

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE GÈNES CIBLES DU  
RÉCEPTEUR ARYL HYDROCARBONE DANS DES CELLULES CANCÉREUSES  
DE LA GLANDE MAMMAIRE

Par

Maud Marques

thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Décembre 2012



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-93226-1*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93226-1*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 21 décembre 2012

*le jury a accepté la thèse de Madame Maud Marques  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Luc R. Gaudreau  
Directeur de recherche  
Département de biologie

Monsieur Benoît Leblanc  
Membre  
Département de biologie

Monsieur Alain Nepveu  
Membre externe  
Université McGill

Professeur Nicolas Gévry  
Président rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression génique et plus particulièrement au rôle de la chromatine dans cette régulation. En effet, chez les eucaryotes l'ADN est compactée autour de protéines appelées histones créant ainsi des nucléosomes lesquels forment une structure plus complexe, la chromatine. Cette dernière est une barrière aux processus cellulaires touchant l'ADN dont la transcription. La compréhension de la régulation de la structure de la chromatine est essentielle pour saisir les variations de l'expression génique.

Mon projet de doctorat a porté sur l'étude de la régulation des gènes cibles du récepteur aryl hydrocarboné (AhR), *CYP1A1* et *CYP1B1*, et plus particulièrement sur le rôle du variant d'histone H2A.Z dans l'expression de ces gènes. AhR est un senseur moléculaire auquel va se lier de nombreux polluants appartenant principalement à ces deux grandes familles : les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH). En réponse à la liaison de ces polluants, AhR va induire l'expression de ses gènes cibles. *CYP1A1* et *CYP1B1* sont impliquées dans le métabolisme de l'estradiol (E2) en 2-hydroxyestradiol et 4-hydroxyestradiol respectivement. Il a été proposé qu'une diminution du ratio *CYP1A1/CYP1B1* soit importante pour l'initiation du cancer du sein. Au cours de mon doctorat, j'ai pu mettre en évidence un rôle du variant H2A.Z dans la régulation de l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1*. J'ai aussi pu montrer que le statut de ER $\alpha$  déterminait l'importance de H2A.Z lors de l'induction de *CYP1A1*. De plus, nous avons observé que la déplétion de H2A.Z induit une augmentation de la méthylation de l'ADN au promoteur de *CYP1A1*. En parallèle, nous avons confirmé que ER $\alpha$  réprime spécifiquement l'induction de *CYP1A1* sans affecter celle de *CYP1B1*. Nos résultats montrent qu'en présence de TCDD et d'E2, ER $\alpha$  et DNMT3B sont recrutés au promoteur de *CYP1A1*, ce qui conduit à une augmentation de la méthylation du promoteur de *CYP1A1* et conséquemment à une diminution de son induction.

AhR possède de nombreux ligands d'origine très variée qui peuvent être aussi bien toxiques que bénéfiques. Nous avons choisi de comparer deux de ces ligands : le TCDD et le DIM. Au cours de ces travaux, nous avons montré que le DIM utilisé à forte concentration ( $>50\mu\text{M}$ ) induit les gènes cibles de AhR (*CYP1A1* et *CYP1B1*) mais aussi un arrêt de la croissance et la mort des cellules. A l'opposé, le traitement avec des concentrations plus faible de DIM ( $10\mu\text{M}$ ) induit principalement les gènes cibles de ER $\alpha$  (*TFF1* et *GREB1*) et la prolifération des cellules. Nous avons aussi montré que l'activation de ER $\alpha$  par le DIM est due à l'action de la protéine kinase A (PKA). En effet, l'inhibition de la PKA ainsi que la déplétion de ER $\alpha$  abolissent les effets du DIM sur l'expression de *GREB1* et *CYP1A1* ainsi que sur la prolifération cellulaire.

En conclusion, nous avons dans un premier temps mis en évidence le rôle de deux protéines, DNMT3B et H2A.Z, dans la régulation de *CYP1A1* dans les cellules MCF7. Nous avons ainsi découvert un nouveau corépresseur partenaire de ER $\alpha$  en DNMT3B et nous avons proposé une nouvelle façon pour ER $\alpha$  de promouvoir la carcinogenèse en dérégulant le ratio CYP1A1/CYP1B1. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la concentration de DIM utilisée dans les expériences peut conduire à des résultats diamétralement opposés sur la croissance cellulaire.

Mots-clés : H2A.Z, AhR, TCDD, DIM, ER $\alpha$ , transcription, chromatine et méthylation de l'ADN.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais commencer par remercier Luc Gaudreau, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Il m'a donné la chance de démarrer un nouveau projet et m'a laissé mener ma barque, me permettant de m'épanouir intellectuellement. Je le remercie pour toute la confiance qu'il m'a accordée et son soutien tout au long de ces années. Je le remercie aussi pour m'avoir fait découvrir les plaisirs d'entraîner des chiens de traîneau et m'avoir fait vivre des aventures cocasses. Je voudrais aussi remercier mes conseillers Benoît Leblanc, Viktor Steimle et Nicolas Gévry. Un merci spécial à Benoît pour être capable de préparer de magnifiques figures en un temps record. À tous les membres du laboratoire Gaudreau qui m'ont côtoyée au cours de mes 7 ans de doctorat, merci. Plus particulièrement, Annie, Benoît, Joëlle et Sébastien (les anciens), je vous remercie d'avoir été là à mes débuts dans le laboratoire et au Québec. Vous avez été une source d'inspiration pour moi tout au long de ces années. Un merci spécial à Liette toujours disponible pour les discussions (scientifiques ou pas) et les bons conseils techniques. Un grand merci à JF, côtoyer un autre Français qui aime le vin, c'est bon pour le moral et aussi pour toutes les longues et nombreuses discussions au laboratoire ou dans l'autobus. Merci à lui et à Jennifer pour m'avoir hébergée quand je n'avais plus de chez moi à Sherbrooke. Petite Fanny merci pour ton énergie et tous les bons moments que l'on a passé ensemble. Merci à Patrice pour toutes nos conversations autour d'un café. Et merci à Anahita pour m'avoir obligée à parler anglais et qui m'a ainsi permise de m'améliorer. Un gros merci à Maïka et Stéphanie, les françaises d'à côté, pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble. Pour finir, je voudrais remercier ma famille et Alain, qui m'ont supportée de près ou de loin et qui m'ont donné la force de mener à bien mon doctorat.

# TABLE DES MATIÈRES

|  |             |
|--|-------------|
| <b>SOMMAIRE</b> .....  | <b>i</b>    |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....   | <b>iii</b>  |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....  | <b>iv</b>   |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....  | <b>vii</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....  | <b>viii</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....   | <b>ix</b>   |
| <b>CHAPITRE I</b> .....  | <b>1</b>    |
| <i>Introduction générale</i> .....   | <b>1</b>    |
| <b>1 Le récepteur aryl hydrocarbone (AhR)</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Mécanisme d'activation</b> .....  | <b>2</b>    |
| <b>1.2 Ligands</b> .....   | <b>4</b>    |
| 1.2.1 Les ligands synthétiques .....   | <b>5</b>    |
| 1.2.2 Les ligands naturels.....  | <b>6</b>    |
| <b>1.3 Gènes cibles de AhR</b> .....   | <b>7</b>    |
| <b>1.4 Autres fonctions biologiques de AhR</b> .....   | <b>8</b>    |
| <b>1.5 Interaction croisée entre AhR et ER<math>\alpha</math></b> .....                            | <b>9</b>    |
| 1.5.1 ER $\alpha$ .....  | <b>9</b>    |
| 1.5.1.1 Généralités.....   | <b>9</b>    |
| 1.5.1.2 ER $\alpha$ et le cancer du sein.....  | <b>11</b>   |
| 1.5.2 Interaction entre les voies de signalisation de AhR et de ER $\alpha$ .....                  | <b>12</b>   |
| <b>2 La transcription génique</b> .....  | <b>14</b>   |
| <b>2.1 Structure d'un gène codant pour une protéine</b> .....                                      | <b>15</b>   |
| <b>2.2 La machinerie transcriptionnelle</b> .....  | <b>16</b>   |
| 2.2.1 L'ARN pol II .....   | <b>16</b>   |
| 2.2.2 Les facteurs généraux de transcription .....   | <b>18</b>   |
| 2.2.3 Le Médiateur .....   | <b>19</b>   |
| <b>2.3 Les activateurs et répresseurs transcriptionnels</b> .....                                  | <b>20</b>   |
| <b>2.4 Les coactivateurs et les corépresseurs de transcription</b> .....                           | <b>21</b>   |
| <b>3 La chromatine</b> .....   | <b>22</b>   |
| <b>3.1 Modifications post-traductionnelles des histones</b> .....                                  | <b>24</b>   |
| 3.1.1 Acétylation des histones.....  | <b>25</b>   |
| 3.1.2 Méthylation des histones .....   | <b>26</b>   |
| 3.1.3 Phosphorylation des histones.....  | <b>27</b>   |
| 3.1.4 Ubiquitination des histones .....  | <b>28</b>   |
| 3.1.5 Distribution des modifications post-traductionnelles des histones à l'échelle du génome..... | <b>28</b>   |
| <b>3.2 Complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP</b> .....                       | <b>30</b>   |
| <b>3.3 Les variants d'histone</b> .....  | <b>32</b>   |
| 3.3.1 Le variant d'histone H2A.Z .....   | <b>34</b>   |
| <b>4 La méthylation de l'ADN</b> .....   | <b>38</b>   |
| <b>4.1 Généralités</b> .....   | <b>38</b>   |

|  |  |     |
|--|--|-----|
| 4.2  | Les ADN méthyltransférases .....   | 40  |
| 4.3  | Rôle de la méthylation de l'ADN .....  | 40  |
| 4.4  | Méthylation de l'ADN et cancer .....   | 42  |
| 4.5  | Déméthylation de l'ADN .....   | 44  |
| 5  | Hypothèses et objectifs généraux de la thèse .....   | 45  |
| CHAPITRE II .....  |  | 47  |
| <i>Le variant d'histone H2A.Z est important pour la régulation de CYP1A1, un gène cible de AhR dans des lignées de cancer du sein exprimant ER<math>\alpha</math>.</i> ..... |  | 47  |
| <b>Variant Histone H2A.Z Can Selectively Mediate Dioxin Receptor Gene Expression by Antagonizing Estrogen Signaling</b> .....  |  | 48  |
| Abstract .....   |  | 49  |
| CHAPITRE III .....   |  | 86  |
| <i>Le niveau protéique de DNMT3B varie selon les lignées cellulaires et est régulé par Tip60.</i> .....  |  | 86  |
| 1  | Préambule .....  | 86  |
| 2  | Matériels et méthodes .....  | 87  |
| 2.1  | Lignées cellulaires et conditions de cultures .....  | 87  |
| 2.2  | Constructions et transfection .....  | 88  |
| 2.3  | Immunoprécipitation et immunobuvardage de type Western .....   | 88  |
| 2.4  | Essai d'ubiquitination .....   | 89  |
| 2.5  | Transcription inverse et PCR en temps réel .....   | 89  |
| 3  | Résultats .....  | 90  |
| 3.1  | La quantité de DNMT3B est corrélée avec l'intensité de la répression de CYP1A1 par ER $\alpha$ ..... | 90  |
| 3.2  | DNMT3B interagit avec Tip60 et p400 .....  | 91  |
| 3.3  | La surexpression de Tip60 augmente les niveaux de DNMT3B acétylés .....                              | 92  |
| 3.4  | La surexpression de Tip60 augmente le niveau de DNMT3B ubiquitiné et sa dégradation .....            | 93  |
| 4  | Conclusions .....  | 95  |
| CHAPITRE IV .....  |  | 96  |
| <i>En absence d'oestradiol, le 3,3'-diindolylmethane active ER<math>\alpha</math> et induit la prolifération des cellules MCF7 à faible concentration.</i> .....             |  | 96  |
| CHAPITRE V .....   |  | 122 |
| <i>Conclusion générale</i> .....   |  | 122 |
| 1  | Discussion .....   | 122 |
| 2  | Perspectives .....   | 131 |
| ANNEXE I .....   |  | 134 |
| <b>Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis.</b> .....   |  | 134 |
| ANNEXE 2 .....   |  | 155 |
| <b>The positive and negative sides of histone H2A.Z.</b> .....   |  | 155 |





## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|                     |   |
|---------------------|---|
| A.....              | Adenine                                 |
| ADN.....            | Acide désoxyribonucléique               |
| ARN.....            | Acide ribonucléique                     |
| ARNm.....           | ARN messenger                           |
| C.....              | Cytosine                                |
| ChIP.....           | Chromatin immunoprecipitation           |
| CYP.....            | Cytochrome P450                         |
| EDTA.....           | Acide diaminotétracarboxylique          |
| ER.....             | Estrogen receptor                       |
| G.....              | Guanine                                 |
| GR.....             | Glucocorticoïde receptor                |
| H2A.Z.....          | Histone 2A variant Z                    |
| HAT.....            | Histone acetyl-transferase              |
| HDAC.....           | Histone deacetylase                     |
| Na-DOC.....         | Sodium deoxycholate                     |
| PCR.....            | Polymerase Chain Reaction               |
| PMSF.....           | Fluorure de phenylméthanesulfonyle      |
| PPAR $\gamma$ ..... | Peroxisome proliferator-activated gamma |
| SDS.....            | Sodium dodecyl sulfate                  |
| T.....              | Thymidine                               |
| VDR.....            | Vitamine D receptor                     |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Les différentes ARN polymérase eucaryote.....  | 15 |
| 1.2 Les facteurs généraux de transcription (GTF) et leurs fonctions.....                                   | 18 |
| 1.3 Principaux variants de H2A et H3 et leurs fonctions.....   | 32 |
| 1.4 Présence des différents variants d'épissage de DNMT3B dans des lignées cellulaires<br>cancéreuses..... | 44 |
| S2.1 ShRNA targeting sequences.....  | 80 |
| S2.2 Primers used for RT-qPCR.....   | 80 |
| S2.3 Antibodies used for CHIP experiments.....   | 80 |
| S2.4 Primers used for qPCR analysis of ChIPs experiments.....  | 81 |
| S2.5 Antibodies used for Western blot experiments.....   | 81 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Schéma illustrant les différents domaines fonctionnels de AhR.....   | 3  |
| 1.2 Schéma représentant la voie de signalisation de AhR.....   | 4  |
| 1.3 Schéma des domaines fonctionnels de ER $\alpha$ ainsi que les sites de phosphorylation et les enzymes responsables de ces phosphorylations.....                                      | 10 |
| 1.4 Schéma représentant la structure modulaire du Médiateur et les différents facteurs avec lesquels il peut interagir.....  | 20 |
| 1.5 Schéma illustrant les différents niveaux de compaction de la chromatine.....   | 23 |
| 1.6 Schéma représentant les modifications post-traductionnelles sur les histones canoniques.....   | 24 |
| 1.7 Schéma représentant la distribution des différentes modifications post-traductionnelles des histones sur le promoteur distal et proximal ainsi que le corps d'un gène transcrit..... | 29 |
| 1.8 Mécanisme de régulation du locus Igf2-H19 soumis à l'empreinte génomique parentale.....  | 41 |
| 1.9 Différents variants d'épissage de DNMT3B.....  | 43 |
| 2.1 ER $\alpha$ specifically represses <i>CYP1A1</i> expression in MCF7 cells.....   | 53 |
| 2.2 H2A.Z depletion impairs AhR-mediated activation in ER $\alpha$ positive cell lines.....  | 55 |
| 2.3 AhR binding at the <i>CYP1A1</i> promoter is impaired in H2A.Z-depleted cells OR in the presence of E2.....  | 58 |
| 2.4 Inhibition of DNA methylation restores full induction of <i>CYP1A1</i> and AhR binding at the <i>CYP1A1</i> promoter in presence of E2.....  | 60 |
| 2.5 ER $\alpha$ cannot repress <i>CYP1A1</i> induction in DNMT3B-depleted cells.....   | 62 |
| 2.6 ER $\alpha$ induces DNA methylation at the XRE-3 of the <i>CYP1A1</i> promoter.....  | 64 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.7 H2A.Z depletion promotes DNA methylation at the <i>CYP1A1</i> promoter.....   | 66  |
| 2.8 Proposed model for <i>CYP1A1</i> gene regulation by AhR and ER $\alpha$ .....   | 68  |
| 2.S1 Degradation of ER $\alpha$ abolishes the repression of <i>CYP1A1</i> expression and the decrease in AhR binding at the <i>CYP1A1</i> promoter in presence of E2..... | 75  |
| 2.S2 AhR binding at the <i>CYP1B1</i> promoter is not affected in H2A.Z-depleted cells OR in the presence of E2.....  | 76  |
| 2.S3 Verification of DNMT's knockdown efficiencies.....   | 77  |
| 2.S4 DNMT3B can directly interact with ER $\alpha$ .....  | 78  |
| 2.S5 Levels of DNA methylation in different <i>CYP1A1</i> promoter regions.....   | 79  |
| 3.1 Le niveau protéique de DNMT3B est corrélé avec l'intensité de la répression de <i>CYP1A1</i> par ER $\alpha$ .....  | 91  |
| 3.2 DNMT3B coimmunoprécipite avec Tip60 et p400.....  | 92  |
| 3.3 La surexpression de Tip60 augmente le niveau d'acétylation de DNMT3B.....   | 93  |
| 3.4 La surexpression de Tip60 augmente le niveau de DNMT3B ubiquitiné et sa dégradation.....  | 94  |
| 4.1 DIM activates both AhR and ER signaling pathways.....   | 105 |
| 4.2 ER $\alpha$ degradation increases <i>CYP1A1</i> induction in response to DIM.....   | 107 |
| 4.3 Effects of different concentrations of DIM on AhR and ER $\alpha$ target gene expressions....   | 109 |
| 4.4 DIM ligand-independent activation of ER $\alpha$ is mediated by the PKA signaling pathway.....  | 110 |
| 4.5 Low concentration of DIM induces MCF7 proliferation in absence of E2.....   | 112 |
| 5.1 P400 ou SRCAP reste associé avec les nucléosomes contenant H2A.Z pour augmenter sa stabilité.....   | 125 |
| 5.2 Modèle proposé pour expliquer la régulation de l'expression de <i>CYP1A1</i> par ER $\alpha$ en présence de TCDD et E2.....   | 128 |
| A1.1 Proposed model for initiation of breast cancer by pollutants and pesticides.....   | 140 |

|   |     |
|---|-----|
| A1.2 Proposed model for the regulation of the <i>CYP1A1</i> gene by ER $\alpha$ ..... | 146 |
| A2.1 Model of H2A.Z stabilization into chromatin by chaperones.....                   | 162 |
| A2.2 Model for H2A.Z mechanisms of action in transcriptional regulation.....          | 164 |

# CHAPITRE I

## *Introduction générale*

### **1 Le récepteur aryl hydrocarboné (AhR)**

Depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, nous sommes exposés à un grand nombre de composés chimiques produits par une augmentation de l'activité industrielle au niveau mondial. La pollution, conséquence directe de cette activité, est par définition la contamination d'une personne ou d'un lieu par des substances impures. Ces substances peuvent contaminer plusieurs composantes de l'écosystème (tels que l'air, l'eau, le sol et les sédiments) et s'accumuler dans de nombreux organismes vivants dont l'Homme, ce qui va avoir un impact sur sa santé (Risebrough et al., 1968). En effet, plusieurs études rapportent une contribution importante des polluants sur de nombreux problèmes de santé qui touchent les Canadiens tels que les maladies respiratoires (asthme) et cardiovasculaires, les cancers et les problèmes congénitaux. À ces maladies, il faut associer un coût monétaire de \$3,6 à \$9,1 milliards de dollars par année (représentent le prix des médicaments, l'hospitalisation et les congés de maladie) au Canada (Boyd et Genuis, 2008). Parmi les polluants, on retrouve entre autres les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) (Rappe et al., 1979). Les dioxines n'ont pas d'utilité, ce sont des composés non désirés qui sont produits dans certaines conditions. La production des dioxines peut être naturelle : issue des feux de forêts et de l'activité volcanique, ou d'origine humaine : source industrielle (telles que les usines de pâte à papier et les producteurs d'électricité), l'incinération des déchets, les moteurs à

combustion et la fumée de cigarettes. Ces composés chimiques peuvent pénétrer dans nos cellules et affecter diverses fonctions cellulaires soit de façon non spécifique en interagissant avec des macromolécules de la cellule soit de façon plus spécifique en liant des récepteurs cellulaires. Un de ces récepteurs est le récepteur aryl hydrocarbure (AhR), il est considéré comme un des chimio-senseurs que l'on retrouve dans nos cellules.

## 1.1 Mécanisme d'activation

AhR est un facteur de transcription dont l'activité dépend de la liaison d'un ligand (voir section 1.2). Il appartient à la famille de facteurs de transcription « basic hélice-boucle-hélice/Per-Arnt-Sim » (bHLH-PAS) (Hankinson, 1995) (Figure 1.1). Le domaine de liaison à l'ADN (bHLH) et les séquences d'importation et d'exportation nucléaire (NLS, NES) sont situés en N-terminal de la protéine. AhR possède aussi deux domaines PAS (A et B) qui sont impliqués dans la liaison d'un ligand et l'hétérodimérisation avec ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). En région C-terminale, on retrouve le domaine d'activation qui est riche en glutamines. En absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme par un groupe de protéines chaperonnes, Hsp90-XAP2-p23, en un complexe inactif (Kazlauskas et al., 2001). Ces chaperonnes ont plusieurs fonctions : empêcher la dégradation de AhR, le maintenir dans une conformation qui permet la liaison d'un ligand et masquer sa séquence de localisation nucléaire (NLS) en absence de ligand (Cox et Miller, 2004; Ma et Whitlock, 1997; Meyer et al., 1998; Petrusis et al., 2000; Pongratz et al., 1992). Après la liaison d'un ligand, la NLS est exposée et permet à AhR d'être transloqué dans le noyau où, grâce à ses domaines PAS, il va pouvoir interagir avec son partenaire d'hétérodimérisation ARNT. Une fois l'hétérodimère AhR/ARNT formé, il va pouvoir aller activer l'expression de ses gènes cibles en interagissant avec la séquence d'ADN qu'il est capable de reconnaître (Figure 1.2). Cette séquence est appelée *Xenobiotic response element* (XRE) et est caractérisée par le motif suivant : 5'-T/GNGCGTG-3' (en gras souligné est la partie essentielle de la



séquence pour la liaison de AhR/ARNT) (Denison et al., 1988). Les gènes cibles de AhR/ARNT codent principalement pour des enzymes de phase I et II dans le métabolisme des xénobiotiques (voir section 1.3).

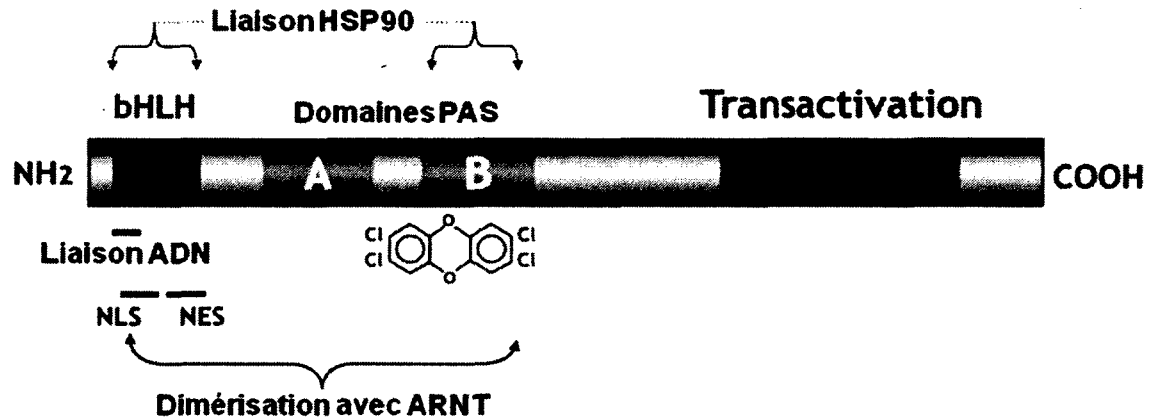


Figure 1.1 : Schéma illustrant les différents domaines fonctionnels de AhR. Adapté de Linden et al 2010 (Linden et al., 2010).

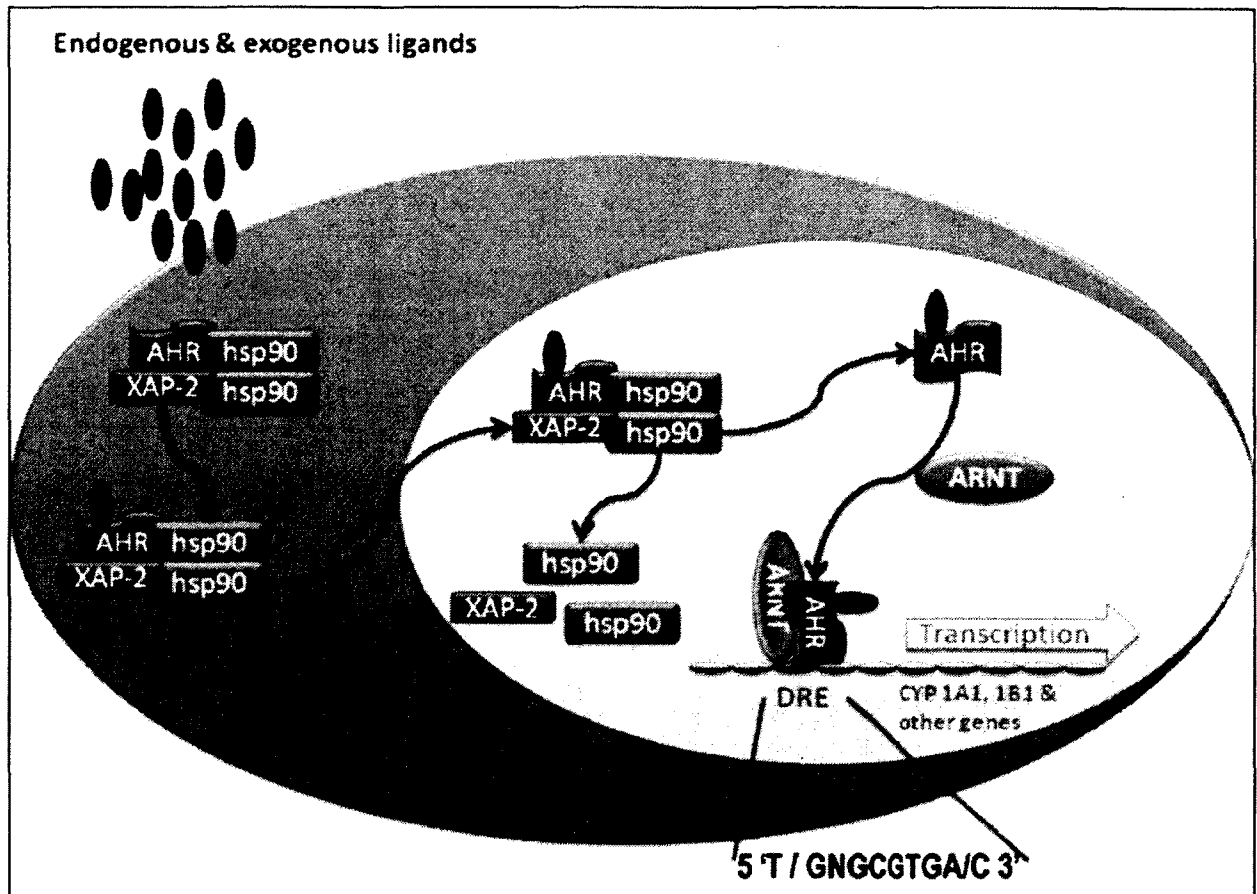


Figure 1.2 : Schéma représentant la voie de signalisation de AhR. Tiré de (Zhang, 2011).

## 1.2 Ligands

Les ligands de AhR peuvent être classés en deux grandes catégories, les ligands synthétiques et les ligands naturels. Les ligands synthétiques sont principalement des contaminants environnementaux tels que les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH). Les ligands naturels pour leur part sont soit des dérivés du tryptophane ou encore des produits de condensation acide de l'indole-3-carbinol (I3C) (Denison et Nagy, 2003). Une des caractéristiques des ligands de AhR est qu'ils sont majoritairement des composés planaires très hydrophobes.

Cette caractéristique conduit à leur bioaccumulation dans le tissu adipeux et rend difficile leur élimination. Une revue de littérature, sur les différentes classes de ligands de AhR et les mécanismes impliqués dans les interactions entre AhR et ER $\alpha$ , est présentée en ANNEXE 1.

### 1.2.1 Les ligands synthétiques

Les ligands synthétiques sont la classe de ligands la plus importante et la plus variée. Les HAHs, incluant les dioxines, les dibenzofuranes et les biphényles, sont métaboliquement très stables et possèdent une très forte affinité pour AhR avec des concentrations de l'ordre du pM au nM. Les PAH incluent le benzopyrène, les benzanthracènes et les benzoflavones. Ils sont métaboliquement plus labiles et se lient à AhR avec un peu moins d'affinité que les HAHs. Dans les HAHs, on retrouve le 2,3,7,8-tétradichloro-p-dioxin (TCDD) qui est considéré comme le plus toxique de sa classe. Il est un ligand qui a une très forte affinité pour AhR (Poland et Knutson, 1982). Plusieurs cas de contaminations avec le TCDD sont tristement connus. L'utilisation d'un herbicide contenant du TCDD (Agent Orange) et massivement épandu au Viêt Nam serait responsable de la naissance de 500 000 enfants avec des défauts congénitaux (Ngo et al., 2006). Un autre ligand de AhR appartenant aux PAHs est le benzopyrène ou B[a]P, un agent mutagène. Les B[a]P sont des produits de combustion incomplète. Ils vont être produits par exemple lors de la cuisson de viandes sur des barbecues et sont retrouvés dans la fumée de cigarette. Il existe plusieurs pesticides qui possèdent une structure très proche des ligands connus de AhR. Un criblage réalisé en 2008 par le groupe du professeur Kojima a montré que certaines classes de pesticides étaient des ligands de AhR. La présence de ces composés dans notre alimentation et dans l'air soulève de nombreuses questions quant aux répercussions physiologiques sur l'Homme soumis à une exposition chronique tout au long de sa vie (Takeuchi et al., 2008).

## 1.2.2 Les ligands naturels

Les ligands naturels de AhR sont principalement retrouvés dans les aliments que nous consommons. De nombreux indoles contenus dans nos aliments vont être convertis dans le système digestif pour former des agonistes plus puissants de AhR (Bjeldanes et al., 1991; Perdew et Babbs, 1991). Le 3,3'-diindolylmethane (DIM) et le indolo [3,2-b] carbazole (ICZ) sont des produits de condensation du indole-3-carbinol (I3C) formés en contact avec l'acide gastrique. Le I3C est retrouvé dans les plantes de la familles des *Brassicacea* telles que le brocoli, les choux de Bruxelles et le chou. Le ICZ est potentiellement le ligand endogène avec la plus forte affinité pour AhR (Gillner et al., 1993; Gillner et al., 1989). Le DIM a été montré comme étant capable d'inhiber spécifiquement la croissance de cellules cancéreuses en culture et de réduire la formation de tumeurs de la glande mammaire chez des rats traités avec du DMBA, un agent carcinogène très puissant (Chen et al., 1998b). De nombreux laboratoires de recherche tentent d'identifier ou de développer des agonistes de AhR qui possèderaient la même capacité d'induction des *CYP1s* et les mêmes propriétés antiprolifératives, sans les effets de toxicité qui peuvent être observés au niveau du foie. Ces molécules sont appelées Selective AhR Modulators (SAhRM). D'autres composés trouvés dans notre alimentation sont connus pour lier AhR tels que les flavonoïdes, les caroténoïdes et le curcumin (Nguyen et Bradfield, 2008; Stejskalova et al., 2011).

Peu de ligands endogènes de AhR ont été identifiés à ce jour. Dans cette catégorie nous retrouvons les indigoïdes, des métabolites de l'acide arachidonique et des dérivés du tryptophane qui sont les mieux caractérisés. À la fin des années 70, un groupe rapporte une augmentation de l'activité monooxygénase, habituellement associée à CYP1A1, après l'exposition de cellules aux UV et nécessitant la présence de tryptophane (Paine, 1976; Paine et Francis, 1980). Plusieurs groupes ont ensuite investigué l'habileté des photo-produits du tryptophane à lier AhR et à activer ses gènes cibles (Helferich et Denison, 1991; Helfrich et al., 1997; Rannug et al., 1987; Wei et al., 2000; Wei et al.,

1999). Dans une étude récente, Opitz et al. (2011) ont montré que le L-kynurenine, un catabolite du tryptophane produit principalement par des cellules cancéreuses, était capable d'activer AhR et d'induire l'expression de certains de ses gènes cibles (Opitz et al., 2011). Dans ce contexte, l'activation de AhR permet aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire et de continuer à proliférer.

### 1.3 Gènes cibles de AhR

Les gènes cibles de AhR les mieux caractérisés sont principalement des enzymes de détoxification de phase I et de phase II (Nebert et Gonzalez, 1987; Nebert et al., 2000). Les enzymes de phase I sont des mono-oxygénases de la famille des cytochromes P450 1 (CYP1) et comptent trois membres : CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1. Les enzymes de phase II sont des enzymes de conjugaison qui ont pour but de transformer une molécule lipophile en un composé polaire pour faciliter son élimination du corps. Celles régulées par AhR sont NQO1, UGT1A1 et la NADPH-quinone-oxydoréductase.

Au cours de mon doctorat, je me suis surtout concentrée sur *CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1*. Brièvement, CYP1A2 est exprimé de façon constitutive dans le foie, cependant il pourra être encore plus induit par l'activation de AhR. Il est responsable du métabolisme de la caféine et de la bio-activation de carcinogènes comme l'aflatoxine B1 (Butler et al., 1989; Langouet et al., 1995). CYP1A1 et CYP1B1 sont majoritairement exprimés dans les tissus extrahépatiques après activation de AhR et sont aussi responsables de la bioactivation de certains polluants environnementaux (Beresford, 1993; Shimada et al., 1996). Les gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* sont localisés sur le chromosome 15 et partagent la même région intergénique. Au moins une dizaine de XREs sont retrouvés dans cette région qui est majoritairement localisée à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS) du gène *CYP1A1*. Le positionnement en tandem

de ces deux gènes est conservé entre l'humain, la souris et le rat. Le gène *CYP1B1* est localisé sur le chromosome 2. On retrouve neuf XREs dans la région du promoteur proximal et aussi deux sites de liaison pour le récepteur ER $\alpha$ . En plus de leurs fonctions de détoxification, CYP1A1 et CYP1B1 sont aussi impliquées dans le métabolisme de certaines hormones stéroïdiennes comme l'œstradiol (E2) (Tsuchiya et al., 2005). L'œstradiol et ses métabolites sont bien connus pour leur rôle dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Cependant, tous les métabolites n'ont pas le même potentiel mutagène et certains possèdent des effets plus délétères que d'autres. CYP1A1 et CYP1B1 vont convertir l'E2 en 2-hydroxyœstradiol (2-OHE2) et en 4-hydroxyœstradiol (4-OHE2) respectivement (Martucci et Fishman, 1993; Tsuchiya et al., 2005). Des cellules normales de la glande mammaire vont principalement convertir l'E2 en 2-OHE2, qui est un des métabolites les moins génotoxiques. Il a été observé que les cellules de cancers du sein produisaient plus de 4-OHE2, un des métabolites les plus génotoxiques, que les cellules normales. Conséquemment à ces observations il a été proposé que le ratio entre 2-OHE2/4-OHE2 puisse avoir un rôle dans la carcinogenèse (Coumoul et al., 2001). L'extension de ce modèle est que le ratio entre les enzymes CYP1A1/CYP1B1 soit lui aussi important dans l'initiation du cancer du sein.

#### **1.4 Autres fonctions biologiques de AhR**

Durant de nombreuses années, l'étude de AhR a principalement concerné son rôle dans le métabolisme de contaminants environnementaux. Cependant, des études plus récentes tentent de comprendre les fonctions endogènes de AhR en absence de molécules xénobiotiques (McMillan et Bradfield, 2007). Une des approches utilisées afin d'identifier ces fonctions a été la génération de souris « knock-out » pour le gène codant pour AhR et d'observer les phénotypes associés à la perte de ce gène. Trois laboratoires indépendants ont généré des souris « knock-out » pour le gène *AhR* : deux des groupes ont enlevé le premier exon (Fernandez-Salguero et al., 1995; Mimura et al., 1997) et le

troisième groupe a enlevé le deuxième exon (Schmidt et al., 1996). Les phénotypes les plus marqués sont une réduction de 25-50% de la taille du foie, la présence de fibrose hépatique, une diminution de l'espérance de vie et, pour les femelles, on observe différents problèmes de reproduction (réduction du nombre de follicules matures, défauts lors de la fertilisation et l'implantation des embryons, réduction du taux de survie des souriceaux due à un défaut dans le développement de la glande mammaire). AhR joue aussi un rôle au niveau du système immunitaire (pour une revue (Esser et al., 2009)). En plus de ses différentes fonctions, AhR interagit avec d'autres facteurs de transcription tels que NF-kappaB (Kim et al., 2000; Tian et al., 1999), Nrf2 (Hayes et al., 2009), Rb/E2F (Puga et al., 2000), Sp1 (Wang et al., 1999), le récepteur aux androgènes (AR) (Ohtake et al., 2007) et les récepteurs aux oestrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) (Beischlag et Perdew, 2005; Matthews et al., 2005; Ohtake et al., 2007; Ohtake et al., 2003; Wormke et al., 2003). Dans le cadre de mon projet de doctorat, l'interaction croisée entre AhR et ER $\alpha$  m'a plus particulièrement intéressée.

## **1.5 Interaction croisée entre AhR et ER $\alpha$**

### **1.5.1 ER $\alpha$**

#### **1.5.1.1 Généralités**

ER $\alpha$  est un facteur de transcription appartenant à la super famille des récepteurs nucléaires (NR). ER $\alpha$  possède un domaine d'activation indépendant du ligand A/B (AF1) situé en région N-terminale et un domaine d'activation dépendant du ligand E/F (AF2) situé en région C-terminale (Tora et al., 1989). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est

constitué de deux doigts de zinc et il est situé juste après la région AF1 (Figure 1.3). ER $\alpha$  peut être activé par la liaison d'un ligand (appelé voie classique) mais aussi par d'autres mécanismes dit non classiques impliquant des voies de signalisation différentes selon le stimulus (Bai et Gust, 2009; Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Thomas et al., 2005).

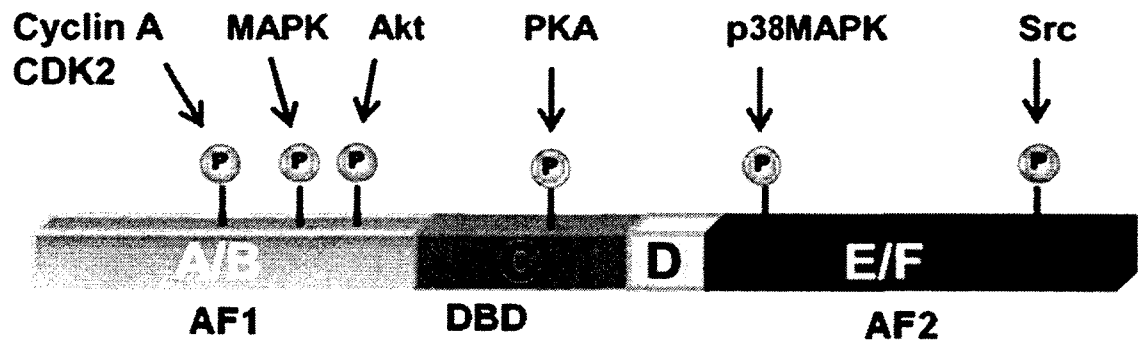


Figure 1.3 : Schéma des domaines fonctionnels de ER $\alpha$  ainsi que les sites de phosphorylation et les enzymes responsables de ces phosphorylations. Adapté de Roman-Blas et al 2009.

