

La mystification et l'ingéniosité de suppresseurs de tumeurs dans les fonctions nucléaires

Christelle Cayrou, Yannick Doyon,
Anne-Julie Landry, Valérie Côté, Jacques Côté

Centre de recherche en cancérologie
de l'Université Laval,
Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ),
9, rue McMahon,
Québec (Québec) G1R 2J6, Canada.
jacques.cote@crhdq.ulaval.ca



> La dynamique de la structure chromatinienne est régulée par un jeu de modifications épigénétiques [1] qui vont dicter le devenir de nombreux processus nucléaires comme la transcription, la réparation d'ADN, la recombinaison et la réplication. Les connaissances actuelles sur les éléments auxquels attribuer ces modifications révèlent le rôle prépondérant de ces facteurs dans le déclenchement et la progression de nombreuses maladies chez l'homme, en particulier certaines formes de cancer. [2]. Par exemple, la méthylation et la désacétylation de résidus spécifiques des histones sont parmi les mécanismes pouvant aboutir à la répression d'un gène suppresseur de tumeurs [3]. Les activités modifiant la chromatine fonctionnent sous forme de complexes multiprotéiques [2]. L'identification, la purification et la caractérisation biochimique de ces complexes sont ainsi au cœur de la compréhension moléculaire de l'expression de gènes aussi bien que du maintien et du transfert d'information génétique chez les eucaryotes.

Tous les membres de la famille des suppresseurs de tumeurs ING (*inhibitor of growth*) sont des

corégulateurs de la fonction transcriptionnelle de p53, jouant un rôle premier dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire, ainsi que dans l'apparition de cancers [4]. Ces protéines sont très conservées de la levure à l'homme. Chez la levure, chacun des 3 homologues de cette famille se retrouve exclusivement à l'intérieur de complexes histone désacétylase (HDAC ; Pho23 dans Sin3/Rpd3L) et histone acétyltransférase (HAT ; Yng1 dans NuA3 et

Yng2 dans NuA4) (Figure 1, partie supérieure) [5, 6]. Chez l'homme, la famille compte cinq protéines, les ING de 1 à 5. ING1, étant plus apparenté à Pho23 de levure, est une sous-unité du complexe mSin3/HDAC tandis que ING3, similaire à Yng2, se retrouve dans le complexe hNuA4/Tip60 (Figure 1, partie inférieure, A et B) [7, 8]. Ces deux associations chez l'homme suggèrent donc que les autres membres de la famille, soit ING2, ING4 et ING5, sont également associés

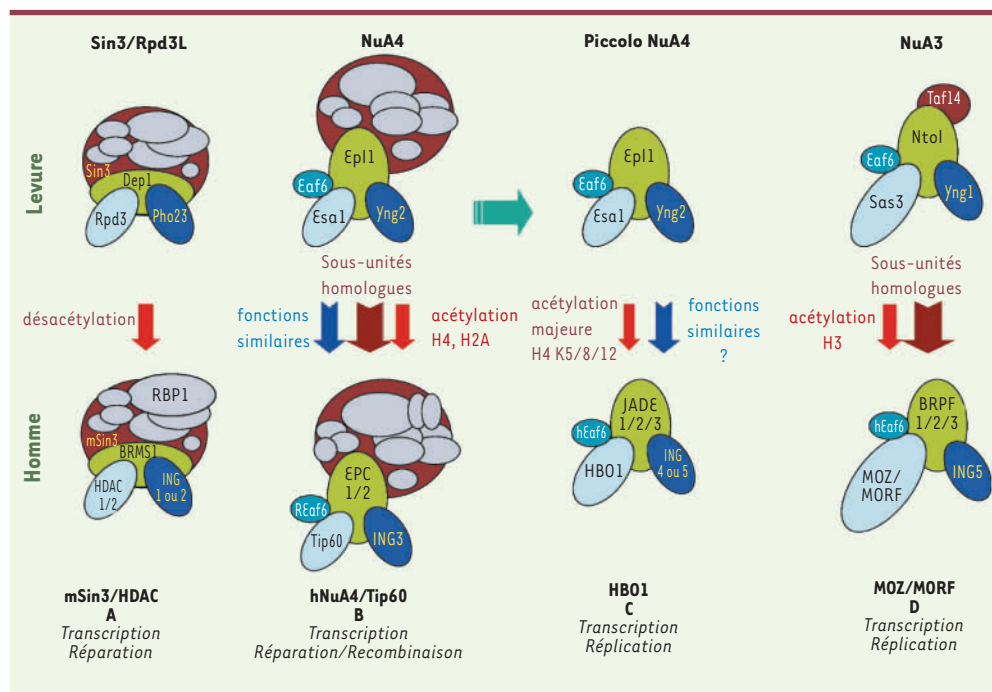


Figure 1. Conservation de la composition, de la spécificité enzymatique et des fonctions nucléaires des complexes ING de la levure à l'humain. Les complexes ING1/2 ont été impliqués dans la régulation transcriptionnelle et la réparation de l'ADN. Le complexe ING3 joue des rôles importants durant la transcription, la réparation et la recombinaison. Le complexe ING4 a été impliqué en transcription, de même pour les complexes ING5, sauf que ces derniers sont en plus essentiels pour la réplication de matériel génétique. Les complexes ING sont donc au cœur de l'expression et du maintien du génome des eucaryotes (tiré de [9] avec la permission de Elsevier).

