fig. 4B). Whether it participates in apoptotic DNA fragmentation or not remains uncertain.

Apoptosis induction in Jurkats cells is associated with histone deacetylase 5 expression decrease.

As described earlier, prior studies have already suggested a possible role for HDACs in apoptosis assessment. It is well accepted that a decrease in HDAC3 and HDAC4 expression are features of apoptosis. Our own investigation on HDAC expression during apoptosis seems to go in the same direction, in addition with a first report of significantly lowered expression of HDAC5 upon apoptosis induction by CHX (Fig 5A). Moreover, the decrease in expression of these three HDAC happened upon cell treatment with every tested intrinsic (CHX, TBT, staurosporine) and extrinsic (a-Fas) apoptotic stimuli (Fig. 5C). Consistently with our previously presented results, a 4-hour treatment with TSA did not induce a decrease of any HDAC expression since apoptosis is not induced by this compound at this time. Our data show that the significant decrease in HDAC3, HDAC4 and HDAC5 expression occurs late, at least 4 hours after CHX is added to the cell culture. In our model, only 2 hours are needed before DNA fragmentation can begin. Therefore, late HDAC cleavage can hardly fit a possible role in apoptosis activation. On the other hand, we found no fluctuation in HDAC1 and HDAC2 expression (Fig. 5A). Class I HDAC 1 and 2 are known to be strictly nuclear and both seem to be protected from proteolytic cleavage during apoptosis. HDAC3 is an unconventional class I HDAC and can be found in both nuclear and cytoplasmic compartments, as well as class II HDACs. Hence, it seems there is a link between HDAC ability to translocate through the nuclear membrane and their susceptibility for apoptotic cleavage.

Histone deacetylase 5 subcellular localization varies upon apoptosis induction in Jurkat cells

Next, we investigated whether HDAC5 intracellular localization might be modulated during apoptosis. We treated cells with CHX and TBT for varying times and measured HDAC5 distribution in cytoplasmic and nuclear fractions using a detergent-free hypotonic fractionation buffer. We found that both apoptotic stimuli lead to a fast decrease in nuclear HDAC5, prior to a much later observed decrease in cytoplasmic HDAC5 (Fig 6). HDAC3

intracellular localization behavior is very similar and was associated by Escaffit and colleagues to HDAC3 cytoplasmic relocalization following its apoptotic cleavage (Escaffit et al., 2007). Oppositely with HDAC3 and HDAC5, HDAC4 seems to undergo a cytoplasm to nucleus trafficking during apoptosis, since we observe an increasing accumulation of its nuclear expression as apoptosis occurs. Even if no change in HDAC1 and HDAC2 intracellular localization was observed during apoptosis, our model suggests that they are constitutively expressed in both nuclear and cytoplasmic fractions and sets a contradiction with the consensus that most class I HDACs are strictly nuclear.

Histone deacetylase 5 apoptotic cleavage is dependent on caspase-3 proteolytic activity.

Proteolytic cleavage of HDAC5 was shown to be a feature of apoptosis in Jurkat cells. We next wanted to know if the decrease in HDAC5 expression was caspase-dependent. Using caspase-3-specific inhibitor Ac-DMQD-CHO at a concentration of 100 μ M, we achieved a complete inhibition of HDAC5 apoptotic cleavage (Fig 7A). Caspase-6-specific inhibition using Z-VE(OMe)ID(OMe)-FMK did not reduce HDAC5 cleavage as much as caspase-3 inhibitor. However, a significant decrease in HDAC5 cleavage is observed (Fig 7B). Recent observations revealed that even if caspase-6 seems to be usually activated by caspase-3, it can also participate in potentiation of caspase-3 activation during apoptosis (Hirota et al., 2006). Then, the low inhibition of HDAC5 cleavage upon caspase-6 specific inhibition may be indirectly caused by a slight decrease in caspase-3 activation. Regarding HDAC4 expression, no modulation was observed, suggesting the involvement of another pathway for HDAC4 changes of expression during apoptosis. The determination of HDAC5 precise site of cleavage by caspase-3 during apoptosis of Jurkat cells is presently underway in our laboratory.

Histone deacetylase 5 can be cleaved in the nucleus

The previously presented results on HDAC5 cytoplasmic/nuclear ratio variation during apoptosis lead us to investigate the reason of the faster decrease of HDAC5 nuclear fraction. In myocytes, it is known that HDAC5 is translocated from the nucleus to the cytoplasm upon myogenesis stimulation. In these cells, the transcription factor MEF2 is activated by the nuclear export of its corepressor HDAC5. The nuclear export of HDAC5 happens following the phosphorylation of its serines 259 and 498, which is ordered by calmodulin kinase II (CaMKII) and leads to the binding of 14-3-3 protein to phosphorylated HDAC5. The binding of HDAC5 to 14-3-3 allows subsequent sequestration of HDAC5 into cytoplasmic fraction and derepression of MEF2 (Grozingier and Schreiber, 2000, McKinsey et al., 2000). First, we wanted to see if HDAC5 subcellular localization could also be modulated by CaMKII in Jurkat cells. We found that the inhibition of CaMKII by the myristoylated autocalcinein-2-related inhibitory peptide (AIP) leads to a significant decrease in HDAC5 cytoplasmic/nuclear ratio distribution, suggesting a CaMKII-dependent dynamic nuclear export of HDAC5 is also present in Jurkat cells (Fig. 8A). We wanted to find out if the early nuclear export of HDAC5 was required in order for its caspase-3-dependant processing to occur in the cytoplasm. We found that the inhibition of CaMKII and the related HDAC5 phosphorylation inhibition did not block its expression decrease in the nucleus upon apoptosis induced by CHX (Fig. 8B). In order to confirm that HDAC5 could be cleaved in the nucleus, we performed the inhibition of the nuclear membrane receptor CRM1/exportin1 using leptomycin B (LMB) (Kudo et al., 1998). Consistently with the results obtained from CaMKII inhibition, we found that the exportin inhibition leads to a similar decrease in HDAC5 cytoplasmic/nuclear ratio distribution and to the cleavage of HDAC5 in the nucleus upon apoptosis induced by 3 hours of treatment with CHX (Fig. 8C).

DISCUSSION

As described previously, a release of histones from the nucleosomes occurs during apoptosis (Wu et al., 2002). Hence, the efficiency of histone extraction based on nuclei isolation can be altered by apoptotic conditions. Moreover, it seems this kind of extraction may be unsuitable for histone post-translational modifications studies since the apoptotic release of histone H3 is correlated with its acetylation state. However, whether increased level of histone acetylation in the supernatant is the cause or the consequence of the release remains unclear (Th'ng, 2001). We found no global hyperacetylation of any kind upon apoptosis treatments, despite suggested in a previous work (Lee et al., 1996). In another publication, histone deacetylation was reported during apoptosis of rat thymocytes, but was neither observed herein (Allera et al., 1997). A possible explanation for the unchanged balance between global acetylated and deacetylated histones is that the rates of deacetylation might be higher on unlinked than on DNA-linked histones, relatively of a lowered steric hindrance once they are free from chromatin organised structure. This would contribute to explain a lower expression of HDAC upon apoptosis stimulation can still balance the effect of HAT and maintain an invariable global level of histone acetylation. However, this hypothesis is constrained by our observation of an increased acetylation level on histones that are free from the nucleosomes. DNA fragmentation is an important part of apoptosis because the degradation of nuclear material and heterochromatin is necessary for minimizing genetic transfer to neighbour cells and for escaping auto-antibody formation associated with auto-immune disorders (de la Taille et al., 1999, Nagata, 2000). We can easily imagine the major apoptotic endonuclease DFF40 may be priorly specific to tridimensional open conformation associated with gene expression and already highly acetylated regions of chromatin, thus explaining a lower proportion of acetylated histones H3 on the remaining DNA-linked group of histones. This second hypothesis is coherent with a previous work in which the same apoptotic nuclear export of the acetylated form of histones was shown by immunofluorescence staining (Hendzel et al., 1998).

Many studies have participated in elucidating the regulation of apoptotic endonuclease DFF40 (Inohara et al., 1999, Korn et al., 2005, Lechardeur et al., 2005, Lechardeur et al.,

2000, Lechardeur et al., 2004, Liu et al., 1997, Widlak et al., 2005). However, the pathway leading to the activation of the DFF40 and the mechanisms that might be involved in DNA fragmentation resistance are not fully understood yet. Cells like lymphoblastic leukemia cell line HPB-45.0, which are characterised by a loss of CD45 at extracellular membrane surface show a resistance to nuclear apoptosis (Dupere-Minier et al., 2004). Even if these cells present normal apoptotic DFF45 cleavage and accumulation of DFF40 in nuclear fraction, no DNA fragmentation is observed. The origins of this resistance are unknown. Hence, we managed to further investigate the behavior of its substrate, chromatin, during apoptosis. It was recently shown that negatively charged molecules like RNA, heparin or other polyanions can inhibit the activity of DFF40 (Widlak and Garrard, 2006). Noteworthy, we observed a decrease in negatively charged phosphate groups on histones H3 during normal apoptosis. This may have an influence on favorising optimal electrostatic interactions between mainly positively charged DFF40 and DNA, which is mainly negatively charged. Moreover, since HDAC inhibitors were shown to rapidly reproduce a similar decrease in histone H3 phosphorylation, it is thinkable they could overcome nuclear apoptosis resistance by lowering a possible interference brought on by phosphorylated histones. On the other hand, it was previously shown that histone H3 phosphorylation was increased upon gliotoxin induced-apoptosis in rat thymocytes and in P815 cells (Waring et al., 1997). However, this post-translational change seems to be specific to gliotoxin because it was not observed upon dexamethasone- or thapsigargin-induced apoptosis. Studies on the relationship between CD45 expression and apoptotic histones H3 dephosphorylation are currently in course in our laboratory.

Histone post-translational modification is not the only effect induced by cell treatment with HDAC inhibitors. It is probable to find non-histone proteins changes in acetylation levels following non-specific inhibition of HDACs because they also participate in post-translational modifications of proteins like the human tumour suppressor PTEN (Ikenoue et al., 2008), the multifunctional protein APEX (Bhakat et al., 2003) or the stress response-associated transcription factor NF- κ B (Hasselgren, 2007). Multiple pathways can be corrupted by such a treatment and the exact initiation step by which they will finally lead to apoptosis is hard to point out. The period of time needed for apoptosis induction by HDAC inhibitor TSA suggests they might exert their influence by inhibiting pro-apoptotic genes

repression by HDAC, leading to imbalance between pro- and anti-apoptotic proteins. It is possible the expression decrease of specific HDACs during apoptosis occurs in order to promote the upregulation of pro-apoptotic genes via locus-specific increase of acetylated histones. However, our data suggest the lowering in the expression of HDAC 3, 4 and 5 occurs only after nuclear apoptosis is well underway. Also, we have demonstrated that the proteolytic cleavage of HDAC5 does not require its presence in the cytoplasmic fraction. Moreover, HDAC5 subcellular localization was found to depend on the same nucleocytoplasmic shuttling mechanism found in myocytes during myogenesis process, which consists of HDAC5 phosphorylation by the calmodulin kinase II (CaMKII) and to its subsequent sequestration by 14-3-3 in the cytoplasm (Grozingler and Schreiber, 2000, McKinsey et al., 2000). Taken together, these results suggest that HDAC5 might be translocated from the nucleus to the cytoplasm priorly to cleavage, rendering possible a relationship between *de novo* expression of pro-apoptotic factors and the modulation of HDAC during apoptosis. Interestingly, HDAC5 was shown to coimmunoprecipitate with HDAC3 and to collaborate with the latter HDAC to the inhibition of the transcription factor MEF2 (Gregoire et al., 2007, Grozingler et al., 1999, McKinsey et al., 2000). Hence, the apoptotic behavior of both HDACs may have their function for apoptosis progression since MEF2 is know to regulate positively, together with CABIN1 and calmodulin, the expression of the immediate-early gene Nur77 (Youn et al., 1999).

LEGEND OF FIGURES

Figure 1: Cycloheximide-induced apoptosis-related histone post-translational modifications and subcellular localization of histones H3.

A) Cycloheximide (CHX) leads to a leakage of histones H3 out of the nuclei after 3 hours of treatment. B) Histones H3 apoptosis-related leakage is positively correlated with its acetylation state (Ac-H3). C) Histones H3 and H4 acetylation measured at different time points following CHX-induced apoptosis. Jurkat cells were untreated (Ctrl), treated with vehicle ethyl alcohol (EtOH) 0.04% (Ctrl-1) and treated with CHX 100 μ M for 1h30 and 3h00 (A-B) or for 2, 4, and 6 hours. (C). Histones were then analysed by performing Western blots as described in materials and methods. Blots in figure 1C were obtained using complete cell lysates.