Dans la voie classique, en absence de ligand, ER $\alpha$  interagit avec la protéine chaperonne HSP90 et est séquestré dans le cytoplasme. Après la liaison de son ligand qui est principalement l'E2, ER $\alpha$  va être transloqué dans le noyau. Il va se dimériser et lier sa séquence génique cible appelée ERE (*Estrogen response element*) possédant le motif consensus suivant : AGGTCAnnnTGACCT (Cowley et al., 1997; Klinge, 2001). La voie non classique utilise une portion de ER $\alpha$  qui est associée à la membrane et est activée par des signaux extracellulaires (Thomas et al., 2005). L'activation de ces voies conduit à la phosphorylation de ER $\alpha$  qui peut avoir lieu sur plusieurs résidus et qui s'effectue par différentes protéines kinases telles que MAPK, Akt, PKA, p38MAPK et Src (Aronica et al., 1994; Bunone et al., 1996; Chen et al., 1999; Kato et al., 1995). La phosphorylation de ER $\alpha$ , surtout dans son domaine AF1, influence son interaction avec des coactivateurs et augmente son activité transcriptionnelle (Endoh et al., 1999; Lavinsky et al., 1998; Tremblay et al., 1999). ER $\alpha$  régule positivement des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la production de facteurs de croissance. ER $\alpha$  peut aussi agir comme



un répresseur transcriptionnel et interagir avec des corépresseurs tels que N-CoR (*nuclear receptor corepressor*), SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*) et HDAC1, 2 et 7 (Chen et Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Laherty et al., 1998; Malik et al., 2010).

### 1.5.1.2 ER $\alpha$ et le cancer du sein

Le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquent chez la femme. En effet, une femme sur 8 va être diagnostiquée avec un cancer du sein. Depuis de nombreuses années on sait que l'œstrogène et ses différents métabolites jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Une partie des effets carcinogéniques de l'œstrogène est réalisée par ER $\alpha$ . Dans des tissus normaux de la glande mammaire, seules 15% des cellules épithéliales expriment ER $\alpha$  (Shoker et al., 1999). À l'inverse, dans 70% des cancers du sein, ER $\alpha$  est surexprimé. Pour cette raison, le statut de ER $\alpha$  dans les cancers du sein est utilisé pour déterminer le type de thérapies. Les patientes avec des cancers du sein exprimant ER $\alpha$  vont se voir administrer des thérapies hormonales qui utilisent des modulateurs sélectifs du récepteur à l'œstrogène (SERM) comme le Tamoxifen et le Raloxifen. Malheureusement, certains de ces SERMs sont aussi des agonistes de ER $\alpha$  dans des tissus autres que ceux de la glande mammaire (Grilli, 2006). De plus en plus de cas de cancers résistants à ce type de thérapies apparaissent et des traitements alternatifs doivent être utilisés. D'autres molécules appelées anti-œstrogène pure, telle que le ICI 182780, possèdent uniquement une activité antagoniste de ER $\alpha$ . Dans le cas du ICI 182780, celui-ci augmente la dégradation de la protéine ER $\alpha$  dans les cellules conduisant à une perte quasi totale de ER $\alpha$  dans les cellules traitées avec du ICI 182780 après 6 heures (Jensen et al., 1999).

## 1.5.2 Interaction entre les voies de signalisation de AhR et de ER $\alpha$

En 1978, Kociba et collaborateurs ont montré que des rates Sprague-Dawley traitées pendant deux ans de façon chronique avec du TCDD développaient moins de tumeurs spontanées de la glande mammaire en vieillissant (Kociba et al., 1978). Dix ans plus tard, d'autres études ont montré que la prolifération de cellules de cancer du sein est inhibée par le TCDD uniquement si ces cellules expriment ER $\alpha$  (Gierthy et al., 1987). De nombreux laboratoires ont tenté d'identifier les mécanismes par lesquels AhR réprime la voie de signalisation de ER $\alpha$ . De ces études, trois mécanismes principaux ressortent. Premièrement, AhR et ER $\alpha$  partagent de nombreux facteurs de transcription et coactivateurs pour induire l'expression de leurs gènes cible respectifs. En cas d'activation simultanée des deux voies de signalisation, AhR et ER $\alpha$  vont se concurrencer pour le recrutement de ces facteurs (Kobayashi et al., 1997; Kumar et Perdew, 1999; Kumar et al., 1999; Nguyen et al., 1999). Deuxièmement, AhR est capable de réprimer directement l'expression de certains gènes cible de ER $\alpha$  en se liant dans leur région promotrice. Le premier exemple de ce mécanisme a été découvert au promoteur du gène *cathepsinD* où la séquence de liaison de AhR a été identifiée (Krishnan et al., 1995; Wang et al., 2001). La présence du XRE inhibiteur (iXRE) est essentielle pour permettre la répression du gène *cathepsinD* par AhR. Plus tard d'autres iXRE fonctionnels ont été identifiés dans les promoteurs des gènes *c-fos*, *hsp27* et *TFF1* (Duan et al., 1999; Gillesby et al., 1997; Porter et al., 2001). Troisièmement, plusieurs équipes ont observé que l'activation de AhR augmentait la dégradation de ER $\alpha$  par la voie ubiquitine-protéasome (Harris et al., 1990; Wormke et al., 2003). De plus, AhR est capable de s'associer à un complexe E3 ubiquitine ligase (Ohtake et al., 2007). Dans le même article, les auteurs montrent, en utilisant un plasmide contenant un site de liaison pour ER $\alpha$  (ERE), ainsi que le gène de la luciférase utilisé comme gène rapporteur, qu'en présence de MG132 (un inhibiteur du protéasome) AhR n'est plus capable de réprimer l'expression de la luciférase. Cependant, la diminution de la quantité globale de ER $\alpha$  dans la cellule en présence d'agoniste de AhR ne se reflète pas sur la quantité de ER $\alpha$  recruté au promoteur de *c-fos* après traitement à l'E2 (le ligand de ER $\alpha$ ). Des études précédentes avaient montré un rôle

important de la voie ubiquitine-protéasome pour l'induction de *TFF1*, un gène cible de ER $\alpha$  (Lonard et al., 2000; Reid et al., 2003), ce qui est en contradiction avec l'absence d'effet du traitement au MG132 sur l'expression du plasmide ERE-luciférase en présence d'E2 seul. Les différences de résultats observés entre la mesure de l'expression directe d'un gène et l'utilisation de plasmide rapporteur contenant seulement un fragment de la région régulatrice d'un gène soulève une inquiétude importante quand à la possibilité d'extrapoler des données obtenues avec les plasmides rapporteurs. Dans notre laboratoire, le traitement de cellules MCF7 (une lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein exprimant ER $\alpha$ ) avec du TCDD seul pendant 24h n'a aucun effet sur les niveaux protéiques de ER $\alpha$ . Par contre, les traitements avec de l'E2 ou avec le DIM (qui active aussi bien AhR que ER $\alpha$ ) diminuent la quantité totale de ER $\alpha$  dans la cellule. L'utilisation du mécanisme de dégradation de ER $\alpha$  par l'activation de AhR semble être spécifique à certains types cellulaires et même à certaines conditions expérimentales précises et ne peut donc expliquer à lui seul les effets inhibiteurs de AhR sur ER $\alpha$ .

Dans le cadre de mon projet de doctorat je me suis intéressée au rôle de ER $\alpha$  dans la régulation des gènes cibles de AhR. Dès le début du projet, j'ai pu observer dans la littérature qu'il y avait de nombreuses contradictions parmi les articles publiés sur l'effet de ER $\alpha$  sur les gènes cibles de AhR. Néanmoins, la majorité des groupes observent une répression de l'induction de *CYP1A1* dans des cellules cotraitées avec TCDD et E2 et peu ou pas d'effet sur le niveau d'expression de *CYP1B1* (Beischlag et Perdew, 2005; Kharat et Saatcioglu, 1996; Kietz et al., 2009). Cependant, quelques groupes ont observé à l'inverse que ER $\alpha$  est un coactivateur de AhR et donc augmente le niveau d'expression de *CYP1A1* en présence des deux ligands (Matthews et al., 2005). Les explications fournies dans la plupart des revues de littérature mettent en cause des différences dans la façon de cultiver les cellules et la source du sérum. A part l'observation des effets sur l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, aucun mécanisme n'avait été investigué. Cependant, Kharat et collègues (1996) avaient proposé dans leur article que ER $\alpha$  pouvait inhiber la liaison de AhR sur l'ADN (Kharat et Saatcioglu, 1996). En 2005, Beischlag et collègues ont montré que AhR et Arnt sont capables d'interagir directement avec ER $\alpha$  *in*

*vitro*. Dans la même étude, ils ont aussi montré que la liaison de ER $\alpha$  au promoteur de *CYP1A1* arrive uniquement en présence de TCDD et E2. D'après ces résultats les auteurs suggèrent qu'il est fort probable que le recrutement de ER $\alpha$  au promoteur de *CYP1A1* est lieu via son interaction avec le complexe AhR-Arnt. L'ensemble de ces résultats a été le point de départ de mon projet de doctorat. Dans le chapitre II, j'ai cherché à identifier par quel(s) mécanisme(s) ER $\alpha$  pouvait réprimer l'expression de *CYP1A1*. Dans le chapitre III, j'ai comparé deux ligands de AhR (TCDD et DIM) et leurs effets sur l'expression des gènes cibles de AhR et de ER $\alpha$ .

Dans les sections suivantes, je décris succinctement les concepts et les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression génique. Les buts de ces sections sont de faire un survol des connaissances permettant de comprendre les articles présentés dans les chapitre II, III et IV et de faciliter la compréhension de la discussion générale dans le chapitre V.

## **2 La transcription génique**

Toutes les cellules somatiques d'un eucaryote possèdent la même information génétique. Cependant chez les métazoaires, on peut dénombrer une centaine de types cellulaires différents, et bien qu'ils contiennent tous les mêmes gènes, chacun a une fonction spécifique. La diversité des types cellulaires s'explique par le contrôle et la régulation de l'expression d'un sous-groupe de gènes précis pour chaque type cellulaire. La transcription de l'information génétique portée par l'ADN est effectuée par une enzyme nommée ARN polymérase (ARN pol). Par contraste avec les bactéries qui ne possèdent qu'une seule ARN pol, les eucaryotes en comptent trois : l'ARN pol I (14 sous-unités), l'ARN pol II (12 sous-unités) et l'ARN pol III (16 sous-unités). Bien qu'elles partagent

des facteurs communs et une structure similaire, elles transcrivent des types de gènes différents (Tableau 1.1). Celle qui nous intéressera plus particulièrement est l'ARN pol II qui est, entre autres, chargée de la transcription de tous les gènes codant pour des protéines.

Tableau 1.1 : Les différentes ARN polymérase eucaryotes.

| Type de polymérase | Gènes transcrits   |
|--------------------|--|
| ARN polymérase I   | Gènes des ARNr 5.8S, 18S et 28S  |
| ARN polymérase II  | Gènes codant pour toutes les protéines, plus les gènes des snoARN et certains gènes des snARN  |
| ARN polymérase III | Gènes des ARNt, gènes des ARNr 5S, certains gènes des snARN et les gènes des autres petits ARN |

## 2.1 Structure d'un gène codant pour une protéine

Un gène codant pour une protéine est composé d'une région régulatrice (promoteur proximal et séquence activatrice) et d'une région codante. La région codante contient l'information qui sera transcrite en ARN messager (ARNm) pour être finalement traduite en protéine. Les séquences traduites sont localisées dans des régions appelées des exons. Chez les eucaryotes supérieurs, d'autres séquences non traduites appelées introns s'intercalent entre les exons. Pour former un ARNm mature, l'ARN prémessager subit plusieurs modifications : ajout d'une coiffe en 5' ainsi d'une queue polyadénylée en 3' et, chez les eucaryotes supérieurs, il y a clivage des introns lors de l'épissage.

Le promoteur proximal est situé en amont de la région codante. La structure de base d'un promoteur comporte un site d'initiation de la transcription (le site +1 ou TSS). Certains gènes (environ 20%) possèdent aussi une boîte TATA, située de 30 à 100 pb en amont du TSS, qui favorise la liaison de TBP (*TATA binding protein*) une protéine appartenant au complexe TFIID (Section 2.2.2). D'autres séquences localisées à proximité du TSS favorisent le recrutement des facteurs généraux de transcription et de l'ARN pol II. En plus de ces éléments de base, d'autres séquences régulatrices plus spécifiques modulent l'expression d'un gène en permettant la liaison soit d'activateurs, soit de répresseurs en réponse à des stimuli environnementaux précis. Ces séquences, appelées amplificateurs (traduction de « *enhancers* »), peuvent être localisées en amont ou en aval du TSS et peuvent avoir des effets à de très longues distances.

## **2.2 La machinerie transcriptionnelle**

### **2.2.1 L'ARN pol II**

L'ARN pol II est composée de 12 sous-unités nommées Rpb1 à Rpb12. Le cœur catalytique est formé par les sous-unités Rpb1 et Rpb2 et localisé à la base d'une profonde fente formée par d'autres sous-unités de l'ARN pol II dans laquelle passe l'ADN à transcrire. Les autres sous-unités constituant l'ARN pol II ont pour rôle de stabiliser l'interaction entre Rpb1 et Rpb2 ainsi que l'interaction entre ces deux sous-unités et l'ADN. La sous-unité Rpb1 possède un domaine carboxy-terminal unique (CTD), consistant en la répétition en tandem d'un heptapeptide dont la séquence consensus est [Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser]. Cette séquence est très conservée chez tous les eucaryotes, bien que le nombre de répétition varie d'une espèce à l'autre (par exemple, 26 dans *S. cerevisiae* et 52 chez l'humain) (Dahmus, 1996). L'ARN pol II est généralement présente sous deux formes selon le niveau de phosphorylation de son CTD.

Une forme hypophosphorylée (RNAP IIA) qui s'assemble au complexe de préinitiation de la transcription au promoteur et une forme hyperphosphorylée (RNAP IIO) qui est associée à des complexes d'élongation et aux régions codantes des gènes (Lu et al., 1991). La phosphorylation du CTD a principalement lieu aux sérines 2 et 5, et selon le résidu phosphorylé, la fonction est différente. Le patron de phosphorylation du CTD change au cours du cycle transcriptionnel. La phosphorylation de la sérine 5 a lieu dans les régions 5' des gènes et conduit au recrutement des enzymes impliquées dans la réaction de coiffage de l'extrémité 5' de l'ARNm néosynthétisé (Cho et al., 1997; Ho et al., 1998; Komarnitsky et al., 2000). La phosphorylation de la sérine 2 prédomine dans des régions distales du promoteur et participe à la liaison de complexes impliqués dans la maturation de la partie 3' de l'ARNm pendant l'élongation (Cho et al., 2001; Komarnitsky et al., 2000).

Pendant longtemps nous avons pensé que le recrutement de l'ARN pol II au promoteur était l'étape prédominante dans la régulation de la transcription. Des études à l'échelle génomique réalisées chez la drosophile (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007), des cellules de souris et des cellules humaines ont permis de mettre en évidence que l'ARN pol II était associée aux promoteurs de nombreux gènes en absence de transcription productive (Bernstein et al., 2006; Guenther et al., 2007; Lee et al., 2006). Principalement, deux facteurs : DSIF (*DRB sensitivity-inducing factor*) et NELF (*negative elongation factor*) sont importants pour maintenir l'ARN pol II en pause. Pour permettre à l'ARN pol II la poursuite de la transcription, d'autres facteurs sont nécessaires tels que TFIIS et P-TEFb (*positive transcription-elongation factor-b complex*). P-TEFb est constitué de Cdk9 et de la cycline T, Cdk9 est la protéine kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN pol II et va aussi phosphoryler NELF et DSIF conduisant à la dissociation de NELF de l'ARN pol II et à la conversion de DSIF en un facteur d'élongation positif.

## 2.2.2 Les facteurs généraux de transcription

*In vitro*, l'ARN pol II est incapable d'initier la transcription à un promoteur sans l'ajout des facteurs généraux de transcription (GTF) : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. Des études ont décortiqué le rôle des GTF *in vitro* et elles ont permis d'identifier un rôle pour chacun des différents facteurs (Buratowski et al., 1989) (ces résultats sont résumés dans le tableau 1.2). De plus, l'identification d'un complexe contenant l'ARN pol II et les GTF TFIIB, TFIIIF et TFIIH (nommé holoenzyme de l'ARN pol II), permet d'affirmer que l'ARN pol II peut exister sous forme d'holoenzyme *in vivo*, néanmoins en faible quantité par rapport à l'ARN pol II seule. Un des rôles majeurs des GTF *in vivo* est de participer à la formation du complexe de pré-initiation (PIC) qui va diriger l'ARN pol II au TSS des gènes à transcrire.

Tableau 1.2 : Les facteurs généraux de transcription (GTF) et leurs fonctions.

| Facteur |      | Nb. de sous-unités | Fonction  |
|---------|------|--------------------|---|
| TFIIA   |      | 2                  | Stabilise la liaison de TFIID avec l'ADN  |
| TFIIB   |      | 1                  | Lie TBP, la polII et l'ADN, participe à la sélection du site d'initiation de la transcription         |
| TFIID   | TBP  | 1                  | Lie la boîte TATA, déforme l'ADN aux promoteurs. Plateforme d'assemblage pour TFIIB, TFIIA et les TAF |
|         | TAFs | 14                 | Lie l'initiateur. Cible de facteurs de régulation.  |
| TFIIE   |      | 2                  | Rôle dans le recrutement de TFIIIF et l'accessibilité du promoteur                                    |
| TFIIIF  |      | 3                  | Rôle dans le positionnement dans l'ADN lors de l'initiation   |
| TFIIH   |      | 10                 | Activité kinase et hélicase. Essentiel pour ouvrir l'ADN au niveau du promoteur.                      |



### 2.2.3 Le Médiateur

Le Médiateur a été identifié à la fois par criblage génétique et par des méthodes biochimiques chez la levure. Le laboratoire de Richard Young a réalisé un criblage génétique pour trouver des suppresseurs de mutants possédant un CTD tronqué et a identifié les protéines Srb (*Supressor of RNA polymerase B*) (Koleske et Young, 1994). En parallèle, le laboratoire de Roger D. Kornberg a identifié un complexe capable d'interagir avec le CTD (Kim et al., 1994) et permettre à la machinerie transcriptionnelle de répondre aux activateurs *in vitro*. Le Médiateur métazoaire est un complexe composé d'environ 30 sous-unités, qu'il est possible de diviser en trois sous-complexes (Figure 1.4)(Malik et Roeder, 2010). La tête est impliquée de façon générale dans l'initiation de la transcription et peut interagir avec le CTD de l'ARN pol II. Le corps interagit avec le CTD et le facteur TFIIE. De plus, Med1 est responsable des interactions avec de nombreux récepteurs nucléaires tels que VDR, PPAR $\gamma$ , ER et GR (Ge et al., 2008; Ge et al., 2002; Hittelman et al., 1999; Kang et al., 2002; Rachez et al., 1999). La queue est quant à elle principalement impliquée dans la reconnaissance et la liaison avec les activateurs. Les sous-unités Med12, Med13, Cdk8 et CycC forment un quatrième sous-complexe du Médiateur possédant une activité kinase. Cdk8 et CycC peuvent phosphoryler la sérine 5 de l'heptapeptide répété qui compose le CTD. Ce sous-module aurait un rôle dans la répression de la transcription (Akoulitchev et al., 2000; Hengartner et al., 1998). La composition des sous-unités du Médiateur détermine sa fonction positive ou négative en transcription. Récemment, une étude a montré que le Médiateur participait à la formation de boucles d'ADN entre les amplificateurs et les TSS de certains gènes, en collaboration avec le complexe cohésine et plus particulièrement NIPB1, une protéine impliquée dans la localisation de ce dernier (Kagey et al., 2010).

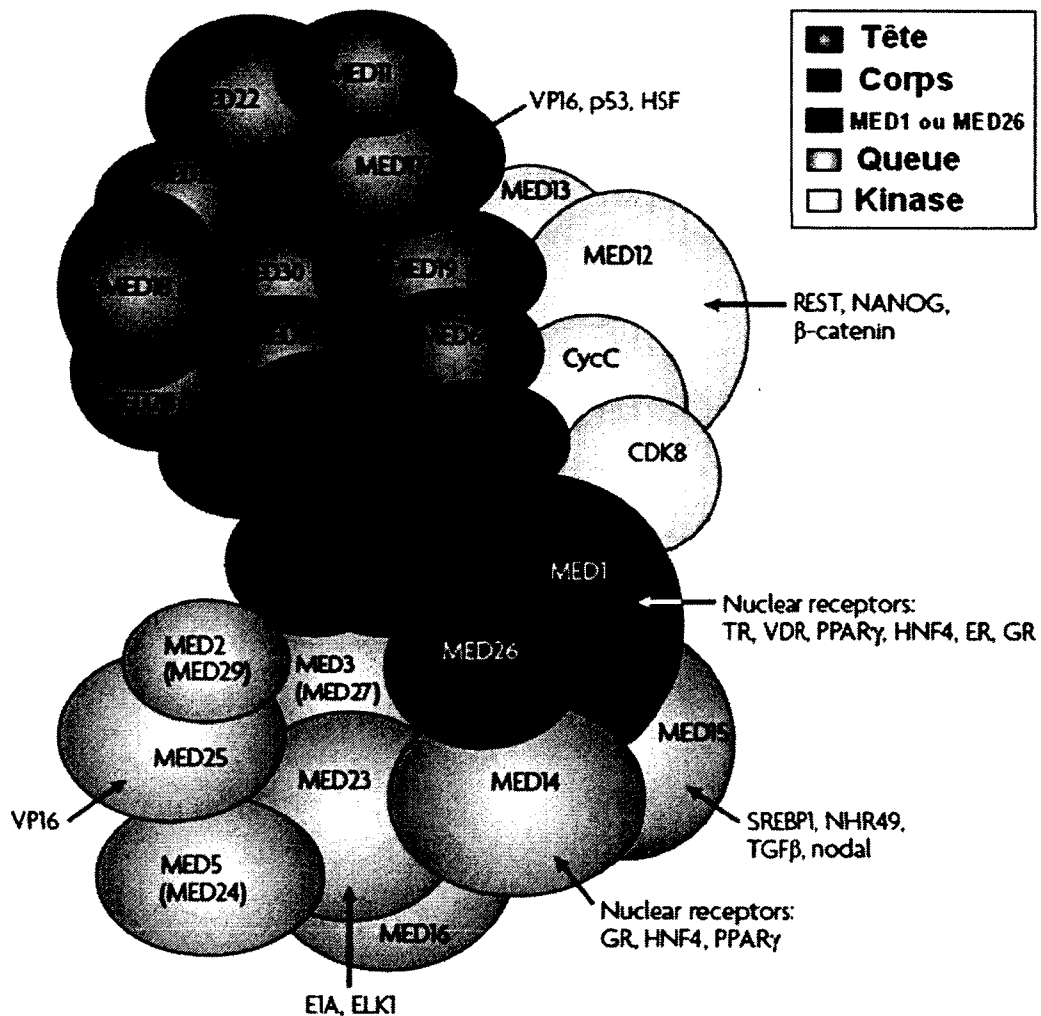


Figure 1.4 : Schéma représentant la structure modulaire du Médiateur et les différents facteurs avec lesquels il peut interagir. Adapté de Malik and Roeder 2010.

### 2.3 Les activateurs et répresseurs transcriptionnels

La machinerie transcriptionnelle et les facteurs généraux de transcription permettent l'obtention d'un niveau de transcription basal *in vitro*. Dans les régions promotrices et les amplificateurs, des séquences d'ADN spécifiques permettent la liaison d'activateurs qui augmentent le niveau basal de transcription des gènes. D'autres séquences sont la cible de

répresseurs qui bloquent quant à eux la transcription. Les activateurs classiques possèdent au moins deux domaines fonctionnels : l'un de liaison à l'ADN et l'autre, d'activation. Le domaine de liaison à l'ADN permet à chaque activateur de reconnaître une séquence d'ADN spécifique et il en existe plusieurs types tels que bHLH, doigts de zinc et « leucine zipper ». Il existe aussi plusieurs types de domaine d'activation dont les principaux sont les domaines acides, riches en glutamines et riches en prolines. La liaison d'un activateur au promoteur ou aux amplificateurs d'un gène cible facilite le recrutement de la machinerie transcriptionnelle ainsi que de coactivateurs (comme des complexes de remodelage de la chromatine abordés dans la Section 3) grâce à son domaine d'activation. Les activateurs transcriptionnels peuvent se transformer en répresseurs selon les conditions et permettre le recrutement de corépresseurs à la place de coactivateurs par des mécanismes similaires.

## **2.4 Les coactivateurs et les corépresseurs de transcription**

D'autres protéines et complexes protéiques peuvent moduler l'expression des gènes, ce sont les coactivateurs et les corépresseurs. Ces complexes vont avoir pour rôle de modifier l'accessibilité de l'ADN soit positivement pour les coactivateurs soit négativement pour les corépresseurs aux facteurs de transcription. Pour cette raison, la plupart des ces complexes sont impliqués dans le remodelage de la chromatine que ce soit en modifiant post-traductionnellement les histones (voir Section 3.1) ou soit en déplaçant les nucléosomes le long de la double hélice d'ADN (Section 3.2). Par exemple, l'histone acétyltransférase p300 est un coactivateur majeur et est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes chez l'humain.

### 3 La chromatine

Dans les cellules eucaryotes, le génome s'organise en une structure nucléoprotéique appelée chromatine, qui représente une barrière à plusieurs mécanismes cellulaires impliquant l'ADN tels que la réplication, la recombinaison, la réparation et la transcription. L'unité élémentaire de la chromatine est le nucléosome. Celui-ci est composé d'un octamère protéique d'histones formé de deux copies de chacune des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel est enroulé ~147 pb d'ADN (Kornberg et Lorch, 1999). La chromatine peut être plus ou moins condensée selon la région génomique ou la phase du cycle cellulaire. La chromatine peut avoir une structure dite en collier de perles sous sa forme la moins condensée et l'ajout de l'histone H1 permet l'augmentation de la condensation en la fibre de 30nm (Figure 1.5). D'autres étapes de compaction permettent d'atteindre le chromosome mitotique qui correspond à une condensation de l'ADN de 10 000 fois. Certaines régions du génome ont été observées comme restant à un état condensé après la mitose : ce sont des régions hétérochromatiques. À l'inverse, les régions retrouvant un état décondensé sont euchromatiques.

Les histones sont de petites protéines basiques contenant un domaine *histone-fold*, formé de trois hélices  $\alpha$  qui est impliqué dans la dimérisation des histones (Luger et al., 1997). De part et d'autre de ce domaine très conservé s'étendent les extrémités amino- et carboxyterminales qui dépassent de la surface du nucléosome. Ces extrémités sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles que nous verrons plus en détail à la section 3.1. Pour pallier aux effets négatifs de la chromatine lors des mécanismes cellulaires impliquant l'ADN, la cellule a mis au point plusieurs stratégies telles que l'utilisation de complexes capables de modifier post-traductionnellement les queues des histones (section 3.1), des complexes de remodelages de la chromatine dépendant de l'ATP (section 3.2) ou l'incorporation de variants d'histone (Section 3.3).

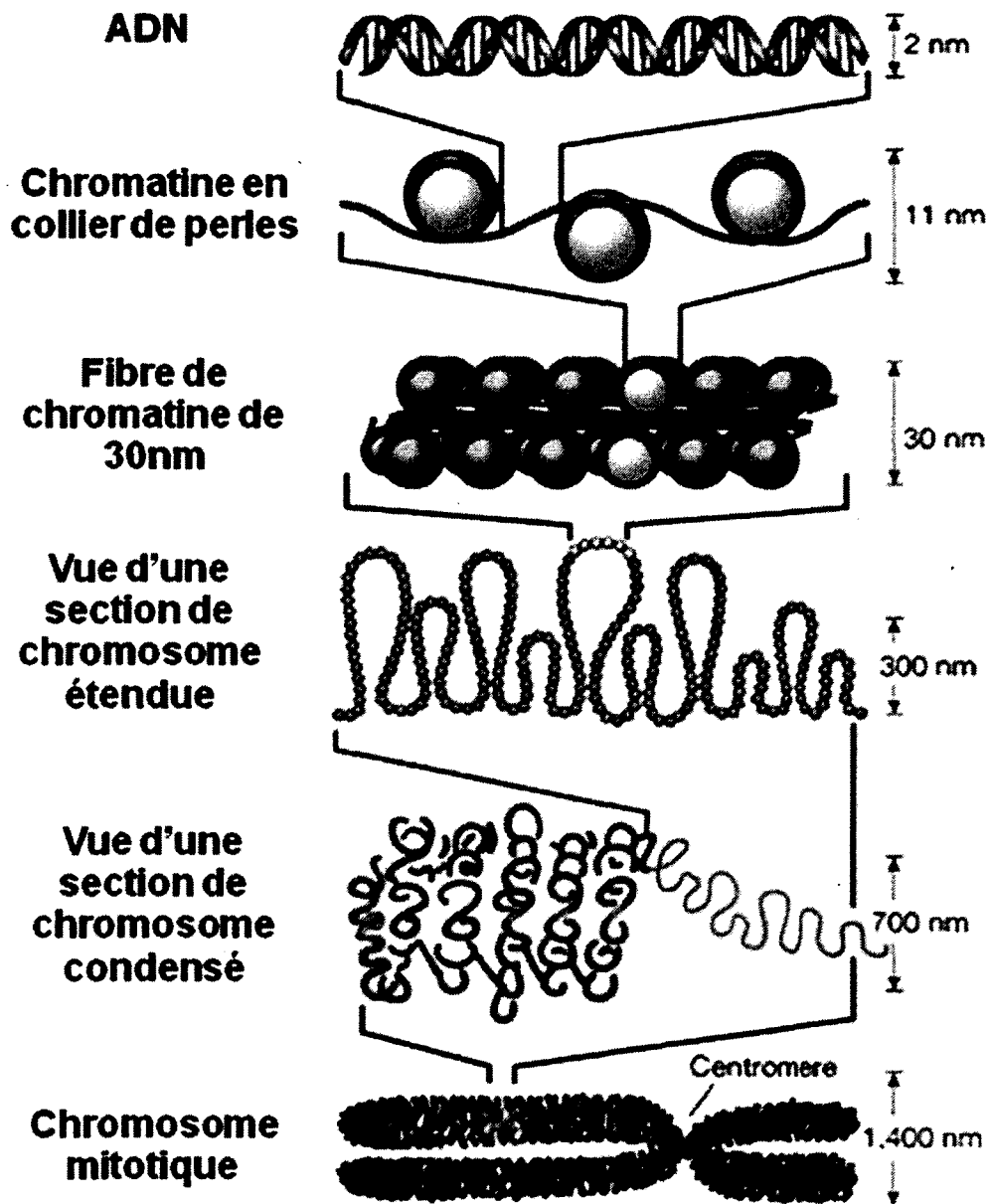


Figure 1.5 : Schéma illustrant les différents niveaux de compactions de la chromatine. Adapté de (Felsenfeld et Groudine, 2003).

### 3.1 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles dont les plus étudiées sont l'acétylation des lysines, la méthylation des lysines et des arginines, la phosphorylation des sérines et l'ubiquitination des lysines. D'autres modifications moins bien caractérisées ont été décrites, telles que la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la glycosylation et la biotinylation. Ces modifications covalentes sont ciblées sur des résidus spécifiques pour chaque histone et sont généralement catalysées par des enzymes spécifiques de manière réversible (Figure 1.6).

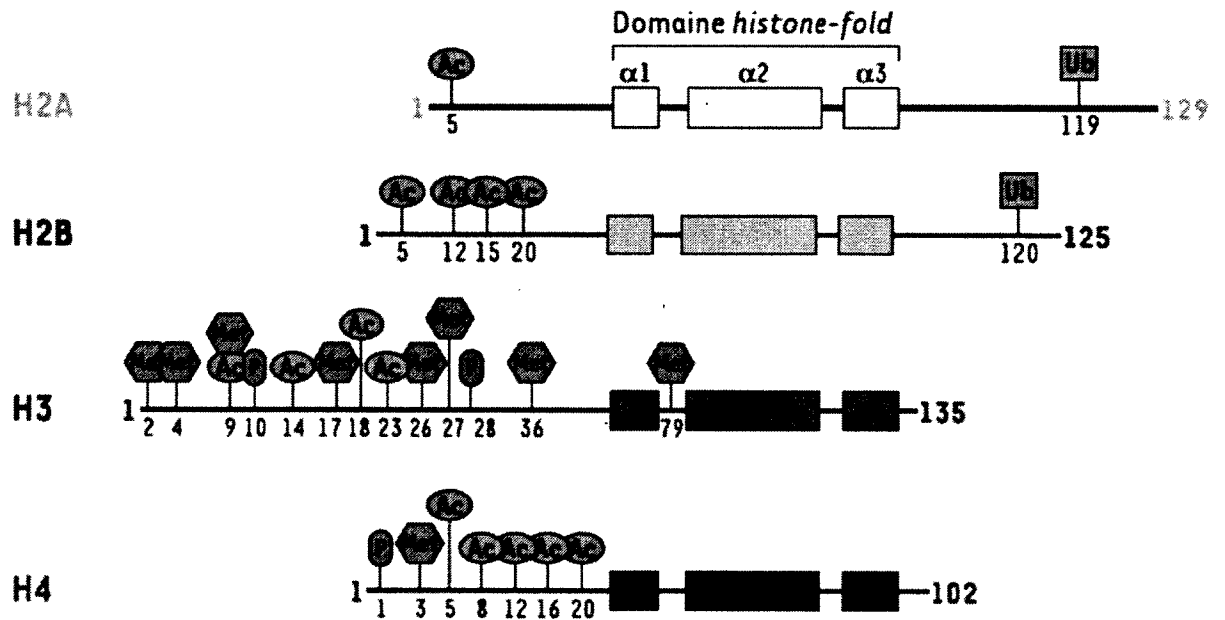


Figure 1.6: Schéma représentant les modifications post-traductionnelles sur les histones canoniques. Adapté de (Ray-Gallet et al., 2005).

### 3.1.1 Acétylation des histones

L'acétylation des queues N-terminales des histones permet d'une part de réduire la charge positive des histones, et ainsi de décondenser la chromatine. D'autre part, l'acétylation permet aussi de recruter des complexes capables de moduler la transcription. En effet, certaines protéines possèdent un domaine appelé bromo-domaine qui reconnaît et lie les histones acétylées. L'acétylation des histones, surtout H3 et H4, est importante pour l'assemblage de la chromatine au cours de la réplication car elle facilite leur incorporation et permet aussi de faire la distinction entre les nouvelles histones et celles conservées (Grunstein, 1997; Wurtele et al., 2009).

Les enzymes responsables de l'acétylation des histones sont les histones acétyltransferases (HAT). Ces protéines sont regroupées en plusieurs groupes selon leurs homologues de séquences et les similarités dans leurs fonctions biologiques (Marmorstein et Roth, 2001). En plus de leur domaine catalytique, les familles de HAT GNAT (Gcn5, hPCAF, yElp3) et CBP/p300 possèdent un bromo-domaine leur permettant d'interagir avec les lysines acétylées, tandis que la famille de HAT MYST (hMOZ, yEsa1, hTip60) possède un chromo-domaine connu pour interagir spécifiquement avec les lysines méthylées. *In vivo*, les HATs sont présentes sous forme de gros complexes multiprotéiques, ce qui leur permet de sélectionner leurs substrats de façon plus spécifique en fonction des sous unités qui les composent. Elles ont été dans un premier temps caractérisées comme des coactivateurs transcriptionnels. Selon le complexe formé, les HATs peuvent interagir avec différents activateurs et certaines sont capable d'acétyler des protéines non histones (Berger, 2002; Du et al., 2010). L'acétylation est une modification réversible : les histones déacétylases (HDAC) sont responsables du clivage des groupements acétyles. Dans les eucaryotes supérieurs, il existe 4 classes de HDAC (I, II, III et IV) et ces enzymes jouent généralement un rôle négatif sur la transcription et sont par conséquent considérées comme des corépresseurs.

### 3.1.2 Méthylation des histones

Les histones H3 et H4 peuvent être mono-, di- ou triméthylées sur les lysines, et seulement mono- et diméthylées sur les arginines (Bedford et Clarke, 2009; Ng et al., 2009). La méthylation permet de moduler l'interaction entre l'ADN et les histones et est reconnue par différents types de domaines protéiques retrouvés dans de nombreuses protéines régulatrices. Ces domaines sont les doigts PHD (*Plant Homeodomain*) et la famille de domaines dite « royale » Tudor qui comprend les chromodomains, les domaines Tudor, PWWP et MBT. La méthylation peut avoir des effets opposés sur la structure de la chromatine et la transcription selon le résidu modifié. Par exemple, la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) permet le recrutement de HP1 (*heterochromatin-associated protein 1*) qui joue un rôle essentiel dans la répression de la transcription en induisant la formation d'hétérochromatine. Ce processus est basé sur la coopération entre des HDACs, des histones méthyl-transférase (HMT) et HP1. La triméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9me3 et H3K27me3) sont des modifications associées à l'inactivation du chromosome X (Xi) chez les mammifères (Heard et al., 2001; Plath et al., 2003). A l'opposé, la méthylation de la lysine 4 de H3 est associée aux promoteurs (H3K4me3 et H3K4me2) et aux amplificateurs (H3K4me2 et H3K4me1). Cette modification est conservée chez la levure et chez l'homme. D'autres modifications, telles la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3), sont associées à des régions transcriptionnellement actives (Hampsey et Reinberg, 2003; Li et al., 2003).

Les enzymes responsables de la méthylation des histones sont les histones méthyltransférases (HMT). Toutes les HMTs possèdent un domaine SET (*su (var) 3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*) qui catalyse la réaction de transfert du groupe méthyl sur les lysines et arginines des histones, excepté Dot1 qui est responsable de la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3. Les HMTs sont relativement spécifiques au résidu modifié et au degré de méthylation produit. Ces dernières années, de nombreuses nouvelles histones



méthyltransferases ont pu être identifiées, et jusqu'à récemment la méthylation des lysines et des arginines était considérée comme une modification irréversible. En 2004, la première lysine déméthylase a été découverte et appelée LSD1 (*Lysine specific demethylase 1*). Cette enzyme, la seule de sa famille à ce jour, est impliquée dans la déméthylation de la mono- et diméthylation des lysine 4 et 9 de l'histone H3 en utilisant comme cofacteur le FAD (Metzger et al., 2005; Shi et al., 2004; Shi et al., 2005). En 2006, une deuxième famille de lysine déméthylase a été identifiée (Tsukada et al., 2006). Cette famille utilise un autre mécanisme de déméthylation qui lui permet de déméthyliser des lysines triméthylées. Leur activité enzymatique est catalysée par le domaine « jumonji ». De même que pour les HMTs, les histones déméthylases sont aussi spécifiques pour le degré de déméthylation et le résidu affecté.

### 3.1.3 Phosphorylation des histones

Bien que toutes les histones puissent être phosphorylées, la phosphorylation des histones H3 et H2A.X a été plus étudiée. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 est associée à la progression du cycle cellulaire et aussi à une transcription active lors de l'interphase chez les mammifères. La phosphorylation du variant H2A.X se produit de manière très localisée aux sites de dommage à l'ADN et est impliqué dans le recrutement de facteurs essentiels pour les mécanismes de réparation. La phosphorylation des histones est effectuée par des protéines kinases et la modification peut être reconnue par des protéines appartenant à la famille 14-3-3 (Macdonald et al., 2005) ou par le domaine BRCT (Stucki et al., 2005).