à des complexes HAT/HDAC spécifiques, liant la régulation de la chromatine avec la fonction de p53 et la suppression de tumeurs. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué la caractérisation biochimique complète des complexes humains associés aux protéines ING [9].

Structure et fonctions des complexes ING humains

Nous avons d'abord purifié par affinité multiple le complexe associé à ING2. Comme ce dernier est très apparenté à ING1, il ne fut pas trop surprenant de le trouver également associé à un complexe mSin3/HDAC, mais indépendamment de ING1. Nous avons identifié dans ce complexe la protéine BRMS1, qui participe à la suppression des métastases, ainsi que RBP1, qui permet le recrutement du complexe mSin3/HDAC par les protéines de la famille Rb, induisant l'arrêt du cycle cellulaire en réprimant la transcription dépendante de E2F (désacétylation des gènes d'entrée en phase S) [9, 10]. Puisque RBP1 et BRMS1 sont partenaires dans un même complexe HDAC, cela suggère un nouveau mécanisme par lequel ING2 pourrait agir comme suppresseur de tumeurs et de métastases (indépendant de p53).

Si ING3 est associée au complexe HAT hNuA4/Tip60 déjà connu (Figure 1, B), ING4, lui, fait partie d'un nouveau complexe HAT de quatre sous-unités (Figure 1C). Outre ING4, régulateur de la croissance et de l'angiogenèse de tumeurs au cerveau [11], le complexe contient HBO1 (*histone acetyltransferase binding to ORC1*, précédemment suggérée comme jouant un rôle lors de l'initiation de la réplication, la formation de lymphomes, ainsi que dans la régulation de la transcription par le récepteur des androgènes [12]) et les paralogues JADE, dont JADE1 qui est un suppresseur de tumeurs du rein [13]. ING3 et ING4 sont donc associées à deux HAT faisant partie de la famille MYST, qui comprend un grand nombre d'acétyl-

transférases de structure apparentée et conservées au cours de l'évolution des cellules eucaryotes [12]. Tip60-ING3 (le complexe hNuA4) acétyle préférentiellement les histones H4 et H2A et HBO1-ING4 acétyle l'histone H4 (et H3 à un moindre degré) [9]. Nous avons démontré par interférence par l'ARN que HBO1 contribue à la majorité de l'acétylation de l'histone H4 chez l'homme tandis que Tip60 joue un rôle secondaire. Une différence importante de leurs effets sur la croissance cellulaire a également été constatée : la déplétion de Tip60 provoque un arrêt de croissance par un blocage en phase G2/M, tandis que HBO1 est requise pour le passage à travers les phases S et G2/M [9].

Cette dualité d'effet de HBO1 à deux endroits du cycle cellulaire est essentiellement due à ses associations indépendantes avec deux membres de la famille ING, formant ainsi deux complexes fonctionnellement distincts. En effet, la purification directe de HBO1 a montré son association additionnelle avec ING5 (Figure 1C). Ce complexe partage les trois autres sous-unités déjà identifiées dans le complexe HBO1-ING4 mais est physiquement distinct de ce dernier. Des études d'interférence par l'ARN ont démontré que HBO1-ING4 est important pour le passage à travers la phase G2/M ; pour sa part, HBO1-ING5 est essentiel pour la progression de la phase S [9]. La mesure de la synthèse d'ADN par marquage *in vivo* a confirmé l'intervention de HBO1, strictement dépendante d'ING5, dans la réplication et, plus précisément, dans la progression de la fourche répliquative. La présence des hélicases MCM dans la purification de ING5, mais non de ING4 soutient cette hypothèse [9].

Finalement, l'effet plus sévère de la déplétion d'ING5 sur la synthèse d'ADN par rapport à celui observé avec HBO1 s'explique par la présence d'un autre complexe HAT contenant ING5 (Figure 1D). En effet, ING5 se trouve dans deux complexes distincts, l'un ciblant l'histone H4 par HBO1 et l'autre ciblant

H3 par MOZ/MORF, deux membres très similaires de la famille MYST [9, 12]. Il semble donc que les complexes HBO1-ING5 et MOZ/MORF-ING5 agissent de concert afin de permettre la réplication de l'ADN chez l'homme.