Figure 2: Histone post-translational modifications are not related to apoptosis-inducing agents.

Histones H3 and H4 acetylation, as well as total histone-related lysines acetylation unvariability is independent of the apoptosis inducer used. Jurkat cells were treated for 4 hours with vehicles EtOH 0.04% (Ctrl-1) and DMSO 0.03% (Ctrl-2), and with apoptosis inducers CHX 100 μ M, TBT 0.8 μ M and STO 0.2 μ M. Histones were then analysed by performing Western blots as described in materials and methods.

Figure 3: Histone hyperacetylation causes no change of apoptosis features upon induction by cycloheximide.

A) Histones H3 and H4 hyperacetylation following TSA treatment. B) Apoptosis induction features are not influenced by TSA treatment. C) DNA fragmentation is not influenced by TSA treatment. Jurkat cells were untreated (Ctrl), treated with vehicle EtOH 0.04% (Ctrl-1), treated with HDAC inhibitor TSA 750 η M and treated with CHX 100 μ M for 4 hours. They were also treated simultaneously with CHX and TSA for 4 hours (X+A). Proteines were then analysed by performing Western blots. Caspase-3 activation by cleavage of pro-caspase-3, apoptotic endonuclease DFF40 inhibitor (DFF45) cleavage and DFF40 activation were detected using appropriate antibodies listed in the materials and methods section. DFF40 activation is observed by its translocation from the cytoplasm (C) to the

nucleus (N). DNA internucleosomal fragmentation detection was assessed as described in materials and methods.

Figure 4: Histone H3 dephosphorylation is related to apoptosis induction.

A) Apoptotic histone H3 dephosphorylation is independent of the apoptosis inducer used. B) TSA treatment reproduces apoptotic histone H3 dephosphorylation before apoptosis is initiated. Jurkat cells were untreated (Ctrl), treated with vehicles EtOH 0.04% (Ctrl-1) and DMSO 0.03% (Ctrl-2), with HDAC inhibitor TSA 750 nM and with apoptosis inducers CHX 100 μM, TBT 0.8 μM and STO 0.2 μM for 4 hours. They were also treated simultaneously with CHX and TSA for 4 hours (X+A). Proteins were then analysed by performing Western blots accordingly with materials and methods section and histone phosphorylation of histones H3 (P-H3) was detected.

Figure 5: Apoptotic modifications of HDAC expression.

A) Apoptotic HDAC expression modulation is HDAC-specific. B) Induction of apoptosis by extrinsic and intrinsic compounds. C) Apoptosis-related expression decrease of HDAC 3, 4 and 5 is independent of the apoptosis inducer used. Jurkat cells were treated with vehicles EtOH 0.04% (Ctrl-1) and DMSO 0.03% (Ctrl-2), with HDAC inhibitor TSA 750 nM and with apoptosis inducers CHX 100 μM, TBT 0.8 μM, STO 0.2 μM and antibody anti-Fas (FAS) 10 μg/ml for 4 hours. Proteins were analysed by performing Western blots accordingly with materials and methods section. Apoptosis was detected by DFF45 inactivation and by flow cytometry apoptosis assessment described in materials and methods section.

Figure 6: HDAC-specific expression patterns following apoptosis induction.

HDAC 1, 2, 3, 4 and 5 show distinct ratios of cytoplasmic/nuclear expression at different time points following apoptosis induction. Jurkat cells were treated with vehicle EtOH 0.04 % (Ctrl-1), with CHX 100 μM and with TBT 0.8 μM for 2.5, 3, 3.5 and 4 hours. Similar results were obtained from STO 0.2 μM treatment (data not shown). Nucleus fraction (N) was isolated from cytoplasmic fraction (C) using nuclei isolation buffer and proteins were analysed by Western blot technique described in the materials and methods section.

Figure 7: Influence of caspase inhibition on HDAC4 and HDAC5 cycloheximide-induced decrease of expression.

A) Caspase-3 inhibitor influence on HDAC4 and HDAC5 cycloheximide-induced apoptotic cleavage. B) Caspase-6 inhibitor influence on HDAC4 and HDAC5 cycloheximide-induced apoptotic cleavage. Jurkat cells were pre-treated for 1 hour with caspase-3 specific inhibitor Ac-DMQD-CHO or with caspase-6 specific inhibitor Z-VE(OMe)ID(OMe)-FMK, at increasing concentrations of 1, 10 and 100 μM . Cells were then submitted to a 4 hours treatment with vehicle EtOH 0.04% (E) and with cycloheximide (X) 100 μM . Proteins expression was then measured using described Western blotting protocol.

Figure 8: HDAC5 apoptotic cleavage can occur in the nucleus

A) Calmodulin kinase II (CaMKII) inhibition favours HDAC5 nuclear localization. B) HDAC5 nuclear retention does not lower its caspase-3-dependent apoptotic cleavage. C) CRM1/exportin1 inhibition and related HDAC5 nuclear sequestration can still lead to HDAC5 caspase-3-dependent apoptotic cleavage. Jurkat cells were pre-treated for 3 hours with CaMKII inhibitor myristoylated-AIP (AIP) 2 μM or for 18 hours with CRM1/exportin1 inhibitor leptomycin B 1 (LMB-1) and 10 $\eta\text{g/ml}$ (LMB-2), and then submitted to treatment with vehicle EtOH 0.04 % (Ctrl-1) and with CHX 100 μM for 3 hours. Nucleus fraction (N) was isolated from cytoplasmic fraction (C) using nuclei isolation buffer and proteins were analysed by Western blot technique described in the materials and methods section.

FIGURES

Figure 1

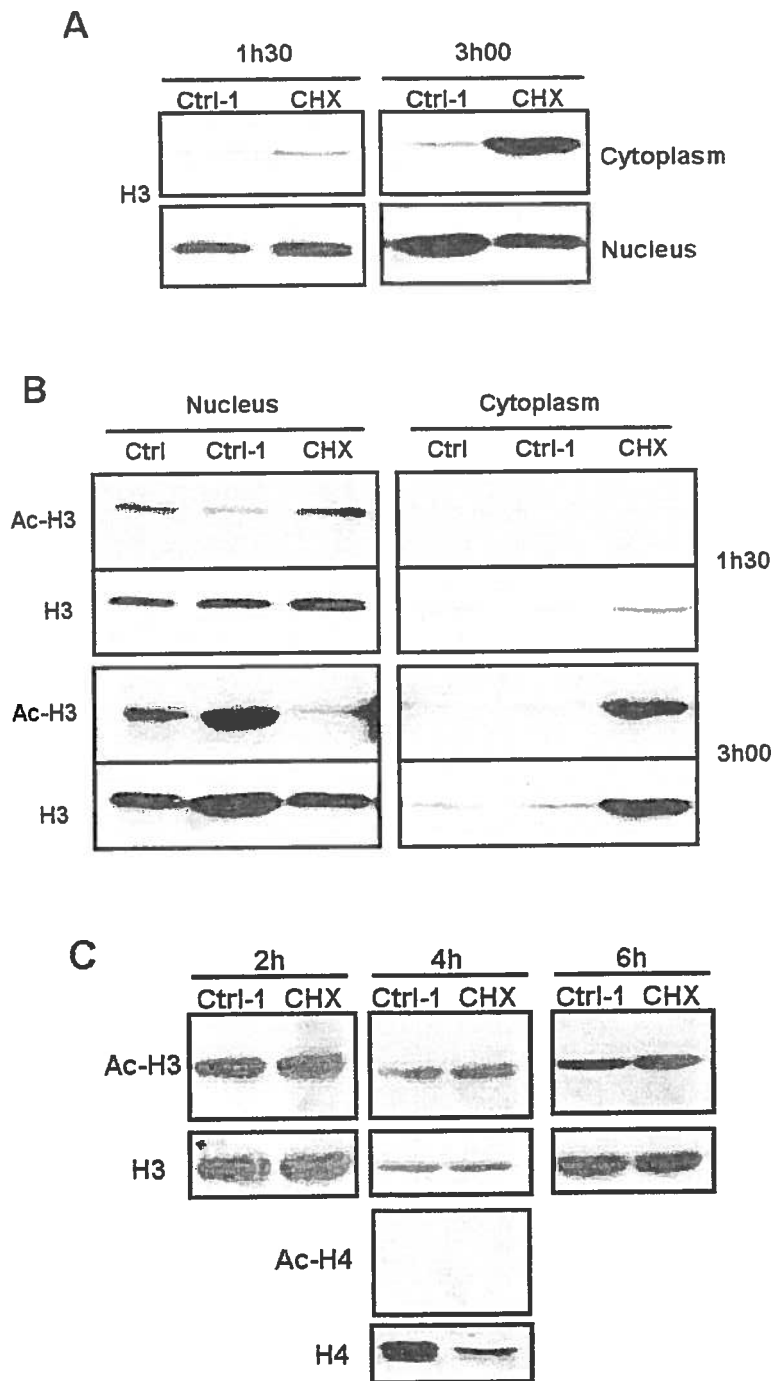


Figure 2

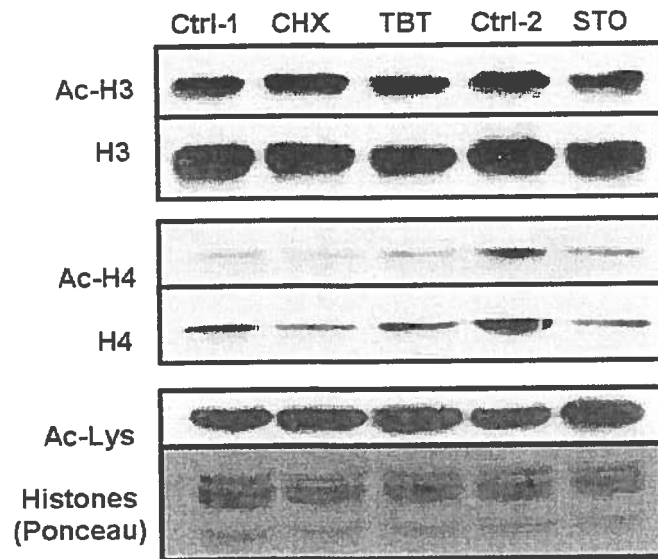


Figure 3

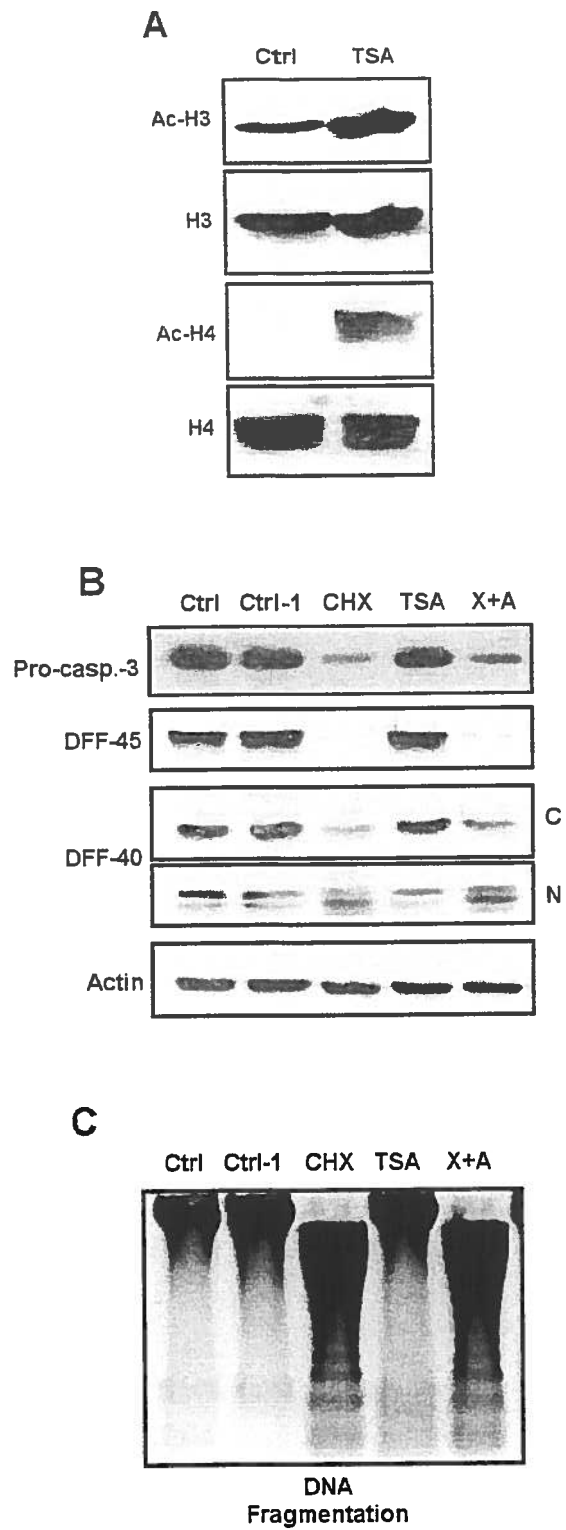
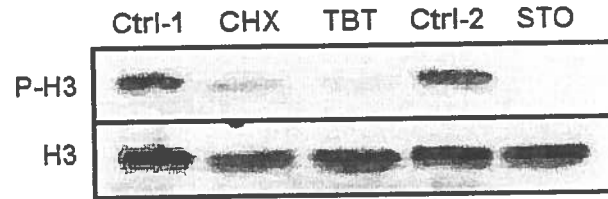