### 3.1.4 Ubiquitination des histones

Les histones H1, H3, H2A et H2B sont connues pour pouvoir être ubiquitinées *in vivo*, de même que les variants H2A.X et H2A.Z (Bonner et al., 1988; Chen et al., 1998a; Nickel et al., 1989; Pham et Sauer, 2000). Jusqu'à présent, la monoubiquitination des histones H2A et H2B sont les plus étudiées. Chez les eucaryotes supérieurs, entre 5 à 15 % de l'histone H2A et entre 1 à 2 % de l'histone H2B sont ubiquitinés. Par contre, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'ubiquitination de l'histone H2A n'est pas détectable et environ 10 % de l'histone H2B est ubiquitiné. Des études tendent à montrer que l'ubiquitination des histones ne modifierait pas leur demi-vie et donc ne serait pas liée à leur dégradation, mais aurait par contre un effet sur la structure de la chromatine. Chez les mammifères, la monoubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 est associée à des régions non transcrites, par exemple sur le chromosome X inactif des femelles (de Napoles et al., 2004). Pour l'instant seule la monoubiquitination de l'histone H2B est liée à l'activation de la transcription. Elle serait de plus requise pour l'expression optimale de plusieurs gènes inductibles chez la levure (Henry et al., 2003) et uniquement retrouvée dans des régions de chromatine active (Kao et al., 2004). Il a été proposé que l'ubiquitination et la déubiquitination soient importantes pour la bonne induction de l'expression du gène *GAL1*. Ce processus peut servir d'exemple pour la coopération entre les différents complexes de remodelage, puisque l'enzyme responsable de la déubiquitination de l'histone H2B est Ubp8, qui fait aussi partie du complexe SAGA.

### 3.1.5 Distribution des modifications post-traductionnelles des histones à l'échelle du génome

Le domaine d'étude de la chromatine et de la transcription a connu une petite révolution technique avec l'arrivée du séquençage à haut débit. En effet, en couplant les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec le séquençage à haut débit, il a été possible

d'identifier les sites de liaisons d'activateurs (Schones et al., 2008) et une grande partie des modifications post-traductionnelles des histones à l'échelle génomique (Barski et al., 2007; Wang et al., 2008). Ce type de données a permis d'associer des modifications ou combinaisons de modifications à des régions fonctionnellement différentes du génome et ainsi, par extrapolation, d'associer des fonctions putatives à certaines régions de fonction inconnue. La figure 1.7 représente la distribution des modifications post-traductionnelles des histones pour les gènes activement exprimés. Par exemple, on peut prédire si un gène est transcrit en regardant les niveaux de triméthylation de la lysine 36 de H3 dans la région codante du gène.

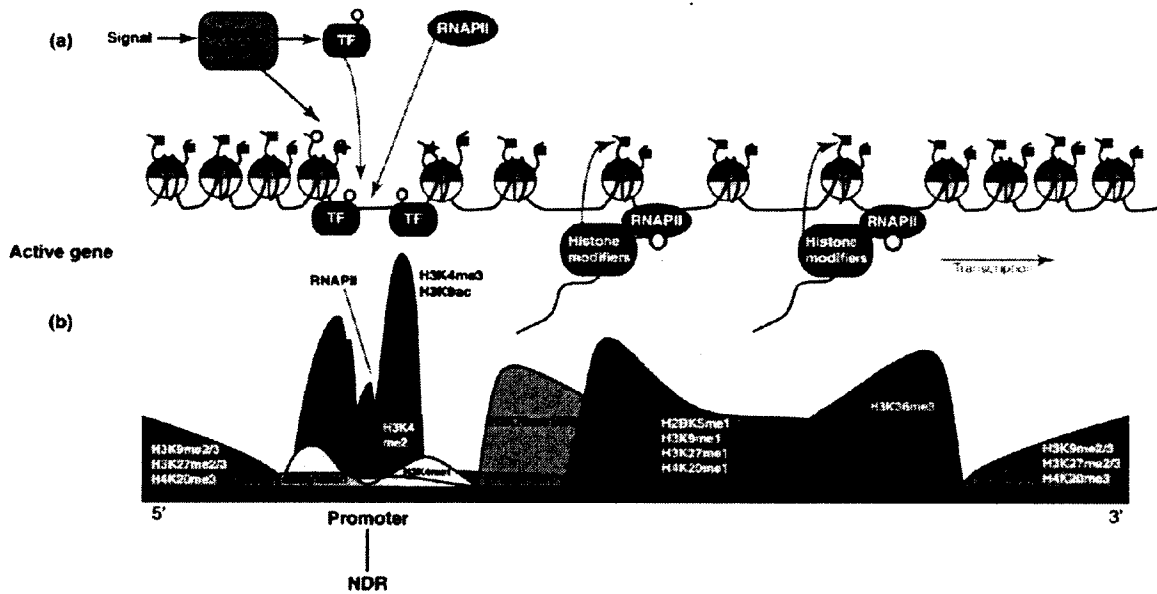


Figure 1.7 : Schéma représentant la distribution des différentes modifications post-traductionnelles des histones sur le promoteur distal et proximal ainsi que le corps d'un gène transcrit. Tiré de (Barth et Imhof, 2010).

Les modifications post-traductionnelles ne sont pas les seuls mécanismes qui permettent de moduler l'accessibilité de la chromatine, puisque les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP et l'incorporation de variants d'histone remplissent aussi cette fonction. Ces différents mécanismes coopèrent pour réguler l'expression des gènes.

### 3.2 Complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP

Les complexes de remodelage de la chromatine sont composés de trois familles majeures (SWI2/SNF2, ISWI et Mi-2/CHD), et d'une quatrième famille découverte plus récemment contenant le complexe Ino80 et SWR1. La protéine au cœur de tous ces complexes est une hélicase. Les complexes de la famille SWI2/SNF2 ont été découverts les premiers lors d'un criblage génétique dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hirschhorn et al., 1992; Klar et Bonaduce, 1991; Laurent et al., 1991; Peterson et Herskowitz, 1992). Ce sont de très gros complexes faisant jusqu'à plusieurs MDa. Les complexes de la famille ISWI ont d'abord été découverts chez la drosophile (Becker et al., 1994), puis des homologues ont été découverts dans plusieurs organismes tels que la levure (Tsukiyama et al., 1999) et l'humain (LeRoy et al., 2000). Les complexes de cette famille sont de plus petite taille et ne possèdent que quelques sous-unités. Les complexes de remodelage de la chromatine peuvent aussi posséder un rôle négatif dans la régulation de la transcription, c'est le cas par exemple de Mi-2. En effet, Mi-2 est associé avec des histones déacétylases et forme le complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) qui est impliqué dans la répression de la transcription (Wolffe et al., 2000). Une des raisons pouvant expliquer ce rôle négatif est la présence d'une sous-unité dans le complexe contenant un chromodomaine reconnaissant la marque H3K9 méthylée (Musselman et al., 2012). Les protéines de la sous-famille INO80 ont la caractéristique de posséder un insert dans leur domaine ATPase. Ino80 peut déplacer des nucléosomes *in vitro*, et semblent posséder en rôle lors de la réparation de l'ADN après des cassures double brins (Shen et al., 2000; Tsukuda et al., 2005). Il a aussi été montré comme capable d'enlever le variant d'histone H2A.Z et de le remplacer par l'histone canonique H2A *in vitro* (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Quant à Swr1, il est impliqué dans l'échange des dimères H2A-H2B par des dimères H2A.Z-H2B chez la levure (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004). La protéine Swr1 possède deux orthologues chez l'homme SRCAP (*Snf2-related CREB-Binding protein activator protein*) et p400, qui sont toutes les deux capables d'incorporer l'histone H2A.Z dans la chromatine (Gevry et al., 2007; Ruhl et al., 2006).

L'habilité des différents complexes à altérer la structure de la chromatine a été étudiée en utilisant une grande variété d'essais *in vitro*. Il a pu être ainsi montré que chaque famille de complexes de remodelage n'affecterait pas la structure de la chromatine de la même façon. Par exemple, BRG1, l'homologue humain de SWI2/SNF2, et SNF2H, l'homologue humain de ISWI, peuvent tous deux remodeler des fibres nucléosomales. Cependant, seul BRG1 peut altérer le patron de digestion avec des enzymes de restriction et moduler l'accessibilité à la DNase sur des mononucléosomes sans ADN flanquant. Bien que ces complexes soient de mieux en mieux caractérisés *in vitro*, leurs mécanismes de remodelage *in vivo* sont encore mal connus.

Deux modèles de mécanisme d'action des complexes de remodelages sont principalement proposés pour augmenter l'accessibilité à certaines séquences d'ADN. Le « sliding », ou glissement, consiste en un mouvement, de même intensité et dans la même direction, induit à l'entrée et à la sortie du nucléosome. L'ADN qui, à l'origine, interagissait avec les histones, se retrouve à l'extérieur du nucléosome. Cependant ce mécanisme ne permet pas d'expliquer le remodelage de la chromatine dans toutes les situations (par exemple, dans les régions où les nucléosomes sont très peu espacés). Pour cette raison, un deuxième modèle propose que les complexes de remodelage de la chromatine puissent induire un changement de conformation au niveau du nucléosome, permettant d'augmenter l'accessibilité de l'ADN sans changer sa localisation. Des expériences de digestion avec des enzymes de restriction ou à la DNase sur des nucléosomes sans ADN flanquant en présence de SWI/SNF ont permis d'observer des variations du profil de digestion (Kingston et Narlikar, 1999). Ces résultats soutiennent le deuxième modèle proposé. En plus de ces deux mécanismes, les complexes de remodelage de la chromatine peuvent induire une perte des nucléosomes et remplacer les histones canoniques par un de leurs variants. À part la sous-unité catalytique, les autres sous-unités des complexes ne semblent pas ou peu avoir été conservées. En principe, ces autres sous-unités peuvent avoir deux fonctions distinctes : d'une part, moduler l'activité enzymatique, et d'autre part, cibler le complexe de remodelage jusqu'au promoteur, soit directement, soit via l'interaction avec des activateurs.

### 3.3 Les variants d'histone

En plus des histones canoniques, les histones H2A, H2B et H3 possèdent des variants et les mieux caractérisés sont ceux des histones H2A et H3 (Tableau 1.3). Leur incorporation dans la chromatine peut modifier ses propriétés (différence de modification post-traductionnelle, capacité à recruter des facteurs et complexes différents).

Tableau 1.3: Principaux variants de H2A et H3 et leurs fonctions. Inspiré de (Kamakaka et Biggins, 2005).

| Variant  | Espèces     | Effet sur la chromatine      | Fonctions  |
|----------|-------------|------------------------------|--|
|          | <i>H2A</i>  |                              |  |
| MacroH2A | Vertébrés   | Augmente la condensation     | Inactivation du chromosome X                         |
| H2ABbd   | Vertébrés   | Ouvre la chromatine          | Activation de la transcription                       |
| H2A.X    | Ubiquitaire | Augmente la condensation     | Réparation de l'ADN                                  |
| H2A.Z    | Ubiquitaire | Ouvre et ferme la chromatine | Rôle en transcription et ségrégation des chromosomes |
|          | <i>H3</i>   |                              |  |
| CenH3    | Ubiquitaire |                              | Formation et fonction des kinétochores               |
| H3.3     | Ubiquitaire | Ouvre la chromatine          | Transcription  |

Il existe principalement deux variants de l'histone H3 : H3.3 et H3 centromérique (CenH3). CenH3 (Cse4 chez *S. cerevisiae*) est un variant très conservé et essentiel qui se lie aux centromères, et est impliqué dans la formation des kinétochores qui vont permettre la ségrégation des chromosomes lors de la mitose et de la méiose. Le variant H3.3 ne possède que quatre acides aminés de différence avec H3, mais contrairement à l'histone canonique, il est exprimé pendant tout le cycle cellulaire et est souvent localisé dans les régions chromosomiques transcriptionnellement actives (Ahmad et Henikoff, 2002). H2A est l'histone qui possède le plus de variants connus : H2A.Z, H2A.X, MacroH2A, H2A-Bbd et H2AvD. Certains variants tel que H2A.Z (Jackson et al., 1996) sont conservés au cours de l'évolution, alors que d'autres comme MacroH2A (Costanzi et Pehrson, 1998) et H2A-Bbd (Chadwick et Willard, 2001) sont retrouvés uniquement chez les vertébrés ou les mammifères. Les variants de H2A se distinguent de l'histone principale par leur queue C-terminale qui diffère en taille et en séquence, de même que leur localisation génomique. MacroH2A se localise préférentiellement sur le chromosome X inactif (Costanzi et Pehrson, 1998), alors que H2A-Bbd se localise sur le chromosome X actif et les chromosomes autosomaux (Chadwick et Willard, 2001). H2A.X et H2A.Z sont constitutivement exprimés et localisés dans tout le génome. De façon intéressante, l'histone H2A chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* est plus similaire au variant H2A.X qu'à l'histone H2A retrouvée chez les mammifères (Malik et Henikoff, 2003). Chez la drosophile, un seul variant appelé H2AvD possède les séquences caractéristiques de H2A.X et H2A.Z (Redon et al., 2002). H2A.X est important pour la stabilité du génome, car bien qu'il soit exprimé de manière constitutive et localisé dans tous les chromosomes, on le retrouve préférentiellement phosphorylé aux environs des cassures d'ADN double brin. Bien que H2A.X n'a pas été directement lié à la réparation des cassures d'ADN double brin, sa phosphorylation est essentielle pour le recrutement de nombreux complexes de réponse aux dommages à l'ADN au site à réparer (Paull et al., 2000). Le variant H2A.Z sera abordé plus en profondeur dans la section suivante et constitue celui qui m'intéresse le plus dans le cadre de mon projet de recherche.

### 3.3.1 Le variant d'histone H2A.Z

Le variant d'histone H2A.Z est très conservé (Thatcher et Gorovsky, 1994), même plus que l'histone canonique H2A, et est essentiel pour la viabilité de plusieurs espèces telles que *Tetrahymena thermophila* (Liu et al., 1996), la souris (Faast et al., 2001) et la drosophile (van Daal et Elgin, 1992). Dans une cellule, H2A.Z représente environ 5 à 10 % des histones de type H2A. L'incorporation de H2A.Z à la place de H2A ne modifie pas énormément la structure du nucléosome. Il est à noter que le dimère formé par H2A.Z et H2B présente une surface acide ininterrompue absente dans le dimère H2A-H2B (Suto et al., 2000). Cependant, jusqu'à présent la fonction du variant H2A.Z n'est pas encore bien caractérisée et les nombreuses études réalisées sur celui-ci semblent indiquer qu'il est impliqué dans un grand nombre de mécanismes cellulaires liés à l'ADN.

H2A.Z peut jouer un rôle positif et négatif en transcription. Le rôle positif a été montré en premier chez *Tetrahymena thermophila*, où H2A.Z est uniquement associé au macronoyau transcriptionnellement actif (Allis et al., 1980). Ensuite, d'autres études réalisées chez *Saccharomyces cerevisiae* dans une souche  $\Delta htz1$  (gène codant pour H2A.Z chez la levure) ont permis de mettre en évidence une réduction de l'induction des gènes *GAL1-10* en présence de galactose (Adam et al., 2001) et de *PUR5* en absence de réplication (Larochelle et Gaudreau, 2003). De plus, des études réalisées chez la levure dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence que la queue C-terminale de H2A.Z est capable d'interagir avec Rbp1, la plus grosse sous-unité de l'ARN pol II (Adam et al., 2001). Plus récemment, il a été montré dans des cellules cancéreuses humaines un rôle négatif de H2A.Z sur l'expression de *p21* (Gevry et al., 2007) mais aussi un rôle positif sur l'expression des gènes cibles de ER $\alpha$  (Gevry et al., 2009).

La localisation de H2A.Z à l'échelle du génome a montré un patron de distribution non aléatoire. Des pics nets de H2A.Z sont localisés à proximité du TSS de nombreux gènes,



aussi bien chez la levure que chez l'humain (Barski et al., 2007; Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005). Dans les cellules humaines, H2A.Z va aussi se localiser au niveau des amplificateurs et des insulateurs (Barski et al., 2007). Une des différences majeures entre la levure *S. cerevisiae* et les cellules humaines est que chez la levure, la présence de H2A.Z au promoteur de gènes est inversement corrélée avec la transcription de ceux-ci (Meneghini et al., 2003). À l'opposé, dans des cellules humaines la présence de H2A.Z est fortement corrélée avec la présence d'ARN pol II et de la transcription (Barski et al., 2007; Hardy et al., 2009). Une étude du laboratoire de Gary Felsenfeld a aussi montré que la présence de H2A.Z et H3.3 dans un même nucléosome était associée aux promoteurs actifs, aux amplificateurs et aux insulateurs (Jin et al., 2009). Les nucléosomes contenant les deux variants sont très instables et leur localisation à ces régions faciliterait l'accessibilité pour les facteurs de transcription lors de l'activation. Chez la levure, H2A.Z va aussi être retrouvé dans les régions subtélomériques où il empêche l'étalement de l'hétérochromatine et la répression des gènes situés dans ces régions (Meneghini et al., 2003). Dans les cellules humaines, H2A.Z est aussi retrouvé au niveau de régions hétérochromatiques, péricentromériques et subtélomériques sur des vastes étendues de plusieurs mégabases (Hardy et al., 2009).

H2A.Z est localisé dans les régions péricentromérique lors des premières étapes du développement de la souris (Rangasamy et al., 2003) et colocalise avec la protéine HP1  $\alpha$ , un marqueur de l'hétérochromatine. Chez la levure, la surexpression de H2A.Z dans une souche  $\Delta sir1$ , une protéine impliquée dans le recrutement de « silencers » au niveau du locus *HMR*, restaure la mise en silence de ce locus (Dhillon et Kamakaka, 2000). H2A.Z possède donc un rôle dans la formation de l'hétérochromatine, ce qui semble à l'opposé de son rôle dans les régions subtélomériques. Cependant, H2A.Z semble associé, aussi bien chez la souris que chez la levure, à des formes d'hétérochromatine non permanentes ou qui doivent pouvoir être changées en euchromatine dans certains contextes cellulaires (par exemple, lors du choix du type sexuel de la levure). H2A.Z possède en outre d'autres fonctions non liées à la transcription. En 2006, le laboratoire de Rohinton T. Kamakaka a montré l'importance de H2A.Z pour la progression du cycle

cellulaire (Dhillon et al., 2006). La souche  $\Delta htz1$  présente un retard lors de la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. L'absence de H2A.Z semble provoquer un moins bon recrutement de cdc45 (une protéine impliquée dans les premières étapes de l'initiation de la réplication) aux origines de réplication, ainsi qu'une association plus longue de cette protéine avec l'origine de réplication par rapport à celle de la souche sauvage. Les auteurs proposent que la population de cellules  $\Delta htz1$  se répliquerait de façon asynchrone, ce qui conduirait à une phase S plus longue (Dhillon et al., 2006). Chez la souris, il a été montré grâce à des expériences d'ARN à interférence que le variant d'histone H2A.Z est important pour la ségrégation des chromosomes (Rangasamy et al., 2004), et ce phénotype a aussi été observé chez la levure.

Jusqu'à présent, peu de modifications post-traductionnelles ont été observées sur H2A.Z et leurs fonctions sont peu caractérisées. En début 2006, trois laboratoires ont mis en évidence que H2A.Z pouvait être acétylé sur quatre lysines de sa queue N-terminale : K3, K8, K10 et K14 qui est celle majoritairement acétylée chez la levure. Une étude à l'échelle du génome a été réalisée et H2A.Z acétylé sur K14 semble localisé majoritairement dans les régions promotrices des gènes actifs par rapport à H2A.Z total (Millar et al., 2006). Une des autres études a montré que le complexe NuA4 est responsable de l'acétylation de la lysine 14 de H2A.Z et que la mutation de cette lysine en arginine entraîne un défaut dans la ségrégation et la transmission des chromosomes (Keogh et al., 2006). La dernière étude a observé que la mutation des quatre lysines en arginines provoquait une réduction de l'expression des gènes subtélomériques, indiquant que l'acétylation de H2A.Z serait importante pour son rôle d'élément frontière (Babiarz et al., 2006). Dans les cellules humaines, H2A.Z acétylé est retrouvé aux promoteurs et aux amplificateurs, cependant cette modification semble exclue des régions d'hétérochromatine facultative (Hardy et al., 2009). A l'opposé, H2A.Z monoubiquitiné est quant à elle retrouvée sur le chromosome X inactif, suggérant un rôle dans la maintenance ou la formation de l'hétérochromatine (Sarcinella et al., 2007).

Les histones canoniques sont majoritairement exprimées et incorporées dans la chromatine pendant la phase S du cycle cellulaire, ce qui n'est pas le cas du variant d'histone H2A.Z. Comme déjà mentionné dans la section 3.2, la protéine Swr1 appartenant au complexe SWR-C est responsable de l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine chez la levure *S. cerevisiae* (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004) et possède deux orthologues chez l'homme SRCAP et p400. En 2006 et 2007, l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine par les complexes contenant ces deux protéines a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Gevry et al., 2007; Ruhl et al., 2006). Dans les eucaryotes supérieurs, p400 peut être retrouvé associé ou non en complexe avec la HAT Tip60, ce qui pourrait influencer la résultante transcriptionnelle. Jusqu'à récemment, aucun complexe n'avait été identifié comme étant capable d'échanger spécifiquement un dimère H2A.Z-H2B situé dans la chromatine pour un dimère H2A-H2B. En 2011, le laboratoire de Craig Peterson a montré chez la levure que le complexe INO80 était capable de réaliser cet échange *in vitro* et que la délétion de *ino80* conduisait à une mauvaise localisation de H2A.Z (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Malgré l'identification de ces complexes, peu de choses sont connues sur les signaux responsables de la localisation de H2A.Z dans la chromatine. Chez la levure, l'acétylation des histones H3 et H4 est nécessaire pour l'incorporation de H2A.Z, et dans les cellules humaines l'acétylation de la lysine 18 de l'histone H3 est la marque permettant la meilleure prédiction de la présence de H2A.Z dans un nucléosome (Gervais et Gaudreau, 2009). Il reste encore beaucoup d'études à réaliser pour découvrir les mécanismes et les signaux responsables de l'adressage de H2A.Z à des endroits précis dans le génome.

En 2008, les laboratoires de Daniel Zilberman et Steven Henikoff ont montré une relation antagoniste entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana* à l'échelle du génome (Zilberman et al., 2008). En effet, ces deux marques semblent mutuellement exclusives dans de nombreux organismes aussi bien des plantes que des champignons et certains animaux (Conerly et al., 2010; Zemach et al., 2010). Les auteurs ont proposé que l'exclusion de H2A.Z de la chromatine puisse être un nouveau mécanisme impliqué dans l'inhibition à long terme de l'expression génique. À présent, il

va falloir essayer de comprendre comment les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont capables de distinguer un nucléosome contenant H2A.Z ou H2A.

## 4 La méthylation de l'ADN

### 4.1 Généralités

La méthylation de l'ADN consiste au transfert d'un groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) à la place d'un atome d'hydrogène sur le carbone 5 d'une cytosine que l'on note 5-methylcytosine ou 5-mC. La méthylation de l'ADN est présente aussi bien chez les bactéries que chez les eucaryotes. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu uniquement sur des cytosines formant des dinucléotides CG ou CpG dans les cellules différenciées. Dans les cellules embryonnaires cependant, environ un quart de la méthylation observée a lieu sur des dinucléotides CpA, et en moindre quantité sur des dinucléotides CpT (Lister et al., 2009). Les régions centromériques, péri-centromériques et les éléments répétés sont massivement méthylées chez les mammifères. La distribution des dinucléotides CpG est irrégulière. Dans le génome on retrouve des régions de 500-3000 paires de bases présentant une plus forte concentration de CpG (>55%) qui sont appelées îlot CpG (Bird et al., 1985). Approximativement 60% des gènes codant pour des protéines possèdent un îlot CpG dans leur promoteur ou dans leur premier exon. Ces régions sont normalement non méthylées pour les gènes transcriptionnellement actifs comme les gènes de « ménage » (traduction de « housekeeping » genes). A l'inverse, les gènes tissu spécifique ou impliqués dans le développement vont avoir leurs îlots CpG méthylés afin que ces gènes ne soient pas exprimés dans les tissus différenciés (Bird, 2002; Kundu et Rao, 1999).

La fréquence de dinucléotide CG est cinq fois inférieure à celle attendue dans le génome humain. En effet, avec un contenu en nucléotide CG de 42%, on s'attendrait à observer 4,41% de dinucléotide CG dans le génome humain alors que cette valeur est seulement de 1%. La fréquence élevée des mutations dans les dinucléotides CpG qui est 10 à 40 fois plus fréquentes que pour les autres dinucléotides peut expliquer ce faible pourcentage de CG (Sved et Bird, 1990). Une des explications, pour ce niveau de mutation élevé, est que le nucléotide 5-méthylcytosine est plus souvent muté que les autres nucléotides (Coulondre et al., 1978), (Sved et Bird, 1990). Wang et collègues (1982) ont montré que la déamination spontanée des 5-méthylcytosines est de 1,5 à 3 fois supérieur à celle des cytosines non méthylées (Wang et al., 1982). Les cytosines et 5-méthylcytosines peuvent être spontanément déaminés et ainsi être converti en uracile et thymine respectivement. La différence entre ces produits de déamination est au cœur de la raison expliquant la plus haute fréquence de mutagenicité des cytosines méthylées par rapport à celles qui ne le sont pas. En effet, la thymine est une composante normale de l'ADN et les mésappariements G/T sont moins facilement et efficacement reconnus et réparés que la présence d'un uracile (Brown et Brown-Luedi, 1989) (Wiebauer et al., 1993). La méthylation de l'ADN peut être inhibée en utilisant des analogues de cytidine tel que le 5-azacytidine (5-azaC). Le 5-azaC va être incorporé dans l'ADN (et aussi l'ARN) au cours de la réplication à la place des cytidines. Ceux-ci ne pourront pas être méthylés par les différentes ADN méthyltransférases (DNMT) et vont séquestrer ces mêmes enzymes au niveau de l'ADN les empêchant d'aller méthyler d'autres cytidines. En effet, lors de la réaction de méthylation il y a formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et la base dans l'ADN. L'enzyme est relâchée après le transfert du groupement méthyl sur le cinquième carbone de la cytidine. Lorsque cette réaction tente d'avoir lieu sur les 5-azaC, la liaison covalente entre l'enzyme et la base est difficilement réversible (Santi et al., 1984).

## 4.2 Les ADN méthyltransférases

Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont les DNMT. Les mammifères possèdent trois enzymes fonctionnelles soit DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. DNMT1 possède une plus grande affinité pour l'ADN hémiméthylé et est responsable de la maintenance de la méthylation de l'ADN après la réplication de l'ADN (Fatemi et al., 2001). DNMT3A et DNMT3B sont responsables de la méthylation *de novo* (Okano et al., 1999; Okano et al., 1998). Il existe aussi un autre membre de la famille DNMT3 (DNMT3L) qui ne possède pas d'activité catalytique mais qui est capable de réguler celle de DNMT3A et DNMT3B (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002). Ces trois enzymes sont essentielles à la survie. En effet, la déplétion des deux allèles des gènes *Dnmt1* et *Dnmt3b* est létale au stade embryonnaire chez les souris et celles possédant une déplétion des deux allèles du gène *Dnmt3a* ne survivent que quelques semaines après leur naissance (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). De plus, plusieurs études ont rapporté un rôle de DNMT1 et DNMT3B dans l'altération des profils de méthylation dans les cellules cancéreuses (Beaulieu et al., 2002; Robert et al., 2003).

## 4.3 Rôle de la méthylation de l'ADN

La méthylation d'îlots CpG conduit à la répression stable de l'expression génique. Ce mécanisme est massivement utilisé durant la gamétogénèse et les premières étapes du développement embryonnaire. La régulation de l'expression génique par ce mécanisme est très importante dans le cadre de l'établissement de l'empreinte génomique parentale, phénomène qui consiste en l'expression d'un seul allèle d'un gène selon son origine maternelle ou paternelle. Un des exemples les mieux caractérisés est le locus *Igf2-H19*, deux gènes en tandem. Sur le chromosome maternel, le gène *H19* est exprimé et la région différenciellement méthylée (DMR) localisée dans la région promotrice de *H19* est non

méthylée et CTCF peut s'y lier. Sur le chromosome paternel, la DMR est méthylée inhibant l'expression de *H19* et la liaison de CTCF ce faisant, l'amplificateur situé en 3' de *H19* induit l'expression d'*Igf2* (Figure 1.8) (Bell et Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000; Szabo et al., 2000).

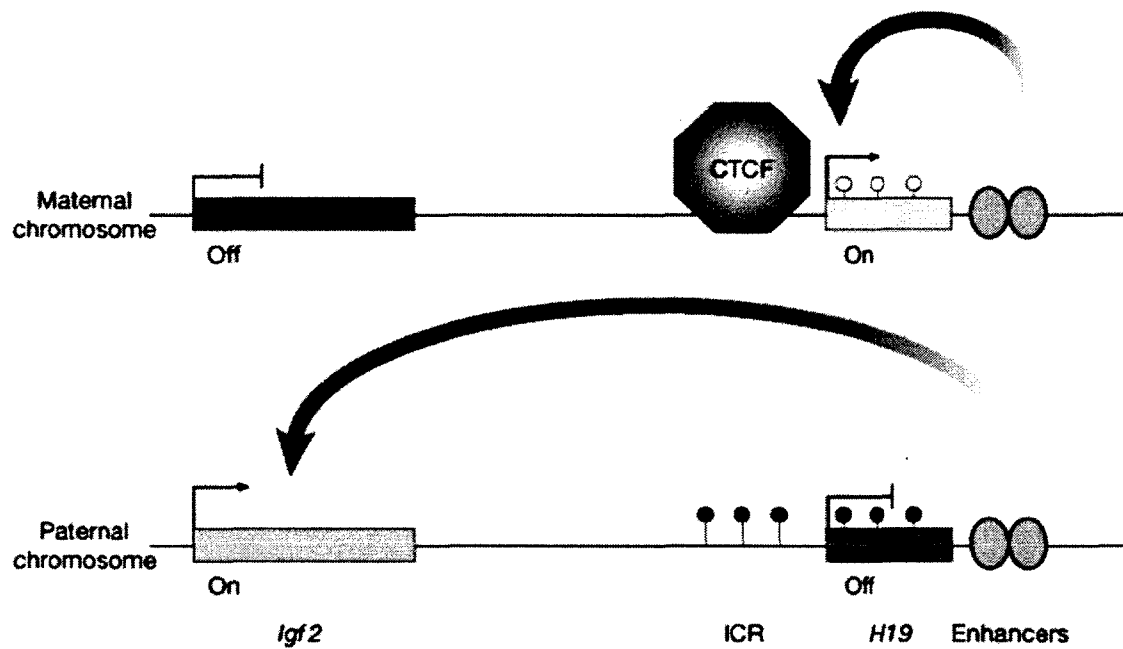


Figure 1.8 : Mécanisme de régulation du locus *Igf2-H19* soumis à l’empreinte génomique parental. Tiré de (Reik et Murrell, 2000).

#### 4.4 Méthylation de l'ADN et cancer

Dans 50% des tumeurs de cancer du sein, on observe une hypométhylation globale, qui s'explique par une réduction de la méthylation des séquences répétées et de l'ADN satellite péricentromérique. L'hypométhylation de ces régions augmente l'instabilité génomique, ce qui se traduit par une augmentation des réarrangements chromosomiques dans les séquences répétées et une plus haute probabilité des rétrotransposons de se transloquer ailleurs dans le génome (Eden et al., 2003; Howard et al., 2008; Rodriguez et al., 2006). De façon paradoxale, les îlots CpG localisés dans les promoteurs de certains suppresseurs de tumeur (par exemple *p16* et *BRCA1*) sont hyperméthylés inhibant ainsi leur expression (Esteller et al., 2000; Merlo et al., 1995). À ce jour, les mécanismes expliquant ces observations ne sont pas connus. Est-ce que le recrutement des DNMTs est différent dans les cellules cancéreuses ou bien est-ce que certaines régions vont être plus activement déméthylées? Les *DNMTs* sont surexprimés dans divers types de cancer mais cet événement est peu fréquent (Eads et al., 1999; Issa et al., 1993; Mizuno et al., 2001). De plus, il semble que les quantités d'ARNm et de protéine des DNMT ne soient pas obligatoirement le reflet de l'activité enzymatique de celles-ci. Environnementalement 30% des patients atteints de cancer du sein montrent une surexpression de *DNMT3B* (Girault et al., 2003). Pour *DNMT1* et *DNMT3A*, les pourcentages de patients les surexprimant sont de 5% et 3% seulement. Ces observations indiquent que *DNMT3B* semble jouer un rôle plus important que *DNMT1* et *DNMT3A* dans le développement de cancers du sein. L'expression élevée de *DNMT3B* est associée à un haut grade histologique laissant supposer que *DNMT3B* puisse aussi être impliqué dans la progression et l'agressivité des tumeurs de la glande mammaire. Une des particularités de *DNMT3B* par rapport aux autres *DNMTs* est qu'il possède de nombreux variants d'épissage (Figure 1.9), qui sont exprimés différenciellement selon le type de cellules cancéreuses (Tableau 1.4) (Ostler et al., 2007). L'ARNm de ces variants et les protéines qui en résultent peuvent être observés dans plusieurs lignées cancéreuses. Le variant *DNMT3B7* est le transcrit aberrant de *DNMT3B* retrouvé dans le plus grand nombre de lignées cancéreuses différentes. Ostler et collègues (2007) ont montré que la



surexpression de ce variant (à des niveaux proche de ceux retrouvés dans des cellules cancéreuses l'exprimant) est suffisante pour altérer l'expression et modifier les profils de méthylation de certains gènes (Ostler et al., 2007).

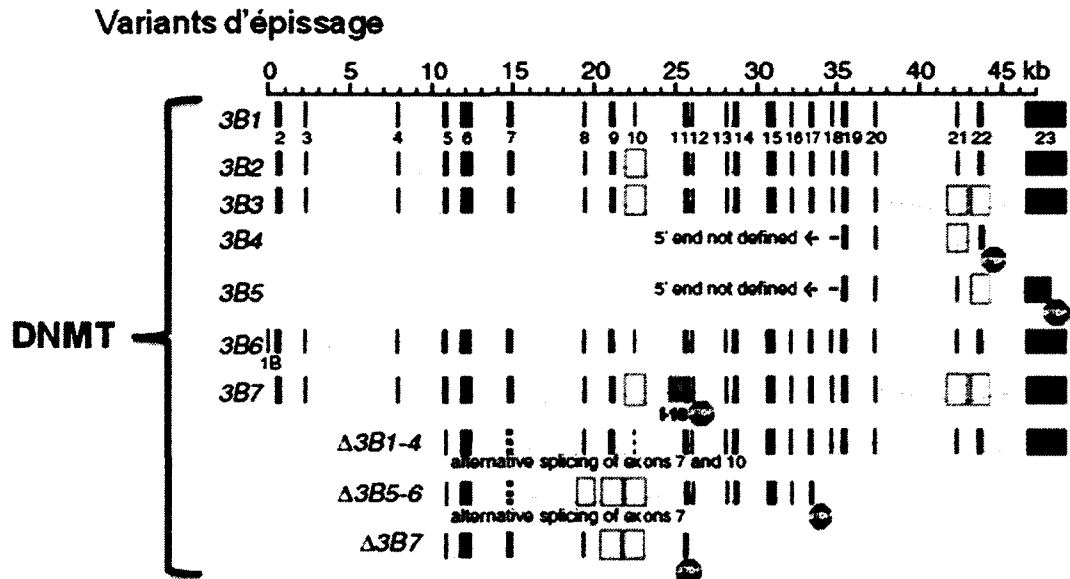


Figure 1.9 : Différents variants d'épissage de DNMT3B. Adapté de (Ostler et al., 2007).

Tableau 1.4: Présence des différents variants d'épissage de *DNMT3B* dans des lignées cellulaires cancéreuses. Tiré de (Ostler et al., 2007).

| Lignée cellulaire | Avec activité catalytique |                      | Sans activité catalytique |              |
|-------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
|                   | <i>DNMT3B1</i>            | <i>DNMT3B2, 3, 6</i> | <i>DNMT3B7, 12, 13</i>    | <i>Other</i> |
| UoC-M1            |                           | X                    | X                         | X            |
| KG-1              |                           | X                    | X                         |              |
| K562              |                           | X                    | X                         |              |
| HL60              |                           | X                    | X                         |              |
| U937              |                           | X                    | X                         |              |
| Jurkat            |                           | X                    | X                         |              |
| CEM               |                           | X                    | X                         |              |
| REH               |                           | X                    | X                         |              |
| SUPB13            |                           | X                    | X                         |              |
| Raji              |                           | X                    | X                         | X            |
| FL18              | X                         | X                    |                           |              |
| HCC1937           |                           | X                    | X                         |              |
| MCF-7             | X                         | X                    | X                         |              |
| MDA-MB-231        |                           | X                    | X                         |              |
| SK-BR-3           |                           | X                    | X                         |              |
| HeLa              | X                         | X                    | X                         | X            |
| MSTO 211 H        | X                         | X                    | X                         |              |
| NCI H28           | X                         | X                    | X                         | X            |
| PCI13             | X                         | X                    | X                         |              |
| H82               | X                         | X                    |                           |              |
| LoVo              | X                         | X                    | X                         | X            |
| Kato-III          | X                         | X                    | X                         | X            |
| Alexander         | X                         | X                    | X                         |              |
| HepG2             | X                         |                      |                           |              |
| Hs 683            | X                         | X                    |                           |              |

## 4.5 Déméthylation de l'ADN

La déméthylation de l'ADN peut avoir lieu de manière passive ou active. La déméthylation passive a lieu au cours de la réplication de l'ADN, en absence d'activité ADN méthyltransférase de maintenance la marque de méthylation va être perdue après

deux divisions cellulaires. La déméthylation active implique le remplacement de 5-metC en C de façon indépendante de la réplication. L'identification d'enzymes impliquées dans le processus de déméthylation active chez les vertébrés en est encore à ces balbutiements. À ce jour, le mécanisme le plus probable débiterait par la déamination de la base 5metC en thymine puis utiliserait les systèmes de réparation de la cellule (*base excision repair* (BER) et *nucleotide excision repair* (NER)) (Teperek-Tkacz et al., 2011). Dans les protéines identifiées pour jouer potentiellement un rôle dans ce mécanisme on retrouve la Thymine DNA glycosylases (TDG et MBD4 (*methyl binding DNA*)) (Hendrich et al., 1999), MBD2 (Bhattacharya et al., 1999; Detich et al., 2002), MBD3 (Brown et al., 2008), GADD45A (Barreto et al., 2007) et AID (*activation induce deaminase*)(Bhutani et al., 2010; Popp et al., 2010).

## **5 Hypothèses et objectifs généraux de la thèse**

Notre laboratoire s'intéresse à la régulation de l'expression génique et mon projet de doctorat s'inscrit dans la compréhension de la régulation de l'expression des gènes cibles de AhR dans des cellules de cancer du sein. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à étudier le ou les mécanismes utilisés par ER $\alpha$  pour réprimer l'expression de *CYP1A1*. Des études précédentes ont montré que ER $\alpha$  est capable de réprimer spécifiquement *CYP1A1* mais pas *CYP1B1* (Beischlag et Perdew, 2005; Kharat et Saatcioglu, 1996; Kietz et al., 2009). Cependant, aucun mécanisme n'a été mis en évidence jusqu'à ce jour. À cause du rôle de chacune de ces enzymes dans la production de métabolites de l'œstradiol dans un cas peu génotoxique pour CYP1A1 et dans un autre cas extrêmement mutagène pour CYP1B1 il nous semble très important d'identifier ce ou ces mécanismes. En effet, il a été proposé qu'une diminution du ratio des enzymes CYP1A1/CYP1B1 soit favorable à l'initiation et la progression du cancer du sein. Notre laboratoire a montré précédemment que le variant d'histone H2A.Z joue un rôle

important dans l'expression des gènes cibles de ER $\alpha$ . Cette observation a été le point de départ de mon projet et je me suis intéressée au rôle de H2A.Z et de ER $\alpha$  dans l'induction des gènes cibles de AhR, *CYP1A1* et *CYP1B1*. Un peu plus d'un an après le début du projet, le laboratoire du Dr. Henikoff a mis en évidence une relation antagoniste entre la présence de H2A.Z et la méthylation de l'ADN et cette observation nous a conduit à investiguer le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de *CYP1A1*. Les résultats de ces recherches sont présentés dans le chapitre II. Dans le chapitre III, je vais présenter des résultats préliminaires non soumis pour publication qui font suite aux données présentées dans le chapitre II. Ces résultats me semblent pertinents à montrer dans le but d'étoffer la discussion dans le chapitre V.