Conclusions

Nous avons caractérisé les interactions moléculaires stables de chacun des suppresseurs de tumeurs de la famille ING, ce qui a fourni des perspectives mécanistiques sur leur fonction dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ces cinq protéines constituent chacune une composante clé de complexes multiprotéiques HAT ou HDAC spécifiques. Elles sont également des régulateurs critiques de l'activité de ces complexes sur la chromatine et sont au cœur de la régulation des niveaux d'acétylation des histones *in vivo*. Par cette étude, nous avons pu identifier l'activité en charge de la majorité de l'acétylation de l'histone H4 chez l'humain. Nous avons démontré pour la première fois le rôle essentiel de complexes HAT dans la réplication de l'ADN durant toute la durée de la phase S, supposément à la fourche répliquative. Dans l'ensemble, les complexes ING identifiés attestent l'importance cruciale de ces suppresseurs de tumeurs dans l'expression et le maintien du génome, c'est-à-dire durant la transcription, la réparation, la recombinaison et la réplication de l'ADN. Ces fonctions enrôlent chaque complexe ING et leurs composants dans différentes formes de cancer, dans la naissance et la croissance de tumeurs ou la formation de métastases, renforçant ainsi l'idée qu'existe un lien incontournable entre la régulation épigénétique et le cancer. ♦

Mystification and cleverness of tumor suppressors in nuclear functions

RÉFÉRENCES

1. Lacoste N, Côté J. The epigenetic code of histones. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 955-9.
2. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2315-35.



GLOSSAIRE

HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histone désacétylase
ING : inhibitor of growth
Yng : yeast homolog of mammalian ING1
MYST : MOZ-Ybf2/Sas3-Sas2-Tip60
(h)NuA4 : (human) nucleosome acetyltransferase of histone H4
NuA3 : nucleosome acetyltransferase of histone H3
Tip60 : Tat-interacting protein 60 kDa
HB01 : histone acetyltransferase binding to ORC1
MOZ : monocytic leukemia zinc finger protein
MORF : monocytic leukemia zinc finger protein-related
MCM : minichromosome maintenance
(m)Sin3 : (mammalian) SWI-independent-3
Rpd3(L) : reduced potassium dependency-3 (large)
RBP1 : retinoblastoma binding protein-1
BRMS1 : breast cancer metastasis suppressor-1
JADE : gene for apoptosis and differentiation in epithelia
BRPF : bromodomain and PHD finger-containing protein
Sas3 : something about silencing-3
Pho23 : phosphate-23
ORC : origin of replication complex

3. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005; 4 : 1377-81.
4. Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 : 2597-613.
5. Howe L, Kusch T, Muster N, et al. Yng1p modulates the activity of Sas3p as a component of the yeast NuA3 histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* 2002; 22 : 5047-53.
6. Nourani A, Doyon Y, Utley RT, et al. Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol Cell Biol* 2001; 21 : 7629-40.
7. Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H, et al. Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 2002; 22 : 835-48.
8. Doyon Y, Selleck W, Lane WS, et al. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 2004; 24 : 1884-96.
9. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 2006; 21 : 51-64.
10. Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem* 2004; 279 : 1562-9.
11. Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* 2004; 428 : 328-32.
12. Utley RT, Côté J. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 274 : 203-36.
13. Zhou MI, Foy RL, Chitalia VC, et al. Jade-1, a candidate renal tumour suppressor that promotes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 : 11035-40.

NOUVELLE

Paludisme : une nouvelle vie pour *Plasmodium*

Robert Ménard

Unité de Biologie et Génétique du Paludisme, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
rmenard@pasteur.fr

> Le paludisme, maladie causée par des parasites du genre *Plasmodium*, tue plus d'un million de personnes par an dans le monde (→). Les symptômes et les complications de cette maladie sont la conséquence de la multiplication du parasite dans les érythrocytes de l'hôte. L'infection commence par une phase dite pré-érythrocytaire, pendant laquelle le parasite inoculé dans le derme par le moustique vecteur doit rejoindre le foie, où il se multiplie et se transforme dans la forme parasitaire qui infecte les érythrocytes (Figure 1).

(→) m/s 2005,
 n° 2, p. 123
 n° 3, p. 243
 n° 5, p. 463
 n° 8-9, p. 700

La phase pré-érythrocytaire du cycle de vie de *Plasmodium*, découverte en 1948 [1], soit 68 ans après la découverte de la forme érythrocytaire du parasite par Alphonse Laveran, reste encore mal connue [2]. Seuls quelques parasites contenus dans les glandes salivaires du moustique, appelés sporozoïtes, sont injectés dans le derme durant une piqûre. Ces parasites sont retrouvés après quelques minutes ou heures dans les hépatocytes, où ils se différencient en quelques jours dans le stade du parasite qui infecte les érythrocytes, mais la voie empruntée par les sporozoïtes entre le site d'inoculation et le foie reste incertaine. Cette phase de l'infection est pourtant connue pour

constituer une cible de choix pour la vaccination anti-palustre. On sait en effet depuis la fin des années 1960 que l'injection de sporozoïtes irradiés, qui envahissent normalement les hépatocytes mais ne s'y développent qu'incomplètement, protège de façon complète et durable contre l'injection ultérieure de sporozoïtes infectieux, dans les modèles rongeurs comme chez le singe et chez l'homme [3, 4]. Une telle stratégie, bien qu'attrayante puisqu'elle vise à prévenir l'infection sanguine génératrice de la pathologie, a longtemps été considérée comme impraticable en vaccination de masse, en particulier en raison de la difficulté de production et de conserva-