Figure 4

A



B

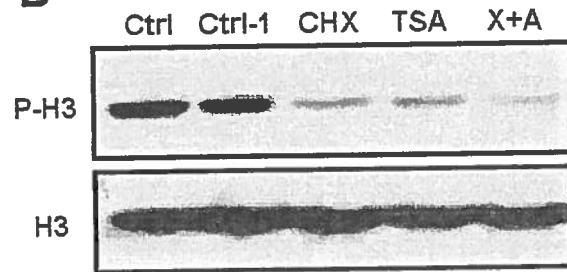


Figure 5

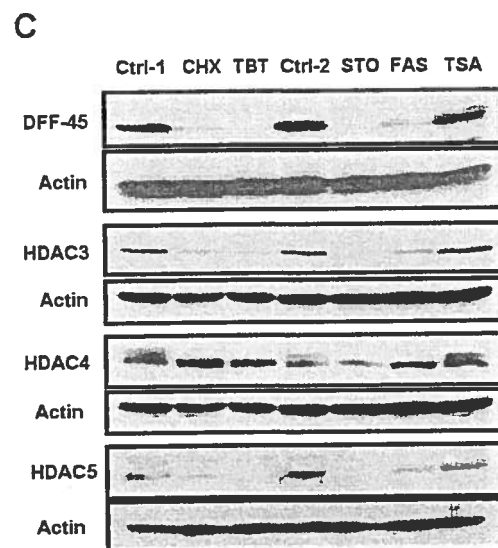
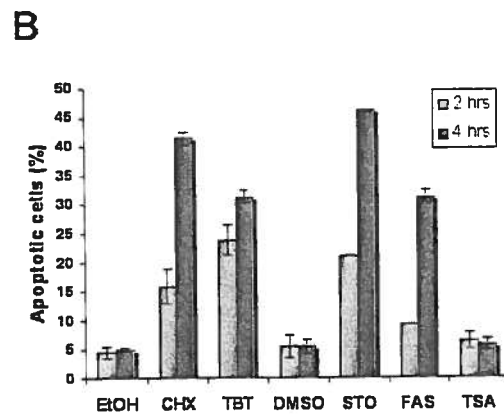
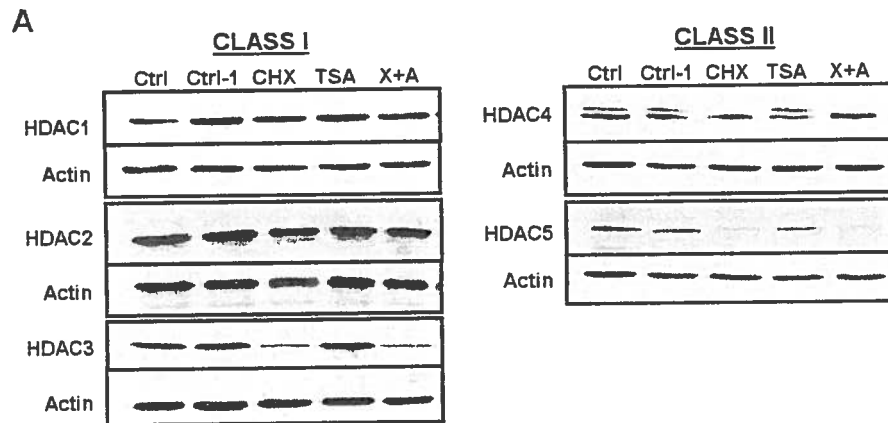


Figure 6

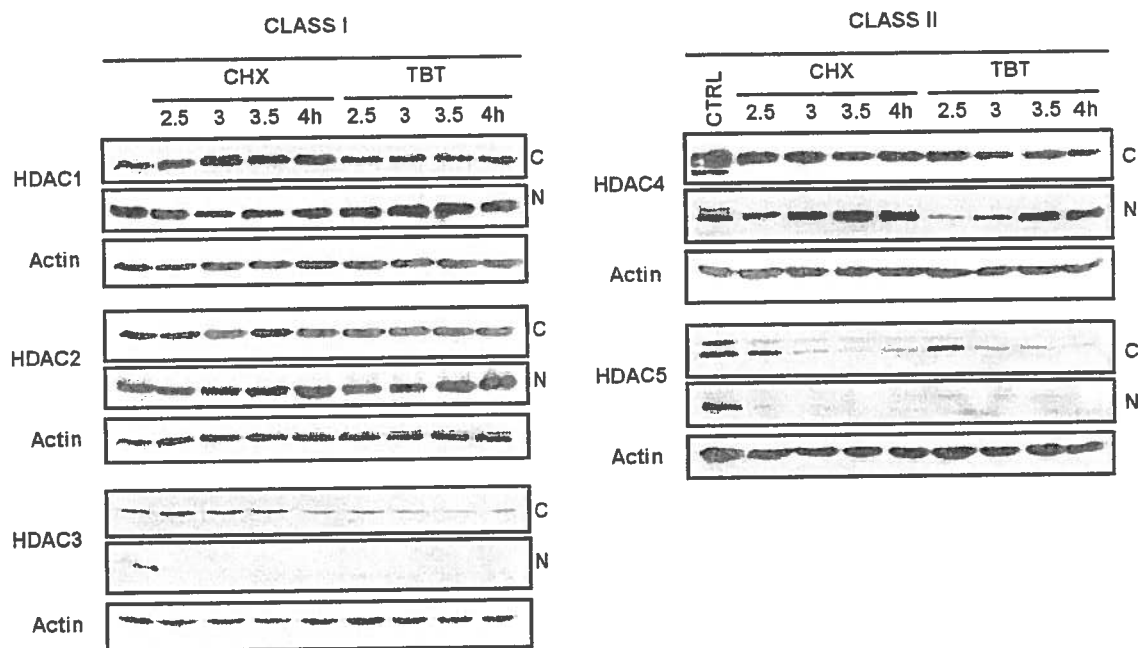


Figure 7

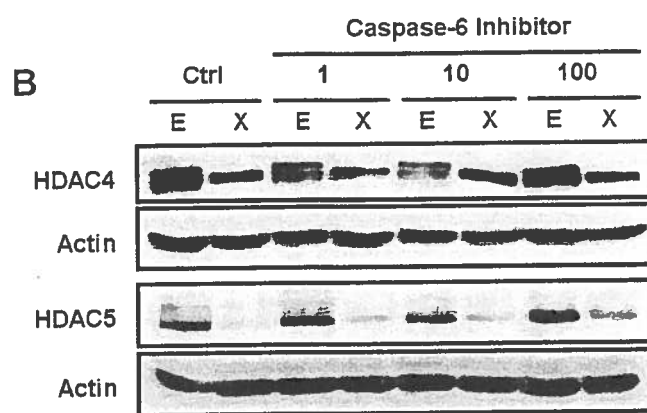
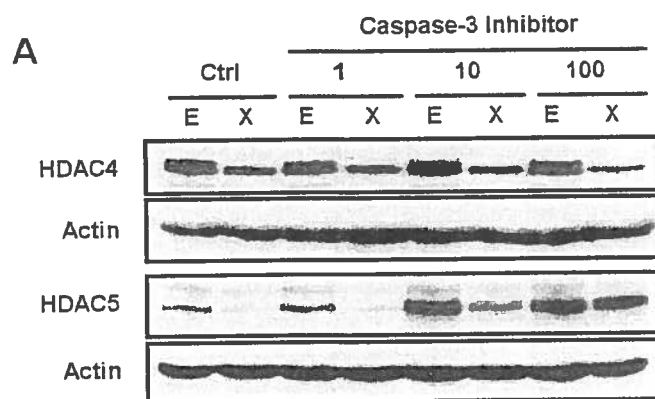
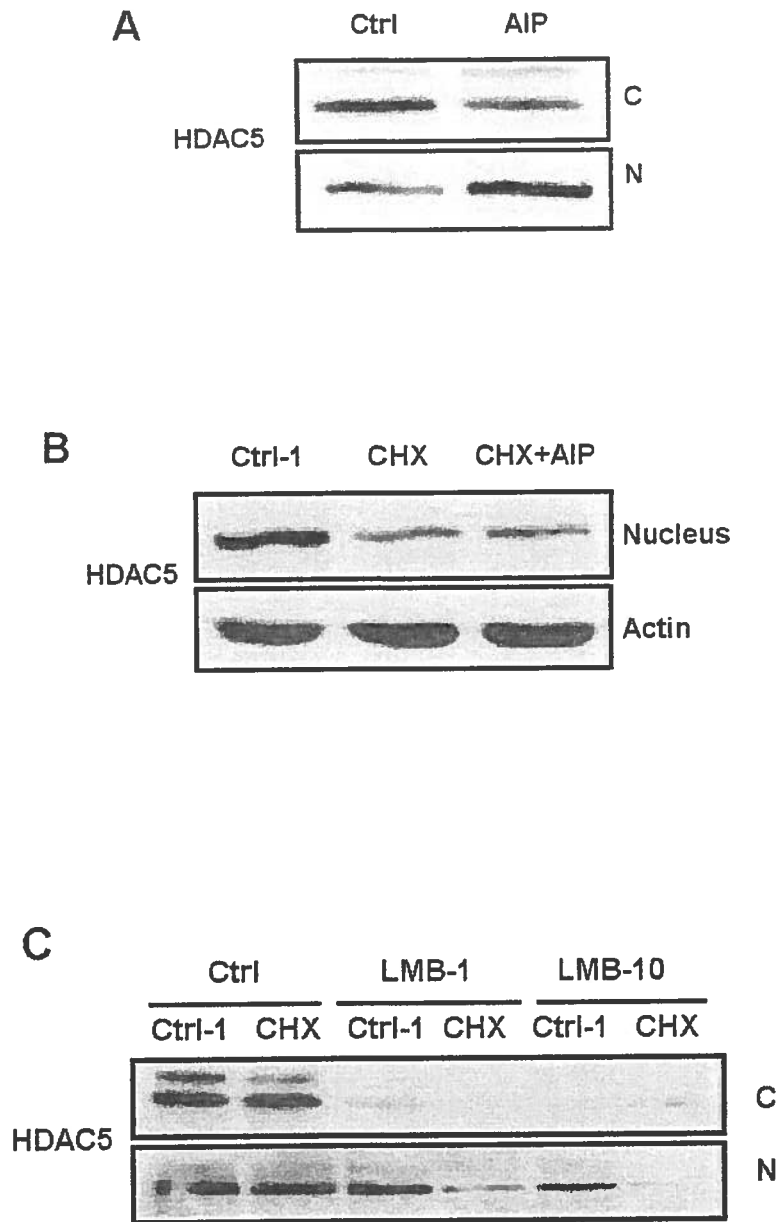


Figure 8



REFERENCES

- ALLERA, C., LAZZARINI, G., PATRONE, E., ALBERTI, I., BARBORO, P., SANNA, P., MELCHIORI, A., PARODI, S. & BALBI, C. (1997) The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. *J Biol Chem*, 272, 10817-10822.
- BASILE, V., MANTOVANI, R. & IMBRIANO, C. (2006) DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines. *J Biol Chem*, 281, 2347-2357.
- BHAKAT, K. K., IZUMI, T., YANG, S. H., HAZRA, T. K. & MITRA, S. (2003) Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J*, 22, 6299-6309.
- CHAWLA, S., VANHOUTTE, P., ARNOLD, F. J., HUANG, C. L. & BADING, H. (2003) Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem*, 85, 151-159.
- CHEN, Y. L., JIAN, M. H., LIN, C. C., KANG, J. C., CHEN, S. P., LIN, P. C., HUNG, P. J., CHEN, J. R., CHANG, W. L., LIN, S. Z. & HARN, H. J. (2008) The induction of orphan nuclear receptor Nur77 expression by n-butylphthalide as pharmaceuticals on hepatocellular carcinoma cell therapy. *Mol Pharmacol*, 74, 1046-1058.
- CRESS, W. D. & SETO, E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*, 184, 1-16.
- DE LA TAILLE, A., CHEN, M. W., BURCHARDT, M., CHOPIN, D. K. & BUTTYAN, R. (1999) Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res*, 59, 5461-5463.
- DE RUIJTER, A. J., VAN GENNIP, A. H., CARON, H. N., KEMP, S. & VAN KUILENBURG, A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, 737-749.
- DOKMANOVIC, M. & MARKS, P. A. (2005) Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem*, 96, 293-304.
- DUPERE-MINIER, G., HAMELIN, C., DESHARNAIS, P. & BERNIER, J. (2004) Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells. *Apoptosis*, 9, 543-551.