Un autre aspect très intéressant de l'étude de AhR est la diversité de ses ligands et comment certains peuvent être extrêmement toxiques alors que d'autres font l'objet d'essais cliniques pour devenir des produits thérapeutiques dans la lutte contre le cancer. Pour cette raison, nous avons voulu comparer deux ligands de AhR, d'une part le TCDD et d'autre part le DIM et voir qu'elles étaient les différences dans la régulation de l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Une des différences très importantes et déjà connue entre ces deux ligands est que le DIM est capable d'activer ER $\alpha$  via l'action de la PKA (*protein kinase A*). À partir de cette observation, j'ai décidé d'étudier l'effet du DIM sur l'expression des gènes cibles de AhR et de ER $\alpha$  et aussi sur la croissance cellulaire (Chapitre IV).

## CHAPITRE II

***Le variant d'histone H2A.Z est important pour la régulation de CYP1A1, un gène cible de AhR dans des lignées de cancer du sein exprimant ER $\alpha$ .***

### Description de l'article et contribution

Dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence deux nouveaux facteurs, H2A.Z et DNMT3B, impliqués dans la régulation des gènes cibles de AhR et plus particulièrement du gène *CYP1A1*. Au début de l'étude nous nous sommes intéressés au rôle de H2A.Z lors de l'induction de *CYP1A1* et *CYP1B1* (les deux gènes cibles de AhR les plus étudiés) après traitement au TCDD (le ligand prototypique de AhR). De façon surprenante, la présence de H2A.Z est essentielle à l'induction de *CYP1A1* uniquement dans des lignées cellulaires exprimant ER $\alpha$  alors qu'elle est toujours importante pour l'expression de *CYP1B1*, peu importe le statut de ER $\alpha$ . À partir de ces observations et sachant que ER $\alpha$  est capable de réprimer spécifiquement l'expression de *CYP1A1* sans avoir d'effet sur *CYP1B1*, nous avons cherché à identifier le mécanisme responsable. Finalement, nous avons pu montrer dans un premier temps, que ER $\alpha$  est capable de recruter DNMT3B au promoteur de *CYP1A1* et ainsi d'induire la méthylation d'au moins un élément de réponse de AhR. Et dans un deuxième temps, que H2A.Z protégeait le promoteur de *CYP1A1* de la méthylation de l'ADN. En tant que premier auteur de ce manuscrit, j'ai contribué de façon majeure à l'initiation du projet, à la mise au point des différents outils et techniques et aux résultats présentés dans les figures de l'article. J'ai aussi participé à l'écriture du manuscrit et à la préparation des figures. Ce manuscrit est soumis à *EMBO Journal*.

**Variant Histone H2A.Z Can Selectively Mediate Dioxin Receptor Gene  
Expression by Antagonizing Estrogen Signaling**

*Maud Marques, Liette Laflamme, and Luc Gaudreau\**

Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,  
Québec J1K 2R1, Canada

\*Corresponding author. Tel.: (819) 821-8000 ext. 62081; Fax: (819) 821-8049; E-mail:  
[Luc.Gaudreau@USherbrooke.ca](mailto:Luc.Gaudreau@USherbrooke.ca)

Running title:

## Abstract

Selective inhibitory crosstalk has been known to occur within the signaling pathways of the dioxin (AhR) and estrogen (ER $\alpha$ ) receptors. More specifically, ER $\alpha$  represses a cytochrome P450-encoding gene (*CYP1A1*) that converts cellular estradiol into a metabolite that inhibits the cell cycle, while it has no effect on a P450-encoding gene (*CYP1B1*) that converts estradiol into a genotoxic product. Here we show that ER $\alpha$  represses *CYP1A1* by targeting the Dnmt3B DNA methyltransferase and concomitant DNA methylation of the promoter. Importantly, we find that histone H2A.Z contributes to *CYP1A1* gene expression by antagonizing ER $\alpha$ -mediated repression, possibly by preventing DNA methylation. Taken together, our results provide a framework for how ER $\alpha$  can repress transcription, and how that impinges on the production of an enzyme that generates genotoxic estradiol metabolites, and potential breast cancer progression. Finally, our results reveal a new mechanism for how H2A.Z can positively influence gene expression, which is by directly antagonizing DNA methylation in human cells.

Keywords : DNA methylation; H2A.Z; transcription

## Introduction

Breast cancer is the major type of cancer that affects women worldwide (<http://globocan.iarc.fr/>). One of the well known risk factor involved in the development of mammary tumors is estrogen. The carcinogenic effect of this hormone has several documented modes of action, one of those is through the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). ER $\alpha$  is a transcriptional regulator that belongs to the nuclear receptor family, which regulates the expression of genes involved in cellular proliferation in response to estrogen (Altucci et al., 1996; Dubik et al., 1987). As a transcriptional activator, ER $\alpha$  is able to recruit many cofactors, such as general transcription factors, histones modifying enzymes, and ATP-dependent remodeling complexes (Metivier et al., 2003). ER $\alpha$  has also been shown to negatively regulate gene expression but not much is currently know on how it can achieve this (Gevry et al., 2009). A second mode of action by which ER $\alpha$  can promote breast carconogenesis is through the formation of metabolites that possess mutagenic properties. A part of estrogen metabolim is mediated by Phase I metabolizing enzymes such as CYP1A1 and CYP1B1. CYP1A1 and CYP1B1 convert 17 $\beta$ -estradiol into 2-hydroxy-estradiol (2-OHE<sub>2</sub>) and 4-hydroxy-estradiol (4-OHE<sub>2</sub>), respectively (Martucci and Fishman, 1993; Tsuchiya et al., 2005). Numerous studies have shown that 4-OHE<sub>2</sub> possess more deleterious effects than 2-OHE<sub>2</sub> (Liehr et al., 1986; Liehr and Ricci, 1996; Newbold and Liehr, 2000; Yager and Liehr, 1996). Importantly, a study suggests a critical role of the CYP1B1/CYP1A1 ratio in mammary carcinogenesis (Coumoul et al., 2001). The major transcription factor involved in *CYP1* gene expression is the Aryl hydrocarbon Receptor, or dioxin receptor (AhR). AhR is a ligand activated molecule that belongs to the basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) family of proteins (Hankinson, 1995). Pollutants such as halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are well characterized AhR ligands (Poland and Knutson, 1982). Briefly, AhR is sequestered into the cytoplasm, after ligand binding, it is translocated into the nucleus where it heterodimerizes with Arnt, and binds to Xenobotic Response Elements (XREs). It is also known that ER $\alpha$  is involved in a two-way inhibitory crosstalk with the AhR. Interestingly, ER $\alpha$  selectively represses *CYP1A1*



but not *CYP1B1* (Bjeldanes et al., 1991; Kharat and Saatcioglu, 1996; Kietz et al., 2009). Numerous mechanisms have been proposed to explain how AhR represses transcription of ER $\alpha$  regulated genes (Krishnan et al., 1995; Kumar and Perdew, 1999; Kumar et al., 1999; Nguyen et al., 1999; Ohtake et al., 2007) but little is known about how ER $\alpha$  inhibits the AhR target gene, *CYP1A1*.

Our laboratory has previously investigated the role of histone variant H2A.Z and the p400 complex in ER $\alpha$ -mediated target gene expression (Gevry et al., 2009). H2A.Z is a very well conserved histone variant, and it has been implicated in the regulation of gene expression in many organisms from yeast to human cells (Gevry et al., 2007; Gevry et al., 2009; Meneghini et al., 2003). In mammalian cells, H2A.Z is predominantly localized in a region that surrounds the transcriptional start site (TSS) of genes, as well as distal regulatory elements (Barski et al., 2007). H2A.Z binding to these regulatory regions positively correlates with the presence of RNA polymerase II - whether active or inactive - in human cells (Hardy et al., 2009). A hint for how H2A.Z may modulate gene expression emerged from studies in our laboratory (Gevry et al., 2009; Guillemette et al., 2005). Our observations suggest that incorporation of H2A.Z within specific chromatin loci may allow 'regulatory' nucleosomes to adopt a stable preferred position along the translational axis of DNA, which could either favor or disfavor the recruitment of components of the transcriptional machinery to nucleosome-embedded DNA (see (Marques et al., 2010), for a more elaborate discussion of the subject). Another hint as to how H2A.Z contributes to regulate gene expression comes from recent studies that have shown that the presence of H2A.Z within regulatory regions, and DNA methylation are mutually antagonistic marks in plants and in mammals (Conerly et al., 2010; Zemach et al., 2010; Zilberman et al., 2008). However, how H2A.Z is able to exclude DNA methylation - or vice versa - remains to be elucidated.

In this study, we investigate the mechanism of repression of *CYP1A1* by ER $\alpha$  and the role of H2A.Z in that process. We observe that H2A.Z depletion, or ER $\alpha$  recruitment to

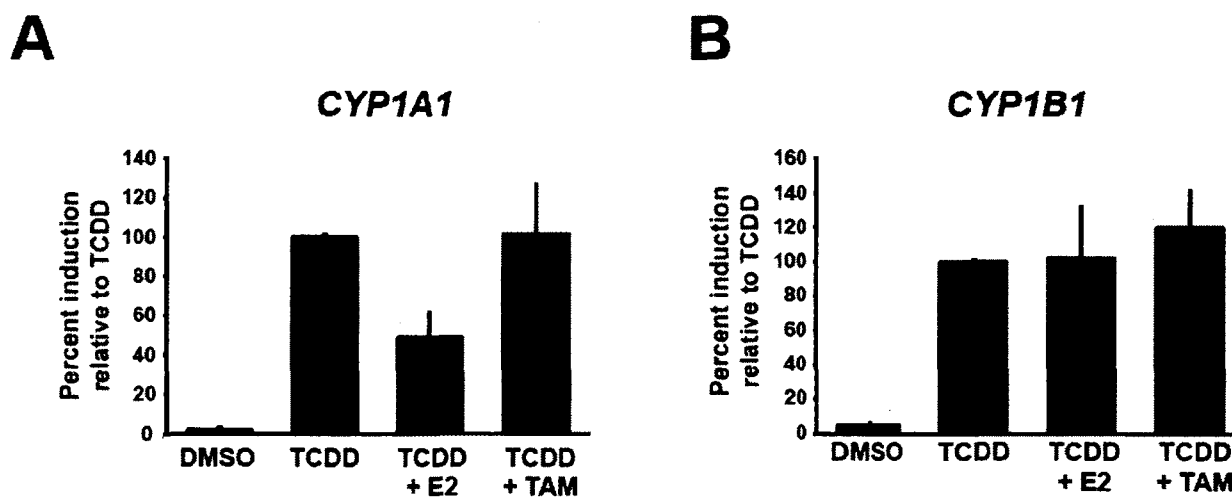
the *CYP1A1* proximal promoter region, impairs AhR binding. We also find that inhibition of DNA methylation with 5-azacytidine, or by cellular depletion of Dnmt3B, restores *CYP1A1* expression levels in the presence of ER $\alpha$ . Furthermore, we show that ER $\alpha$  is able to interact directly with Dnmt3B. Importantly, depletion of H2A.Z allows us to observe an increase in DNA methylation at the *CYP1A1* promoter region. Taken together, our results propose a novel unexpected mechanism of repression of *CYP1A1* by ER $\alpha$  and a link between H2A.Z and DNA methylation in human cells.

## Results

### ER $\alpha$ specifically represses *CYP1A1* but not *CYP1B1*

As ER $\alpha$  was previously shown to contribute to *CYP1A1* and *CYP1B1* gene expression, we decided to investigate how ER $\alpha$  affects *CYP1A1* and *CYP1B1* induction by TCDD in the MCF7 breast cancer cell line. To test this, we measured *CYP* genes expression by RT-qPCR from MCF7 cells RNA grown in estrogen free media during three days and then treated them with TCDD either alone or in combination with estradiol (E2) for 24h. We observed that ER $\alpha$  specifically repress *CYP1A1* in presence of E2 (Fig. 2.1A) and has no effect on *CYP1B1* induction (Fig. 2.1B). Tamoxifen (TAM), an E2 competitor that prevents ER $\alpha$  from recruiting coactivators and also used in breast cancer hormone therapy (Bernstein et al., 1999), was used here to assess whether the repression effect of *CYP1A1* was specific to E2 or not. To answer this, we have treated MCF7 cells grown in estrogen free media with a combination of TCDD and TAM for 24 h. We observed that contrary to E2 treatment TAM has no effect on *CYP1A1* induction (Fig. 2.1A). To ensure that the repression of *CYP1A1* was due to ER $\alpha$  and not E2 itself, we carried out the same experiment than previously described plus we treated the cells with ICI 182.720 (a specific pharmacological inhibitor of ER $\alpha$ ) for 24 h prior to TCDD and TCDD+E2

treatments (see supplementary figure 2.1 A and B). We observe that in the absence of ER $\alpha$  addition of E2 has no significant effect on *CYP1A1* induction by TCDD. Moreover, ICI 182.720 treatment appears to globally increase *CYP1A1* and *CYP1B1* basal and induced levels of gene transcription. Altogether, our results show that ER $\alpha$  specifically represses *CYP1A1* in an E2-dependant manner in MCF7 cells.



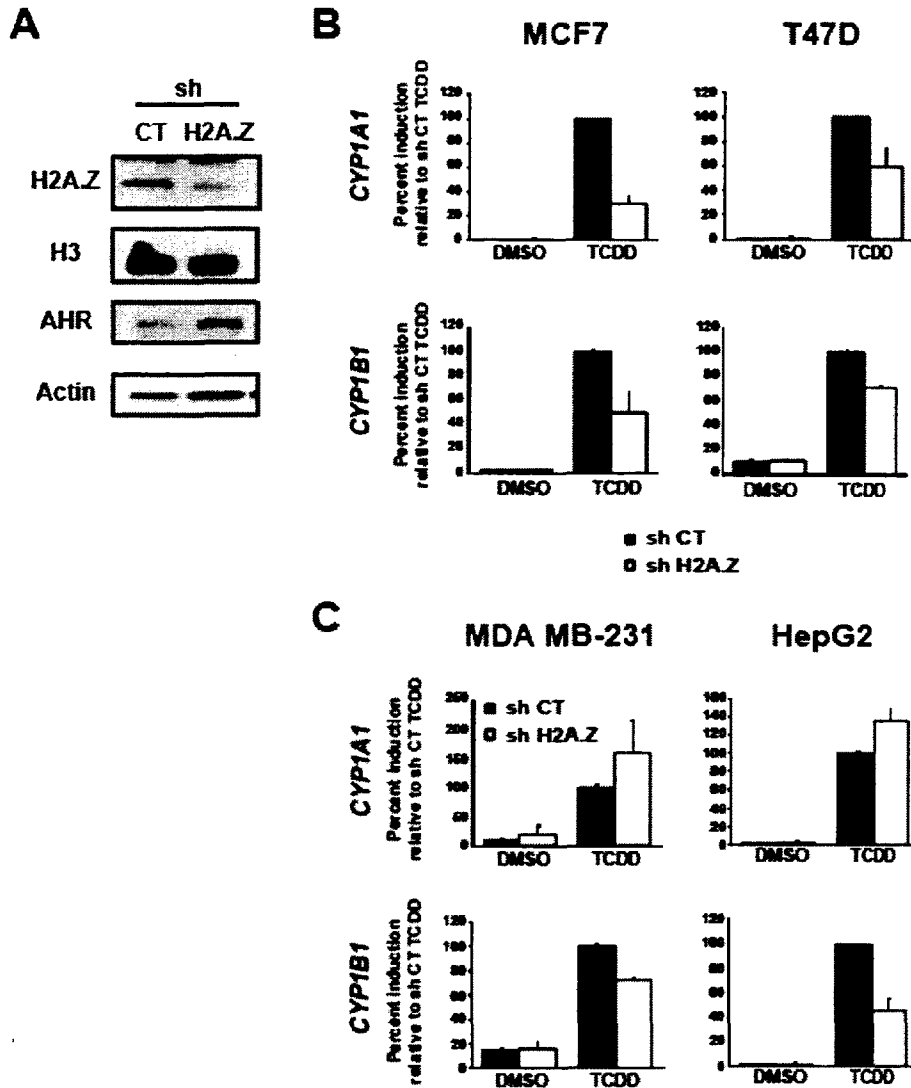
**Figure 2.1: ER $\alpha$  specifically represses *CYP1A1* expression in MCF7 cells.**

*CYP1A1* (A) and *CYP1B1* (B) mRNA levels were quantified in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days, and then treated with DMSO, 10nM TCDD, 10nM TCDD+ 100nM E2 or 10nM TCDD+ 500nM TAM for 24h.

### **H2A.Z depletion impairs AhR-mediated activation in ER $\alpha$ positive cell lines**

Since we have previously demonstrated that H2A.Z is an important positive regulator of ER $\alpha$  signaling, we wanted to investigate how depletion of H2A.Z would impact on TCDD-induced *CYP* gene expression in ER $\alpha$  positive cells compared to ER $\alpha$  negative cells. In order to test this, we depleted H2A.Z in MCF7 and T47D cell lines (ER $\alpha$  positive), and in MDA MB-231 and HepG2 cell lines (ER $\alpha$  negative) using a lentiviral

shRNA construct directed to H2A.Z (Gévry 2009). Figure 2.2A shows that the H2A.Z shRNA construct is efficient at specifically depleting H2A.Z levels. Figure 2.2B shows that TCDD treatment, as expected, strongly induces both *CYP* genes. Interestingly, knockdown of H2A.Z significantly impairs TCDD-mediated induction of both *CYP1A1* and *CYP1B1* in ER $\alpha$  positive cell lines, and particularly in MCF7 cells. To our surprise, the results of Figure 2.2C show that in both ER $\alpha$  negative cell lines, knockdown of H2A.Z does not impair the induction potential of *CYP1A1*, while it still appears to affect induction of *CYP1B1*. Taken together, these results show that H2A.Z is involved in *CYP1A1* and *CYP1B1* gene expression, but its apparent contribution in regulation appears to differ between the two genes.



**Figure 2.2: H2A.Z depletion impairs AhR-mediated activation in ER $\alpha$  positive cell lines.**

(A) MCF7 cells were infected with sh CT or sh H2A.Z construct for 5 days, then protein extraction and western blot were performed. Analysis of *CYP1A1* and *CYP1B1* expression was performed in ER $\alpha$  positive cell lines (B) or in ER $\alpha$  negative cell lines (C). The different cell lines were infected with shCT or shH2A.Z constructs for 5 days and, then treated with 10nM TCDD for 24h.

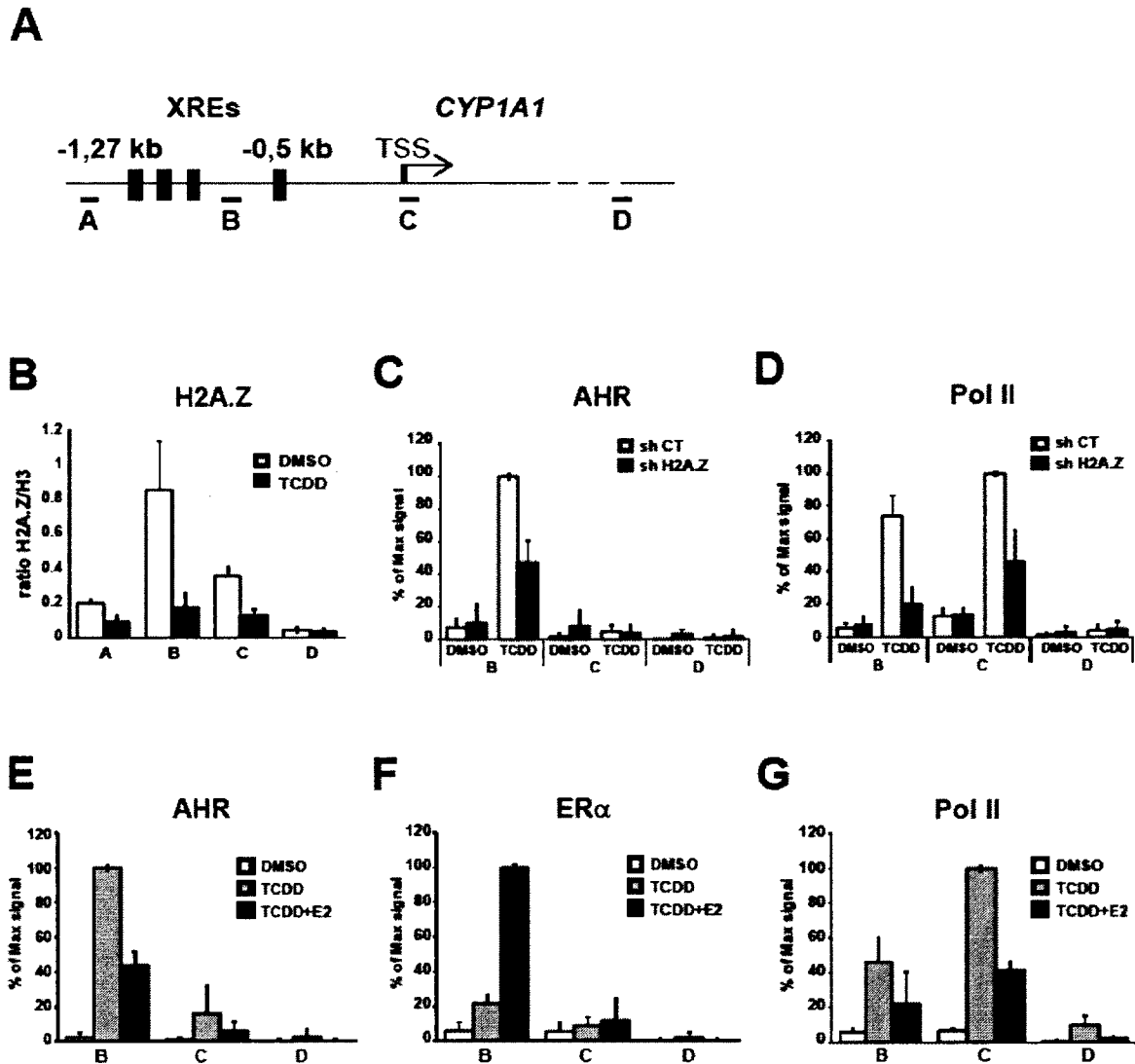
## **ER $\alpha$ -mediated repression of *CYP1A1*, as well as depletion of H2A.Z, reduce AhR binding to the promoter region**

The effect of H2A.Z depletion on *CYP1A1* expression lead us to ask if H2A.Z was associated to the *CYP1A1* promoter, and to further test whether its presence is required to allow full recruitment of AhR and RNA polII. Figure 2.3B depicts a ChIP experiment in MCF7 cells using H2A.Z antibodies. The results show that H2A.Z is enriched at the *CYP1A1* XRE's under uninduced conditions whereas binding is significantly reduced upon induction of the gene by TCDD. Next, we depleted H2A.Z in untreated and TCDD-treated cells to score for AhR and RNA polII binding at the *CYP1A1* promoter. The results of Figure 2.3C and 2.3D show that recruitment of both AhR and RNA polII are significantly impaired upon knockdown of H2A.Z. Surprisingly, depletion of H2A.Z has no effect on AhR binding at the *CYP1B1* promoter. This result support our previous observation that the role of H2A.Z in the regulation of these two genes is different (see supplementary figure 2.2B).

In order to gain insight into how ER $\alpha$  mediates repression of *CYP1A1*, we carried out several ChIP experiments to the promoter region of that gene using antibodies raised against AhR, ER $\alpha$ , and RNA polII. In a first set of experiments, we monitored AhR binding upon ER $\alpha$ -mediated repressive conditions. The results of Figure 2.3E show that, as expected, AhR efficiently binds the *CYP1A1* XRE's when cells are treated with TCDD in estrogen-depleted culture medium. However, upon conditions where estradiol is added, we observe a significant decrease in AhR binding, which is concomitant with a significant increase in ER $\alpha$  recruitment (Fig. 2.3F). Predictively, RNA polII levels also significantly decrease upon addition of estradiol (Fig. 2.3G). We reproduce the same kind of result in MCF7 cells grown in complete medium treated with ICI 182.720 for 24h before TCDD addition (Figs. S2.1C and S2.1D). Thus, we observe that the depletion of ER $\alpha$  promotes an increase in AhR binding at the *CYP1A1* XRE's upon TCDD treatment.

Next, we wanted to verify whether recruitment of ER $\alpha$  to *CYP1B1* would also affect AhR and RNA polII binding. The results show that while ER $\alpha$  is efficiently recruited to the *CYP1B1* XRE's upon treatment of MCF7 cells with both TCDD and E2 (see supplementary figure 2.2 (S2.2) E), it does not appear to influence the ability of AhR and RNA polII to be recruited (Figs. S2C and S2D). Consequently, these results support the expression data we have obtained in the figure 2.1 and confirm the absence of ER $\alpha$  effect on *CYP1B1* induction contrary to what is observed for *CYP1A1*.

Taken together our results show that whatever the mechanism by which ER $\alpha$  represses *CYP1A1*, it actually results in reduced binding of the AhR activator. Moreover, H2A.Z is required for efficient binding of AhR and RNA polII (and potentially the entire transcriptional machinery) at the *CYP1A1* promoter.



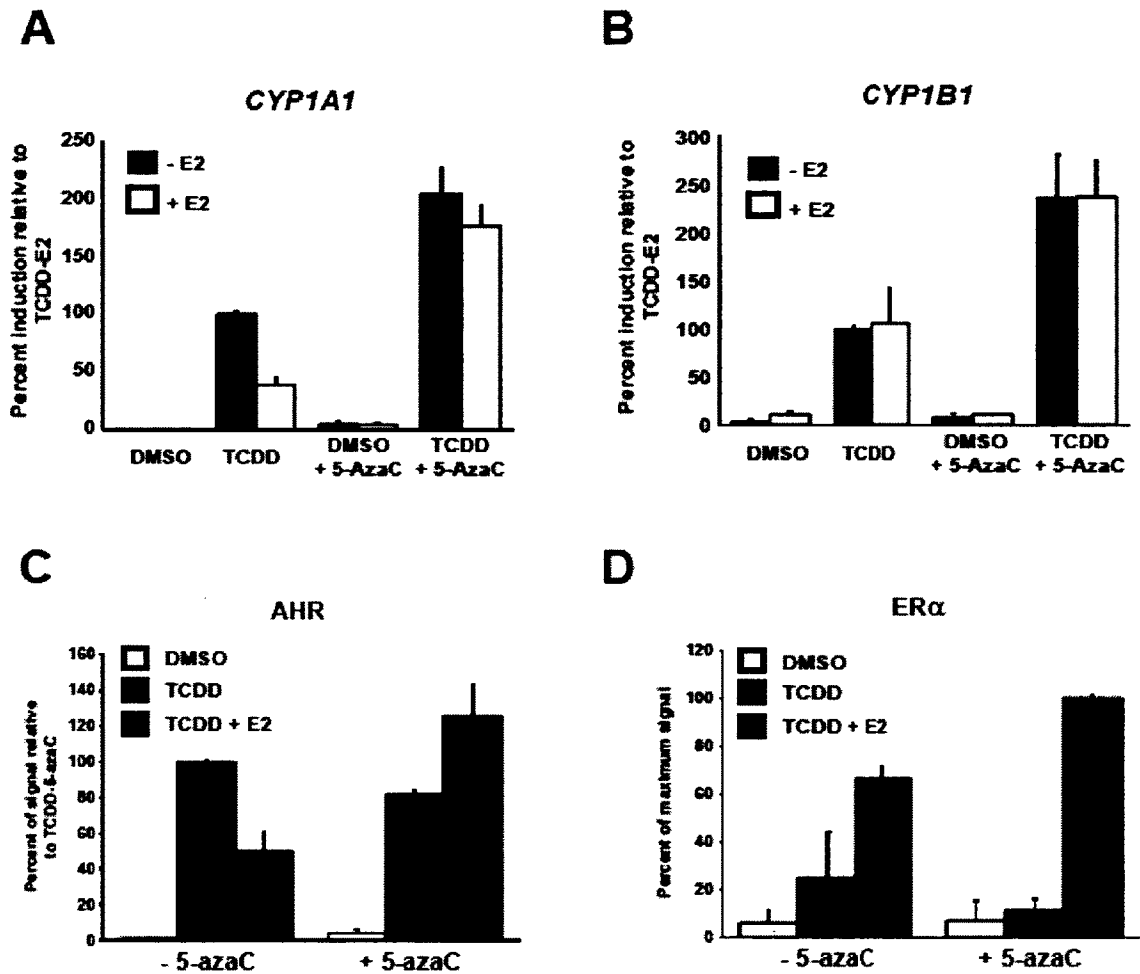
**Figure 2.3: AhR binding at the *CYP1A1* promoter is impaired in H2A.Z-depleted cells OR in the presence of E2.**

(A) Schematic representation of the *CYP1A1* promoter and primer positions. (B) ChIP of H2A.Z were performed in MCF7 cells treated or not with 10nM TCDD during 90min. ChIPs of AHR (C) and RNA polymerase II (D) were performed in MCF7 cells infected with shCT or shH2A.Z constructs for 5 days and, then treated or not with 10nM TCDD during 90min. ChIPs of AHR (E), ER $\alpha$  (F) and RNA polymerase II (G) were performed in MCF7 cells grown in estrogen-free medium for 3 days, then treated with DMSO, 10nM TCDD or 10nM TCDD+100nM E2 for 90 min.



## **Inhibition of *de novo* DNA methylation reverses the repressive effect of ER $\alpha$ on dioxin-induced *CYP1A1* gene expression**

Previous reports have shown that AhR binding to its cognate XRE sequences was significantly reduced when these binding sites were methylated *in vitro* (Shen and Whitlock, 1989) and *in vivo* (Okino et al., 2006). Because we observe that AhR binding is affected upon ER $\alpha$ -mediated repression of *CYP1A1*, we wished to verify whether inhibiting *de novo* DNA methylation could alleviate repression by ER $\alpha$ . To achieve this we made use of 5-azacytidine (5-azaC), a cytosine analogue that promotes DNMTs inactivation (Santi et al., 1984). Thus, we added 5-azaC to cultured MCF7 cells grown in the absence of estradiol, and *CYP1A1* expression was monitored by qRT-PCR after treatment with TCDD alone or in combination with E2 for 24h. The results of Figure 2.4A first show that E2 significantly inhibits *CYP1A1* expression, while addition of 5-azaC almost completely reverses ER $\alpha$ -mediated repression. Moreover, 5-azaC actually appears to globally increase *CYP1A1* expression. When a similar experiment is performed at *CYP1B1* we observe more global expression of the gene but no effect specific to ER $\alpha$  (Fig. 2.4B). Next, we wanted to verify how 5-azaC would influence AhR binding after treating cells with both TCDD and E2. Recall, as shown in Fig. 2.3, ER $\alpha$ -mediated repression of *CYP1A1* appears to displace AhR from its target XRE's. Thus, Fig. 2.4C shows that, as expected, in the absence of 5-azaC, E2 treatment of cells reduces AhR binding to the *CYP1A1* XRE's upon TCDD-mediated activation of the gene. Importantly however, in the presence of 5-azaC, AhR levels remain unaffected when cells are treated with both E2 and TCDD. Finally, we also monitored the presence of ER $\alpha$  under the same conditions in the presence or absence of 5-azaC and the results show that the levels of ER $\alpha$  are not diminished in the presence of 5-aza and E2 (Fig. 2.4D). Taken together, these results suggest that ER $\alpha$  may mediate *CYP1A1* repression by virtue of DNA methylation.



**Figure 2.4: Inhibition of DNA methylation restores full induction of *CYP1A1* and AhR binding at the *CYP1A1* promoter in presence of E2.**

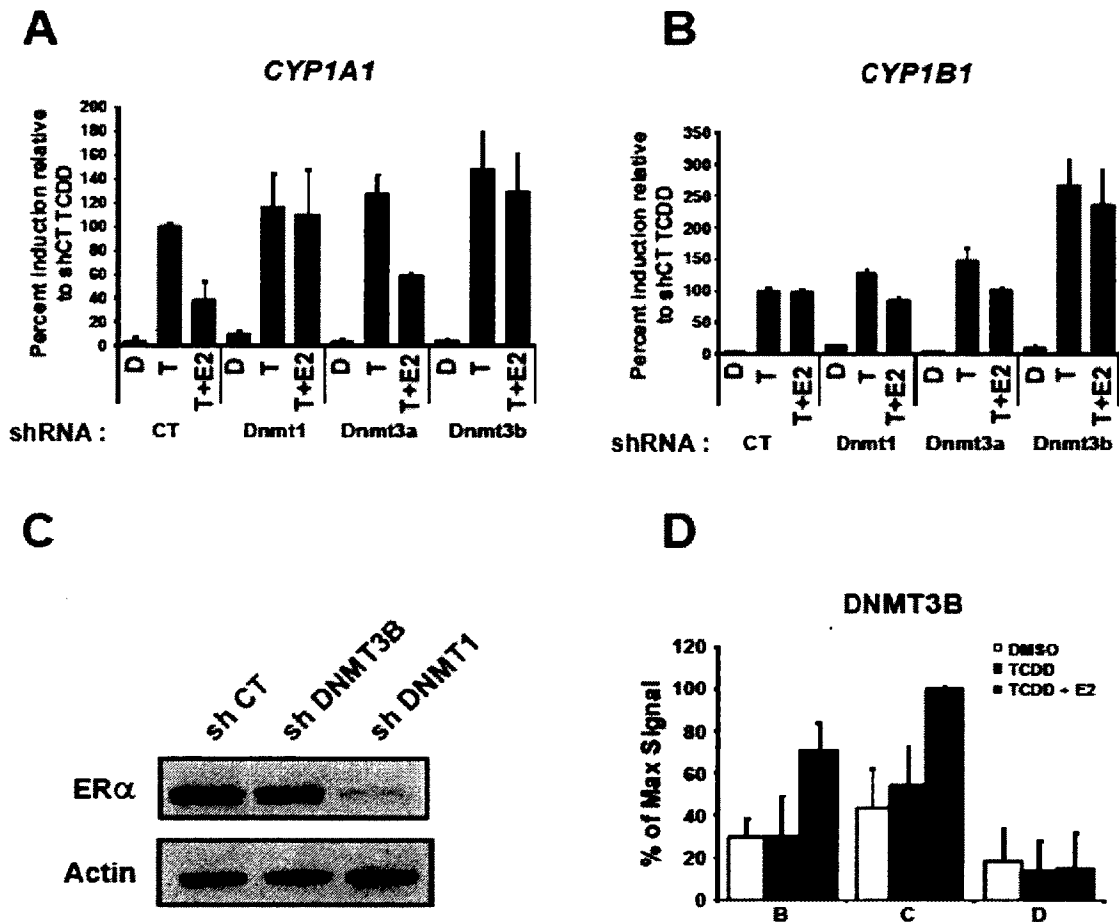
*CYP1A1* (A) and *CYP1B1* (B) mRNA levels were quantified in MCF7 cells treated with 10uM 5-azacytidine for 5 days and grown in estrogen-free medium for 3 days, then treated with 10nM TCDD or 10nM TCDD + 100nM E2 during 24h. ChIP's of AhR (C) and ERα (D) were performed in MCF7 cells treated with 10uM 5-azacytidine for 5 days and grown in estrogen-free medium for 3 days, then treated with 10nM TCDD or 10nM TCDD + 100nM E2 for 90 min. Primer B was used for the qPCR analysis.

## **Dnmt3B is involved in ER $\alpha$ -mediated repression of *CYP1A1***

Since the experiments using 5-azaC revealed that DNA methylation was important for ER $\alpha$ -mediated repression of *CYP1A1*, the next logical step was to directly determine if DNA methyltransferases (e.g. Dnmt1, Dnmt3A, and Dnmt3B) would be involved in repression of *CYP1A1*. To test this, we engineered lentivirus-expressed shRNA constructs directed to all three DNA methyltransferases. Supplementary Figure 2.3 shows immunoblotting experiments that reveal the efficiency of our shRNA constructs in depleting cellular levels of Dnmt proteins in MCF7 cells. Thus, we used selected shRNA constructs in cells grown either in the presence or absence of TCDD and E2, and qRT-PCR assays were performed to monitor *CYP* gene expression. The results of Figure 2.5A first show that, as usual, ER $\alpha$  is able to efficiently repress TCDD-induced *CYP1A1*, but knockdown of either Dnmt1 or Dnmt3B alleviates that repression, while knockdown of Dnmt3A has no effect. When similar experiments were performed at *CYP1B1*, no significant effect was observed, except that knockdown of Dnmt3B appears to globally increase the expression of the gene, but no effect specific to ER $\alpha$ . As a control, we wished to investigate if cellular depletion of the Dnmt1 and Dnmt3B DNA methyltransferases would have any effect on ER $\alpha$  expression itself, a result that could account for derepressing *CYP1A1*. Importantly immunoblotting experiments show that knockdown of Dnmt3B has no effect on ER $\alpha$  expression, while knockdown of Dnmt1 significantly reduces ER $\alpha$  expression (Fig. 2.5C). While this result does not completely rule out a potential role for Dnmt1 in mediating repression at *CYP1A1*, it certainly complicates further investigations. We have thus pursued our investigations only with Dnmt3B for our studies. A clear prediction of the aforementioned results is that Dnmt3B should be associated to *CYP1A1* upon treatment of cells with E2. We thus performed ChIP experiments using an anti-Dnmt3B antibody to test this. Figure 2.5D shows that no significant levels of Dnmt3B can be observed at the *CYP1A1* XRE's in the absence of E2, whereas there is a significant increase in Dnmt3B recruitment upon treatment of cells with E2. These results may then imply that ER $\alpha$  directly recruits Dnmt3B to *CYP1A1* in

order to effect repression of that gene. In line with this possibility, we have been able to detect direct protein-protein interactions between the ER $\alpha$  and Dnmt3B (see Supplementary Figure 2.4).

Taken together, our results suggest that Dnmt3B functions downstream of ER $\alpha$  to mediate repression of TCDD-induced *CYP1A1* but not *CYP1B1*, and that ER $\alpha$  might directly recruit Dnmt3B in that process.



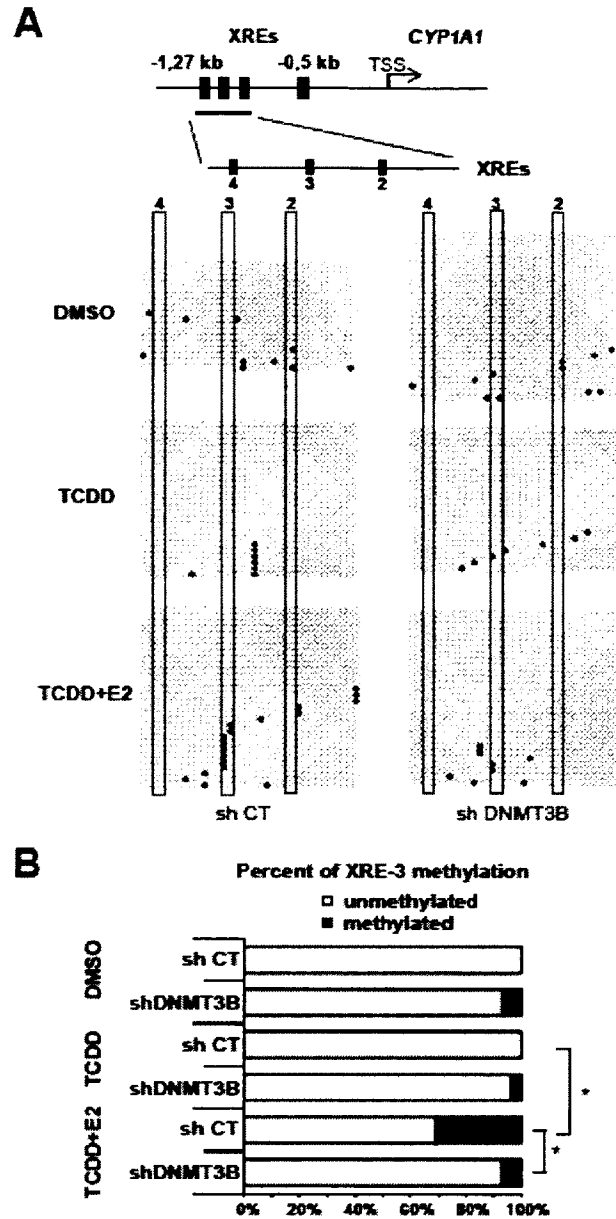
**Figure 2.5: ER $\alpha$  cannot repress *CYP1A1* induction in DNMT3B-depleted cells.**

*CYP1A1* (A) and *CYP1B1* (B) expression was measured in MCF7 cells infected with shCT, shDnmt1, shDnmt3a or shDnmt3b constructs for 5 days and then treated with 10nM TCDD or 10nM TCDD + 100nM E2 for 24h. (C) MCF7 cells were infected with

shCT, shDnmt1, and shDnmt3b constructs for 5 days, and then proteins were extracted and Western blot performed to verify ER $\alpha$  proteins level. Actin is used as loading control. ChIP of DNMT3B (D) was performed in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days, and then treated with DMSO, TCDD or TCDD+E2 for 90min.

### **ER $\alpha$ -Dnmt3B direct a specific methylation pattern at the *CYP1A1* promoter**

Since Dnmt3B is essential to mediate ER $\alpha$ -directed repression of *CYP1A1*, we wanted to monitor how its presence at *CYP1A1* could potentially influence the methylation pattern of the proximal promoter region (see Fig. 2.6A). We chose to investigate that particular region of the gene because that is where we observe a decrease in AhR binding upon ER $\alpha$ -mediated repression. In order to investigate this, we performed bisulfite sequencing on genomic DNA extract from MCF7 cells grown either in the presence or absence of E2 and TCDD, and with or without an shRNA directed to Dnmt3B. Figure 2.6A shows bisulfite sequencing data obtained, and figure 2.6B shows a summary of the percent levels of methylation only at the *CYP1A1* XRE3. Two significant observations can be made: 1) addition of E2 to MCF7 cells increases DNA methylation at XRE3; 2) knockdown of Dnmt3B greatly decreases E2-mediated methylation of XRE3. Taken together these results suggest that while no gross changes in DNA methylation levels are observed at the *CYP1A1* promoter when cells are treated with E2 (see Figure 2.6A), ER $\alpha$ /Dnmt3B appear to direct a specific methylation pattern at XRE3 which is essential to mediate repression of *CYP1A1*.

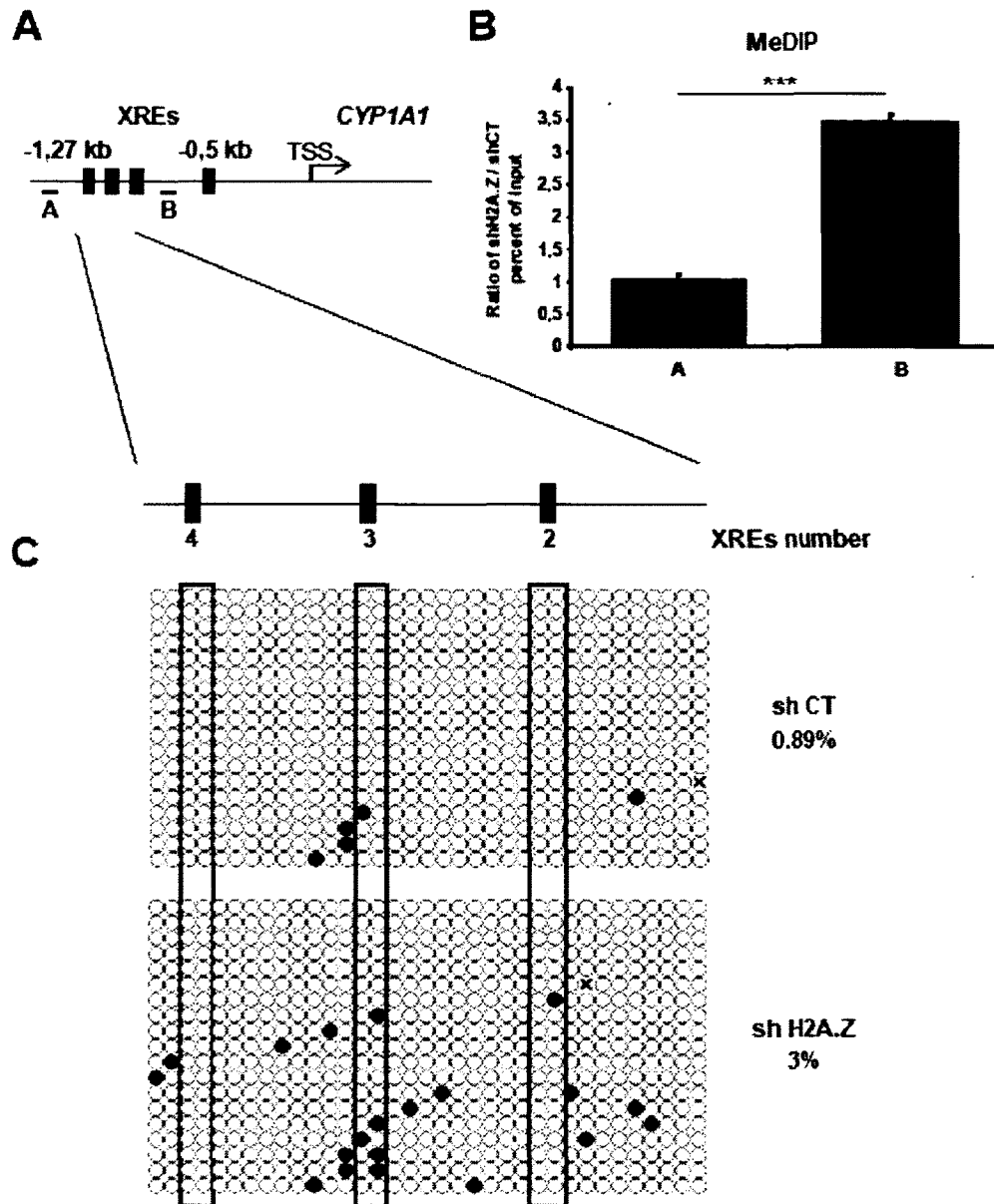


**Figure 2.6: ER $\alpha$  induces DNA methylation at the XRE-3 of the CYP1A1 promoter.**

(A) Schematic representation of the *CYP1A1* promoter and XRE positions. Bisulfite sequencing was performed in MCF7 cells infected with shCT or shDNMT3B constructs, grown in estrogen free media for 3 days and treated with DMSO, TCDD or TCDD+E2 for 24h. XRE are numeroted relatively to their positions from the TSS of *CYP1A1*, and each red rectangle represents one XRE. White circle represents unmethylated CpG and black circle represents methylated CpG. (B) Graphical representation of the percentage of unmethylated and methylated CpGs in XRE-3 (\*p < 0.05).

## **H2A.Z antagonizes DNA methylation at the *CYP1A1* proximal promoter**

Because H2A.Z is important for AhR to bind its cognate XRE's under repressive conditions (Fig.2.2), we wanted to verify if the histone variant could directly regulate DNA methylation levels at the *CYP1A1* promoter. This notion is supported by the fact that the presence of H2A.Z at gene regulatory regions has been found to be mutually exclusive to DNA methylation in plants (Zemach et al., 2010; Zilberman et al., 2008) and in rodents (Conerly et al., 2010). As a first approach, we investigated DNA methylation levels at the entire *CYP1A1* promoter by bisulfite sequencing (supplementary figure 2.5). We observed that most of the promoter is unmethylated except for two regions (E and F) that are localized upstream the XRE4. Next, we have performed a methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) in MCF7 cells grown in complete medium that expressed either a control shRNA (CT) construct or an shRNA directed to H2A.Z. The MeDIP experiments makes use of an antibody that specifically recognizes methylated DNA. Thus, figure 2.7A shows the two amplicons (A and B) that we used for the MeDIP qPCR analysis. The A amplicon is located in the methylated region and is devoid in H2A.Z. On the other hand, the B amplicon is in an unmethylated region, and it is strongly enriched in H2A.Z. The results of Figure 2.7B represent a ratio of immunoprecipitated methylated DNA from cells depleted for H2A.Z over control cells (i.e. using a scrambled shRNA construct), thus a representation of *de novo* methylation at these loci in the absence of the histone variant. Strikingly, we observe that the absence of H2A.Z at amplicon B significantly increases DNA methylation levels of about 3.5 fold, whereas no significant increase is observed at amplicon A. We next wanted to substantiate this finding by using bisulfite sequencing of XRE's 2-4 under the same conditions as Figure 2.7B. Consistently, the results show that absence of H2A.Z also globally increases DNA methylation in that area (Fig. 2.6C). Taken together, our results suggest that the presence of H2A.Z can exclude DNA methylation at the *CYP1A1* proximal xenobiotic response elements, and by such favors AhR binding upon inducing conditions of the gene.



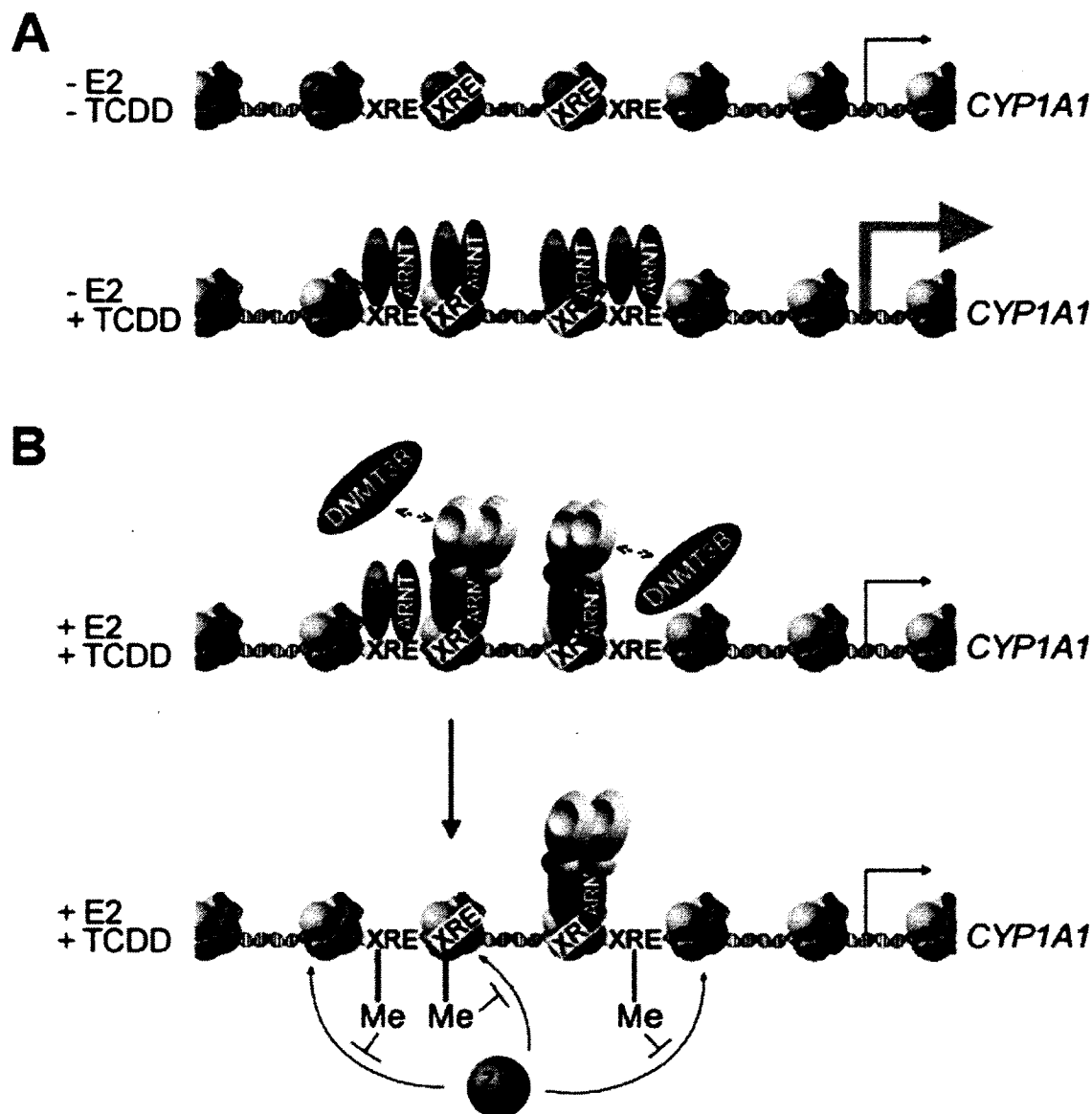
**Figure 2.7: H2A.Z depletion promotes DNA methylation at the *CYP1A1* promoter.**

(A) Schematic representation of the *CYP1A1* promoter and primer positions. (B) Methylated DNA immunoprecipitation was performed in MCF7 cells infected with shCT or shH2A.Z constructs for 5 days. (C) Bisulfite sequencing were performed in MCF7 cells infected with shCT or shH2A.Z constructs and grown in DMEM 10% FBS for 5 days. White circle represents unmethylated CpG and black circle represents methylated CpG.



## Discussion

Carcinogenesis is a multistep process, and in breast cancer, estrogen and ER $\alpha$  are critical players in the initiation and progression stages. In breast tissues, maintenance of a high CYP1A1/CYP1B1 enzyme ratio ensures that intracellular levels of 2-OHE2 are high and levels of 4-OHE2 are low. However, in cancer cells and tumors, elevated concentrations of 4-OHE2 are predominant as compared to normal tissues, and these observations are correlated with a higher expression of *CYP1B1*. In this study, we propose a new mechanism for how ER $\alpha$  could promote breast tumorigenesis by differentially regulating the expression of enzymes involved in estrogen metabolism. Indeed, other laboratories have previously observed specific repression of *CYP1A1* by ER $\alpha$  without affecting *CYP1B1* expression (Kharat et Saatcioglu, 1996; Kietz et al., 2009). Most mechanistic studies on ER $\alpha$  have focussed on its positive role in gene transcription, but less is known about how it represses transcription, as well as which cofactors are involved in this repression process. We thus propose a model in which, in the absence of estradiol and following TCDD treatment, ER $\alpha$  is not associated to the promoter and maximal AhR binding is achieved, thus allowing *CYP1A1* transcription to maximal levels (Figure 2.8A). In the presence of estradiol and TCDD, ER $\alpha$ , by virtue of its interaction with AhR-Arnt, is recruited to the *CYP1A1* promoter. ER $\alpha$  is able to recruit Dnmt3B, which promotes DNA methylation of the AhR response elements. Methylation of specific *CYP1A1* XRE's impairs AhR binding, and consequently decreases *CYP1A1* induction (Figure 2.8B). In our model, the presence of E2 and TCDD are both necessary for ER $\alpha$  recruitment to the *CYP1A1* promoter. We hypothesize that increase DNA methylation level at *CYP1A1* XREs can impair H2A.Z incorporation at the end of the activation. Taken together, we describe a novel mechanism effected by ER $\alpha$  to repress transcription of an AhR target gene. It remains to be determined however if Dnmt3B is also involved in the inhibition of other genes that are repressed by ER $\alpha$ .



**Figure 2.8: Proposed model for *CYP1A1* gene regulation by AhR and ER $\alpha$ .**

(A) In the absence of estradiol, when TCDD is added in the media, AhR/Arnt bind the Xenobiotic Response Elements (XREs) located in the *CYP1A1* promoter. At the same time, the histone variant H2A.Z is removed from the XREs. (B) In the presence of estradiol, ER $\alpha$  displaces AhR/Arnt by promoting DNA methylation on the XREs of the *CYP1A1* promoter, thus resulting in less AhR activating surfaces available to stimulate *CYP1A1* expression.

Changes in DNA methylation patterns are frequently observed in cancer cells when compared to normal cells (Irizarry et al., 2009). Despite hypermethylation of tumor suppressor gene promoters (Esteller et al., 2000; Merlo et al., 1995), global 5-methylcytosine content is decreased in tumor cells (Wilson et al., 2007). This global hypomethylation observed in cancer cells can be explained by a drastic decrease of DNA methylation in repeated sequences such as LINEs and SINEs, which would then result to an increase in genome instability caused by recombination or displacement of these sequences. This phenomenon is indeed observed in 50% of breast cancer cases documented by Girault et al. (Girault et al., 2003) who analyzed the expression of each *DNMT* gene (*DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*) in breast carcinomas isolated from 130 patients. Dnmt3B was shown to be overexpressed in 30% of the tumors, and the authors proposed that Dnmt3B may play a predominant role over Dnmt3A and Dnmt1 in breast carcinogenesis. Interestingly, Dnmt3B possesses numerous splice variants that are differentially expressed in normal and cancer cell lines (Ostler et al., 2007). One of these variants, Dnmt3B7, is able to significantly change DNA methylation patterns when expressed to high levels (Ostler et al., 2007). Whether each of the Dnmt3B isoforms is capable of interacting with ER $\alpha$  and mediate repression of *CYP1A1* expression (and potentially other genes repressed by ER $\alpha$ ) is a matter of further investigations. Variation in the expression level of Dnmt3B isoforms between breast cancer cell lines might explain, at least in part, why there are some discrepancies in the literature regarding the positive or negative role of ER $\alpha$  in *CYP1A1* expression.

Genome-wide studies have shown an enrichment of H2A.Z in promoters, enhancers, and insulators in numerous species (Barski et al., 2007; Guillemette et al., 2005; Hardy et al., 2009). However, little is known about the function of H2A.Z at these regions. In 2009 and 2010, the Henikoff and Zilberman laboratories have elegantly demonstrated an antagonistic relationship between H2A.Z and DNA methylation, first in *Arabidopsis thaliana* and fungi and animals (Zemach et al., 2010; Zilberman et al., 2008). It has been proposed that methylation is the default state of nucleosomal DNA and that unmethylated regions are protected from DNA methylation by histone modifications such as H3K4me,

or deposition of histone variant H2A.Z (Edwards et al., 2010). From these observations, we can hypothesize that the presence of H2A.Z could prevent DNA methylation at CpG islands located within regulatory regions, and thus protect those regions from silencing. A previous study also showed that removing DNA methylation by 5-azacytidine treatment quickly induces H2A.Z incorporation in a subset of genes in colon cancer cell lines (Yang et al., 2012). However, incorporation of H2A.Z within DNA was not sufficient to restore gene expression in that context. In our study, we demonstrate that depletion of H2A.Z leads to a 3.5 fold increase in DNA methylation of the *CYP1A1* promoter after only five days. We also show that the increase in DNA methylation induced by H2A.Z depletion impairs *CYP1A1* induction following TCDD treatment. However, we hypothesize that extended loss of H2A.Z could lead to a more important increase in DNA methylation than what we currently observe.

Taken together, our study unravels two new key players (H2A.Z and Dnmt3B) in the regulation of *CYP1A1* expression. These two factors play a crucial role in *de novo* DNA methylation establishment that is thought to be a major early event in the initiation of tumor formation. Methylation of the *CYP1A1* promoter is already associated with prostate and lung cancers (Okino et al., 2006; Tekpli et al.). It will be interesting to test if this observation is also true in mammary tumors and more generally to all hormone responding tissues.

## **Materials and methods**

### *Chemicals and Reagents*

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was obtained from Cerilliant. 17 $\beta$ -Estradiol (E2), 4-hydroxytamoxifen (TAM), 5-azacytosine, cycloheximide and ICI 182,780 were

purchased from Sigma-Aldrich. The shRNA directed against Dnmts and cloned in pLKO.1-puro lentiviral vector were bought from Sigma. The same Dnmts' targeting sequences were also cloned in pLVTHM lentiviral vector (Trono lab). All the other shRNAs were cloned in either pLKO.1-puro lentiviral vector or in pLVTHM lentiviral vector. Their targeting sequences were listed in Supplementary Table S1.

#### *Cell culture, lentiviral infection, and treatments*

All the cell lines (MCF7, MDA-MB-231, T47D and HepG2) were maintained in DMEM medium (Wisent) containing 10% fetal bovine serum (FBS, VWR) and antibiotics (Invitrogen). The cells were transduced with lentiviruses in the presence of polybrene (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h immediately following cell passage. On the 5<sup>th</sup> day following infections, the cells were treated with 10 nM TCDD for 90 min (ChIP experiments) or 24 h (RT-qPCR experiments). For estrogen-induction assays, cells were grown in phenol red-free DMEM medium (Wisent) containing 5% dextran-coated charcoal-treated fetal bovin serum and antibiotics for 3 days and then treated for 90 min or 24 h with 10 nM TCDD and/or 100 nM E2.

#### *RT-qPCR*

Human *CYP1A1* and *CYP1B1* mRNAs were quantified by RT-qPCR with 36B4 as an internal control. Total RNA was extracted from cultured cells using GenElute (sigma) and reverse transcribed using the M-MLV reverse transcriptase enzyme (Promega). The RT-qPCR primer sequences were listed in Supplementary Table S2.

### *ChIP assays*

ChIP assays were performed essentially as described previously (Gevry et al. 2007) using the antibodies listed in Supplementary Table S3. The recovered DNA was analyzed by qPCR using sets of primers relevant to the promoter regions of the *CYP1A1* and *CYP1B1* genes. The qPCR primers were listed in Supplementary Table S4. Results were shown as percent of maximum signal except for H2A.Z where results are normalized to H3 to account for nucleosome density.

### *MeDIP*

MeDIP experiments were performed as described previously (Sorensen and Collas, 2009). An amount of 5  $\mu\text{g}$  of DNA was immunoprecipitated with 10  $\mu\text{g}$  of monoclonal antibody against 5-methylcytidine (A-1014) from Eurogentec.

### *Bisulfite sequencing*

Genomic DNA was extracted as for the MeDIP experiment. For the bisulfite conversion, we used EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) on 2  $\mu\text{g}$  of DNA. Two rounds of PCR were performed with specific primers (see in Supplementary Table S4). PCR products were cloned in pGEM-T-easy vector (Promega). After transformation, 10 clones for each different experiment were sequenced. The sequences were analyzed with QUMA (Kumaki et al., 2008).

### *Immunoprecipitation and Western Blot*

For whole cell extract for Western Blotting experiments, cells were washed with PBS, harvested, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.2% SDS) and plasma membrane was also disrupted by passing cells through a 23G1 needle. Lysis was performed at 4°C for 1 h with continuous agitation and the lysate was cleared by centrifugation at 14,000 rpm.

For immunoprecipitation experiments, cells were washed with PBS, harvested, resuspended in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) and plasma membrane was also disrupted by passing cells through a 23G1 needle. Lysis was performed at 4°C for 1 h with continuous agitation and the lysate was cleared by centrifugation at 14,000 rpm. Dnmt3b was immunoprecipitated with 4  $\mu$ g of H-230 (Santa Cruz Biotechnology). The antibodies used in the Western blot experiments are listed in Supplementary Table S5.

### **Acknowledgement**

This work was supported by a grant from the Cancer Research Society of Canada awarded to LG. LG holds a Canada Research Chair on Mechanisms of Gene Transcription. We thank Benoît Leblanc for artwork presented in Figure 8. We also thank Dr. Matthew Lorincz for help in primer design, and analysis of bisulfite sequencing experiments.

### **Author contributions**

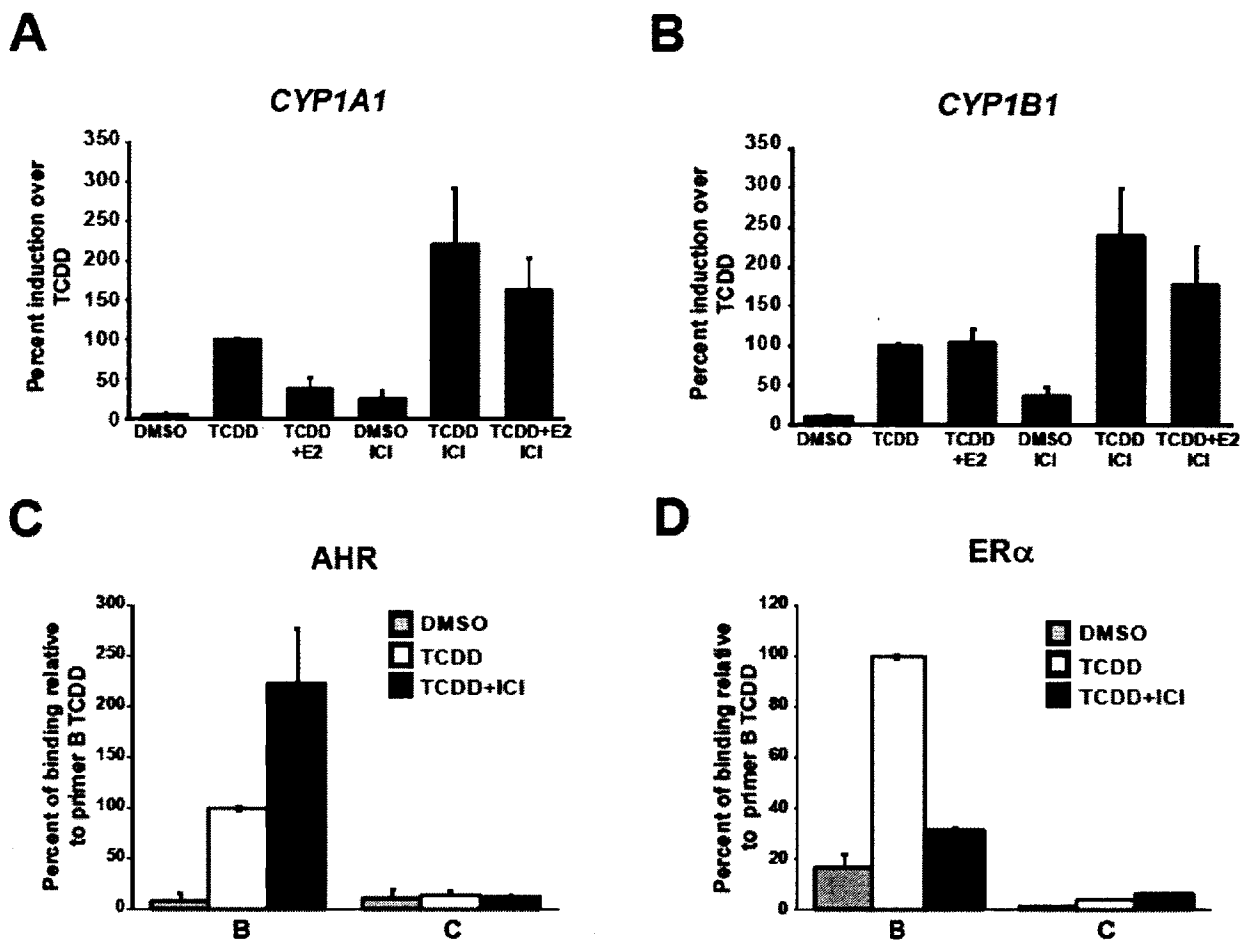
MM and LG conceived the project and designed the experiments. MM and LL performed the experiments. MM and LG wrote the manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

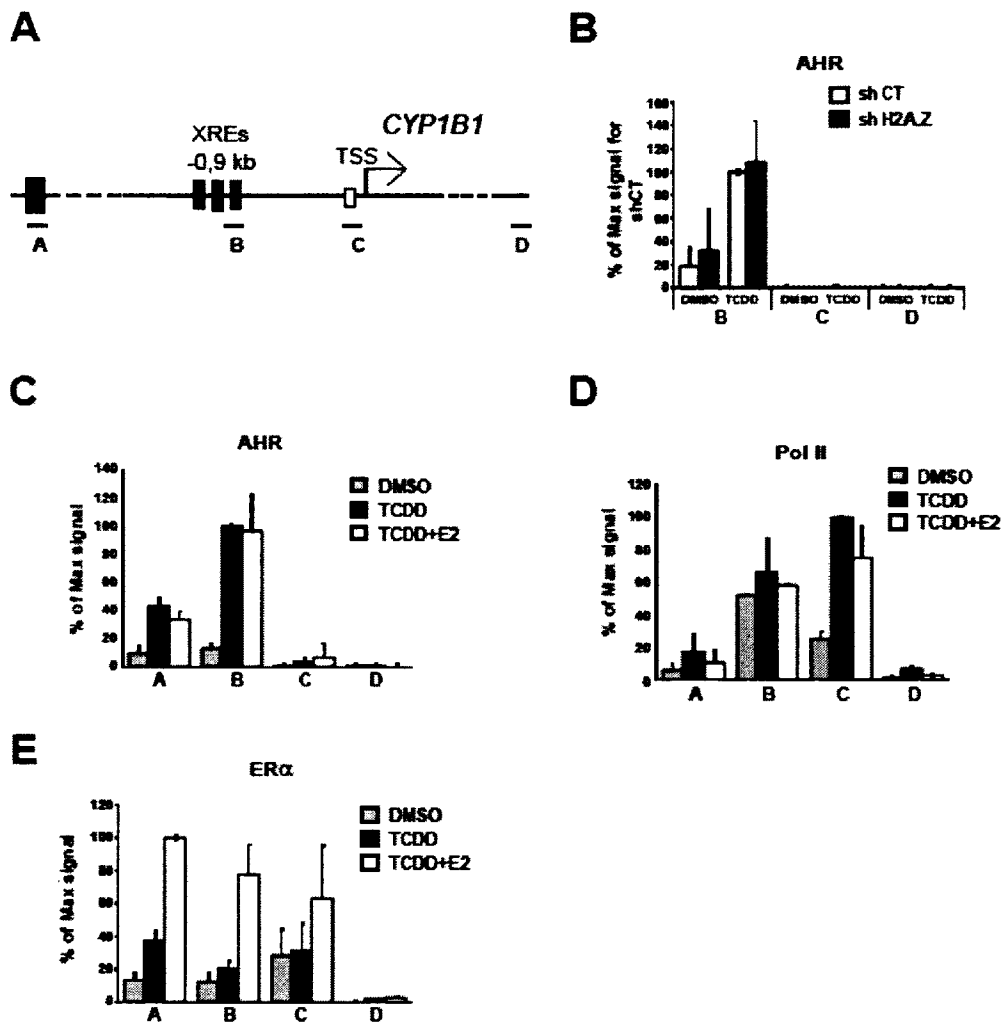


Supplementary Figures



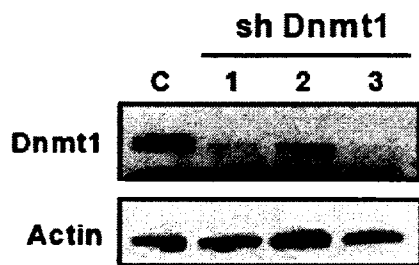
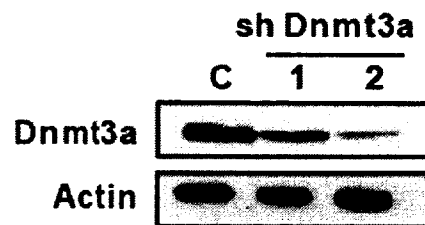
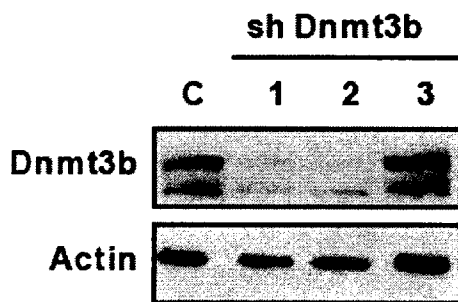
**Supplementary Figure 2.1: Degradation of ER $\alpha$  abolishes the repression of *CYP1A1* expression and the decrease in AhR binding at the *CYP1A1* promoter in presence of E2.**

CYP1A1 (A) and CYP1B1 (B) mRNA levels were quantified in MCF7 cells grown in estrogen free media and treated with DMSO, TCDD, TCDD+E2, ICI, TCDD+ICI, and TCDD+E2+ICI for 24h. CHIP's of AhR (C) and ER $\alpha$  (D) were performed in MCF7 cells treated with ICI 24h prior addition of TCDD for 90min. Localisation of primers can be found in figure 2.3A. Primer B is located at AhR binding site and primer C is near *CYP1A1* gene TSS.



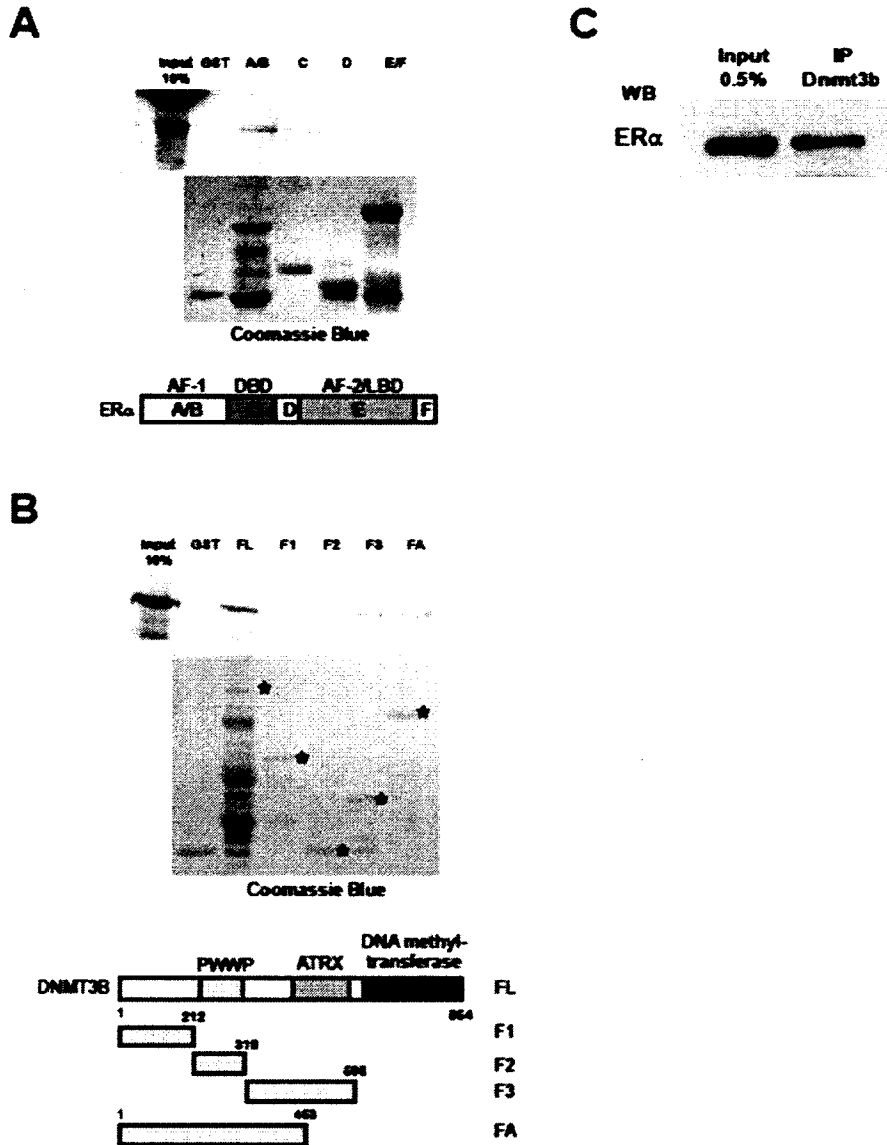
**Supplementary Figure 2.2: AhR binding at the *CYP1B1* promoter is not affected in H2A.Z-depleted cells OR in the presence of E2.**

(A) Schematic representation of the *CYP1B1* promoter. The position of the amplicons A, B, C and D used in the qPCR analyses are illustrated. (B) ChIP of AhR was performed in MCF7 cells infected with shCT or shH2A.Z constructs for 5 days and, then treated or not with 10 nM TCDD during 90 min. ChIPs of ERα (C), AhR (D), RNA polymerase II (E) were performed in MCF7 cells grown in estrogen-free medium for 3 days, then treated with DMSO, 10 nM TCDD or 10 nM TCDD+100 nM E2 for 90 min.

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

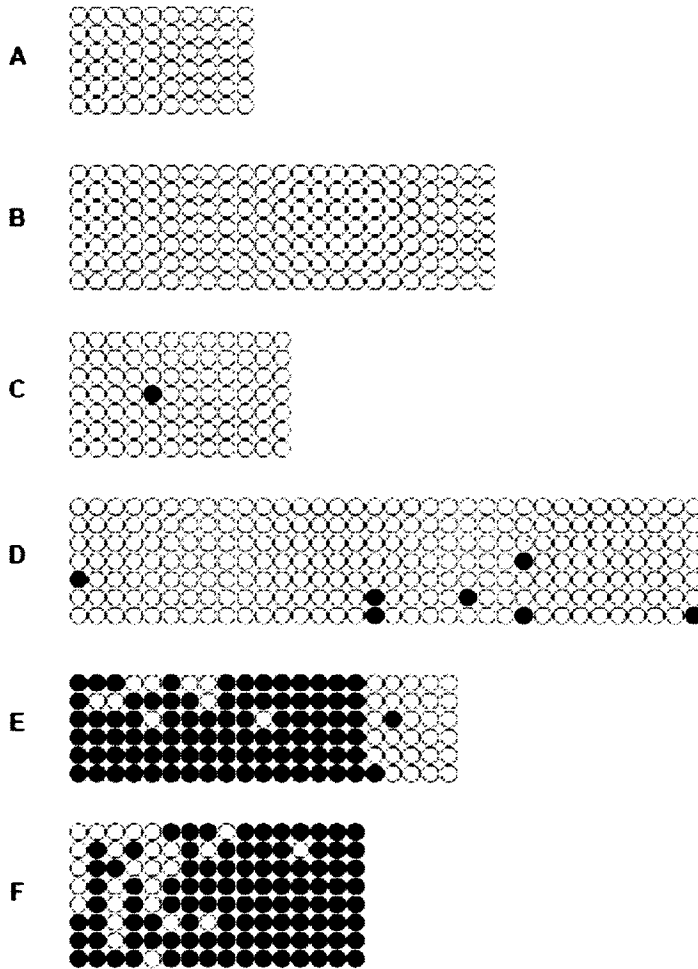
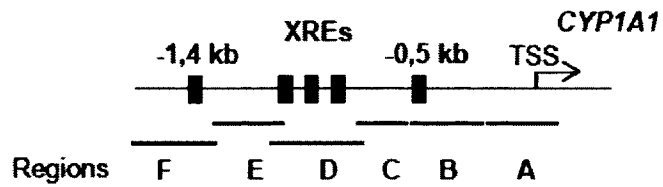
**Supplementary Figure 2.3: Verification of DNMTs knockdown efficiencies.**

Western blot were performed on protein extracts from MCF7 cells infected with constructs against DNMT1 (A), DNMT3A (B) or DNMT3B (C). Actin was used as loading control.



**Supplementary Figure 2.4: DNMT3B can directly interact with ER $\alpha$ .**

<sup>35</sup>S-labeled, in vitro translated DNMT3B, was subjected to GST pull-down assays using either GST or GST-ER $\alpha$  protein domains as depicted (A). <sup>35</sup>S-labeled, in vitro translated ER $\alpha$ , was subjected to GST pull-down assays using either GST or GST-DNMT3B protein fragments as depicted (B). Input represents 10% of the in vitro translated material used in each assay. Western blot of ER $\alpha$  on immunoprecipitated DNMT3B from MCF7 cell extract (C). Input represents 0.5% of the protein extract used in the immunoprecipitation assay.



**Supplementary Figure 2.5: Levels of DNA methylation in different *CYP11A1* promoter regions.**

The schema represents *CYP11A1* promoter first 1.5 kb from the transcription start site (TSS) and containing five XREs. We splitted this region into five regions and analyzed them by bisulfite sequencing. Bisulfite sequencing was performed in MCF7 cells in full media. White circle represents unmethylated CpG and black circle represents methylated CpG.