ESCAFFIT, F., VAUTE, O., CHEVILLARD-BRIET, M., SEGUI, B., TAKAMI, Y., NAKAYAMA, T. & TROUCHE, D. (2007) Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol Cell Biol*, 27, 554-567.

FAJAS, L., EGLER, V., REITER, R., HANSEN, J., KRISTIANSEN, K., DEBRIL, M. B., MIARD, S. & AUWERX, J. (2002) The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 3, 903-910.

GREGOIRE, S., XIAO, L., NIE, J., ZHANG, X., XU, M., LI, J., WONG, J., SETO, E. & YANG, X. J. (2007) Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol*, 27, 1280-1295.

GREGORY, P. D., WAGNER, K. & HORZ, W. (2001) Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*, 265, 195-202.

GROZINGER, C. M., HASSIG, C. A. & SCHREIBER, S. L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4868-4873.

GROZINGER, C. M. & SCHREIBER, S. L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7835-7840.

GRUNSTEIN, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-352.

HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

HASSELGREN, P. O. (2007) Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation--triple threat in muscle wasting. *J Cell Physiol*, 213, 679-689.

HENDZEL, M. J., NISHIOKA, W. K., RAYMOND, Y., ALLIS, C. D., BAZETT-JONES, D. P. & TH'NG, J. P. (1998) Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 24470-24478.

HIROTA, N., OTABE, S., NAKAYAMA, H., YUAN, X. & YAMADA, K. (2006) Sequential activation of caspases and synergistic beta-cell cytotoxicity by palmitate and anti-Fas antibodies. *Life Sci*, 79, 1312-1316.

IKENOUE, T., INOKI, K., ZHAO, B. & GUAN, K. L. (2008) PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res*, 68, 6908-6912.

INOHARA, N., KOSEKI, T., CHEN, S., BENEDICT, M. A. & NUNEZ, G. (1999) Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem*, 274, 270-274.

ISHIDA, A., SHIGERI, Y., TATSU, Y., UEGAKI, K., KAMESHITA, I., OKUNO, S., KITANI, T., YUMOTO, N. & FUJISAWA, H. (1998) Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett*, 427, 115-118.

ITO, K., BARNES, P. J. & ADCOCK, I. M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*, 20, 6891-6903.

JACOBSON, M. D., WEIL, M. & RAFF, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.

KASLER, H. G. & VERDIN, E. (2007) Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes. *Mol Cell Biol*, 27, 5184-5200.

KELLY, W. K., O'CONNOR, O. A. & MARKS, P. A. (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*, 11, 1695-1713.

KORN, C., SCHOLZ, S. R., GIMADUTDINOW, O., LURZ, R., PINGOUD, A. & MEISS, G. (2005) Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *J Biol Chem*, 280, 6005-6015.

KRUG, L. M., CURLEY, T., SCHWARTZ, L., RICHARDSON, S., MARKS, P., CHIAO, J. & KELLY, W. K. (2006) Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid. *Clin Lung Cancer*, 7, 257-261.

KUDO, N., WOLFF, B., SEKIMOTO, T., SCHREINER, E. P., YONEDA, Y., YANAGIDA, M., HORINOUCI, S. & YOSHIDA, M. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*, 242, 540-547.

LECHARDEUR, D., DOUGAPARSAD, S., NEMES, C. & LUKACS, G. L. (2005) Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem*, 280, 40216-40225.

LECHARDEUR, D., DRZYMALA, L., SHARMA, M., ZYLKA, D., KINACH, R., PACIA, J., HICKS, C., USMANI, N., ROMMENS, J. M. & LUKACS, G. L. (2000)

Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol*, 150, 321-334.

LECHARDEUR, D., XU, M. & LUKACS, G. L. (2004) Contrasting nuclear dynamics of the caspase-activated DNase (CAD) in dividing and apoptotic cells. *J Cell Biol*, 167, 851-62.

LEE, E., FURUKUBO, T., MIYABE, T., YAMAUCHI, A. & KARIYA, K. (1996) Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis. *FEBS Lett*, 395, 183-187.

LIN, B., KOLLURI, S. K., LIN, F., LIU, W., HAN, Y. H., CAO, X., DAWSON, M. I., REED, J. C. & ZHANG, X. K. (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 116, 527-540.

LIN, H. Y., CHEN, C. S., LIN, S. P. & WENG, J. R. (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev*, 26, 397-413.

LIU, F., DOWLING, M., YANG, X. J. & KAO, G. D. (2004) Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4. *J Biol Chem*, 279, 34537-34546.

LIU, H. B., VOSO, M. T., GUMIERO, D., DUONG, J., MCKENDRICK, J. J. & DEAR, A. E. (2009) The anti-leukemic effect of a novel histone deacetylase inhibitor MCT-1 and 5-aza-cytidine involves augmentation of Nur77 and inhibition of MMP-9 expression. *Int J Oncol*, 34, 573-579.

LIU, X., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89, 175-184.

MCKINSEY, T. A., ZHANG, C. L., LU, J. & OLSON, E. N. (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 408, 106-111.

MOLL, U. M., MARCHENKO, N. & ZHANG, X. K. (2006) p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25, 4725-4743.

NAGATA, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

NAGATA, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256, 12-18.

- PANTELEEVA, I., ROUAUX, C., LARMET, Y., BOUTILLIER, S., LOEFFLER, J. P. & BOUTILLIER, A. L. (2004) HDAC-3 participates in the repression of e2f-dependent gene transcription in primary differentiated neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 656-660.
- PARONI, G., FONTANINI, A., CERNOTTA, N., FOTI, C., GUPTA, M. P., YANG, X. J., FASINO, D. & BRANCOLINI, C. (2007) Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4. *Mol Cell Biol*, 27, 6718-6732.
- PARONI, G., MIZZAU, M., HENDERSON, C., DEL SAL, G., SCHNEIDER, C. & BRANCOLINI, C. (2004) Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15, 2804-2818.
- PARRA, M., MAHMOUDI, T. & VERDIN, E. (2007) Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev*, 21, 638-643.
- PENALOZA, C., LIN, L., LOCKSHIN, R. A. & ZAKERI, Z. (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol*, 126, 149-158.
- PRIGENT, C. & DIMITROV, S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*, 116, 3677-3685.
- ROPERO, S., FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., HAMELIN, R., YAMAMOTO, H., BOIX-CHORNET, M., CABALLERO, R., ALAMINOS, M., SETIEN, F., PAZ, M. F., HERRANZ, M., PALACIOS, J., ARANGO, D., ORNTOFT, T. F., AALTONEN, L. A., SCHWARTZ, S., JR. & ESTELLER, M. (2006) A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet*, 38, 566-569.
- SCOTT, F. L., FUCHS, G. J., BOYD, S. E., DENAULT, J. B., HAWKINS, C. J., DEQUIEDT, F. & SALVESEN, G. S. (2008) Caspase-8 cleaves histone deacetylase 7 and abolishes its transcription repressor function. *J Biol Chem*, 283, 19499-19510.
- SONG, J., NOH, J. H., LEE, J. H., EUN, J. W., AHN, Y. M., KIM, S. Y., LEE, S. H., PARK, W. S., YOO, N. J., LEE, J. Y. & NAM, S. W. (2005) Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113, 264-268.
- SPURLING, C. C., GODMAN, C. A., NOONAN, E. J., RASMUSSEN, T. P., ROSENBERG, D. W. & GIARDINA, C. (2008) HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog*, 47, 137-147.
- TANNER, K. G., TRIEVEL, R. C., KUO, M. H., HOWARD, R. M., BERGER, S. L., ALLIS, C. D., MARMORSTEIN, R. & DENU, J. M. (1999) Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem*, 274, 18157-18160.

- TH'NG, J. P. (2001) Histone modifications and apoptosis: cause or consequence? *Biochem Cell Biol*, 79, 305-311.
- VAUX, D. L. & KORSMEYER, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell*, 96, 245-254.
- VOELTER-MAHLKNECHT, S., HO, A. D. & MAHLKNECHT, U. (2005) Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med*, 16, 589-598.
- WARING, P., KHAN, T. & SJAARDA, A. (1997) Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J Biol Chem*, 272, 17929-17936.
- WEISS, C., SCHNEIDER, S., WAGNER, E. F., ZHANG, X., SETO, E. & BOHMANN, D. (2003) JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J*, 22, 3686-3695.
- WIDLAK, P. & GARRARD, W. T. (2006) The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions. *Apoptosis*, 11, 1331-1337.
- WIDLAK, P., KALINOWSKA, M., PARSEGHIAN, M. H., LU, X., HANSEN, J. C. & GARRARD, W. T. (2005) The histone H1 C-terminal domain binds to the apoptotic nuclease, DNA fragmentation factor (DFF40/CAD) and stimulates DNA cleavage. *Biochemistry*, 44, 7871-7878.
- WILSON, A. J., BYUN, D. S., POPOVA, N., MURRAY, L. B., L'ITALIEN, K., SOWA, Y., ARANGO, D., VELCICH, A., AUGENLICHT, L. H. & MARIADASON, J. M. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*, 281, 13548-13558.
- WU, D., INGRAM, A., LAHTI, J. H., MAZZA, B., GRENET, J., KAPOOR, A., LIU, L., KIDD, V. J. & TANG, D. (2002) Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem*, 277, 12001-12008.
- XU, W. S., PARMIGIANI, R. B. & MARKS, P. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26, 5541-5552.
- YOUN, H. D., SUN, L., PRYWES, R. & LIU, J. O. (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science*, 286, 790-793.
- ZHANG, X. K. (2007) Targeting Nur77 translocation. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 69-79.

Discussion générale et conclusion

Depuis quelques années, l'intérêt envers l'étude des mécanismes épigénétiques pouvant intervenir dans la régulation de l'apoptose a pris de l'ampleur, non seulement pour le bénéfice de la recherche fondamentale sur le processus apoptotique, mais aussi pour la compréhension des voies signalétiques impliquées lors de l'induction de l'apoptose par une nouvelle catégorie de médicaments anti-cancéreux testés cliniquement comme adjuvants à la chimiothérapie, les inhibiteurs des histone désacétylases (HDI). L'objectif des travaux entrepris dans le cadre de cette maîtrise était l'exploration de causes possibles de la transformation des cellules normales en cellules tumorales résistantes à mortalité et l'identification de voies par lesquelles il serait possible de renverser cette résistance. Plus précisément, cet ouvrage fait état des modifications épigénétiques pouvant être modulées suite à l'induction de l'apoptose par des inducteurs standards non-HDI. Des cellules Jurkat J77.6 étaient maintenues en culture, puis traitées avec différents stimuli apoptotiques comme le tributylétain (TBT), la cycloheximide, la staurosporine ou l'anticorps anti-Fas. La modulation de deux paramètres épigénétiques a été identifiée durant l'apoptose des cellules Jurkat. Tout d'abord, les modifications post-traductionnelles des histones suivant l'induction de l'apoptose ont été étudiées. Puis, la modulation des histone désacétylases (HDAC) de classe I et de classe II a été caractérisée lors de l'apoptose. Enfin, certains liens ont pu être identifiés entre les modifications épigénétiques observées lors de l'apoptose *normale* et l'influence du traitement des cellules avec un HDI comme la trichostatine A (TSA) sur les voies de régulation épigénétique.

En premier lieu, cette étude a permis de soulever un point important au sujet du protocole d'analyse des modifications post-traductionnelles des histones durant l'apoptose. Dans le but d'isoler les histones des autres protéines, il est possible d'utiliser un protocole d'extraction des histones basé sur l'isolation des noyaux et complété par l'extraction acide à froid des protéines nucléaires dont la charge globale est fortement positive (Ito *et al.*, 2000). Les histones sont reconnus comme des protéines positives et cette caractéristique leur permet de se lier aux groupements phosphates négatifs de l'ADN par interaction électrostatique. Cependant, il est primordial de s'assurer que les conditions auxquelles sont

soumis les cellules n'affectent pas la liaison des histones aux nucléosomes ou du moins, que la localisation nucléaire des histones n'est pas remise en question. Tel que décrit dans une publication précédente, il y a libération d'histones par les nucléosomes durant l'apoptose (Wu *et al.*, 2002). Dans un même sens, les résultats présentés démontrent que l'isolation des histones dans une fraction nucléaire devient particulièrement inefficace suivant l'induction de l'apoptose par la cycloheximide (Fig 1A). L'utilisation de ce type d'extraction pour l'étude des modifications post-traductionnelles pourrait tout de même rester une option si les histones étaient perdues sans aucune spécificité pour ni l'une ni l'autre de leurs modifications post-traductionnelles. Cependant, la libération apoptotique des histones H3 est corrélée à leur acétylation (Fig 1B). En effet, lors de l'induction de l'apoptose par la cycloheximide et lorsque la fragmentation de l'ADN est bien enclenchée, on observe une diminution flagrante du taux d'acétylation chez les histones H3 présentes au niveau du noyau. De façon cohérente, on note une augmentation significative du taux d'acétylation chez les histones perdues dans le surnageant de l'isolation nucléaire. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente démontrant l'export nucléaire apoptotique des histones acétylés par immunofluorescence (Hendzel *et al.*, 1998). Il semble donc que ce type d'extraction ne peut être utilisé pour l'étude de la modulation apoptotique des modifications post-traductionnelles des histones. L'analyse des histones à partir du lysat cellulaire total demeure la meilleure option en conditions apoptotiques.

L'explication derrière la perte sélective des histones H3 acétylées durant l'apoptose demeure obscure. Dans la publication par Wu et al. (2002), il est suggéré que la fragmentation de l'ADN par l'endonucléase DFF40 est corrélée au relâchement des histones par les nucléosomes lors de l'apoptose. Alors, il semble plausible que l'activité du DFF40 soit favorisée par une quelconque augmentation de l'acétylation des histones lors de l'apoptose, tel que suggéré dans une publication précédente (Lee *et al.*, 1996). Pour vérifier cette hypothèse, il était nécessaire de vérifier si l'hyperacétylation des histones est effectivement une caractéristique marquante chez les cellules apoptotiques. Cependant, les résultats obtenus lors de l'analyse de l'acétylation des histones H3 et H4 suivant l'induction de l'apoptose des cellules Jurkat par la cycloheximide ne vont pas dans ce sens. Malgré un taux d'acétylation supérieur chez les histones cytosolique lors de l'apoptose, le taux global d'acétylation des histones ne varie pas significativement (Fig 1C). Le même constat a

également été fait lors de l'induction de l'apoptose par d'autres inducteurs, le TBT et la staurosporine (Fig. 2). La stabilité observée au niveau de l'acétylation des histones durant l'apoptose des cellules Jurkat est donc indépendante du stimulus apoptotique. Selon cette dernière observation, il semble clair que le mécanisme d'induction de l'apoptose par les inhibiteurs de HDAC ne passe pas simplement par l'hyperacétylation des histones. D'ailleurs, selon les résultats présentés dans cet ouvrage, il semble que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 par la TSA n'influence pas l'apoptose à court terme (Fig. 3). Lorsque les cellules Jurkat étaient traitées avec la TSA seule ou en combinaison avec la cycloheximide, aucune des caractéristiques apoptotiques n'étaient accrues. Entre autres, la fragmentation de l'ADN n'était pas augmentée par le traitement avec la TSA. La fragmentation de l'ADN par les endonucléases est un événement majeur de l'apoptose qui permet la dégradation du matériel génétique et de l'hétérochromatine. La dégradation des composants nucléaires est essentielle à la minimisation du transfert génétique des cellules en phase apoptotique vers les cellules environnantes et de la formation d'auto-anticorps associée à certaines affections auto-immunes (de la Taille *et al.*, 1999; Nagata, 2000). Considérant le rôle capital de la fragmentation pour la destruction des gènes contenus dans les cellules désuètes ou transformées, on peut s'imaginer que l'endonucléase apoptotique principale, le DFF40, ait une affinité première pour les régions transcrites de l'ADN et de ce fait, pour les régions particulièrement acétylées de l'ADN. Cette hypothèse serait cohérente avec la libération supérieure des histones acétylées durant l'apoptose et implicitement, avec la diminution associée du taux d'acétylation des histones lors de l'extraction nucléaire.

Plusieurs études ont participé à la caractérisation et à l'investigation des mécanismes régulateurs de l'endonucléase DFF40 (Inohara *et al.*, 1999; Korn *et al.*, 2005; Lechardeur *et al.*, 2005; Lechardeur *et al.*, 2000; Lechardeur *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 1997; Widlak et Garrard, 2005). Cependant, les voies d'activation du DFF40 et celles pouvant être impliquées dans la résistance à la fragmentation ne sont pas clairement établies à ce jour. Des études préalables menées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que les cellules de leucémies lymphoblastiques HPB-45.0, caractérisées par la perte du récepteur membranaire CD45 au niveau de la surface extracellulaire, exhibent une résistance à l'apoptose nucléaire (Dupere-Minier *et al.*, 2004). Chez ces cellules, la caspase-3 est

activée et l'inhibiteur DFF45 est dégradé, mais aucune fragmentation de l'ADN n'est observée. L'origine et les voies signalétiques impliquées dans cette résistance n'est pas connue et fait l'objet d'une recherche continue dans notre laboratoire. Il a été démontré que des molécules chargées négativement, comme l'ARN, l'héparine ou d'autres polyanions, peuvent inhiber l'activité du DFF40 (Widlak et Garrard, 2006). En lien avec cette observation, les résultats présentés démontrent que l'apoptose est fortement corrélée à une déphosphorylation massive de la sérines en position 10 sur les histone H3 (Fig. 4A). De plus, cette déphosphorylation n'est pas dépendante du stimulus apoptoptique utilisé, puisque le TBT et la staurosporine ont aussi entraîné cette modification post-traductionnelle. Les groupements phosphates sont fortement chargés négativement. Il est possible que la déphosphorylation apoptotique des histones H3 soit nécessaire pour l'activité du DFF40 et qu'une résistance à cette déphosphorylation aie, de la même façon que les polyanions, un effet inhibiteur envers l'endonucléase. La résistance à la fragmentation pourrait-elle provenir d'une compétition, pour la liaison à l'enzyme positive DFF40, des groupements phosphates des histones avec les groupements phosphates de l'ADN? Lors de travaux futurs, il sera intéressant de comparer la déphosphorylation apoptotique des cellules CD45+ (HPB-ALL) avec celle des cellules CD45- et résistantes à la fragmentation de l'ADN (HPB-45.0). Une telle investigation pourrait mener à la détermination de l'impact réel de la déphosphorylation des histones H3 sur l'activité du DFF40, sur la fragmentation de l'ADN et la progression de l'apoptose. Une étude précédente suggère que la phosphorylation des histones H3 est accrue lors de l'induction de l'apoptose par la gliotoxine (Waring *et al.*, 1997). Cependant, il semble que cette variation soit spécifique à la gliotoxine car elle n'est pas observée lors de l'induction de l'apoptose par le dexaméthasone ou la thapsigargine.

Une seconde observation intéressante concernant la déphosphorylation des histones H3 est qu'elle peut être reproduite par le traitement des cellules Jurkat avec la TSA (Fig. 4B). En effet, il semble que la sérine 10 sur l'histone H3 subisse une déphosphorylation significative lorsque les cellules sont exposés à la TSA. Le mécanisme par lequel cet inhibiteur des HDAC entraîne cette modification post-traductionnelle inattendue est obscur. Il est possible que l'hyperacétylation des histones qui suit le traitement des cellules avec la TSA favorise, par transrégulation, l'action des phosphatases impliquées dans la

déphosphorylation des histones ou encore qu'elle défavorise les kinases impliquées dans leur phosphorylation. Il serait intéressant d'étudier l'interrelation possible de ces deux modifications post-traductionnelles en vérifiant si la perte apoptotique des histones aux nucléosomes est aussi corrélée à l'état déphosphorylé des histones H3. À savoir si l'induction de l'apoptose chez les cellules résistantes à la mortalité par les inhibiteurs de HDAC dépend ou non de leur capacité à induire la déphosphorylation des histones H3, rien n'est encore certain et une investigation plus approfondie à ce sujet devra être entreprise.

D'autres travaux ont permis de démontrer que l'inhibition non-spécifique des HDAC par les HDI peut aussi avoir une influence importante sur l'acétylation d'une quantité de protéines non-histones pouvant être impliquées dans l'apoptose ou dans la résistance à l'apoptose comme le suppresseur de tumeurs PTEN (Ikenoue *et al.*, 2008), la protéine multifonctionnelle APEX (Bhakat *et al.*, 2003) ou encore le facteur de transcription associé à la réponse au stress NF- κ B (Hasselgren, 2007). La grande diversité des voies signalétiques pouvant être touchées de près ou de loin par la baisse de l'activité de désacétylation au sein d'une cellule rend l'identification du mode d'action pro-apoptotique des HDI très complexe. Le temps nécessaire à l'induction de l'apoptose par la TSA suggère une possible implication de l'expression *de novo* de gènes pro-apoptotiques menant à un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti- apoptotiques. La diminution de l'expression de certaines HDAC durant l'apoptose *normale* pourrait alors être le pendant naturel du mécanisme apoptotique relié aux HDI. Cependant, selon notre modèle, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN surviennent bien avant la diminution apoptotique de l'expression des HDAC 3, 4 et 5 qui devient significative seulement 4 heures après l'induction de l'apoptose par la cycloheximide (Fig. 5). Il devient alors difficile d'imaginer que la baisse de l'expression de ces HDAC puisse être la cause de l'activation des caspases effectrices par exemple. Bien que le clivage caspase-3-dépendant de la HDAC5 soit une caractéristique des cellules Jurkat en phase apoptotique, il semble peu probable que ce clivage soit à la source de l'induction de l'apoptose (Fig. 7). Ce clivage protéolytique serait plutôt une conséquence de l'apoptose. Cependant, l'observation de la disparition rapide de la fraction nucléaire de la HDAC5 lors de l'apoptose relance la possibilité d'une implication de la HDAC5 dans la progression de l'apoptose (Fig. 6). Le présent ouvrage fait également état de la présence d'un mécanisme de translocation

nucléocytoplasmique de la HDAC5, qui est similaire à celui emprunté par les myocytes lors de l'activation de la myogenèse, chez les cellules Jurkat (Fig. 8). Ce mécanisme consiste en la phosphorylation de la HDAC5 par la calmoduline kinase II (CaMKII) et à la séquestration subséquente de la HDAC5 au niveau du cytoplasme par sa liaison avec 14-3-3 (Grozinger et Schreiber, 2000; McKinsey *et al.*, 2000a). De plus, les résultats sur l'inhibition de l'export nucléaire de la HDAC5 durant l'apoptose induite par la cycloheximide ont démontré que la présence cytoplasmique de la HDAC5 n'est pas nécessaire pour que son clivage par la caspase-3 survienne. Ces derniers résultats suggèrent que la HDAC5 est transloquée du noyau vers le cytoplasme tôt après l'induction de l'apoptose et qu'une relation entre la modulation de cette HDAC et l'expression *de novo* de gènes pro-apoptotiques est plausible. Fait intéressant, il a été démontré que la HDAC5 co-immunoprécipite avec la HDAC3 et qu'elle peut collaborer avec elle pour l'inhibition du facteur de transcription MEF2 (Gregoire *et al.*, 2007; Grozinger et Schreiber, 2000; McKinsey *et al.*, 2000a). Il est donc possible que le comportement apoptotique de ces deux HDAC puisse favoriser l'activation de MEF2 et l'activation subséquente de la transcription du gène exprimé précocement (*immediate-early gene*) Nur77 (Youn *et al.*, 1999).