Supplementary Tables

**Table S2.1. ShRNA targeting sequences**

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| Sh CT/pLVTHM      | GTCACGATAAGACAATGATAT               |
| Sh CT/pLKO.1-puro | Non-Mammalian shRNA (shc002, Sigma) |
| Sh Dnmt1-1        | GCCCAATGAGACTGACATCAA               |
| Sh Dnmt1-2        | GCCGAATACATTCTGATGGAT               |
| Sh Dnmt1-3        | GAGGTTCGCTTATCAACTAA                |
| Sh Dnmt3a-1       | CCAGATGTTCTTCGCTAATAA               |
| Sh Dnmt3a-2       | CCCAAGGTCAAGGAGATTATT               |
| Sh Dnmt3b-1       | CCTGTCATTGTTTGATGGCAT               |
| Sh Dnmt3b-2       | CCATGCAACGATCTCTCAAAT               |
| Sh Dnmt3b-3       | GCCCGTGATAGCATCAAAGAA               |
| Sh H2A.Z-4        | ATACTCTAACAGCTGTCCA                 |
| Sh p400 mix       |                                     |
| Sh p400           | GGACTTGGTTCTCATCGAC                 |
| Sh p400-1         | CGTACTGGCAGGAACCATT                 |
| Sh p400-2         | CAGTCTCCAGTTATCAAA                  |
| Sh SrCAP-1        | CCTGGAGGGGTTTCAGCTTATC              |

**Table S2.2. Primers used for RT-qPCR**

|               |                              |
|---------------|------------------------------|
| 36B4 RT-FWD   | 5'-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3' |
| 36B4-RT-REV   | 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'     |
| CYP1A1-RT-FWD | 5'- TGAACCCCAGGGTACAGAGA-3'  |
| CYP1A1-RT-REV | 5'- GGCCTCCATATAGGGCAGAT-3'  |
| CYP1B1-RT-FWD | 5'-AACGTACCGGCCACTATCAC-3'   |
| CYP1B1-RT-REV | 5'-CCACGACCTGATCCAATTCT-3'   |

**Table S2.3. Antibodies used for ChIP experiments**

|             |   |
|-------------|---|
| Dnmt3b      | ab2851, Abcam   |
| ER $\alpha$ | (HC-20) sc-543, Santa Cruz Biotechnology                  |
| H2A.Z       | Raised against an C-terminal H2A.Z peptide (CSLIGKKGQQKT) |
| H3          | b1791, Abcam  |
| p400        | ab5201, Abcam   |
| RNA pol II  | (8WG16) MMS-126R, Covance                                 |

**Table S2.4. Primers used for qPCR analysis of ChIPs experiments**

---

|              |                                 |
|--------------|---------------------------------|
| CYP1A1-A-FWD | 5'- CTTCGTGTCGTGCCACAG-3'       |
| CYP1A1-A-REV | 5'- AGGGTCTAGGTCTGCGTGTG-3'     |
| CYP1A1-B-FWD | 5'- CAGCACTAAGGCGATCCTAGA-3'    |
| CYP1A1-B-REV | 5'- GATTGAAGGATCGGAATGGA-3'     |
| CYP1A1-C-FWD | 5'- CGTACAAGCCCGCCTATAAA-3'     |
| CYP1A1-C-REV | 5'- CTGGGATCACAAGGATCAGG-3'     |
| CYP1A1-D-FWD | 5'- CATGTCGGCCACGGAGTTTCTTC-3'  |
| CYP1A1-D-REV | 5'- ACAGTGCCAGGTGCGGGTTCTTTC-3' |
| CYP1B1-A-FWD | 5'- AAGCTGTGCCATAACCCAAG-3'     |
| CYP1B1-A-REV | 5'- TAATTTGCGTGCAGACAAGC-3'     |
| CYP1B1-B-FWD | 5'-ATGACTGGAGCCGACTTTCC-3'      |
| CYP1B1-B-REV | 5'-GGCGAACTTTATCGGGTTG-3'       |
| CYP1B1-C-FWD | 5'-GACCCCCAGTCTCAATCTCA-3'      |
| CYP1B1-C-REV | 5'-AGTCTCTTGGCGTCGTCAGT-3'      |
| CYP1B1-D-FWD | 5'-TGCTTCATTTGTATGTCAAAGC-3'    |
| CYP1B1-D-REV | 5'-GGCTAAGTTCTGGGACATGAA-3'     |

---

**Table S2.5. Antibodies used for Western blot experiments**

---

|             |  |
|-------------|--|
| Actin       | A2066, Sigma                               |
| AhR         | (H-211) sc-5579, Santa Cruz Biotechnology  |
| Dnmt1       | (H-300) sc-20701, Santa Cruz Biotechnology |
| Dnmt3a      | (H-295) sc-20703, Santa Cruz Biotechnology |
| Dnmt3b      | (H-230) sc-20704, Santa Cruz Biotechnology |
| ER $\alpha$ | (HC-20) sc-543, Santa Cruz Biotechnology   |
| H2A.Z       | ab4174, Abcam                              |
| H3          | 06-755, Upstate                            |

---

## References

- Altucci, L., Addeo, R., Cicatiello, L., Dauvois, S., Parker, M.G., Truss, M., Beato, M., Sica, V., Bresciani, F., and Weisz, A. (1996). 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12, 2315-2324.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bernstein, L., Deapen, D., Cerhan, J.R., Schwartz, S.M., Liff, J., McGann-Maloney, E., Perlman, J.A., and Ford, L. (1999). Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 91, 1654-1662.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., and Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9543-9547.
- Conerly, M.L., Teves, S.S., Diolaiti, D., Ulrich, M., Eisenman, R.N., and Henikoff, S. (2010). Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res* 20, 1383-1390.
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3942-3948.
- Dubik, D., Dembinski, T.C., and Shiu, R.P. (1987). Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 47, 6517-6521.
- Edwards, J.R., O'Donnell, A.H., Rollins, R.A., Peckham, H.E., Lee, C., Milekic, M.H., Chanrion, B., Fu, Y., Su, T., Hibshoosh, H., *et al.* (2010). Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns. *Genome Res* 20, 972-980.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.
- Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., *et al.* (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92, 564-569.



Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.

Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., and Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.

Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R., and Bieche, I. (2003). Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 9, 4415-4422.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.

Hardy, S., Jacques, P.E., Grévry, N., Forest, A., Fortin, M.E., Laflamme, L., Gaudreau, L., and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet*.

Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., *et al.* (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41, 178-186.

Kharat, I., and Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* 271, 10533-10537.

Kietz, S., Feng, S., Agoulnik, A., and Hombach-Klonisch, S. (2009). Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1160, 367-373.

Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X., and Safe, S. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6710-6719.

Kumaki, Y., Oda, M., and Okano, M. (2008). QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 36, W170-175.

- Kumar, M.B., and Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.
- Kumar, M.B., Tarpey, R.W., and Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.
- Liehr, J.G., Fang, W.F., Sirbasku, D.A., and Ari-Ulubelen, A. (1986). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem* 24, 353-356.
- Liehr, J.G., and Ricci, M.J. (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3294-3296.
- Marques, M., Laflamme, L., Gervais, A.L., and Gaudreau, L. (2010). Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics* 5, 267-272.
- Martucci, C.P., and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther* 57, 237-257.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.
- Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1, 686-692.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.
- Newbold, R.R., and Liehr, J.G. (2000). Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res* 60, 235-237.
- Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E., and Safe, S. (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 367, 250-257.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., *et al.* (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.

Okino, S.T., Pookot, D., Li, L.C., Zhao, H., Urakami, S., Shiina, H., Igawa, M., and Dahiya, R. (2006). Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 66, 7420-7428.

Ostler, K.R., Davis, E.M., Payne, S.L., Gosalia, B.B., Exposito-Cespedes, J., Le Beau, M.M., and Godley, L.A. (2007). Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene* 26, 5553-5563.

Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554.

Santi, D.V., Norment, A., and Garrett, C.E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6993-6997.

Shen, E.S., and Whitlock, J.P., Jr. (1989). The potential role of DNA methylation in the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 264, 17754-17758.

Sorensen, A.L., and Collas, P. (2009). Immunoprecipitation of methylated DNA. *Methods Mol Biol* 567, 249-262.

Tekpli, X., Zienolddiny, S., Skaug, V., Stangeland, L., Haugen, A., and Mollerup, S. (2012). DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer* 131, 1509-1516.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., and Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227, 115-124.

Wilson, A.S., Power, B.E., and Molloy, P.L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775, 138-162.

Yager, J.D., and Liehr, J.G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 203-232.

Yang, X., Noushmehr, H., Han, H., Andreu-Vieyra, C., Liang, G., and Jones, P.A. (2012). Gene reactivation by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation requires SRCAP-mediated H2A.Z insertion to establish nucleosome depleted regions. *PLoS Genet* 8, e1002604.

Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., and Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328, 916-919.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.

## CHAPITRE III

### *Le niveau protéique de DNMT3B varie selon les lignées cellulaires et est régulé par Tip60.*

#### 1 Préambule

Dans ce chapitre, je vais présenter des résultats préliminaires non soumis pour publication qui vont me servir lors de la discussion dans le chapitre V. Dans le chapitre précédent, nous avons identifié la protéine DNMT3B comme étant un nouveau corépresseur de ER $\alpha$ . Nous avons aussi montré que ER $\alpha$  réprime spécifiquement *CYP1A1* dans deux lignées cellulaires modèles de cancer du sein (les MCF7 et les T47D). Cependant, l'intensité de la répression diffère entre les deux lignées et nous avons décidé d'essayer de comprendre pourquoi. D'autre part, le mécanisme régissant l'antagonisme entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN est encore inconnu. Une étude publiée en 2010 avait montré que l'acétylation de DNMT1 par Tip60 promouvait son ubiquitination et sa dégradation (Du et al., 2010). Tip60 est une HAT et est associée en complexe avec p400, une des enzymes responsables de l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine. Grâce à des expériences de ChIPs, nous savons que la déplétion de H2A.Z affecte le recrutement du complexe p400 et que les protéines H2A.Z et p400 sont souvent localisées aux mêmes endroits dans le génome. À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que le complexe Tip60-p400 pourrait jouer un rôle dans la relation antagoniste entre H2A.Z

et la méthylation de l'ADN en stimulant localement la dégradation de DNMT1 et DNMT3B.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Lignées cellulaires et conditions de cultures

Quatre types de lignées cellulaires ont été utilisées dans ce chapitre : MCF7, T47D, HepG2 et HepER3 (référence). Les MCF7 sont des cellules issues d'un adénocarcinome humain et les T47D sont des cellules issues d'un adénocarcinome canalaire humain. Ces deux lignées expriment ER $\alpha$  de façon endogène. Les HepG2 sont des cellules issues d'un carcinome du foie humain et les HepER3 sont des cellules HepG2 exprimant de manière ectopique ER $\alpha$ . Elles nous ont été données par Stefan Nilsson. Les cellules sont conservées dans du DMEM auquel on ajoute 10% de FBS et une combinaison d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Pour les expériences investiguant la répression de l'expression de *CYP1A1* par ER $\alpha$ , les cellules sont cultivées pendant 3 jours dans du DMEM sans rouge de phénol auquel on ajoute 5% de sérum traité avec du charbon activé afin de retirer les hormones stéroïdiennes du sérum avant d'être traitées pendant 24h avec 10nM TCDD ou avec 10nM TCDD et 100nM E2. Pour les expériences d'ubiquitination de DNMT3B, les cellules sont traitées avec 5 $\mu$ M de MG132 pendant 12h avant la récupération des protéines totales.

## 2.2 Constructions et transfection

Les constructions utilisées sont pcDNA3-Tip60-Flag donné par Jacques Côté, pMT123 qui exprime l'ubiquitin avec une étiquette HA donné par Viktor Steimle et EBSB-6Myc-DNMT3B2. Les transfections ont été réalisées avec du PEI et un ratio ADN : PEI de 1 :3. Trois jours après la transfection, les protéines totales sont extraites.

## 2.3 Immunoprécipitation et immunobuvardage de type Western

Pour les expériences d'immunoprécipitation ou de coimmunoprécipitation, les cellules sont lysées dans un tampon RIPA (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% Triton, 0,5% Na-DOC, 0,1% SDS, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs) et les protéines totales sont extraites puis dosées au spectrophotomètre selon la méthode de Bradford. Pour chaque immunoprécipitation, on utilise 1mg de protéines totales et soit 4 $\mu$ g d'anticorps dirigés contre ( $\alpha$ ) p400 (Abcam) ou 5 $\mu$ l  $\alpha$ -9E10 (fait maison) ou 40 $\mu$ l de billes M2-agarose (Sigma) selon l'expérience et l'on incube toute la nuit à 4°C avec agitation. On fait trois lavages avec une solution peu stringente (16,7mM Tris-HCl pH8, 1,2mM EDTA, 167mM NaCl, 1,1% Triton, 0,01% SDS, 1X PMSF, 1X cocktail inhibiteurs) puis on élue dans une solution 2X SDS (125mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glycérol, 1,98%  $\beta$ -mercaptoethanol). Pour les immunobuvardages de type Western, les protéines totales sont extraites avec un tampon RIPA (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 1% Triton, 0,5% Na-DOC, 0,2% SDS, 1mM DTT, 1X PMSF, 1X cocktail inhibiteurs) puis dosées. La quantité de protéines déposée par puits dépend de la sensibilité de l'anticorps utilisé pour la détection.

## **2.4 Essai d'ubiquitination**

Pour les essais d'ubiquitination, des cellules MCF7 sont transfectées avec la combinaison de 3 vecteurs : pcDNA3-Tip60-Flag, EBSB-6Myc-DNMT3B2 et pMT123 (contenant Ubiquitin-HA), et sont laissées pendant 2 jours avant un traitement de 12h avec 5 $\mu$ M MG132 (inhibiteur du protéasome). Puis les protéines sont extraites, DNMT3B2 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-MYC (9E10) et on utilise un anticorps dirigé contre HA pour reconnaître les formes de DNMT3B ubiquitinées lors de l'immunobuvardage de type Western.

## **2.5 Transcription inverse et PCR en temps réel**

Les ARN totaux sont extraits avec le kit GenElute de Sigma. On utilise 600ng d'ARN pour réaliser la transcription inverse avec la M-MLV RT de Promega en suivant le protocole de la compagnie. Le niveau d'ARNm de nos gènes d'intérêts est évalué par PCR en temps réel (qPCR) à partir des ADNc produits par la transcription inverse. Les séquences des amorces utilisées pour les analyses de qPCR sont : RT 36B4 Fwd- CGACCTGGAAGTCCAACACTAC; RT 36B4 Rev- ATCTGCTGCATCTGCTTG; RT CYP1A1 Fwd- TGAACCCAGGGTACAGAGA; RT CYP1A1 Rev- GGCCTCCATATAGGGCAGAT.

## 3 Résultats

### 3.1 La quantité de DNMT3B est corrélée avec l'intensité de la répression de *CYP1A1* par ER $\alpha$

Dans les résultats obtenus dans le chapitre II, nous avons observé une différence dans l'efficacité de la répression de *CYP1A1* par ER $\alpha$ . Après l'identification de DNMT3B, l'hypothèse la plus évidente était qu'il pouvait ne pas y avoir la même quantité de DNMT3B dans toutes les lignées cellulaires. Nous avons décidé de comparer les niveaux protéiques de DNMT3B dans les trois lignées exprimant ER $\alpha$  à notre disposition dans le laboratoire. La figure 3.1A nous montre clairement que le niveau de DNMT3B varie beaucoup entre les lignées cellulaires. En comparant les résultats de la figure 3.1A et 3.1B, nous avons déduit que plus le niveau de DNMT3B est élevé et plus ER $\alpha$  réprime l'expression de *CYP1A1*. Par conséquent, le niveau protéique de DNMT3B est corrélé avec l'intensité de répression de *CYP1A1* par ER $\alpha$ . Un autre fait important est l'existence de nombreux variants d'épissage de DNMT3B et leur expression différentielle selon les types de lignées cellulaires (Tableau 1.4). Je n'ai malheureusement pas eu le temps au cours de mon doctorat d'investiguer si un des variants était plus spécifiquement responsable de la répression de *CYP1A1*.



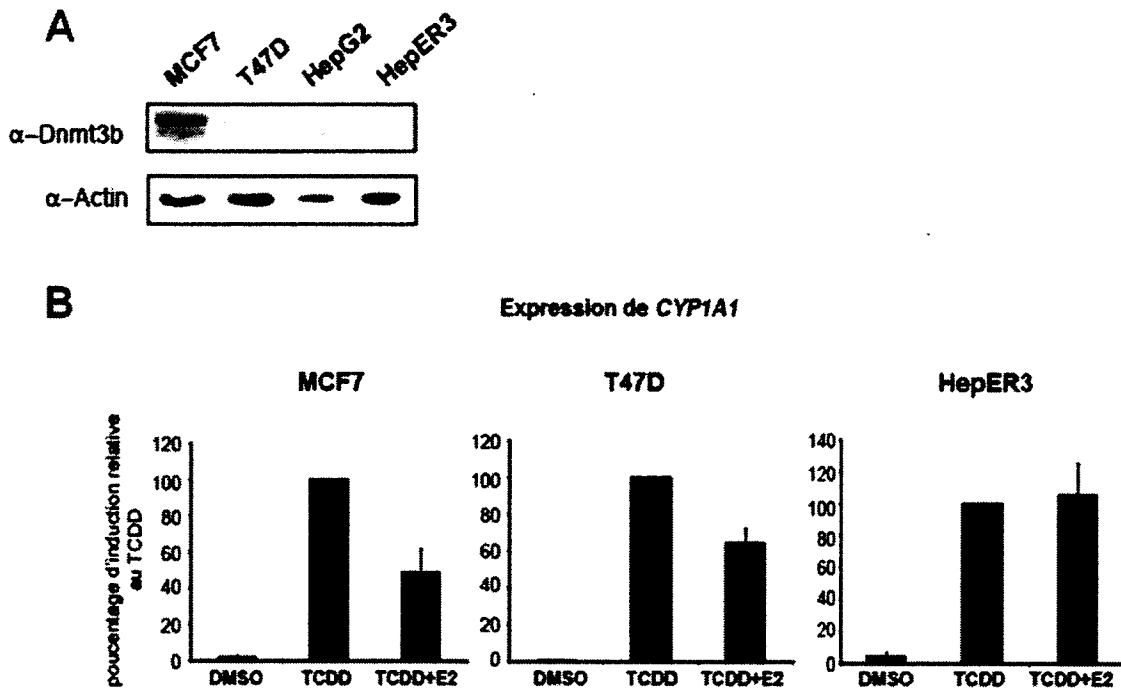


Figure 3.1 : Le niveau protéique de DNMT3B est corrélé avec l'intensité de la répression de *CYP1A1* par ER $\alpha$ . (A) Immunobuvardage de type Western réalisé sur des extraits protéiques totaux provenant de 4 lignées cellulaires différentes avec un anticorps dirigé contre DNMT3B et comme contrôle, un anticorps dirigé contre l'actine. (B) Mesure de l'induction de *CYP1A1* dans 3 lignées cellulaires exprimant ER $\alpha$  après traitement avec 10nM TCDD ou 10nM TCDD et 100nM E2 dans du milieu sans E2.

### 3.2 DNMT3B interagit avec Tip60 et p400

Afin de déterminer si le complexe Tip60-p400 est impliqué dans la régulation des niveaux protéiques de DNMT3B, nous avons voulu savoir dans un premier temps si DNMT3B est capable de s'associer avec ces deux protéines. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des coimmunoprécipitations (Figure 3.2). Pour réaliser l'expérience de coimmunoprécipitation entre DNMT3B et Tip60, nous avons du

surexprimer les deux protéines avec une étiquette, soit Myc pour DNMT3B soit Flag pour Tip60, car les anticorps commerciaux disponibles contre ces deux protéines ne fonctionnent pas bien en Western Blot et en immunoprécipitation. Cependant, l'anticorps commercial dirigé contre p400 fonctionne très bien en immunoprécipitation ce qui nous a permis de réaliser l'expérience avec la protéine endogène uniquement. Grâce à ces expériences, nous avons pu observer une association entre DNMT3B et Tip60 (Figure 3.2A) et entre DNMT3B et p400 (Figure 3.2B).

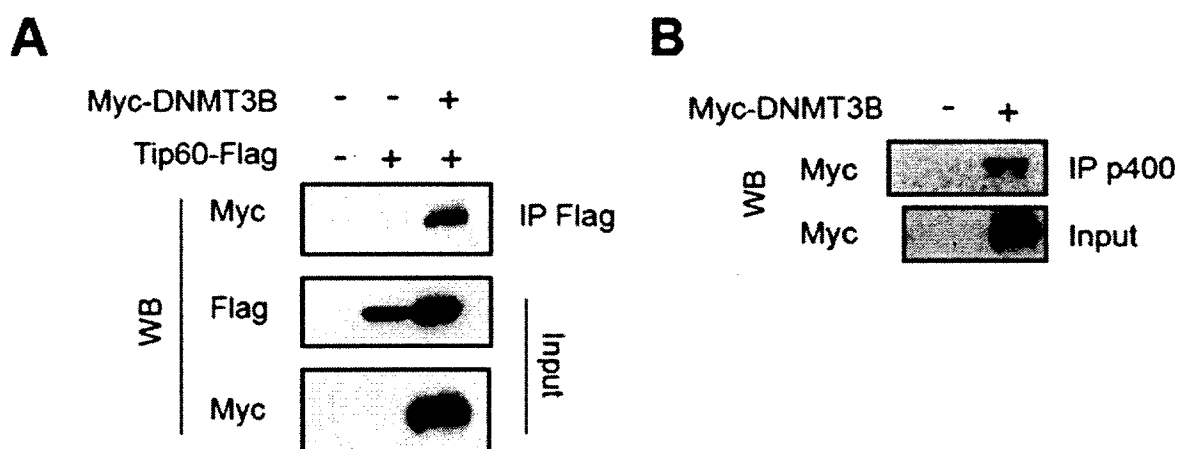


Figure 3.2 : DNMT3B coimmunoprécipite avec Tip60 et p400. (A) Les MCF7 sont transfectées avec pcDNA3-Tip60-Flag et EBSB-6Myc-DNMT3B2 et les protéines extraites. On utilise des billes M2-agarose pour immunoprécipiter Tip60-Flag puis on réalise un immunobuvardage de type Western contre l'étiquette Myc. (B) Les MCF7 sont transfectées avec EBSB-6Myc-DNMT3B2, les protéines extraites et on immunoprécipite p400 puis on réalise un immunobuvardage de type Western contre l'étiquette Myc.

### 3.3 La surexpression de Tip60 augmente les niveaux de DNMT3B acétylés

Tip60 possède une activité acétyltransférase et est capable d'acétyler tant des histones que des protéines non histones (Du et al., 2010; Tang et al., 2006). Nous avons regardé

les niveaux d'acétylation de DNMT3B dans des cellules MCF7 surexprimant ou pas la protéine Tip60. Nous avons donc transfecté des cellules MCF7 avec la construction contenant Tip60-Flag, puis réalisé une immunoprécipitation de DNMT3B et comme nous ne connaissons pas le ou les résidus acétylés nous avons donc utilisé un anticorps dirigé contre les acétyl-lysines (K-Ac) pour les immunobuvardages de type Western. Dans la figure 3.3 on peut voir que la surexpression de Tip60 induit une augmentation du niveau de DNMT3B acétylé.

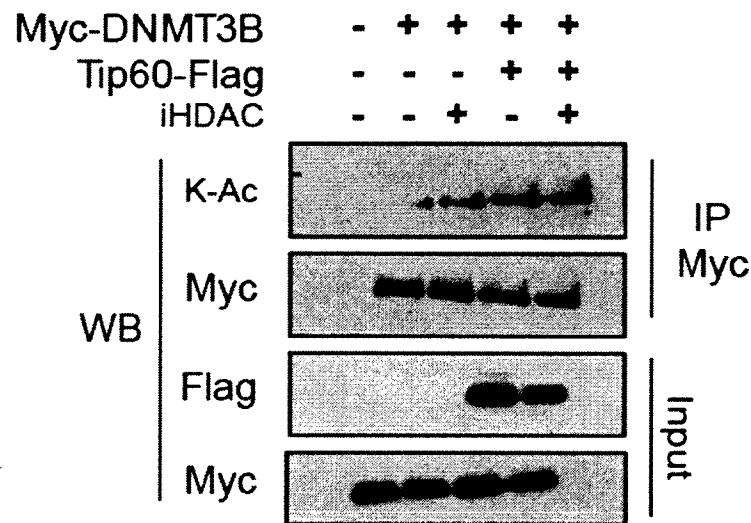


Figure 3.3 : La surexpression de Tip60 augmente le niveau d'acétylation de DNMT3B. Immunobuvardage de type Western avec les anticorps K-Ac, Myc (9E10) et Flag (M2) sur des immunoprécipitats de DNMT3B provenant d'extraits de cellules MCF7.

### 3.4 La surexpression de Tip60 augmente le niveau de DNMT3B ubiquitiné et sa dégradation

Il a été montré précédemment que l'acétylation de DNMT1 par Tip60 induit l'ubiquitination de DNMT1 et sa dégradation. Nous avons donc regardé les effets de la surexpression de Tip60 sur les niveaux de DNMT3B ubiquitinés. Pour répondre à cette

question, nous avons co-transfecté des cellules MCF7 avec des vecteurs exprimant : Tip60-Flag, Myc-DNMT3B et ubiquitin-HA, et réalisé une immunoprécipitation de DNMT3B. Afin de voir les niveaux de DNMT3B ubiquitinés, nous avons fait un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps HA sur les éluats de l'immunoprécipitation. On peut voir dans la figure 3.4A que la surexpression de Tip60 accroît la quantité de DNMT3B ubiquitiné détecté par immunobuvardage de type Western. Nous nous sommes ensuite demandé si cette augmentation de l'ubiquitination avait un effet sur la quantité de DNMT3B dans les cellules. Pour répondre à cette question, nous avons cotransfecté DNMT3B avec des quantités croissantes de Tip60 dans des cellules MCF7 et regardé par immunobuvardage de type Western l'effet sur les niveaux de DNMT3B. On peut voir dans la figure 3.4B que la surexpression de Tip60 diminue drastiquement la quantité de DNMT3B dans les cellules proportionnellement à la quantité de Tip60.

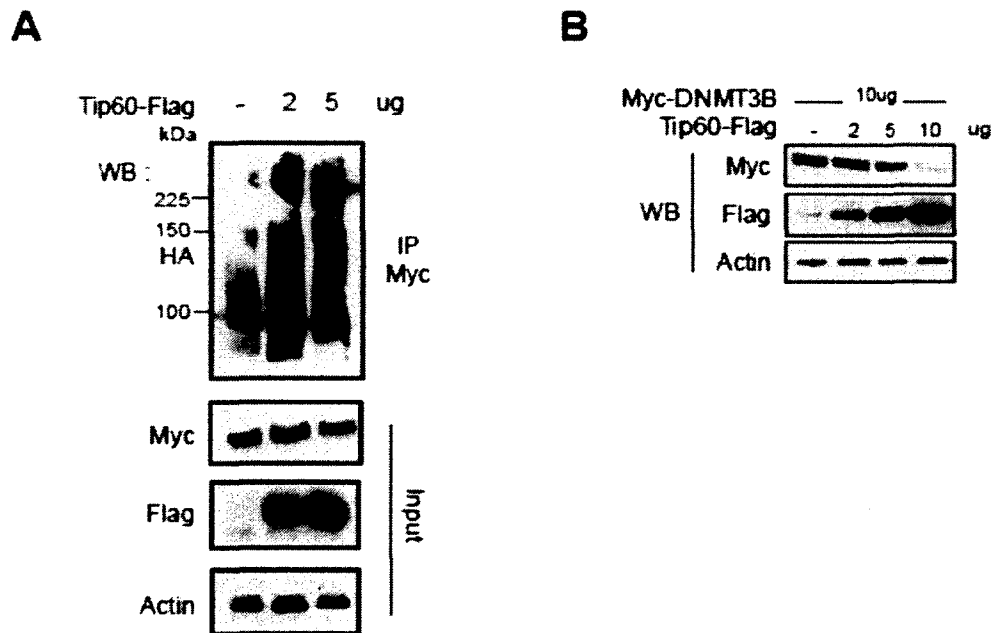


Figure 3.4 : La surexpression de Tip60 augmente le niveau de DNMT3B ubiquitiné et sa dégradation. (A) Essai de l'ubiquitination de DNMT3B dans des MCF7 en surexprimant des quantités croissantes de Tip60. (B) Quantification du niveau protéique de DNMT3B total dans des MCF7 en surexprimant des quantités croissantes de Tip60.

## 4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons présenté des résultats qui sont la continuité des résultats du chapitre II. Nous avons pu montrer principalement deux nouvelles observations. Premièrement, il semble y avoir un lien entre les niveaux de DNMT3B et la capacité de ER $\alpha$  à réprimer *CYP1A1*. Ce résultat est très intéressant car il pourrait en partie expliquer pourquoi différents laboratoires ne s'accordent pas sur le rôle de ER $\alpha$  dans la régulation de l'expression de *CYP1A1*. Afin de déterminer si cette hypothèse est vraie, nous pourrions surexprimer DNMT3B dans les cellules T47D et voir si l'on est capable d'augmenter la capacité de ER $\alpha$  à réprimer *CYP1A1* dans ces conditions là. Deuxièmement, nous avons montré que DNMT3B peut s'associer avec Tip60 et p400, deux protéines appartenant à un même complexe et capable d'incorporer H2A.Z dans la chromatine. Nous avons aussi montré que la surexpression de Tip60 augmente la quantité de DNMT3B acétylée et ubiquitinée et aussi diminue la quantité totale de DNMT3B dans des cellules MCF7 de façon quantité dépendante. À partir de ces observations, nous proposons un modèle où le complexe Tip60-p400 serait préférentiellement associé à des régions contenant H2A.Z et protégerait ces régions de la méthylation de l'ADN en favorisant la dégradation de DNMT1 et DNMT3B localement.

## CHAPITRE IV

### ***En absence d'oestradiol, le 3,3'-diindolylmethane active ER $\alpha$ et induit la prolifération des cellules MCF7 à faible concentration.***

#### Description de l'article et contribution

Dans ce manuscrit, nous avons poursuivi l'étude des gènes cibles de AhR, *CYP1A1* et *CYP1B1*, en comparant l'effet de deux ligands sur leur expression. Nous avons observé une absence de répression de *CYP1A1* lors de l'ajout d'E2 en présence de DIM, contrairement aux résultats observés en présence de TCDD. D'autres études avaient précédemment montré la capacité du DIM d'activer ER $\alpha$ . Nous avons décidé dans un premier temps de récapituler les résultats obtenus par différents groupes de façon disparate. Ensuite, nous avons montré que le DIM à une concentration potentiellement physiologique est capable d'activer ER $\alpha$  via l'action de la PKA. Dans ces conditions ER $\alpha$  est capable à la fois d'activer et de réprimer l'expression de certains de ces gènes cibles et d'induire la prolifération de cellules MCF7 en absence d'E2. L'idée originale de comparer les deux ligands vient de Luc Gaudreau et les résultats de la figure 1 ont été produits par Coumba Cissokho. Toute la suite de l'article a été pensée et réalisée par moi-même. J'ai écrit tout le manuscrit sous la supervision de Luc Gaudreau.

**Low levels of 3,3'-diindolylmethane activates estrogen receptor  $\alpha$  and induces proliferation of MCF7 cells in the absence of estradiol**

Marques Maud<sup>1</sup>, Cissokho Coumba<sup>1</sup>, and Gaudreau Luc<sup>1\*</sup>,

<sup>1</sup>Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: (819) 821-8000 #62082; Fax: (819) 821-8049; Email: [Luc.Gaudreau@USherbrooke.ca](mailto:Luc.Gaudreau@USherbrooke.ca)

**Running title: Induction of ER $\alpha$  signaling by a low concentration of DIM**

## Abstract

3,3'-diindolylmethane (DIM) is an acid-catalyzed dimer of indole-3-carbinol (I3C), a phytochemical found in cruciferous vegetables including broccoli, Brussels sprouts and cabbage. DIM is an aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand and a potential anticancer agent, namely for the treatment of breast cancer. However, in this study we report that physiological concentrations of DIM (10  $\mu$ M) preferentially activate the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) signaling pathway in the human breast cancer cell line MCF7, despite the absence of 17 $\beta$ -estradiol (E2). Indeed, we observe induction of ER $\alpha$  target genes such as *GREB1* and *TFF1*, and an increase in cellular proliferation after treatment with 10 $\mu$ M DIM in the absence of E2. By using an ER $\alpha$  specific inhibitor (ICI 182 780), we confirm that the transcriptional and proliferative effects of DIM treatment are mediated by ER $\alpha$ . Importantly, DIM activates ER $\alpha$  via the protein kinase A (PKA) signaling pathway. Accordingly, treatment of cells with a PKA inhibitor abrogates all effects of DIM mediated by ER $\alpha$  in the absence of E2. During breast cancer cell proliferation, ER $\alpha$  is able to repress *CYP1A1*, an outcome that promotes an increase in the generation of genotoxic metabolites. Consequently, DIM possesses a dual role in the regulation of *CYP1A1* expression: on the one hand, DIM binds AhR and promotes *CYP1A1* induction; on the other hand, DIM triggers ER $\alpha$  activation by the PKA signaling pathway and represses *CYP1A1* expression. The increase of cellular proliferation by physiological concentrations of DIM raises potential safety risks for the use of DIM as a therapeutic agent.



## Introduction

Breast cancer is one of the leading causes of women death in industrialized countries. Estrogens are known to play a role in the initiation and the promotion of breast cancer (Parl et al., 2009). Initiation of breast cancer by  $17\beta$ -estradiol (E2) involves the formation of DNA damage via its oxidation products. E2, the main estrogen found in mammary tissues, is a substrate for the phase I cytochrome P450 (CYP) enzymes, CYP1A1 and CYP1B1. These two enzymes oxidize E2 into 2-hydroxyestradiol (2-OHE2) and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) respectively (Martucci and Fishman, 1993; Tsuchiya et al., 2005). The 2-OHE2 metabolites can bind estrogen receptor (ER)  $\alpha$  but do not induce transcriptional activity (Martucci and Fishman, 1977). On the other hand, 4-OHE2 hydroxylation results in the formation of a carcinogenic metabolite which can be further oxidized to highly reactive semiquinones and quinines (Cavaliere et al., 1997). These C-4 metabolites are well characterized and known to produce DNA adducts that lead to depurination of DNA and subsequent mutations (Belous et al., 2007; Fernandez et al., 2006; Li et al., 2004; Zhao et al., 2006), which can lead to tumor initiation. The presence of CYP1B1 was found in many types of tumors compared to normal tissues (Murray et al., 1997). These observations suggest a function for CYP1B1 in tumor cells. To support this hypothesis, expression of *CYP1B1* has been observed in mammary tissues weeks prior to the apparition of tumors in DMBA-treated rats (Yang et al., 2008). Furthermore, in normal mammary tissues, 2-OHE2 metabolites are the main conversion products of E2 but a significant increase of 4-OHE2 metabolites is observed in breast cancer. Based on these observations a model proposes that the CYP1A1/CYP1B1 enzyme ratio is essential to control the intracellular level of genotoxic estrogen metabolites (Coumoul et al., 2001).

The *CYP1A1* and *CYP1B1* genes are mainly expressed in extrahepatic tissue, and are regulated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand activated transcription factor that belongs to the bHLH/PAS family. Ligands of AhR are numerous and belong to several classes of chemicals. The long list includes halogenated aromatic hydrocarbons

(HAH) such as 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as benzopyrene and phytochemicals found in cruciferous vegetables like 3,3'-diindolylmethane (DIM). Female rodents, exposed to TCDD for 2 years, showed a gain of liver cancer but a decrease in spontaneous mammary tumor formation (Kociba et al., 1978). Later studies revealed that TCDD and others AhR ligands inhibit cellular proliferation of human breast cancer cell lines (Gierthy and Lincoln, 1988; Gierthy et al., 1987) as well as DMBA-induced mammary tumors in rats (Chen et al., 1998). These observations highlighted a functional crosstalk between AhR and ER $\alpha$  signaling. The potential role of the AhR signaling pathway in mammary carcinogenesis inhibition led to the development of selective AhR modulators (SAhRMs) that act as possible anticancer agents. Even if TCDD possesses chemopreventive and chemotherapeutic proprieties in breast cancer development, it also has an acute liver toxicity. SAhRMs, like DIM, are reported to have the same inhibitory effects on mammary tumor formation in rats without having the deleterious effects of TCDD and other toxic AhR ligands.

DIM is an acid-catalyzed dimer of indol-3-carbonyl (I3C), a compound found in cruciferous vegetables such as broccoli, Brussels sprouts and cabbage. DIM is one of the most biologically active products examined so far (Bjeldanes et al., 1991), and because of its potential chemotherapeutic functions, it has been extensively studied. Reports showed that DIM treatment is able to induce a G1 arrest in the cell cycle of breast, ovarian, prostate, and colon cancer cell lines (Chang et al., 2006; Chang et al., 2005; Choi et al., 2009; Vivar et al., 2009). DIM also induces apoptosis and *p21* expression in a p53-independent manner (Cao et al., 2006; Ge et al., 1996; Hong et al., 2002). DIM is a low affinity ligand for AhR but conflicted reports can be found in the literature as to whether DIM is an agonist or an antagonist of AhR in the expression of the *CYP1* family genes (Chen et al., 1996; Gross-Steinmeyer et al., 2004; Gross-Steinmeyer et al., 2009; Hestermann and Brown, 2003; Stresser et al., 1995). Furthermore, DIM activates ER $\alpha$  in a ligand-independent manner, which involves the PKA and MAPK signaling pathways under certain conditions (Leong et al., 2004).

As a natural compound, DIM can be easily taken as a dietary supplement. However, there is not enough information regarding the use of these DIM supplements that are available in large amounts and whether or not they are safe on a long-term basis. In this study, we decide to compare the effect of two concentrations of DIM on the expression of AhR and ER $\alpha$  target genes, and also test their impact on AhR-ER $\alpha$  crosstalk. We chose a lower concentration of DIM (10  $\mu$ M), which can theoretically be reached in the human body by a 'heavy eater' of cruciferous vegetables, and a higher concentration (50  $\mu$ M), which is known to possess strong antiproliferative effects in cancer cells. Our results indicate a dose-dependent opposite effect of DIM in MCF7 cells in the absence of E2. At a high concentration, DIM strongly inhibits cell proliferation and induces both *p21* and *CYP1A1* gene expression. At a lower concentration (within a physiological range), in the absence of E2, DIM acts as an estrogen mimetic and induces ER $\alpha$  target gene expression and concomitant cellular proliferation. Moreover, we showed that the estrogenic effects observed following DIM treatment are mediated by ER $\alpha$  and the PKA signaling pathway.

## **Materials and Methods**

### *Chemicals and Reagents*

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was obtained from Cerilliant Cambridge isotope Laboratories (catalogue #ED-901-C). 17 $\beta$ -Estradiol (E2) and ICI 182,780 (ICI) were purchased from Sigma-Aldrich. 3,3'-diindolylmethane (DIM) was purchased from LKT Laboratories, Inc (catalogue #D3232), and H89 was purchased from Cayman chemical (catalogue #10010556).

### *Cell culture and treatments*

MCF7 cell line from American Type Culture Collection was maintained in DMEM (Wisent) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. For all the experiments, cells were grown in phenol red free DMEM medium (Wisent) containing 5% dextran-coated charcoal-treated fetal bovine serum and antibiotics for 3 days and then treated with different combinations of chemicals. For expression assays, we treated the cells for 24 h with 10nM TCDD, 10  $\mu$ M or 50  $\mu$ M DIM, 100 nM E2. For ChIP assays, we treated the cells, with the same concentrations as expression assays, for 90 min with TCDD and TCDD+E2, and for 60 min with DIM and DIM+E2. In experiments with ICI and H89, we added these chemicals 24 h prior other treatments.

### *RNA isolation and reverse transcription PCR*

MCF7 cells were seeded in 6-well plates at density of  $0.35 \times 10^6$  cells per well. The day after, the cells were washed twice with PBS and put in estrogen free media for 3 days. The cells were incubated with ligands for 24 h. Total RNA was extracted from cells using Genelute (Sigma). cDNA was synthesized from 600 ng of total RNA using MMLV-RT (Promega).