Nur77 est une protéine pouvant favoriser à la fois la survie cellulaire et la mort cellulaire programmée. Lorsqu'elle est localisée au niveau du noyau, Nur77 fonctionne comme un oncogène. De façon opposée, lorsque Nur77 est exportée hors du noyau vers la mitochondrie, elle favorise la conversion du facteur anti-apoptotique Bcl-2 en facteur pro-apoptotique permettant la libération du cytochrome c et l'induction de l'apoptose (Lin *et al.*, 2004). Il est intéressant de constater que le niveau d'expression de Bcl-2 est anormalement élevé chez les cellules tumorales de la majorité des cancers du sein (Moll *et al.*, 2006; Zhang, 2007). Aussi, un peptide de conversion de Bcl-2 dérivé de Nur77 (NuBCP) a été reconnu comme inducteur de l'apoptose des cellules résistantes présentes dans un modèle animal de cancer du sein. Nur77 est aussi reconnue comme une cible prometteuse pour le traitement du carcinome hépatocellulaire (Nakada *et al.*, 2008). Certains inhibiteurs des HDAC comme le MCT-1 et la 5-aza-cytidine ont démontré un effet anti-leucémique relié à une hausse de l'expression de Nur77. En regard des avancées récentes de la connaissance des cibles potentielles pour le traitement du cancer et des caractéristique apoptotiques concernant HDAC5 ici présenté, il sera intéressant d'étudier

l'effet de l'inhibition de la translocation nucléocytoplasmique de la HDAC5 sur l'expression de Nur77 et sur la progression de l'apoptose. La mutagenèse dirigée contre les sites de phosphorylation de la HDAC5 est une technique qui pourra permettre l'étude de l'impact de l'inhibition de l'export nucléaire sur la répartition normale de la HDAC5 et sur la disparition rapide de la HDAC5 au niveau nucléaire suivant l'induction de l'apoptose. L'influence de l'inhibition de l'expression de la HDAC5 par la technique des *small interfering-RNA* (siRNA) pourrait aussi s'avérer intéressante pour l'étude du rôle de la HDAC5 durant l'apoptose.

Malgré l'acceptation récente par la Food and Drug Administration (FDA) du premier inhibiteur de HDAC, Zolinza de *Merck* (vorinostat; SAHA), pour le traitement du lymphome de cellules T cutanées, les mécanismes par lesquels les inhibiteurs de HDAC non-spécifiques induisent l'apoptose des cellules résistantes à la mortalité sont encore mal définis. C'est d'ailleurs la faible spécificité de la majorité des HDI qui complexifie la décortication des mécanismes épigénétiques régulateurs de l'apoptose induite par les HDI (Garber, 2007). Dans l'avenir, une meilleure connaissance de l'action précise de chacune des HDAC durant l'apoptose et des modifications post-traductionnelles des histones survenant durant l'apoptose permettra une meilleure compréhension des déséquilibres métaboliques pouvant être responsables de la carcinogenèse et le développement de traitements plus spécifiques ciblant la source précise de la pathologie.

Liste des références

- AHN, J. Y., LIU, X., CHENG, D., PENG, J., CHAN, P. K., WADE, P. A., YE, K. (2005a) Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell*, 18, 435-445.
- AHN, S. H., CHEUNG, W. L., HSU, J. Y., DIAZ, R. L., SMITH, M. M., ALLIS, C. D. (2005b) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, 120, 25-36.
- ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.
- AUSIO, J. (2000) Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays*, 22, 873-877.
- AW, T. Y., NICOTERA, P., MANZO, L., ORRENIUS, S. (1990) Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*, 283, 46-50.
- AYLLON, V., MARTINEZ, A. C., GARCIA, A., CAYLA, X., REBOLLO, A. (2000) Protein phosphatase 1 alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J*, 19, 2237-2246.
- BAEK, S. H., OHGI, K. A., ROSE, D. W., KOO, E. H., GLASS, C. K., ROSENFELD, M. G. (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell*, 110, 55-67.
- BALIGA, B. S., PRONCZUK, A. W., MUNRO, H. N. (1969) Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *J Biol Chem*, 244, 4480-4489.
- BASILE, V., MANTOVANI, R., IMBRIANO, C. (2006) DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines. *J Biol Chem*, 281, 2347-2357.
- BELIZARIO, J. E., ALVES, J., OCCHIUCCI, J. M., GARAY-MALPARTIDA, M., SESSO, A. (2007) A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res*, 40, 1011-1024.
- BERESHCHENKO, O. R., GU, W., DALLA-FAVERA, R. (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*, 32, 606-613.

- BERTRAND, R., SOLARY, E., O'CONNOR, P., KOHN, K. W., POMMIER, Y. (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res*, 211, 314-321.
- BESTOR, T. H., INGRAM, V. M. (1983) Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 5559-5563.
- BHAKAT, K. K., IZUMI, T., YANG, S. H., HAZRA, T. K., MITRA, S. (2003) Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J*, 22, 6299-6309.
- BOLDEN, J. E., PEART, M. J., JOHNSTONE, R. W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 769-784.
- BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D. R. (1999) Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem*, 274, 17484-17490.
- CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S., REED, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-1321.
- CASTELLANO, R., VIRE, B., PION, M., QUIVY, V., OLIVE, D., HIRSCH, I., VAN LINT, C., COLLETTE, Y. (2006) Active transcription of the human FASL/CD95L/TNFSF6 promoter region in T lymphocytes involves chromatin remodeling: role of DNA methylation and protein acetylation suggest distinct mechanisms of transcriptional repression. *J Biol Chem*, 281, 14719-14728.
- CHAI, J., DU, C., WU, J. W., KYIN, S., WANG, X., SHI, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406, 855-862.
- CHEN, X., WANG, J., WOLTRING, D., GERONDAKIS, S., SHANNON, M. F. (2005) Histone dynamics on the interleukin-2 gene in response to T-cell activation. *Mol Cell Biol*, 25, 3209-3219.
- CHEUNG, W. L., AJIRO, K., SAMEJIMA, K., KLOC, M., CHEUNG, P., MIZZEN, C. A., BEESER, A., ETKIN, L. D., CHERNOFF, J., EARNSHAW, W. C., ALLIS, C. D. (2003) Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, 113, 507-517.
- CHIANG, C. W., HARRIS, G., ELLIG, C., MASTERS, S. C., SUBRAMANIAN, R., SHENOLIKAR, S., WADZINSKI, B. E., YANG, E. (2001) Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood*, 97, 1289-1297.

CHIPUK, J. E., GREEN, D. R. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 18, 157-164.

CHO, S. G., KIM, J. W., LEE, Y. H., HWANG, H. S., KIM, M. S., RYOO, K., KIM, M. J., NOH, K. T., KIM, E. K., CHO, J. H., YOON, K. W., CHO, E. G., PARK, H. S., CHI, S. W., LEE, M. J., KANG, S. S., ICHIJO, H., CHOI, E. J. (2003) Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities. *J Cell Biol*, 163, 71-81.

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., BHAT, G. K. (2008) Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 10-27.

COTE, S., ROSENAUER, A., BIANCHINI, A., SEITER, K., VANDEWIELE, J., NERVI, C., MILLER, W. H., JR. (2002) Response to histone deacetylase inhibition of novel PML/RARalpha mutants detected in retinoic acid-resistant APL cells. *Blood*, 100, 2586-2596.

CROMPTON, M., BARKSBY, E., JOHNSON, N., CAPANO, M. (2002) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 84, 143-152.

DANGOND, F., HAFLER, D. A., TONG, J. K., RANDALL, J., KOJIMA, R., UTKU, N., GULLANS, S. R. (1998) Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 242, 648-652.

DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., GREENBERG, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-241.

DAVIE, J. R. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 133, 2485S-2493S.

DE LA TAILLE, A., CHEN, M. W., BURCHARDT, M., CHOPIN, D. K., BUTTYAN, R. (1999) Apoptotic conversion: evidence for exchange of genetic information between prostate cancer cells mediated by apoptosis. *Cancer Res*, 59, 5461-5463.

DE RUIJTER, A. J., VAN GENNIP, A. H., CARON, H. N., KEMP, S., VAN KUILENBURG, A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, 737-749.

DEGTEREV, A., BOYCE, M., YUAN, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-8567.

DEGTEREV, A., YUAN, J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 378-390.

DENIS, F., RHEAUME, E., AOUAD, S. M., ALAM, A., SEKALY, R. P., COHEN, L. Y. (1998) The role of caspases in T cell development and the control of immune responses. *Cell Mol Life Sci*, 54, 1005-1019.

DEVERAUX, Q. L., WELSH, K., REED, J. C. (2000) Purification and use of recombinant inhibitor of apoptosis proteins as caspase inhibitors. *Methods Enzymol*, 322, 154-161.

DI GENNARO, E., BRUZZESE, F., CARAGLIA, M., ABRUZZESE, A., BUDILLON, A. (2004) Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*, 26, 435-441.

DIJKERS, P. F., MEDEMA, R. H., LAMMERS, J. W., KOENDERMAN, L., COFFER, P. J. (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, 10, 1201-1204.

DOKMANOVIC, M., MARKS, P. A. (2005) Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem*, 96, 293-304.

DOWNS, J. A., ALLARD, S., JOBIN-ROBITAILLE, O., JAVAHERI, A., AUGER, A., BOUCHARD, N., KRON, S. J., JACKSON, S. P., COTE, J. (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell*, 16, 979-990.

DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L., WANG, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.

DUAN, H., DIXIT, V. M. (1997) RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, 385, 86-89.

DUPERE-MINIER, G., HAMELIN, C., DESHARNAIS, P., BERNIER, J. (2004) Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells. *Apoptosis*, 9, 543-551.

ELLIS, H. M., HORVITZ, H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-829.

ESCAFFIT, F., VAUTE, O., CHEVILLARD-BRIET, M., SEGUI, B., TAKAMI, Y., NAKAYAMA, T., TROUCHE, D. (2007) Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol Cell Biol*, 27, 554-567.

FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148, 2207-2216.

FAJAS, L., EGLER, V., REITER, R., HANSEN, J., KRISTIANSEN, K., DEBRIL, M. B., MIARD, S., AUWERX, J. (2002) The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 3, 903-910.

FALCIERI, E., MARTELLI, A. M., BAREGGI, R., CATALDI, A., COCCO, L. (1993) The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 19-25.

FERRARA, F. F., FAZI, F., BIANCHINI, A., PADULA, F., GELMETTI, V., MINUCCI, S., MANCINI, M., PELICCI, P. G., LO COCO, F., NERVI, C. (2001) Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*, 61, 2-7.

FISCHLE, W., KIERMER, V., DEQUIEDT, F., VERDIN, E. (2001) The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol*, 79, 337-348.

FLETCHER, J. I., HUANG, D. C. (2006) BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell Death Differ*, 13, 1268-1271.

FOEHR, E. D., LORENTE, G., VINCENT, V., NIKOLICH, K., URFER, R. (2005) FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS. *J Neurooncol*, 74, 241-248.

FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., VILLAR-GAREA, A., BOIX-CHORNET, M., ESPADA, J., SCHOTTA, G., BONALDI, T., HAYDON, C., ROPERO, S., PETRIE, K., IYER, N. G., PEREZ-ROSADO, A., CALVO, E., LOPEZ, J. A., CANO, A., CALASANZ, M. J., COLOMER, D., PIRIS, M. A., AHN, N., IMHOF, A., CALDAS, C., JENUWEIN, T., ESTELLER, M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37, 391-400.

FRYE, R. A. (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 273-279.

FUENTES-PRIOR, P., SALVESEN, G. S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384, 201-232.

GALASINSKI, S. C., RESING, K. A., GOODRICH, J. A., AHN, N. G. (2002) Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem*, 277, 19618-19626.

GARBER, K. (2007) HDAC inhibitors overcome first hurdle. *Nat Biotechnol*, 25, 17-19.

GARCIA-RAMIREZ, M., ROCCHINI, C., AUSIO, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem*, 270, 17923-17928.

GERSCHENSON, L. E., GESKE, F. J. (2001) Virchow and apoptosis. *Am J Pathol*, 158, 1543.

GIRARDOT, V., RABILLOUD, T., YOSHIDA, M., BEPPU, T., LAWRENCE, J. J., KHOCHBIN, S. (1994) Relationship between core histone acetylation and histone H1(0) gene activity. *Eur J Biochem*, 224, 885-892.

GLOZAK, M. A., SENGUPTA, N., ZHANG, X., SETO, E. (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, 15-23.

GOEBEL, W., OBERMEYER, N., BLEICHER, N., KRATZMEIER, M., EIBL, H. J., DOENECKE, D., ALBIG, W. (2007) Apoptotic DNA fragmentation is not related to the phosphorylation state of histone H1. *Biol Chem*, 388, 197-206.

GONZALEZ-CUADRADO, S., LOPEZ-ARMADA, M. J., GOMEZ-GUERRERO, C., SUBIRA, D., GARCIA-SAHUQUILLO, A., ORTIZ-GONZALEZ, A., NEILSON, E. G., EGIDO, J., ORTIZ, A. (1996) Anti-Fas antibodies induce cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. *Kidney Int*, 49, 1064-1070.