### *Quantitative real-time PCR*

The synthesized cDNA was diluted to 1:8 and 5  $\mu$ l of the dilution was used by 96-well. Quantitative real-time PCR was performed using homemade 2X mix with SYBR Green at 2 mM MgCl<sub>2</sub> and homemade Taq. We used qPCR primers for *36B4* as internal control during qPCR. Human *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GREB1*, *TFF1* and *p21* mRNAs were

quantified with the following primers. Primer sequences: RT *36B4* Fwd-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC; RT *36B4* Rev-ATCTGCTGCATCTGCTTG; RT *CYP1A1* Fwd-TGAACCCCAAGGTACAGAGA; RT *CYP1A1* Rev-GGCCTCCATATAGGGCAGAT; RT *CYP1B1* Fwd-AACGTACCGGCCACTATCAC; RT *CYP1B1* Rev-CCACGACCTGATCCAATTCT; RT *GREB1* Fwd-CGTTGGAAATGGAGACAAGG; RT *GREB1* Rev-CTCTGCCTGAAGGATGCTGT; RT *TFF1* Fwd-GTGCAAATAAGGGCTGCTGT; RT *TFF1* Rev-GCACATCCCTGCAGAAGTGT; RT *p21* Fwd-GGAGACTCTCAGGGTCGAAA; RT *p21* Rev-GGATTAGGGCTTCCTCTTGG.

### *ChIP assays*

ChIP assays were performed essentially as described previously (Gevry et al. 2007). Briefly, cells were crosslinked with 1.1% formaldehyde for 10 minutes and stopped by addition of 125 mM glycine. Samples were sonicated to generate DNA fragments <500 bp. And then chromatin was immunoprecipitated with specific antibodies against AhR (SantaCruz) and ER $\alpha$  (SantaCruz). qPCR was performed using a set of primers relevant to the promoter regions of the *CYP1A1*. The primers used in qPCR are ChIP *CYP1A1*-A Fwd-CAGCACTAAGGCGATCCTAGA; ChIP *CYP1A1*-A Rev-GATTGAAGGATCGGAATGGA. Results are shown as percent of input.

### *Cell proliferation assay*

The MCF7 cells were seeded in 48-well plates at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells per wells in estrogen free media. After 3 days, Day 0 was fixed with 4% formaldehyde (FA) for 15 min and the rest of the cells were treated with DMSO, 100 nM E2, 10  $\mu$ M DIM, 50  $\mu$ M DIM, 50  $\mu$ M ICI, 10  $\mu$ M H89, 10  $\mu$ M DIM and 50  $\mu$ M ICI, 10  $\mu$ M DIM and 10  $\mu$ M H89.

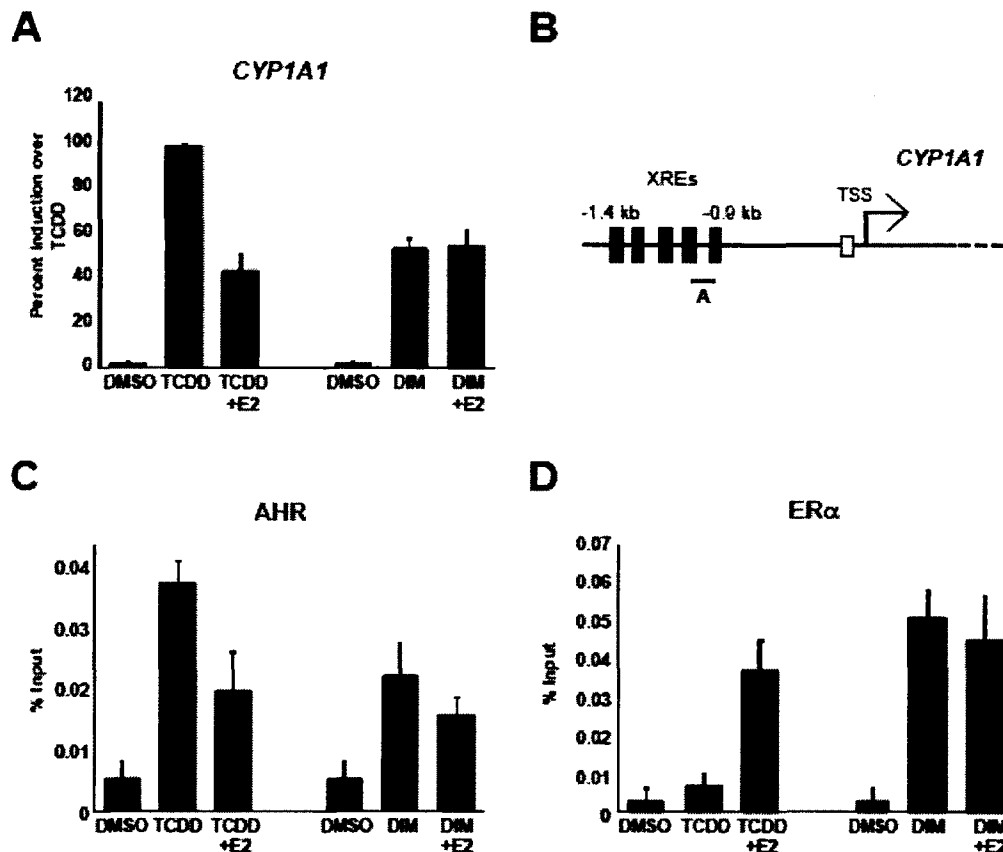
During 3 days, cells were collected and fixed with 4% FA for 15 min. At days 2 fresh media was placed on the cells. The fixed cells were kept in 0.4% FA/PBS 1X at 4°C. The cells were washed once with sterile distilled water, followed by addition of 500µl of 0.1% crystal violet in 10% EtOH for 20 minutes. Then the cells were washed 3 times with sterile distilled water and allowed to air dry. We added 500 µl of 10% acetic acid to each well and incubated 20 min with shaking. We transferred 500 µl acetic acid into 96-well plates and measured absorbance at 590 nm. The values were normalized to day 0 and are presented as fold over day 0. Each treated time-point is the average of 9 wells from 3 independent experiments, and the error bars represent standard deviation.

## Results

### *Different effects of two AhR agonists on ER $\alpha$ -mediated repression of CYP1A1 induction*

*CYP1A1* expression was measured in MCF7 breast cancer cells that were grown in estrogen-free medium for three days, and then treated with either 10 nM TCDD or 50 µM DIM, alone, or in combination with 100 nM E2 for 24h. Co-treatment of cells with E2 and TCDD typically produces 60% less activation of *CYP1A1* when compared to TCDD alone (Figure 4.1A; Marques et al.). Following DIM treatment, *CYP1A1* activity reaches levels similar to those found in TCDD+E2 treated cells. Addition of E2 produces no effect on DIM-induced *CYP1A1* expression (Figure 4.1A). To further investigate this phenomenon, we next sought to verify the recruitment of AhR and ER $\alpha$  at the *CYP1A1* proximal promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. As expected from the expression results, co-treatment with TCDD and E2 impairs AhR binding at the *CYP1A1* promoter as compared to TCDD alone (Figure 4.1C). For the DIM treated cells, we observe no significant variation of AhR binding when E2 is added (Figure 4.1C). ER $\alpha$  recruitment to the *CYP1A1* promoter is known to occur only when AhR and ER $\alpha$  signaling pathways are simultaneously activated (Beischlag and Perdew, 2005). Our

results are consistent with this, since ER $\alpha$  is present at the *CYP1A1* promoter only after treatment with TCDD+E2 but not after addition of TCDD alone (Figure 4.1D). Treatment with DIM resulted in the recruitment of both AhR (Figure 4.1C) and ER $\alpha$  in cells treated with DIM alone, or in combination with E2 (Figure 4.1D). This is consistent with the finding that DIM activates both AhR and ER $\alpha$  signaling pathway (Chen et al., 1996; Leong et al., 2001). Altogether, these results show that *CYP1A1* expression and AhR and ER $\alpha$  binding at the *CYP1A1* promoter are differently regulated by TCDD and DIM.



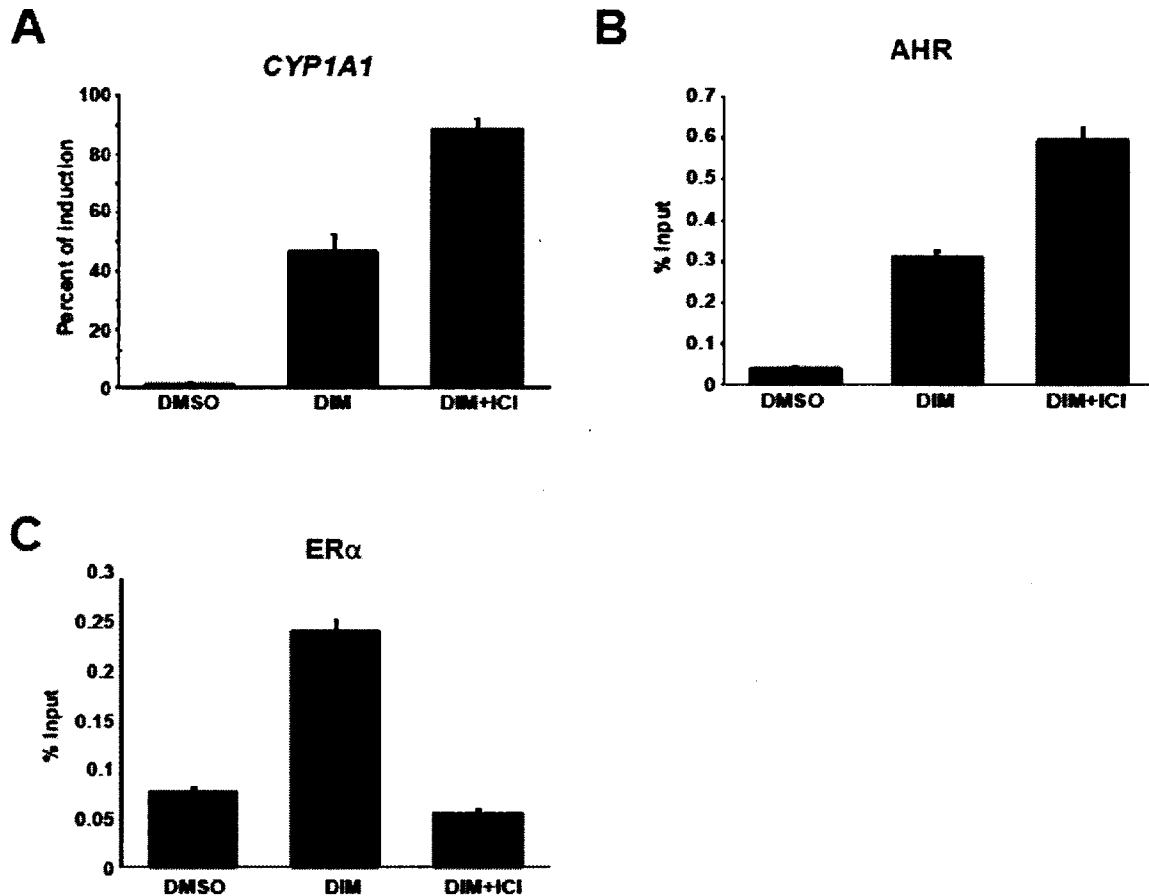
**Figure 4.1. DIM activates both AhR and ER signaling pathways.** (A) *CYP1A1* mRNA expression in MCF7 cells, grown in estrogen free media for 3 days, then treated with DMSO, 10 nM TCDD, 10 nM TCDD+100 nM E2, 50  $\mu$ M DIM or 50  $\mu$ M DIM+100 nM E2. After 24 h, the cells were lysed, RNA was extracted and reverse transcribed. qPCR results are presented as percent induction over TCDD. (B) Schematic representation of the *CYP1A1* promoter and primer position used for ChIP analysis. ChIP analyses of AhR (C) and ER $\alpha$  (D) were performed in MCF7 cells, grown in estrogen free media for 3 days, then treated with DMSO, 10 nM TCDD, 10 nM TCDD+100 nM E2, 50  $\mu$ M DIM or

50  $\mu$ M DIM+100 nM E2. Results are showed as % of Input and represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation.

*Inhibition of ER $\alpha$  increases CYP1A1 induction in response to DIM*

DIM is documented as a weak AhR ligand when compared to TCDD, and has been described as an antagonist of AhR-mediated gene transcription (Chen et al., 1996). Considering the repressive effect of ER $\alpha$  on AhR signaling, the activation of ER $\alpha$  by DIM treatment might in part explain the weaker induction of *CYP1A1*. This scenario could also explain why co-treatment of cells with both TCDD and DIM leads to less induction of AhR target genes in ER $\alpha$  positive cells (Chen et al., 1996; Degner et al., 2009). We next wanted to verify if depletion of ER $\alpha$  would allow an increase in *CYP1A1* expression after DIM treatment. MCF7 cells were grown in E2-depleted media for three days and then treated with 50  $\mu$ M ICI 182 780 (a specific ER $\alpha$  inhibitor also known as Fulvestran) for 24 h prior to addition of 50  $\mu$ M DIM for another 24 h. We observe a two-fold increase in *CYP1A1* induction in cells treated with DIM and ICI compared to DIM alone (Figure 4.2A). ChIP experiments at the *CYP1A1* promoter confirms the increase of AhR binding and the absence of ER $\alpha$  recruitment in cells co-treated with DIM and ICI (Figure 4.2B and 4.2C). The latter result is consistent with the previous study showing that ICI leads to ER $\alpha$  degradation (Kansra et al., 2005). Overall, our data indicate a dual role of DIM in the regulation of *CYP1A1* expression. On the one hand, DIM binds AhR and promotes *CYP1A1* induction, and on the other, DIM triggers ER $\alpha$  activation and represses *CYP1A1* expression.



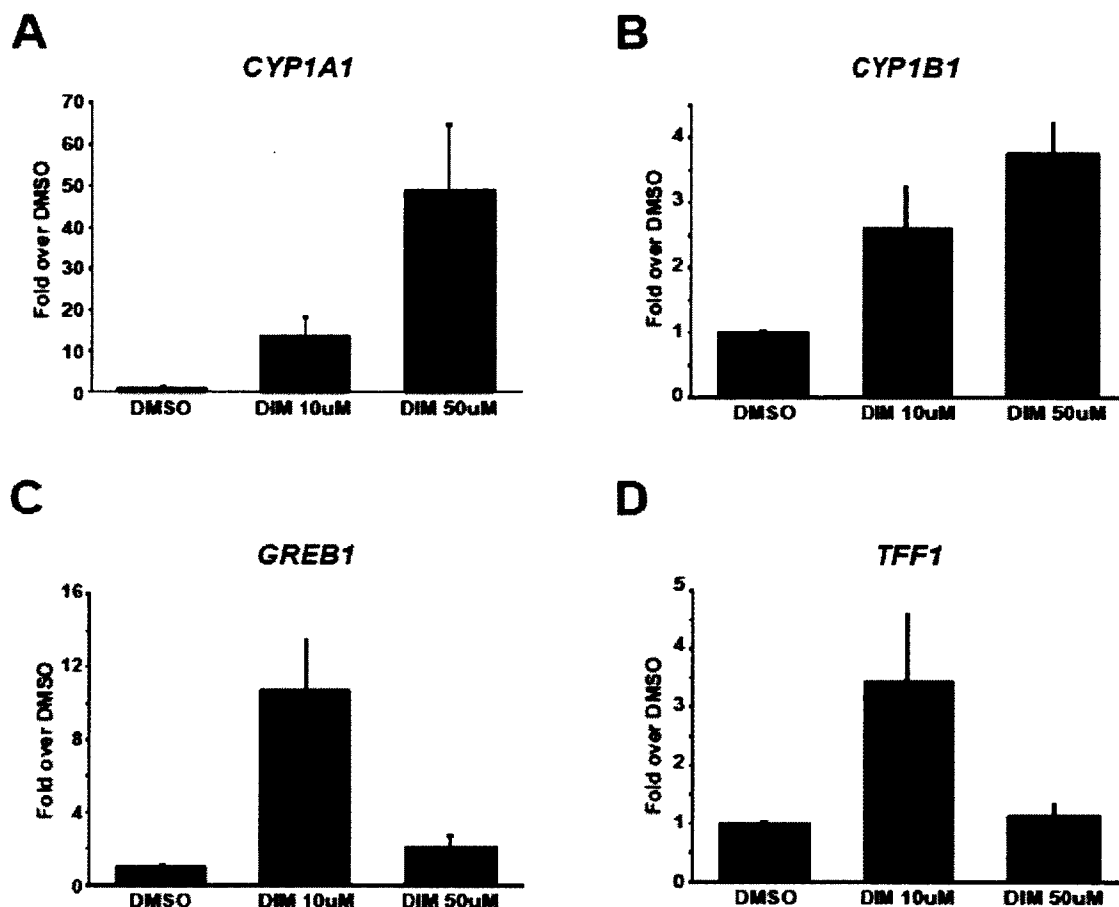


**Figure 4.2. ER $\alpha$  degradation increases *CYP1A1* induction in response to DIM.** (A) mRNA expression analysis were performed in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days and treated with 50  $\mu$ M ICI 182 780 for 24h prior addition of 50  $\mu$ M DIM for 24 h. ChIP experiments of AhR (B) and ER $\alpha$  (C) were performed in MCF7 cells, grown in estrogen free media for 3 days, and then treated or not with 50  $\mu$ M ICI 182 780 for 24 h prior to addition of 50  $\mu$ M DIM for 1 h. Results are showed as % of Input and represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation.

*Different concentrations of DIM preferentially activates AhR or ER $\alpha$  signaling pathways*

In the previous experiments, we used 50  $\mu$ M DIM, which is considered to be a high concentration. For example, Leong and co-workers proposed that a heavy eater of

*Brassica* vegetables could reach, under optimal conditions, a DIM blood concentration of approximately 10  $\mu\text{M}$  (Leong et al., 2001). Thus, we decided to compare a potential physiological concentration of DIM (“low” = 10  $\mu\text{M}$ ) with an elevated concentration (“high” = 50  $\mu\text{M}$ ). We next treated MCF7 cells grown in estrogen-free media for three days with the low and the high concentrations of DIM, and we measured the mRNA levels of two AhR target genes (*CYP1A1* and *CYP1B1*), as well as two ER $\alpha$  target genes (*GREB1* and *TFF1*). We observe an increase in gene expression that is directly proportional to DIM concentrations for the AhR target genes (Figure 4.3A and 4.3B). Strikingly, low concentration of DIM strongly induces ER $\alpha$  target gene expression whereas high concentration has almost no effect on the expression of these genes (Figure 4.3C and 4.3D). These results suggest that physiological concentrations of DIM stimulate transcriptional activity of ER $\alpha$ -dependant genes in the absence of E2 in MCF7 cells.

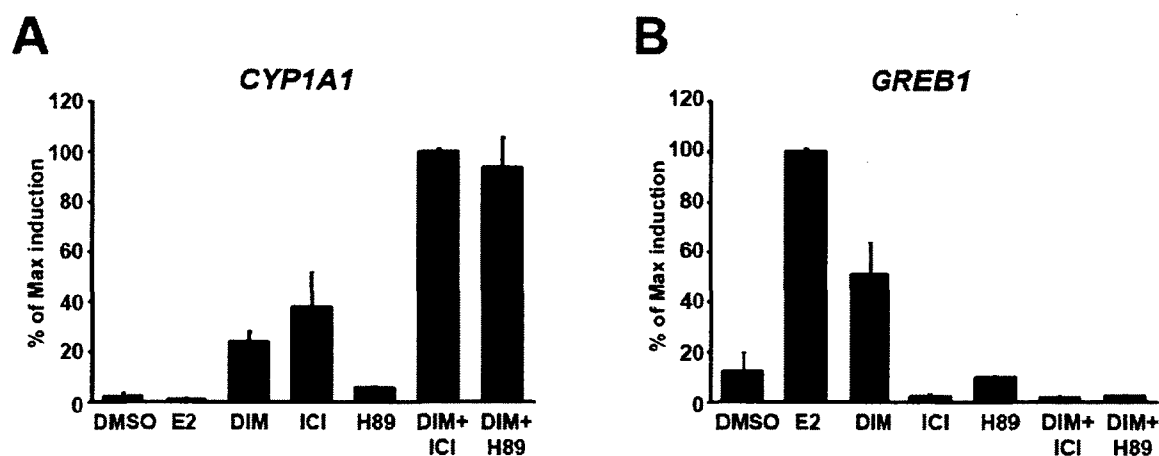


**Figure 4.3. Effects of different concentrations of DIM on AhR and ER $\alpha$  target gene expressions.** mRNA levels of AhR target genes *CYP1A1* (A) and *CYP1B1* (B) and ER $\alpha$  target genes *GREB1* (C) and *TFF1* (D) were quantified in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days, then treated with DMSO, 10  $\mu$ M DIM or 50  $\mu$ M DIM for 24 h. Results are showed as fold over DMSO and represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation.

*DIM ligand-independent activation of ER $\alpha$  is mediated by the PKA signaling pathway*

Previous studies have showed using reporter assays that activation of ER $\alpha$  by DIM is independent of its binding on ER $\alpha$ , and involves mainly the PKA signaling pathway

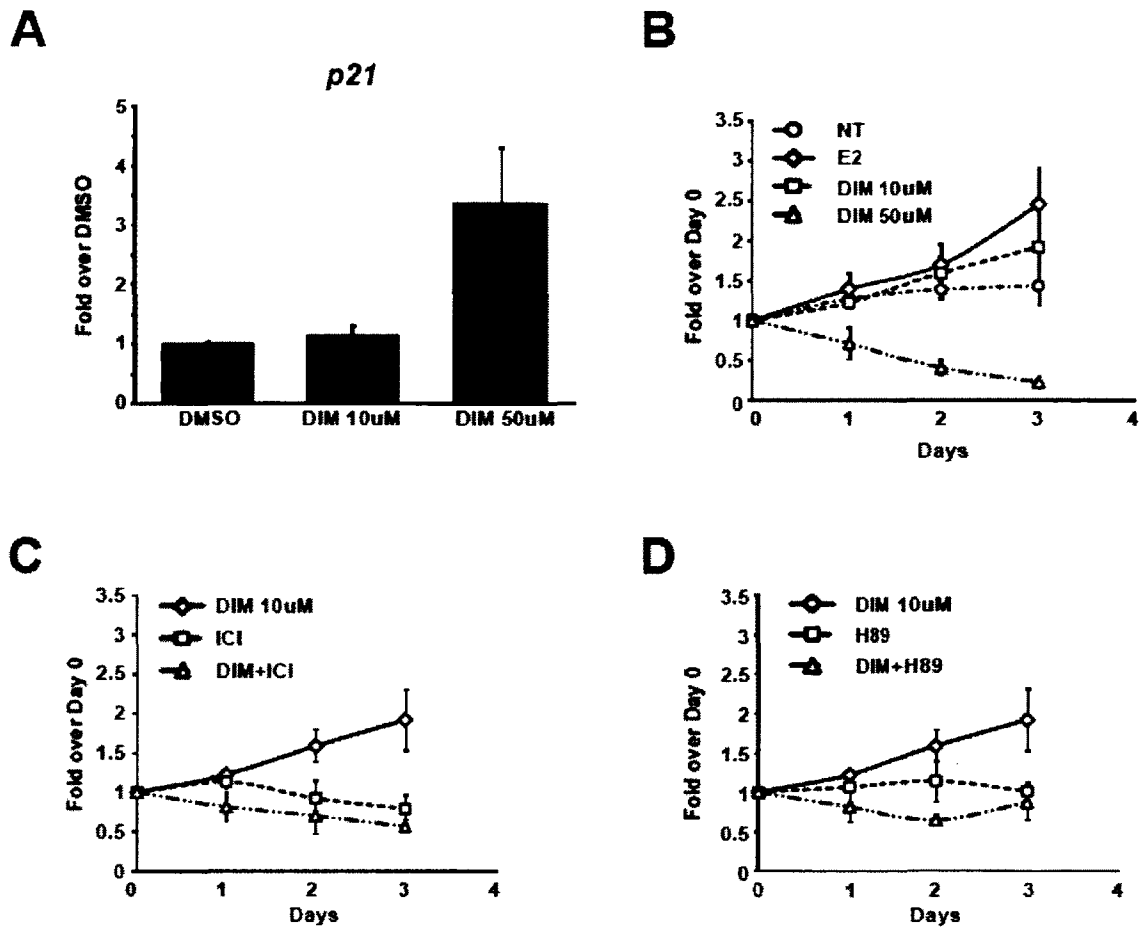
(Leong et al., 2004). To test the role of the PKA signaling pathway in ER $\alpha$  activation by DIM, we chose to directly measure mRNA levels of *CYP11A1*, which is negatively regulated by ER $\alpha$ , and *GREB1*, which is positively regulated by ER $\alpha$ . MCF7 cells, grown in E2-depleted media, were treated with 100 nM E2, 10  $\mu$ M DIM, 10  $\mu$ M DIM + 50  $\mu$ M ICI or 10  $\mu$ M DIM + 10  $\mu$ M H89 (an inhibitor of the PKA signaling pathway) for 24 h. ICI and H89 co-treatments with DIM abrogate the repression mediated by ER $\alpha$  on *CYP11A1* gene expression (Figure 4.4A). Conversely, we observe that ICI and H89 co-treatments with DIM abolish the induction of *GREB1* (Figure 4.4B). In conclusion, the effect of DIM observed on gene expression is, at least in part, mediated by ER $\alpha$  via the action of PKA.



**Figure 4.4. Ligand-independent activation of ER $\alpha$  by DIM is mediated by the PKA signaling pathway.** *CYP11A1* mRNA levels (A) and *GREB1* mRNA levels (B) in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days, and then treated or not with 50  $\mu$ M ICI or 10  $\mu$ M H89 for 24 h prior addition of DMSO, 100 nM E2, 10  $\mu$ M DIM, 50  $\mu$ M ICI, 10  $\mu$ M H89, 10  $\mu$ M DIM+50  $\mu$ M ICI or 10  $\mu$ M DIM+10  $\mu$ M H89 for 24 h. Results are showed as percent of maximum induction and represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation.

*Low concentrations of DIM induces MCF7 proliferation in the absence of E2*

It is known that high concentrations of DIM (>50  $\mu\text{M}$ ) have antiproliferative and antitumor properties in almost all cancer cell lines that have been tested (Choi et al., 2009; Ge et al., 1996; Hong et al., 2002). However, according to results presented in the previous section, a low dose of DIM activates ER $\alpha$  and might potentially induce cellular proliferation. We thus decided to compare the effect of both DIM concentrations on cellular proliferation. To test this, we chose to verify if the expression of *p21*, a key regulator of the cell cycle associated with G1 arrest and senescence, was affected by DIM treatment. We treated MCF7 cells grown in E2-depleted media with 10  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  of DIM, and we measured *p21* expression by qRT-PCR. We observe that only the high concentration of DIM induces *p21* expression (Figure 4.5A). We then compared MCF7 cell proliferation by using crystal violet staining in E2-depleted media following three days of treatment with either E2, 10  $\mu\text{M}$  DIM or 50  $\mu\text{M}$  DIM (Figure 4.5B). We observe that the two concentrations of DIM have opposite effects on cellular proliferation. On one hand, a low concentration of DIM stimulates cell growth almost as much as E2 treatment. On the other hand, a high concentration of DIM inhibits cell growth and promotes cell death (Fig 4.5B). To verify that the observed effects of the low concentration of DIM on cellular proliferation were mediated by ER $\alpha$  and PKA, we treated MCF7 cells with either ICI or H89 in addition of DIM (Figure 4.5C, 4.5D). Degradation of ER $\alpha$  and inhibition of the PKA signaling pathway abrogate the proliferative effect of DIM treatment in MCF7 cells in the absence of E2. However, in the presence of E2, low concentration of DIM reduces proliferation of MCF7 cells after 3 days (data not shown). In conclusion, we observe that a low concentration of DIM induces MCF7 cells proliferation in absence of E2. Also, we show that the effect of DIM on cell proliferation is mediated by ER $\alpha$  and PKA.



**Figure 4.5. Low concentration of DIM induces MCF7 proliferation in the absence of E2.** (A) *p21* mRNA expression was quantified in MCF7 cells grown in estrogen free media for 3 days and then treated with DMSO, 10  $\mu$ M DIM and 50  $\mu$ M DIM for 24 h. (B-D) Proliferation assay of MCF7 cells, grown in estrogen free media with the following treatments for 3 days: (B) DMSO (NT), 100 nM E2, 10  $\mu$ M DIM and 50  $\mu$ M DIM; (C) 10  $\mu$ M DIM, ICI 182 780 (ICI) or both (DIM + ICI); (D) 10  $\mu$ M DIM, H89 or both (DIM + H89).

## Discussion

Bidirectional inhibitory crosstalk between AhR and ER $\alpha$  is very complex and occurs at many regulatory levels (Ohtake et al.; Safe and Wormke, 2003). The chemopreventive properties of AhR ligands in breast cancer development have strongly influenced the research in only one direction and consequently, understanding the mechanisms underlying the regulation of ER $\alpha$  signaling pathway by AhR, and AhR ligands is the focus of most studies. We, on the other hand decided to investigate this inhibitory crosstalk in the other direction – i.e. how ER $\alpha$  affects AhR target gene expression - and to study how diverse AhR ligands can differentially modulate this crosstalk. To pursue these objectives, we chose to focus our investigations on DIM, which is particularly interesting because it can activate both pathways. DIM has been intensely studied as a possible therapeutic agent in cancer treatment, especially breast cancer. Indeed, studies report that DIM treatment promotes cellular growth arrest of cancer cells as well as a decrease in mammary tumor formation in DMBA-treated rats (Chen et al., 1998; Chen et al., 1996; Hong et al., 2002). Although the use of DIM as a therapeutic agent in the treatment of breast cancer is not yet allowed, there are active clinical trials that are currently testing DIM for the treatment of many types of cancers (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=diindolylmethane>). However, DIM can be easily bought as a dietary supplement and be self-administrated. As previously mentioned, DIM is a SAhRM and binds AhR, which is involved in the regulation of the expression of phase I and II drug metabolizing enzymes. Discrepancies are found in the literature as to whether DIM is an agonist or an antagonist of AhR (Chen et al., 1996; Gross-Steinmeyer et al., 2004; Gross-Steinmeyer et al., 2009; Hestermann and Brown, 2003; Stresser et al., 1995), thus, clarification of this issue will be important, especially regarding the potentially toxic effect mediated by AhR agonists in the liver following AhR activation.

In this study, we used two well-known AhR ligands: on the one hand, the prototypical AhR ligand TCDD, which is here used as a positive control. On the other hand, we used

DIM, and tested more particularly how the use of different concentrations of this compound can lead to opposite biological outcomes. As previously reported, we confirmed that activation of ER $\alpha$  by E2 represses the induction of *CYP1A1* by approximately 60% after TCDD treatment (Figure 4.1A). The simultaneous activation of AhR and ER $\alpha$  when cells are treated with DIM does not allow full induction of *CYP1A1*. Furthermore, addition of E2 to DIM treated cells has no repressive effect on *CYP1A1* expression, which can be explained by the fact that ER $\alpha$  is already fully recruited to the *CYP1A1* promoter after DIM treatment alone. To ensure that DIM treatment has an ER $\alpha$ -dependant repressive effect on *CYP1A1*, we used a specific ER $\alpha$  inhibitor, ICI 182 780 (ICI) in combination with DIM and observed a two fold increase both in *CYP1A1* mRNA induction and in AhR binding at its promoter (Figure 4.2A and 4.2B). We propose that activation of ER $\alpha$  by DIM can explain, at least in part, some discrepancies found in the literature on the role of DIM as an agonist/antagonist of AhR in estrogen positive cell lines.

DIM concentrations found in the human body are dependent on the diet. Our first experiments were carried out using a concentration of 50  $\mu$ M, which is probably much higher than concentrations that can be reached in the body (Leong et al., 2001). We then also compared 50  $\mu$ M DIM with a more physiological concentration of DIM (10  $\mu$ M), and observed that the high concentration of the compound exclusively induces the expression of AhR target genes (*CYP1A1* and *CYP1B1*), while the low concentration of DIM shows significant effects on the expression of ER $\alpha$  target genes (*GREB1* and *TFF1*) in the absence of E2. These observations indicate that at physiological concentrations, DIM principally mediates estrogenic effects. It can also explain why oral administration of DIM in rodents has no hepatic toxicity due to the weak induction of the *CYP1A1* gene at this low concentration. ER $\alpha$  activation can be mediated by direct binding of its main ligand (E2), but it can also be induced by the activation of the PKA and MAPK signaling pathways. The phosphorylation of ER $\alpha$  increases its capacity to interact with the transcription machinery and triggers expression of ER $\alpha$  target genes (Endoh et al., 1999; Kato et al., 1995; Lavinsky et al., 1998; Tremblay et al., 1999). Accordingly, we were



able to demonstrate that the effect of DIM treatment on *CYP1A1* and *GREB1* expression are mediated by ER $\alpha$  and the PKA signaling pathway.

The estrogen receptor is highly expressed in almost 70% of breast cancer cases and its activation promotes cellular proliferation and tumor development (Masood, 1992). Our results demonstrate that DIM, at concentrations possibly reached by a diet rich in cruciferous vegetables, induces proliferation of MCF7 cells in the absence of E2. DIM requires ER $\alpha$  and the PKA signaling pathway to promote cellular growth in the absence of E2. Consequently, the estrogen receptor status, as well as circulating estrogen levels, will influence the local effects of DIM on cell growth. An interesting study showed that DIM treatment induces *CYP1A1* and *CYP1A2* expression to 113 and 25 fold respectively in human primary hepatocytes. Co-treatment with aflatoxin B1 (AFB), a hepatocarcinogen, and DIM -even at a low concentration of 10  $\mu$ M- promotes a huge increase in the formation of DNA adducts, and thus the genotoxicity of AFB in primary hepatocytes (Gross-Steinmeyer et al., 2004; Gross-Steinmeyer et al., 2009). Altogether, our findings suggest that careful use of DIM as a dietary supplement or as a therapeutic agent should be reinvestigated.

## References

Beischlag, T.V., and Perdew, G.H. (2005). ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280, 21607-21611.

Belous, A.R., Hachey, D.L., Dawling, S., Roodi, N., and Parl, F.F. (2007). Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res* 67, 812-817.

Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., and Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9543-9547.

Cao, L., Kim, S., Xiao, C., Wang, R.H., Coumoul, X., Wang, X., Li, W.M., Xu, X.L., De Soto, J.A., Takai, H., *et al.* (2006). ATM-Chk2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency. *EMBO J* 25, 2167-2177.

Cavalieri, E.L., Stack, D.E., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S.L., Patil, K.D., Gross, M.L., Gooden, J.K., *et al.* (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10937-10942.

Chang, X., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2006). Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane. *Carcinogenesis* 27, 541-550.

Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2005). 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis* 26, 771-778.

Chen, I., McDougal, A., Wang, F., and Safe, S. (1998). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis* 19, 1631-1639.

Chen, I., Safe, S., and Bjeldanes, L. (1996). Indole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists in T47D human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 51, 1069-1076.

Choi, H.J., Lim do, Y., and Park, J.H. (2009). Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol* 9, 39.

Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3942-3948.

Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Selmin, O., and Romagnolo, D.F. (2009). Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J Nutr* 139, 26-32.

Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., and Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19, 5363-5372.

Fernandez, S.V., Russo, I.H., and Russo, J. (2006). Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells. *Int J Cancer* 118, 1862-1868.

Ge, X., Yannai, S., Rennert, G., Gruener, N., and Fares, F.A. (1996). 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 153-158.

Gierthy, J.F., and Lincoln, D.W., 2nd (1988). Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Breast Cancer Res Treat* 12, 227-233.

Gierthy, J.F., Lincoln, D.W., Gillespie, M.B., Seeger, J.I., Martinez, H.L., Dickerman, H.W., and Kumar, S.A. (1987). Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue

plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 47, 6198-6203.

Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P.L., Liu, F., Tracy, J.H., Bammler, T.K., Quigley, S.D., Farin, F.M., Buhler, D.R., Safe, S.H., Strom, S.C., *et al.* (2004). Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes. *Xenobiotica* 34, 619-632.

Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P.L., Tracy, J.H., Bammler, T.K., Strom, S.C., Buhler, D.R., and Eaton, D.L. (2009). Modulation of aflatoxin B1-mediated genotoxicity in primary cultures of human hepatocytes by diindolylmethane, curcumin, and xanthohumols. *Toxicol Sci* 112, 303-310.

Hestermann, E.V., and Brown, M. (2003). Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 23, 7920-7925.

Hong, C., Kim, H.A., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2002). 3,3'-Diindolylmethane (DIM) induces a G(1) cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21(WAF1/CIP1) expression. *Carcinogenesis* 23, 1297-1305.

Kansra, S., Yamagata, S., Sneade, L., Foster, L., and Ben-Jonathan, N. (2005). Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol* 239, 27-36.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreon, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnins, R.P., Frauson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., *et al.* (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 279-303.

Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., *et al.* (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2920-2925.

Leong, H., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2001). Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor-alpha expression. *Carcinogenesis* 22, 1809-1817.

Leong, H., Riby, J.E., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2004). Potent ligand-independent estrogen receptor activation by 3,3'-diindolylmethane is mediated by cross talk between the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 18, 291-302.

Li, K.M., Todorovic, R., Devanesan, P., Higginbotham, S., Kofeler, H., Ramanathan, R., Gross, M.L., Rogan, E.G., and Cavalieri, E.L. (2004). Metabolism and DNA binding studies of 4-hydroxyestradiol and estradiol-3,4-quinone in vitro and in female ACI rat mammary gland in vivo. *Carcinogenesis* 25, 289-297.

Martucci, C., and Fishman, J. (1977). Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action--uterotrophic activity of estradiol metabolites. *Endocrinology* 101, 1709-1715.

Martucci, C.P., and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther* 57, 237-257.

Masood, S. (1992). Estrogen and progesterone receptors in cytology: a comprehensive review. *Diagn Cytopathol* 8, 475-491.

Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D., and Melvin, W.T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57, 3026-3031.

Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K., and Kato, S. (2011). Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 102-107.

Parl, F.F., Dawling, S., Roodi, N., and Crooke, P.S. (2009). Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Ann N Y Acad Sci* 1155, 68-75.

Safe, S., and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16, 807-816.

Stresser, D.M., Bjeldanes, L.F., Bailey, G.S., and Williams, D.E. (1995). The anticarcinogen 3,3'-diindolylmethane is an inhibitor of cytochrome P-450. *J Biochem Toxicol* 10, 191-201.

Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3, 513-519.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., and Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227, 115-124.

Vivar, O.I., Lin, C.L., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2009). 3,3'-Diindolylmethane induces a G(1) arrest in human prostate cancer cells irrespective of androgen receptor and p53 status. *Biochem Pharmacol* 78, 469-476.

Yang, X., Solomon, S., Fraser, L.R., Trombino, A.F., Liu, D., Sonenshein, G.E., Hestermann, E.V., and Sherr, D.H. (2008). Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue. *J Cell Biochem* 104, 402-417.

Zhao, Z., Kosinska, W., Khmelnsky, M., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Chakravarti, D., Sacks, P.G., and Guttenplan, J.B. (2006). Mutagenic activity of 4-hydroxyestradiol, but not 2-hydroxyestradiol, in BB rat2 embryonic cells, and the mutational spectrum of 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol* 19, 475-479.

# CHAPITRE V

## *Conclusion générale*

Au cours de mon doctorat, j'ai étudié l'expression de deux gènes cibles de AhR, *CYP1A1* et *CYP1B1*, dans une lignée cellulaire de cancer du sein exprimant ER $\alpha$  (MCF7). Je me suis intéressée plus particulièrement au rôle du variant d'histone H2A.Z et de ER $\alpha$  lors de l'induction de ces deux gènes cibles avec plus d'emphase sur le gène *CYP1A1*. Dans ce chapitre, je vais d'une part résumer l'ensemble des découvertes que nous avons faites et les intégrer aux connaissances actuelles. D'autre part, je vais exposer les perspectives de ces travaux et proposer des pistes de recherche pour la suite du projet.