GOPISETTY, G., RAMACHANDRAN, K., SINGAL, R. (2006) DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol*, 43, 1729-1740.

GRAY, S. G., EKSTROM, T. J. (1998) Effects of cell density and trichostatin A on the expression of HDAC1 and p57Kip2 in Hep 3B cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 245, 423-427.

GREEN, D. R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, 102, 1-4.

GREGOIRE, S., XIAO, L., NIE, J., ZHANG, X., XU, M., LI, J., WONG, J., SETO, E., YANG, X. J. (2007) Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol*, 27, 1280-1295.

- GREGOIRE, S., YANG, X. J. (2005) Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol*, 25, 2273-2287.
- GREGORY, P. D., WAGNER, K., HORZ, W. (2001) Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*, 265, 195-202.
- GROZINGER, C. M., SCHREIBER, S. L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7835-7840.
- GRUNSTEIN, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.
- GUENTHER, M. G., YU, J., KAO, G. D., YEN, T. J., LAZAR, M. A. (2002) Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev*, 16, 3130-3135.
- HAKE, S. B., XIAO, A., ALLIS, C. D. (2004) Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer*, 90, 761-769.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HARADA, H., BECKNELL, B., WILM, M., MANN, M., HUANG, L. J., TAYLOR, S. S., SCOTT, J. D., KORSMEYER, S. J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, 3, 413-422.
- HASSELGREN, P. O. (2007) Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation--triple threat in muscle wasting. *J Cell Physiol*, 213, 679-689.
- HAUSER, C., SCHUETTENGRUBER, B., BARTL, S., LAGGER, G., SEISER, C. (2002) Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. *Mol Cell Biol*, 22, 7820-7830.
- HENDZEL, M. J., NISHIOKA, W. K., RAYMOND, Y., ALLIS, C. D., BAZETT-JONES, D. P., TH'NG, J. P. (1998) Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 24470-24478.
- HENGARTNER, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- HENGARTNER, M. O., ELLIS, R. E., HORVITZ, H. R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356, 494-499.

HITOMI, J., KATAYAMA, T., EGUCHI, Y., KUDO, T., TANIGUCHI, M., KOYAMA, Y., MANABE, T., YAMAGISHI, S., BANDO, Y., IMAIZUMI, K., TSUJIMOTO, Y., TOHYAMA, M. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*, 165, 347-356.

HORN, P. J., PETERSON, C. L. (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*, 297, 1824-1827.

HSU, H., XIONG, J., GOEDDEL, D. V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81, 495-504.

HUBBERT, C., GUARDIOLA, A., SHAO, R., KAWAGUCHI, Y., ITO, A., NIXON, A., YOSHIDA, M., WANG, X. F., YAO, T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417, 455-458.

IKENOUE, T., INOKI, K., ZHAO, B., GUAN, K. L. (2008) PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res*, 68, 6908-6912.

IMAI, Y., KIMURA, T., MURAKAMI, A., YAJIMA, N., SAKAMAKI, K., YONEHARA, S. (1999) The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, 398, 777-785.

INOHARA, N., KOSEKI, T., CHEN, S., BENEDICT, M. A., NUNEZ, G. (1999) Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem*, 274, 270-274.

INSINGA, A., MONESTIROLI, S., RONZONI, S., GELMETTI, V., MARCHESI, F., VIALE, A., ALTUCCI, L., NERVI, C., MINUCCI, S., PELICCI, P. G. (2005) Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*, 11, 71-76.

ITO, K., BARNES, P. J., ADCOCK, I. M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*, 20, 6891-6903.

ITOH, N., TSUJIMOTO, Y., NAGATA, S. (1993) Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol*, 151, 621-627.

JACOBSON, M. D., WEIL, M., RAFF, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.

JIANG, X., WANG, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, 275, 31199-31203.

- JOHNSON, C. A., WHITE, D. A., LAVENDER, J. S., O'NEILL, L. P., TURNER, B. M. (2002) Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. *J Biol Chem*, 277, 9590-9597.
- KASLER, H. G., VERDIN, E. (2007) Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes. *Mol Cell Biol*, 27, 5184-5200.
- KASS, G. E., ORRENIUS, S. (1999) Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 1, 25-35.
- KELLY, W. K., O'CONNOR, O. A., MARKS, P. A. (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*, 11, 1695-1713.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- KERRIDGE, D. (1958) The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Gen Microbiol*, 19, 497-506.
- KHODAREV, N. N., BENNETT, T., SHEARING, N., SOKOLOVA, I., KOUDELIK, J., WALTER, S., VILLALOBOS, M., VAUGHAN, A. T. (2000) LINE L1 retrotransposable element is targeted during the initial stages of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Biochem*, 79, 486-495.
- KIRSH, O., SEELER, J. S., PICHLER, A., GAST, A., MULLER, S., MISKA, E., MATHIEU, M., HAREL-BELLAN, A., KOUZARIDES, T., MELCHIOR, F., DEJEAN, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J*, 21, 2682-2691.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14, 5579-5588.
- KORN, C., SCHOLZ, S. R., GIMADUTDINOW, O., LURZ, R., PINGOUD, A., MEISS, G. (2005) Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *J Biol Chem*, 280, 6005-6015.
- KORNBERG, R. D., LORCH, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98, 285-294.

- KOUZARIDES, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 198-209.
- KRATZMEIER, M., ALBIG, W., HANECKE, K., DOENECKE, D. (2000) Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction. *J Biol Chem*, 275, 30478-30486.
- KRUG, L. M., CURLEY, T., SCHWARTZ, L., RICHARDSON, S., MARKS, P., CHIAO, J., KELLY, W. K. (2006) Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid. *Clin Lung Cancer*, 7, 257-261.
- KUMAR, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14, 32-43.
- LAGGER, G., O'CARROLL, D., REMBOLD, M., KHIER, H., TISCHLER, J., WEITZER, G., SCHUETTENGRUBER, B., HAUSER, C., BRUNMEIR, R., JENUWEIN, T., SEISER, C. (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J*, 21, 2672-2681.
- LAMKANFI, M., DECLERCQ, W., KALAI, M., SAELENS, X., VANDENABEELE, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ*, 9, 358-361.
- LECHARDEUR, D., DOUGAPARSAD, S., NEMES, C., LUKACS, G. L. (2005) Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem*, 280, 40216-40225.
- LECHARDEUR, D., DRZYMALA, L., SHARMA, M., ZYLKA, D., KINACH, R., PACIA, J., HICKS, C., USMANI, N., ROMMENS, J. M., LUKACS, G. L. (2000) Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol*, 150, 321-334.
- LECHARDEUR, D., XU, M., LUKACS, G. L. (2004) Contrasting nuclear dynamics of the caspase-activated DNase (CAD) in dividing and apoptotic cells. *J Cell Biol*, 167, 851-862.
- LEE, E., FURUKUBO, T., MIYABE, T., YAMAUCHI, A., KARIYA, K. (1996) Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis. *FEBS Lett*, 395, 183-187.
- LEMASTERS, J. J., QIAN, T., HE, L., KIM, J. S., ELMORE, S. P., CASCIO, W. E., BRENNER, D. A. (2002) Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 4, 769-781.

LEMERCIER, C., BROCARD, M. P., PUVION-DUTILLEUL, F., KAO, H. Y., ALBAGLI, O., KHOCHBIN, S. (2002) Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 277, 22045-22052.

LI, L. Y., LUO, X., WANG, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-99.

LIN, B., KOLLURI, S. K., LIN, F., LIU, W., HAN, Y. H., CAO, X., DAWSON, M. I., REED, J. C., ZHANG, X. K. (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 116, 527-540.

LIN, H. Y., CHEN, C. S., LIN, S. P., WENG, J. R. (2006) Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev*, 26, 397-413.

LINGGI, B. E., BRANDT, S. J., SUN, Z. W., HIEBERT, S. W. (2005) Translating the histone code into leukemia. *J Cell Biochem*, 96, 938-950.

LIU, F., DOWLING, M., YANG, X. J., KAO, G. D. (2004) Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4. *J Biol Chem*, 279, 34537-34546.

LIU, X., KIM, C. N., YANG, J., JEMMERSON, R., WANG, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.

LUGOVSKOY, A. A., ZHOU, P., CHOU, J. J., MCCARTY, J. S., LI, P., WAGNER, G. (1999) Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell*, 99, 747-755.

LUO, X., BUDIARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C., WANG, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490.

LUTTER, M., FANG, M., LUO, X., NISHIJIMA, M., XIE, X., WANG, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol*, 2, 754-761.

MAGER, J., BARTOLOMEI, M. S. (2005) Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nat Genet*, 37, 1194-1200.

MARCHETTI, P. (2005) [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil*, 33, 632-641.

MARKS, P., RIFKIND, R. A., RICHON, V. M., BRESLOW, R., MILLER, T., KELLY, W. K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1, 194-202.

MARTIN, S. J., LENNON, S. V., BONHAM, A. M., COTTER, T. G. (1990) Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol*, 145, 1859-1867.

MARTINO, J. C., DUBOIS-DAUPHIN, M., STAPLE, J. K., RODRIGUEZ, I., FRANKOWSKI, H., MISSOTTEN, M., ALBERTINI, P., TALABOT, D., CATSICAS, S., PIETRA, C., ET AL. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13, 1017-1030.

MARUSHIGE, Y., MARUSHIGE, K. (1995) Disappearance of ubiquitinated histone H2A during chromatin condensation in TGF beta 1-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 15, 267-272.

MATSUZAWA, A., ICHIJO, H. (2001) Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem*, 130, 1-8.

MCKINSEY, T. A., ZHANG, C. L., LU, J., OLSON, E. N. (2000a) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 408, 106-111.

MCKINSEY, T. A., ZHANG, C. L., OLSON, E. N. (2000b) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14400-14405.

MCKINSEY, T. A., ZHANG, C. L., OLSON, E. N. (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*, 21, 6312-6321.

MEDEMA, J. P., SCAFFIDI, C., KISCHKEL, F. C., SHEVCHENKO, A., MANN, M., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16, 2794-2804.

MIURA, M., ZHU, H., ROTELLO, R., HARTWIEG, E. A., YUAN, J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 75, 653-660.

MOLL, U. M., MARCHENKO, N.,ZHANG, X. K. (2006) p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25, 4725-4743.

NAGATA, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

NAGATA, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256, 12-18.

NAGATA, S., NAGASE, H., KAWANE, K., MUKAE, N.,FUKUYAMA, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10, 108-116.

NAKADA, S., CHEN, G. I., GINGRAS, A. C.,DUROCHER, D. (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*, 9, 1019-1026.

NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A.,YUAN, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.

NAKANO, K., VOUSDEN, K. H., (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-694.

NOWAK, S. J., PAI, C. Y.,CORCES, V. G. (2003) Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 23, 6129-6138.

O'REILLY, L. A.,STRASSER, A. (1999) Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res*, 48, 5-21.

OEHNINGER, S., MORSHEDI, M., WENG, S. L., TAYLOR, S., DURAN, H.,BEEBE, S. (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online*, 7, 469-476.

ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T., TANAKA, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058.

OKANO, M., XIE, S.,LI, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 19, 219-220.

PANTELEEVA, I., ROUAUX, C., LARMET, Y., BOUTILLIER, S., LOEFFLER, J. P.,BOUTILLIER, A. L. (2004) HDAC-3 participates in the repression of e2f-dependent gene transcription in primary differentiated neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 656-660.

- PARONI, G., FONTANINI, A., CERNOTTA, N., FOTI, C., GUPTA, M. P., YANG, X. J., FASINO, D., BRANCOLINI, C. (2007) Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4. *Mol Cell Biol*, 27, 6718-6732.
- PARONI, G., MIZZAU, M., HENDERSON, C., DEL SAL, G., SCHNEIDER, C., BRANCOLINI, C. (2004) Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15, 2804-2818.
- PARRA, M., MAHMOUDI, T., VERDIN, E. (2007) Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev*, 21, 638-643.
- PARRISH, J. Z., XUE, D. (2006) Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development. *Chromosoma*, 115, 89-97.
- PASQUALUCCI, L., BERESCHENKO, O., NIU, H., KLEIN, U., BASSO, K., GUGLIELMINO, R., CATTORETTI, G., DALLA-FAVERA, R. (2003) Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma*, 44 Suppl 3, S5-12.
- PAULSON, J. R., PATZLAFF, J. S., VALLIS, A. J. (1996) Evidence that the endogenous histone H1 phosphatase in HeLa mitotic chromosomes is protein phosphatase 1, not protein phosphatase 2A. *J Cell Sci*, 109 (Pt 6), 1437-1447.
- PENALOZA, C., LIN, L., LOCKSHIN, R. A., ZAKERI, Z. (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol*, 126, 149-158.
- PETER, M. E., KRAMMER, P. H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, 10, 26-35.
- PETERSON, C. L., WORKMAN, J. L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Gen Dev*, 10, 187-192
- PFLUM, M. K., TONG, J. K., LANE, W. S., SCHREIBER, S. L. (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem*, 276, 47733-47741.
- POGO, B. G., ALLFREY, V. G., MIRSKY, A. E. (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55, 805-812.
- PRIGENT, C., DIMITROV, S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*, 116, 3677-3685.

- PUCCI, B., KASTEN, M.,GIORDANO, A. (2000) Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2, 291-299.
- PUTCHA, G. V., MOULDER, K. L., GOLDEN, J. P., BOUILLET, P., ADAMS, J. A., STRASSER, A., JOHNSON, E. M. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, 29, 615-628.
- RAO, J., BHATTACHARYA, D., BANERJEE, B., SARIN, A.,SHIVASHANKAR, G. V. (2007) Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 263-268.
- RAO, R. V., PEEL, A., LOGVINOVA, A., DEL RIO, G., HERMEL, E., YOKOTA, T., GOLDSMITH, P. C., ELLERBY, L. M., ELLERBY, H. M.,BREDESEN, D. E. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*, 514, 122-128.
- RICHON, V. M., EMILIANI, S., VERDIN, E., WEBB, Y., BRESLOW, R., RIFKIND, R. A.,MARKS, P. A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3003-7.
- RIEDL, S. J., RENATUS, M., SCHWARZENBACHER, R., ZHOU, Q., SUN, C., FESIK, S. W., LIDDINGTON, R. C.,SALVESEN, G. S. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104, 791-800.
- RODRIGUEZ, J.,LAZEBNIK, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, 13, 3179-3184.
- ROGAKOU, E. P., NIEVES-NEIRA, W., BOON, C., POMMIER, Y.,BONNER, W. M. (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*, 275, 9390-9395.
- ROSATO, R. R., ALMENARA, J. A.,GRANT, S. (2003) The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res*, 63, 3637-3645.
- ROTH, S. Y.,ALLIS, C. D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci*, 17, 93-98.
- RUDNER, J., LEPPLE-WIENHUES, A., BUDACH, W., BERSCHAUER, J., FRIEDRICH, B., WESSELBORG, S., SCHULZE-OSTHOFF, K.,BELKA, C. (2001) Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J Cell Sci*, 114, 4161-4172.

- SAMEJIMA, K., EARNSHAW, W. C. (2005) Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 677-688.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K. J., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17, 1675-1687.
- SCHUETTENGRUBER, B., SIMBOECK, E., KHIER, H., SEISER, C. (2003) Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression. *Mol Cell Biol*, 23, 6993-7004.
- SCHUTZE, S., TCHIKOV, V., SCHNEIDER-BRACHERT, W. (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 655-662.
- SCHWER, B., NORTH, B. J., FRYE, R. A., OTT, M., VERDIN, E. (2002) The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*, 158, 647-57.
- SCOLTOCK, A. B., CIDLOWSKI, J. A. (2004) Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition. *Exp Cell Res*, 297, 212-223.
- SCOTT, F. L., FUCHS, G. J., BOYD, S. E., DENAULT, J. B., HAWKINS, C. J., DEQUIEDT, F., SALVESEN, G. S. (2008) Caspase-8 cleaves histone deacetylase 7 and abolishes its transcription repressor function. *J Biol Chem*, 283, 19499-19510.
- SEIPP, S., SCHMICH, J., LEITZ, T. (2001) Apoptosis--a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractina echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Development*, 128, 4891-4898.
- SENGUPTA, N., SETO, E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*, 93, 57-67.
- SEONG, Y. M., CHOI, J. Y., PARK, H. J., KIM, K. J., AHN, S. G., SEONG, G. H., KIM, I. K., KANG, S., RHIM, H. (2004) Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J Biol Chem*, 279, 37588-37596.
- SHI, Y., LAN, F., MATSON, C., MULLIGAN, P., WHETSTINE, J. R., COLE, P. A., CASERO, R. A. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119, 941-953.

- SHIMIZU, S., NARITA, M., TSUJIMOTO, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399, 483-487.
- SHINJYO, T., KURIBARA, R., INUKAI, T., HOSOI, H., KINOSHITA, T., MIYAJIMA, A., HOUGHTON, P. J., LOOK, A. T., OZAWA, K., INABA, T. (2001). Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, 21, 854-864.
- SIEGEL, R. M., FREDERIKSEN, J. K., ZACHARIAS, D. A., CHAN, F. K., JOHNSON, M., LYNCH, D., TSIEN, R. Y., LENARDO, M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288, 2354-2357.
- SIKORA, E., BIELAK-ZMIJEWSKA, A., MAGALSKA, A., PIWOCKA, K., MOSIENIAK, G., KALINOWSKA, M., WIDLAK, P., CYMERMAN, I. A., BUJNICKI, J. M. (2006) Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells. *Mol Cancer Ther*, 5, 927-934.
- SMITH, B. C., DENU, J. M. (2009) Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta*, 1789, 45-57.
- SPENCER, V. A., DAVIE, J. R. (2001) Dynamically acetylated histone association with transcriptionally active and competent genes in the avian adult beta-globin gene domain. *J Biol Chem*, 276, 34810-34815.
- SPURLING, C. C., GODMAN, C. A., NOONAN, E. J., RASMUSSEN, T. P., ROSENBERG, D. W., GIARDINA, C. (2008) HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog*, 47, 137-147.
- SRINIVASULA, S. M., DATTA, P., FAN, X. J., FERNANDES-ALNEMRI, T., HUANG, Z., ALNEMRI, E. S. (2000) Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem*, 275, 36152-26157.
- STENNICKE, H. R., JURGENSMEIER, J. M., SHIN, H., DEVERAUX, Q., WOLF, B. B., YANG, X., ZHOU, Q., ELLERBY, H. M., ELLERBY, L. M., BREDESEN, D., GREEN, D. R., REED, J. C., FROELICH, C. J., SALVESEN, G. S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*, 273, 27084-27090.
- STRAHL, B. D., ALLIS, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-45.

SUN, J. M., SPENCER, V. A., CHEN, H. Y., LI, L., DAVIE, J. R. (2003) Measurement of histone acetyltransferase and histone deacetylase activities and kinetics of histone acetylation. *Methods*, 31, 12-23.

SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B. E., BROTHERS, G. M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D. R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D. P., PENNINGER, J. M., KROEMER, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.

TANNER, K. G., TRIEVEL, R. C., KUO, M. H., HOWARD, R. M., BERGER, S. L., ALLIS, C. D., MARMORSTEIN, R., DENU, J. M. (1999) Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem*, 274, 18157-18160.

TARTAGLIA, L. A., ROTHE, M., HU, Y. F., GOEDEL, D. V. (1993) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell*, 73, 213-216.

TH'NG, J. P. (2001) Histone modifications and apoptosis: cause or consequence? *Biochem Cell Biol*, 79, 305-311.

THOMPSON, T. A., LEWIS, J. M., DEJNEKA, N. S., SEVERS, W. B., POLAVARAPU, R., BILLINGSLEY, M. L. (1996) Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther*, 276, 1201-1216.

THORNBERRY, N. A. (1997) The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*, 53, 478-490.

THORNBERRY, N. A., BULL, H. G., CALAYCAY, J. R., CHAPMAN, K. T., HOWARD, A. D., KOSTURA, M. J., MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER, J. R., AUNINS, J., ET AL. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356, 768-774.

TOYOTA, M., ISSA, J. P. (2000) The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis*, 21, 329-333.

VANYUSHIN, B. F. (2005) Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 488-499.

VAUX, D. L., CORY, S., ADAMS, J. M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-442.

VAUX, D. L., KORSMEYER, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell*, 96, 245-254.

- VAUX, D. L., WEISSMAN, I. L., KIM, S. K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258, 1955-1957.
- VERDEL, A., CURTET, S., BROCARD, M. P., ROUSSEAU, S., LEMERCIER, C., YOSHIDA, M., KHOCHBIN, S. (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*, 10, 747-749.
- VERHAGEN, A. M., EKERT, P. G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J., VAUX, D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53.
- VIRDEE, K., PARONE, P. A., TOLKOVSKY, A. M. (2000) Phosphorylation of the proapoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr Biol*, 10, R883.
- VOELTER-MAHLKNECHT, S., HO, A. D., MAHLKNECHT, U. (2005) Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med*, 16, 589-598.
- WANG, A. H., YANG, X. J. (2001) Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. *Mol Cell Biol*, 21, 5992-6005.
- WANG, H. G., PATHAN, N., ETHELL, I. M., KRAJEWSKI, S., YAMAGUCHI, Y., SHIBASAKI, F., MCKEON, F., BOBO, T., FRANKE, T. F., REED, J. C. (1999) Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284, 339-343.
- WANG, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-2933.
- WARING, P., KHAN, T., SJAARDA, A. (1997) Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J Biol Chem*, 272, 17929-17936.
- WEISS, C., SCHNEIDER, S., WAGNER, E. F., ZHANG, X., SETO, E., BOHMANN, D. (2003) JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J*, 22, 3686-3695.
- WHITFIELD, J., NEAME, S. J., PAQUET, L., BERNARD, O., HAM, J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, 29, 629-643.
- WIDLAK, P. (2000) The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol*, 47, 1037-1044.

WIDLAK, P., GARRARD, W. T. (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*, 94, 1078-1087.

WIDLAK, P., GARRARD, W. T. (2006) The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions. *Apoptosis*, 11, 1331-1337.

WIDLAK, P., KALINOWSKA, M., PARSEGHIAN, M. H., LU, X., HANSEN, J. C., GARRARD, W. T. (2005) The histone H1 C-terminal domain binds to the apoptotic nuclease, DNA fragmentation factor (DFF40/CAD) and stimulates DNA cleavage. *Biochemistry*, 44, 7871-7878.

WIDLAK, P., LI, P., WANG, X., GARRARD, W. T. (2000) Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem*, 275, 8226-8232.

WILSON, C. B., MERKENSCHLAGER, M. (2006) Chromatin structure and gene regulation in T cell development and function. *Curr Opin Immunol*, 18, 143-151.

WIPER-BERGERON, N., WU, D., POPE, L., SCHILD-POULTER, C., HACHE, R. J. (2003) Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J*, 22, 2135-2145.

WU, D., INGRAM, A., LAHTI, J. H., MAZZA, B., GRENET, J., KAPOOR, A., LIU, L., KIDD, V. J., TANG, D. (2002) Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem*, 277, 12001-12008.

WYLLIE, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556.

WYLLIE, A. H. (1997) Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*, 53, 451-465.

XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R. J., GREENBERG, M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-1331.

XU, W. S., PARMIGIANI, R. B., MARKS, P. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26, 5541-5552.

YOON, Y. S., KIM, J. W., KANG, K. W., KIM, Y. S., CHOI, K. H., JOE, C. O. (1996) Poly(ADP-ribosyl)ation of histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis. *J Biol Chem*, 271, 9129-9134.

YOSHIDA, M., KIJIMA, M., AKITA, M., BEPPU, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265, 17174-17179.

YOULE, R. J., STRASSER, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.

YOUN, H. D., LIU, J. O. (2000) Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity*, 13, 85-94.

YOUN, H. D., SUN, L., PRYWES, R., LIU, J. O. (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science*, 286, 790-793.

YU, J., LI, Y., ISHIZUKA, T., GUENTHER, M. G., LAZAR, M. A. (2003) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J*, 22, 3403-3410.

ZHA, J., HARADA, H., OSIPOV, K., JOCKEL, J., WAKSMAN, G., KORSMEYER, S. J. (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and proapoptotic activity. *J Biol Chem*, 272, 24101-24104.

ZHANG, K., DENT, S. Y. (2005) Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *J Cell Biochem*, 96, 1137-1148.

ZHANG, X. K. (2007) Targeting Nur77 translocation. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 69-79.

ZHANG, Y., ADACHI, M., KAWAMURA, R., IMAI, K. (2006) Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 13, 129-140.

ZHAO, Y., TAN, J., ZHUANG, L., JIANG, X., LIU, E. T., YU, Q. (2005) Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16090-16095.

ZOU, H., HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A., WANG, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90, 405-413.

ZOU, H., LI, Y., LIU, X., WANG, X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274, 11549-11556.