## **1 Discussion**

L'étude de l'expression des gènes cibles de AhR est un nouveau projet dans le laboratoire que j'ai initié au printemps 2008. Comme mentionné dans l'introduction, les premières recherches bibliographiques m'ont permis de me rendre compte des nombreuses contradictions entre les groupes de recherche et du peu d'information pour expliquer ces différences. Les premières étapes du projet ont donc été de déterminer des conditions expérimentales mais aussi de voir quels résultats déjà publiés étaient reproductibles dans nos cellules. Dans le chapitre II, les résultats d'expression sont présentés en pourcentage d'induction par rapport au TCDD plutôt qu'en fois d'induction. La raison pour cela est que la quantité d'ARNm avant induction de *CYP1A1* est très faible dans toutes les lignées



cellulaires utilisées pour l'étude et à cause de cela j'observais des variations très grandes entre les réplicats biologiques. En effet, l'induction pouvait être comprise entre plusieurs centaines et plusieurs milliers de fois dans les cellules traitées selon l'expérience. En rapportant les résultats sur le maximum cela diminuait drastiquement la variation observée. De même les résultats de CHIP sont présentés en pourcentage du signal maximum afin de diminuer la variation entre les réplicats biologiques. Cependant, à chaque expérience j'utilise toujours une paire d'amorce située dans une région contrôle qui sert de référence pour le bruit de fond (dans le cas des promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* ce sont les amorces D, voir figure 2.3A et supplementary figure 2.2A); et les signaux sont considérés suffisant s'ils sont au moins deux fois supérieur au bruit de fond.

Au début de mon projet, on savait, à partir de travaux réalisés dans notre laboratoire, que le variant d'histone H2A.Z était important pour l'expression des gènes cibles de ER $\alpha$  en réponse à l'E2 dans les cellules MCF7 (Gevry et al., 2009). Nous avons donc voulu savoir si H2A.Z était aussi important pour la régulation des gènes cibles de AhR. Pour cela nous avons infecté les cellules MCF7 avec un lentivirus contenant un shARN dirigé contre H2A.Z, et nous avons conservé les mêmes temps post infection que ceux utilisés dans l'article Gévry et collaborateurs (2009) (Gevry et al., 2009). Dans la figure 2.2A on peut voir que la déplétion de H2A.Z semble augmenter le niveau protéique de AhR dans les cellules, ce résultat n'a pas été reproduit et la quantité en ARNm de AhR ne change pas dans les cellules déplétées en H2A.Z. Nous avons montré que la déplétion de H2A.Z diminuait l'induction de *CYP1A1* en réponse au TCDD uniquement dans les lignées cellulaires exprimant ER $\alpha$ . L'induction de *CYP1B1* est toujours affectée par la déplétion de H2A.Z peu importe le statut de ER $\alpha$  dans la lignée cellulaire. Ces observations tendent à montrer que le rôle de H2A.Z dans la régulation de ces deux gènes est différent. La comparaison des niveaux d'induction d'ARNm de *CYP1A1* et *CYP1B1* entre les différentes lignées cellulaires nous a permis d'observer que l'induction de *CYP1A1* est aussi forte dans les MCF7, T47D et HepG2 alors que celle de *CYP1B1* est la même dans les MDA-MB-231, MCF7 et T47D. Dans les deux cas, nous ne pouvons pas faire de lien entre le statut de ER $\alpha$  et les niveaux d'induction de ces deux gènes. À partir de ces

observations, nous avons décidé de nous intéresser aux interactions entre AhR et ER $\alpha$  et de découvrir quel était le rôle de H2A.Z dans celles-ci. Le « crosstalk » inhibiteur entre AhR et ER $\alpha$  est connu depuis plusieurs décennies. De façon intéressante, AhR semble réprimer globalement tous les effets de ER $\alpha$  alors que ER $\alpha$  affecte spécifiquement *CYP1A1* (et *CYP1A2*) mais pas *CYP1B1*. La combinaison de ces observations suggère que la présence de H2A.Z au gène *CYP1A1* est importante pour empêcher ER $\alpha$  d'inhiber l'induction de celui-ci.

D'après les études précédemment réalisées dans le laboratoire sur le rôle de H2A.Z dans la régulation de l'expression génique chez l'homme, nous savions d'une part que la déplétion de H2A.Z ne modifiait pas la liaison de ER $\alpha$  au promoteur de *TFF1* bien qu'elle affectait l'expression de ce gène et d'autre part, que la présence de p400 était corrélée à celle de H2A.Z à la fois à *p21* et *TFF1* (Gevry et al., 2007; Gevry et al., 2009). Nous avons eu la surprise de voir que ces observations n'étaient pas vraies au promoteur de *CYP1A1*. En effet, la déplétion de H2A.Z conduit à une diminution de 50% de la liaison de AhR au promoteur de *CYP1A1* après traitement au TCDD. De plus, H2A.Z est présent au promoteur de *CYP1A1* avant induction et est remodelé suite à l'activation du gène alors que p400 est quand à lui recruté. D'après ces résultats on peut émettre deux hypothèses, premièrement le rôle de H2A.Z à *CYP1A1* semble être différent de celui qu'il avait à *p21* et *TFF1*. Deuxièmement, p400 pourrait jouer un rôle indépendant (ou tout du moins différent) de l'incorporation de H2A.Z. Pour supporter cette deuxième hypothèse, nous avons observé que la déplétion de p400 n'avait pas d'effet sur l'incorporation de H2A.Z aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* (chapitre II).

Plusieurs groupes ont montré que la liaison de AhR sur l'ADN est inhibée par la méthylation *in vitro* et *in vivo* (Okino et al., 2006; Shen et Whitlock, 1989). De plus, la publication de la relation antagoniste entre la méthylation de l'ADN et H2A.Z nous a conduits à investiguer le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de *CYP1A1*. Grâce à des expériences d'immunoprécipitation de l'ADN

méthylé (MeDIP) et de séquençage au bisulfite, nous avons montré qu'en absence de H2A.Z, la quantité de 5meC était augmentée de 3,5 fois au promoteur de *CYP11A1* (chapitre II). Cette observation soulève une question importante : Quel est le mécanisme derrière la relation antagoniste entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN? Nous avons émis l'hypothèse que le recrutement du complexe p400-Tip60 pourrait promouvoir la dégradation de DNMT1 et DNMT3B pour inhiber localement leur activité. Les résultats préliminaires présentés dans le chapitre III montrent que la surexpression de Tip60 diminue de manière globale la quantité de DNMT3B dans les cellules, ce qui soutient notre hypothèse (figure 3.4B). D'après les résultats de ChIPs obtenus dans le laboratoire, nous savons que la liaison de p400 suit le profil de liaison de H2A.Z (comme à *p21* et *TFF1*) ou bien est présent en petite quantité en même temps que H2A.Z, même s'il est davantage recruté après le départ de H2A.Z (comme à *CYP11A1*). Pour cette raison, nous avons proposé en 2010 dans une publication de type «point de vue» (Marques et al., 2010), qu'un peu de p400 (ou SRCAP) pourrait toujours demeurer associé à H2A.Z sur la chromatine pour ainsi augmenter sa stabilité (figure 5.1). Nous proposons également que la présence du complexe p400-Tip60 n'agisse pas seulement pour stabiliser H2A.Z mais aussi pour protéger de la méthylation les séquences mitoyennes d'ADN.

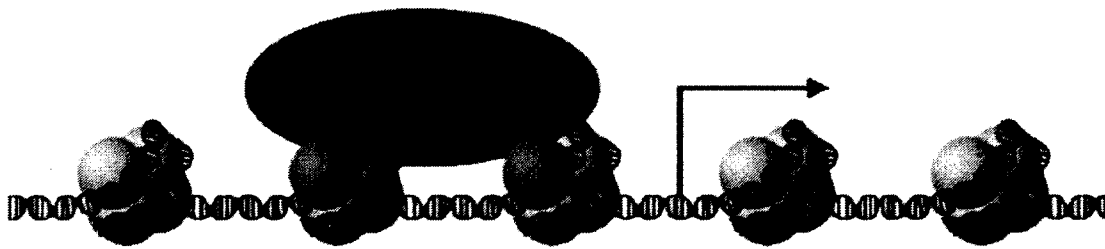


Figure 5.1 : P400 ou SRCAP reste associé avec les nucléosomes contenant H2A.Z pour augmenter sa stabilité. Tiré de Marques et al., 2010.

Des changements dans les patrons de méthylation de l'ADN sont observés dans les tumeurs en comparaison aux tissus sains. Ces changements sont caractérisés par une hypométhylation des éléments répétés qui est une des explications possible pour l'augmentation de l'instabilité génomique (donc l'apparition de réarrangements

chromosomiques) et dans le même temps, une hyperméthylation des îlots CpG localisés dans le promoteur de certains gènes dont des gènes suppresseurs de tumeurs comme *p16* et *BRCA1* (Esteller et al., 2000; Merlo et al., 1995; Wilson et al., 2007). La relation entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN est celle de l'œuf ou la poule, lequel des deux vient en premier? Dans l'article de Steven Henikoff (2008) qui a mis en évidence cette relation chez *Arabidopsis thaliana*, il semble y a voir une dépendance dans les deux sens car peu importe si l'on affecte H2A.Z ou la méthylation de l'ADN, cela modifie la localisation de l'autre marque (Zilberman et al., 2008). D'après les données de séquençage à haut débit produites à partir de cellules humaines, on sait que H2A.Z est présent au promoteur proximal de nombreux gènes qui correspond aussi aux régions les plus enrichies en îlots CpG. Cause ou conséquence? À ce jour, on ne sait pas ce qui régule le choix du lieu de déposition de H2A.Z ou ce qui régule les régions nouvellement méthylées. Dans tous les cas, l'adressage de H2A.Z reste une question primordiale. Considérant les différentes fonctions de H2A.Z dans la cellule, il n'est pas invraisemblable de supposer qu'il peut exister différents signaux d'adressage selon la localisation et/ou le rôle de H2A.Z dans le génome. Une précédente étude bioinformatique réalisée dans notre laboratoire indique que l'acétylation de la lysine 18 de l'histone H3 est la marque qui permet la meilleure prédiction de la présence de H2A.Z dans un nucléosome, peu importe où dans le génome mais cette marque ne permet la prédiction que de 66% des nucléosomes contenant H2A.Z (Gervais et Gaudreau, 2009). L'implication de cette modification pour la localisation de H2A.Z dans le génome est actuellement le projet d'une étudiante au doctorat.

Une augmentation de la méthylation du promoteur de *CYP1A1* a été observée dans deux types de cancer à ce jour (prostate et poumon) (Okino et al., 2006; Tekpli et al., 2012), mais une diminution de l'expression de *CYP1A1* dans des cancers du sein, du cou et de la tête a aussi été rapportée (Hafeez et al., 2012; Sharma et al., 2010). Cependant, la corrélation entre la méthylation du promoteur et le niveau d'expression de *CYP1A1* n'a pas été faite pour ces derniers et il serait intéressant de savoir si le mécanisme de silençage de *CYP1A1* est conservé dans ces différents types de cancer. En effet, le groupe de Robert Barouki (2001) a proposé que le ratio CYP1A1/CYP1B1 puisse être important

dans l'initiation du cancer du sein et a observé que les cellules tumorales de la glande mammaire produisaient plus de 4-OHE2 (un métabolite de l'E2 catalysé par CYP1B1) que les cellules normales (Coumoul et al., 2001). Cependant, ce ratio pourrait aussi être important pour l'initiation d'autres types de cancer.

Dans le chapitre II, nous avons aussi observé que des cellules MCF7 et T47D (ER $\alpha$  positives) cotraitées avec de l'E2 et du TCDD vont produire moins de transcrits de *CYP1A1* que des cellules traitées uniquement avec du TCDD. Dans les cellules MCF7, après traitement avec du TCDD seul, AhR est recruté au promoteur de *CYP1A1*. Cependant lors du cotraitement TCDD et E2, ER $\alpha$  est aussi recruté au promoteur de *CYP1A1* et dans cette condition, la quantité de AhR présente est divisée par deux (chapitre II). Nous avons encore une fois émis l'hypothèse que la méthylation de l'ADN était impliquée dans ce processus de répression. Nous avons pu mettre en évidence d'une part que ER $\alpha$  était incapable de réprimer *CYP1A1* dans des cellules préalablement traitées au 5-azacytidine ou en absence de DNMT3B. D'autre part, DNMT3B est recruté au promoteur de *CYP1A1* de façon E2-dépendante et par des expériences de coimmunoprécipitation et de « pull-down », nous avons montré que DNMT3B et ER $\alpha$  sont capable d'interagir l'un avec l'autre. À partir de ces résultats, nous proposons un modèle de régulation de l'expression de *CYP1A1* par ER $\alpha$  (Figure 5.2). Dans ce modèle, en présence de TCDD et E2, AhR/Arnt et ER $\alpha$  interagissent ensemble et le complexe AhR/Arnt recrute ER $\alpha$  au promoteur de *CYP1A1*. Dans le même temps, ER $\alpha$  recrute DNMT3B qui va méthyler le promoteur de *CYP1A1* et ainsi affecter la liaison de AhR et l'induction de *CYP1A1*.

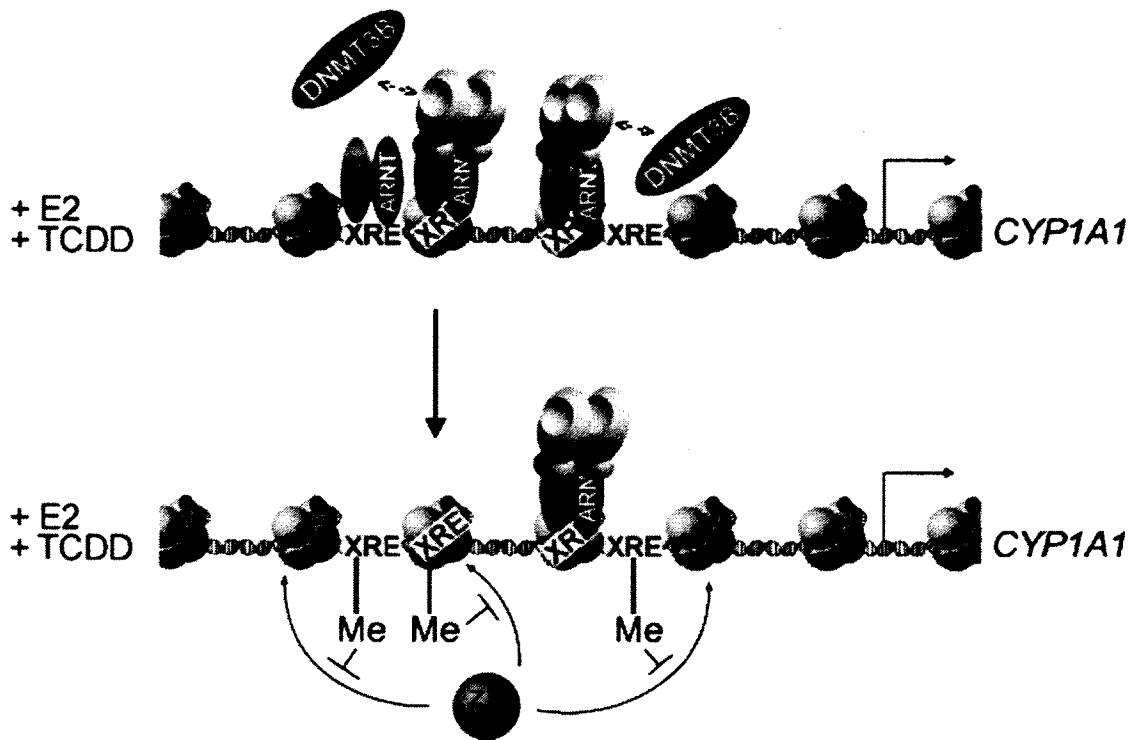


Figure 5.2 : Modèle proposé pour expliquer la régulation de l'expression de *CYP1A1* par ER $\alpha$  en présence de TCDD et E2. Tiré de Marques et al., 2012 (en préparation).

Le rôle de DNMT3B dans la régulation de *CYP1A1* est très intéressant pour plusieurs raisons. En effet, comme je l'ai mentionné précédemment, une augmentation de la méthylation du promoteur de *CYP1A1* a été recensée dans certains cancers. De plus, des changements dans les patrons de méthylation sont fréquemment observés dans les cellules cancéreuses en comparaison avec des cellules normales et c'est le cas dans 50% des cas de cancer du sein (Bernardino et al., 1997; Soares et al., 1999). Une étude publiée en 2003 a montré que *DNMT3B* est surexprimé dans 30% des cas de cancer du sein alors que *DNMT1* et *DNMT3A* ne sont surexprimés que dans 5% et 3% des cas respectivement (Girault et al., 2003). Cette observation permet d'envisager un rôle prépondérant de DNMT3B par rapport aux autres DNMTs dans le développement de cancers du sein. Dans la même étude, les auteurs montrent que 85% des tumeurs avec une expression

normale de *DNMT3B* et 59% des tumeurs avec une surexpression de *DNMT3B* sont ER $\alpha$  positives. Une autre particularité de *DNMT3B* est qu'il possède de nombreux variants d'épissage dont un certain nombre est surexprimé dans des cellules cancéreuses (Ostler et al., 2007). De plus, l'expression de ces variants diffère énormément entre les types cellulaires. Dans le chapitre III, j'ai pu montrer grâce à des expériences d'immunobuvardage de type Western que les niveaux de *DNMT3B* varient beaucoup entre les différentes lignées cellulaires utilisées dans mon étude. Pour cette raison, nous proposons que ces variations soient en partie responsables des différences observées par les laboratoires quant à l'effet de ER $\alpha$  sur l'expression de *CYP1A1*. En effet, jusqu'à présent la principale raison donnée pour expliquer ces différences était les conditions de culture cellulaire qui est une explication peu satisfaisante. Au cours de mon projet, j'ai effectivement pu constater l'impact de la culture cellulaire sur l'expression des *CYP1s* mais jamais sur la régulation de *CYP1A1* par ER $\alpha$ . En effet, après une douzaine de passages des cellules, les niveaux basaux de *CYP1A1* et *CYP1B1* augmentent et, par conséquent, le nombre de fois d'induction diminue. Cependant, même dans ces conditions, nous avons toujours pu observer la répression de *CYP1A1* en présence d'E2. L'identification de *DNMT3B* comme corépresseur de ER $\alpha$  dans la régulation de *CYP1A1* nous conduit à nous poser d'autres questions qui pourraient être le point de départ d'autres projets de recherche. *DNMT3B* est-il aussi impliqué dans la répression d'autres gènes cibles de ER $\alpha$ ? Est-ce que certains variants de *DNMT3B* sont particulièrement exprimés dans les cancers du sein? Est-ce que tous les variants sont capables d'interagir avec ER $\alpha$ ?

Dans le chapitre II, j'ai identifié un mécanisme de régulation de l'expression de *CYP1A1* par ER $\alpha$ , cependant je n'ai pas été capable de montrer pourquoi *CYP1B1* n'était pas affecté par la présence de ER $\alpha$  à son promoteur lors de co-traitement avec du TCDD et de l'E2. Deux différences majeures entre ces deux gènes pourraient potentiellement expliquer que ER $\alpha$  ne les régule pas de la même façon. Premièrement, le promoteur de *CYP1B1* contient deux sites de liaison pour ER $\alpha$  qui sont fonctionnels et nous avons en

effet pu observé que l'expression de *CYP1B1* est induite 3-4 fois après traitement à l'E2 seul. Deuxièmement, l'ARN pol II est pré-liée au promoteur de *CYP1B1* ce qui n'est pas le cas au promoteur de *CYP1A1* (Figure 2.3D et supplementary figure 2.2D). Le gène *CYP1B1* est considéré comme « *poised* » ce qui peut expliquer que les facteurs nécessaires à l'induction de l'expression de ces deux gènes soient différents. Et cela pourrait aussi expliquer pourquoi (si les mêmes facteurs ne sont pas importants) la présence de ER $\alpha$  aurait un effet dans un cas et pas dans l'autre.

Dans le chapitre IV, nous avons comparé deux ligands bien caractérisés de AhR, le DIM et le TCDD. Le DIM est produit dans notre estomac à partir de deux molécules d'indole-3-carbinol (I3C). De nombreuses études ont recensé son action anti-proliférative et plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour l'utilisation de cette molécule (Chang et al., 2006; Chang et al., 2005; Choi et al., 2009; Vivar et al., 2009). Cependant, on peut déjà trouver du DIM en vente comme supplément alimentaire. Le TCDD est le ligand prototypique de AhR et est considéré comme très toxique. Une des différences entre ces deux ligands est que le DIM est capable d'activer ER $\alpha$  via l'action de la PKA (Leong et al., 2004). Pour cette raison, l'ajout d'E2 n'affecte pas l'induction de *CYP1A1* en présence de DIM. Pour avoir une forte induction des *CYP1s*, il faut traiter les cellules avec des concentrations de DIM supérieures à 50 $\mu$ M. Dans ces mêmes conditions, on observe un fort arrêt du cycle cellulaire et de la mortalité cellulaire. De plus, ces concentrations sont loin d'être physiologiques. En effet, la concentration sanguine de DIM atteinte par un gros mangeur de brocoli serait de l'ordre de 10 $\mu$ M (Leong et al., 2001). C'est une des raisons qui nous a poussé à vouloir comparer l'effet de deux concentrations de DIM (10 $\mu$ M et 50 $\mu$ M) sur nos cellules. De manière intéressante, nous avons observé que la faible concentration de DIM induit fortement les gènes cibles de ER $\alpha$  en absence d'E2 et très peu les gènes cibles de AhR. Dans les MCF7, l'activation de ER $\alpha$  est responsable de la prolifération cellulaire. Nous avons donc regardé les effets de la faible concentration de DIM sur la prolifération des cellules MCF7 en absence d'E2 et nous avons pu observer que, dans ces conditions, le DIM induit la croissance cellulaire. Ce résultat est diamétralement opposé à l'effet de la forte concentration de DIM (50 $\mu$ M)



qui induit la mort cellulaire. Afin de montrer que les effets de la faible concentration de DIM étaient dus à ER $\alpha$  et à l'action de PKA, nous avons traité les cellules avec, soit du ICI 182 780 (un inhibiteur de ER $\alpha$ ), soit du H89 (un inhibiteur de PKA). Dans ces conditions, le DIM n'a plus d'effet ni sur l'expression des gènes cibles de ER $\alpha$  et AhR ni sur la croissance cellulaire en absence d'E2. Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'utilisation d'un supplément alimentaire de DIM doit être faite avec précaution. En effet, le DIM peut d'une part induire la prolifération de cellules de façon ER $\alpha$  dépendante en absence d'E2, et d'autre part le DIM peut induire et réprimer à la fois l'expression de *CYP1A1*, ce qui conduit à un ratio CYP1A1/CYP1B1 plus petit qu'après un traitement au TCDD. En plus de nos observations, une autre étude a montré que de faibles concentrations de DIM étaient capables d'activer fortement *CYP1A2* dans des cellules hépatiques et ainsi favoriser la formation d'adduits sur l'ADN en présence de procarcinogènes tel que l'aflotoxine B1 (Gross-Steinmeyer et al., 2004; Gross-Steinmeyer et al., 2009).

## 2 Perspectives

Au début du projet, nous avons regardé les effets de la déplétion de H2A.Z sur *CYP1A1* et *CYP1B1* et, bien que nous ayons observé des effets sur les deux gènes, seul le rôle de H2A.Z à *CYP1A1* a été investigué. Cependant, je pense qu'une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la régulation et la dérégulation de l'expression de *CYP1B1* soit importante. En effet, de fortes quantités de *CYP1B1* sont observées dans une grande variété de tumeurs dont celles issues de tissus répondant à des hormones (exemple : prostate, sein, ovaire) comparées aux tissus normaux (McFadyen et al., 2001; Murray et al., 1997). Le rôle important joué par *CYP1B1* dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes mais aussi dans l'activation de procarcinogènes, peut expliquer son rôle dans les premières étapes de la formation des tumeurs. Je propose de poursuivre

l'investigation du rôle de H2A.Z dans la régulation de *CYP1B1*. Les résultats obtenus dans le chapitre II montrent que la déplétion d'H2A.Z diminue l'induction de *CYP1B1* en réponse au TCDD cependant elle n'affecte pas la liaison de AhR ni de l'ARN pol II au promoteur de celui-ci après 90 minutes de traitement avec du TCDD. Dans un premier temps, je propose de regarder le recrutement de ces deux facteurs et de certaines modifications post-traductionnelles des histones (telles que l'acétylation de H3 et H4 et H3K4me3) au cours d'une cinétique avec des temps supérieurs à 90 minutes. L'ARN pol II est préliée au promoteur de *CYP1B1* avant induction, ce qui peut expliquer pourquoi nous n'avons observé aucun effet de la liaison de l'ARN pol II à des temps plus courts. On peut supposer qu'il va falloir plusieurs rondes d'initiation de la transcription par l'ARN pol II avant de voir un effet.

Un autre aspect du projet qui mérite d'être continué est la suite du chapitre III. En effet, dans ce chapitre j'ai principalement généré des résultats préliminaires qui tendent à montrer un lien entre Tip60 et DNMT3B. Une des premières expériences à réaliser est la déplétion de Tip60 et, dans cette condition, de regarder d'une part l'effet sur l'expression de *CYP1A1* et d'autre part, sur la quantité de DNMT3B recruté au promoteur de *CYP1A1*. À plus long terme, on pourrait envisager de regarder les effets de la déplétion de H2A.Z, Tip60 et p400 ou bien la surexpression de ces trois protéines sur la méthylation de l'ADN à l'échelle génomique.

Pour finir, j'ai souvent mentionné tout au long de ma thèse l'importance du ratio entre les enzymes CYP1A1/CYP1B1 pour la production de 2-OHE2 et de 4-OHE2 mais nous ne l'avons jamais mesuré. Les dernières expériences que je propose sont d'une part de mesurer les niveaux de 2-OHE2 et 4-OHE2 produits par différentes lignées cellulaires (transformées, immortalisées et primaires) en réponse à différents ligands de AhR et en présence ou non d'E2. D'autre part, on pourra vérifier la formation de dommages à l'ADN dans les différentes conditions testées par immunofluorescence à l'aide d'un

anticorps dirigé contre  $\gamma$ H2A.X afin de corrélérer les niveaux de 4-OHE2 et des dommages à l'ADN.

## ANNEXE I

### **Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis**

Fanny L'Héritier<sup>1</sup>, Maud Marques<sup>1</sup> and Luc Gaudreau\*.

Université de Sherbrooke, Département de Biologie, 2500 boul. de l'Université  
Sherbrooke QC J1K 2R1 Canada

<sup>1</sup>These two authors contributed equally to this work.

[Fanny.Lheritier@Usherbrooke.ca](mailto:Fanny.Lheritier@Usherbrooke.ca)

[Maud.Marques@Usherbrooke.ca](mailto:Maud.Marques@Usherbrooke.ca)

[Luc.Gaudreau@Usherbrooke.ca](mailto:Luc.Gaudreau@Usherbrooke.ca) (\*corresponding author)

Revue soumise à Toxicology.

## Abstract

The abundance of dioxins and dioxin-like pollutants has massively increased in the environment due to human activity. These chemicals are particularly persistent and accumulate in the food chain, which raises major concerns regarding long-term exposure to human health. Most dioxin-like pollutants activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR) transcription factor, which regulates xenobiotic metabolism enzymes that belong to the cytochrome P450 1A family (that includes *CYP1A1* and *CYP1B1*). Importantly, a crosstalk exists between ER $\alpha$  and AhR. More specifically, ER $\alpha$  represses the expression of the *CYP1A1* gene, which encodes an enzyme that converts 17 $\beta$ -estradiol into 2-hydroxyestradiol. However, ER $\alpha$  does not repress the *CYP1B1* gene, which encodes an enzyme that converts 17 $\beta$ -estradiol into 4-hydroxyestradiol, one of the most genotoxic estrogen metabolites. In this review, we discuss how chronic exposure to xenobiotic chemicals, such as pesticides, might affect the expression of genes regulated by the AhR-ER $\alpha$  crosstalk. Here we focus on recent advances in the understanding of molecular mechanisms that mediate this crosstalk repression, and particularly on how ER $\alpha$  represses the AhR target gene *CYP1A1*, and could subsequently promote breast cancer. Finally, we propose that genes implicated in this crosstalk could constitute important biomarkers to assess long-term effects of pesticides on human health.

## Introduction

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that belongs to the basic helix-loop-helix (bHLH)/Per-Arnt-Sim (PAS) family (Hankinson, 1995). It is maintained inactive in the cytoplasm in a complex with the Hsp90-XAP2-p23 chaperones (Kazlauskas et al., 2001). Activation of AhR occurs via direct binding of its ligands, where it translocates into the nucleus to form a complex with the bHLH/PAS Arnt protein. This heterodimer complex then binds regulatory consensus regions termed xenobiotic response elements (XREs) located at proximity of its target genes, which include the phase I detoxifying monooxygenases *CYP1A1* and *CYP1B1* (Nebert and Gonzalez, 1987). The best-characterized AhR ligands commonly fall into the following classes: halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs), such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Poland and Glover, 1977). All these chemicals are human by-products that emanate from human-based activities. For example, high levels of PAHs are found in barbecue cooked meat, and are becoming a major concern for human health considering their persistence in the environment.

AhR is best known for its role as a mediator of toxicity during environmental pollutant metabolism. However, recent studies show that AhR plays an important role in normal physiology and development as well (Esser et al., 2009; Linden et al., 2010; McMillan and Bradfield, 2007; Schmidt et al., 1996; Stevens et al., 2009). There has also been various studies demonstrating interactions and crosstalk between AhR and various intracellular signaling pathways, including NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2000; Tian et al., 1999), Nrf2 (Hayes et al., 2009), Rb/E2F (Puga et al., 2000), and Sp1 (Wang et al., 1999), as well as other transcription factors belonging to the nuclear receptor family, such as the androgen receptor (Ohtake et al., 2007), and the estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) (Beischlag and Perdew, 2005; Matthews et al., 2005; Ohtake et al., 2007; Ohtake et al., 2003; Wormke et al., 2003). The crosstalk between the signaling pathways of AhR and

ER $\alpha$  receptors will be the main focus of this review, especially in the context of breast cancer development.

### **Ligands and Agonists of AhR**

The best-characterized high-affinity AhR ligands are hydrophobic molecules that bear aromatic carbon rings. However, there is more and more evidence suggesting that there is a growing spectrum of structurally diverse chemicals that are capable of binding and/or activating the AhR signaling pathway. In this section, we will briefly discuss known endogenous and exogenous ligands of AhR, with an emphasis on pesticides.

#### **Endogenous ligands**

Human exposure to toxic environmental chemicals has greatly changed in the last 200 years, especially in societies struck by the industrial revolution. On the one hand, this suggests that AhR has probably been the target of recent evolutionary pressure in various species. One example recently published by Mark Hahn's laboratory (Wirgin et al.) showed that Atlantic tomcod from the Hudson River exposed to high level of PCB, released by General Electric facilities, exhibited a variant of the *AHR2* gene, which is absent in nearly all tomcod from elsewhere. This variant possesses less affinity for TCDD and other AhR ligands, and consequently has less transcriptional activity and toxicity. On the other hand, it is reasonable to assume that AhR response to these man-made chemicals is a sign of biochemical versatility of the receptor to bind a wide range of molecules (see below). This, in turn, may suggest that AhR could also respond to various endogenous ligands, *i.e.* produced by the cells themselves. Studies showing that the AhR signaling pathway is active in the absence of exogenous ligands have reinforced this view, and lead scientists to suspect a role for AhR in physiological functions of cells.

Consequently, intensification of research to find endogenous AhR ligands has sparked over the last few years. The following chemicals, which are endogenously synthesized by human tissues, are known activators of AhR: indigoids, equilenin, heme metabolites, arachidonic acid metabolites, eicosanoids, and tryptophan derivatives (Denison and Nagy, 2003; Nguyen and Bradfield, 2008; Stejskalova et al., 2011). L-kynurenine, a tryptophan catabolite, was shown to activate AhR and to be constitutively produced by tumor cells, and astonishingly promote their survival and escape from the immune system (Opitz et al., 2011). The later observations provide new evidence that an endogenous ligand of AhR promotes carcinogenesis, thereby conferring oncogenic properties to AhR.

## **Exogenous ligands**

### 'Classical' synthetic AhR ligands

As mentioned earlier, AhR is activated by a large group of environmental pollutants composed of HAHs (including TCDD), PAHs (including benzo[ $\alpha$ ]pyrene), and PCBs (Poland and Glover, 1977). The majority of these chemicals are formed and released as by-products of human activities, mostly emanating from industrial and combustion processes (Marinkovic et al., 2010).

### Natural/ Dietary compounds

One of the most obvious potential source of naturally occurring AhR ligands probably comes from our diet. The non-toxic indole-3-carbinol (I3C) and its derivatives, including 3,3'-diindolylmethane (DIM), have been gathering great attention lately for their anticancer properties. But there are other natural compounds that have been reported to



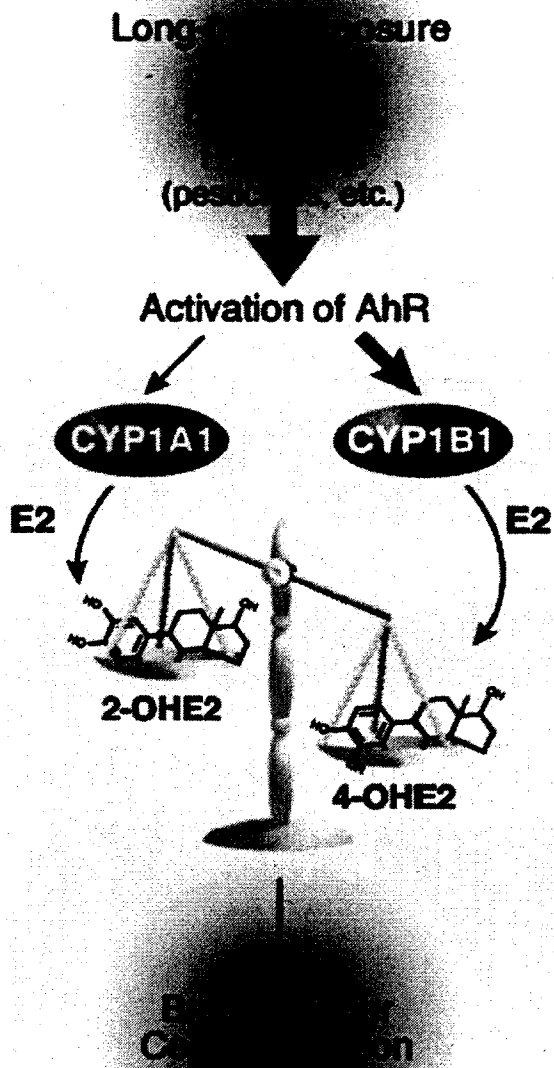
activate the AhR signaling pathway, including flavonoids, carotenoids, curcumin, and others, which are reviewed in Nguyen *et al.* and Stejskalova *et al.* (Nguyen and Bradfield, 2008; Stejskalova *et al.*, 2011).

### Pesticides

In depth analysis of a wide range of pesticides currently used in agriculture revealed that many of them possess a structure very similar to well known AhR ligands, such as TCDD. Considering that exposure to pesticides may lead to various human diseases, including cancer, the implication of AhR in this process should be carefully assessed. It has been documented for quite some time now that pesticides possess endocrine disrupting properties (Colborn *et al.*, 1993). Several currently used pesticides have been reported to have estrogenic activity (Anderson, 2002; Bulger *et al.*, 1978; Coosen and van Velsen, 1989; Cummings, 1997; Garey and Wolff, 1998; Soto *et al.*, 1995; Welch *et al.*, 1969). More recently, Kojima *et al.* used *in vitro* reporter gene assays to screen 200 pesticides for estrogen and androgen activities. They also tested the AhR agonistic activity for these 200 pesticides. Out of those, three herbicides -propanil, linuron and diuron- showed potent AhR agonistic activity and only two -chlorpyrifos and isoxathion- showed both AhR and ER $\alpha$  activities (Kojima *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2008).

Certain pesticides are capable of activating AhR and consequently inducing the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1* genes. The enzymes encoded by these two genes are involved in 17 $\beta$ -estradiol (E2) metabolism: CYP1A1 and CYP1B1 convert E2 into 2-hydroxyestradiol (2-OHE2) and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) respectively (Martucci and Fishman, 1993; Tsuchiya *et al.*, 2005). Several studies have compared the tumorigenic potential of E2 and its metabolites, such as 2-OHE2 and 4-OHE2 (Liehr *et al.*, 1986; Newbold and Liehr, 2000; Yager and Liehr, 1996). In fact, 2-OHE2 inhibits cellular growth of breast cancer cell lines (Gupta *et al.*, 1998), and induces apoptosis in

immortalized mammary cells (Hurh et al., 2004). In contrast, 4-OHE2 induces kidney tumors in Syrian hamsters (Liehr et al., 1986), and enhances proliferation and mutagenesis by promoting the formation of depurinated adducts on DNA (Zhao et al., 2006). 4-OHE2 is reported to be one of the most genotoxic estradiol metabolites. It has also been reported that breast cancer cells metabolize more 4-OHE2 than normal cells (Coumoul et al., 2001). Thus, the ratio between 2-OHE2/4-OHE2 metabolites, and consequently the ratio between CYP1A1/CYP1B1 enzymes, appears to be important in the initiation of carcinogenesis in mammary tissues. In addition, if some pesticides induce more *CYP1B1* expression than *CYP1A1*, this could also lead to imbalances in the ratio between CYP1A1 and CYP1B1 enzymes. Consequently, if we consider this scenario on a long-term exposure scale, more 4-OHE2 metabolites would be formed, hence leading to the accumulation of DNA adducts and potentially initiating cancer development (Figure 1). Estrogen metabolites have already been established as potential biomarkers for susceptibility to breast cancer (Rogan et al., 2003). Thus, linking pesticide exposure to this imbalanced ratio in favor of the CYP1B1 enzyme would provide direct evidence that pesticides may play a role in the early steps of breast cancer development.



**FIGURE A1.1: Proposed model for initiation of breast cancer by pollutants and pesticides.** Long-term exposure to pollutants and pesticides, which could induce AhR and ER $\alpha$  signaling pathways, will create an imbalance between CYP1A1 and CYP1B1 enzymes. Thus, this will modify the 2-OHE2/4-OHE2 ratio and could contribute to mammary carcinogenesis.

It should also be taken into consideration that some of these pesticides probably contain impurities, and may even be contaminated with dioxins, which could only aggravate their adverse effects. The most notorious example is Agent Orange, an herbicide used during the Vietnam War by the U.S. military as a defoliating product. The now-banned herbicide was a mixture of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid), and it was later shown that 2,4,5-T was contaminated with small amounts of TCDD (Stone, 2007). In 2004, the latest update of the Veterans and Agent Orange report of the National Academies' Institute of Medicine (IOM) claimed there was enough evidence of an association between exposure to this herbicide and the following illnesses: chronic lymphocytic leukemia, soft-tissue sarcoma, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease, and chloracne.

While the acute toxicity of pesticides has been well documented, there is still little known about the adverse effects of long-term chronic exposure on human health. According to the World Health Organization (WHO), long-term exposure to pesticides could increase the risk of developmental and reproductive disorders, immune-system disruption, endocrine disruption, impaired nervous-system function, and development of certain types of cancers, such as breast cancer (<http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html>). Attempts to establish correlations between the effects of pesticides on human health are particularly difficult because there are known sex, genetic, epigenetic, and environmental differences in the capacity to metabolize xenobiotics. Differences in susceptibility may also be affected by variations in the rate at which the xenobiotics are eliminated from the body. The adverse effects of pesticides may be related to their interactions with AhR, but they may also be partially or totally mediated by an AhR-independent signaling pathway. In addition, genetic differences in the properties of AhR are known to exist in human populations, and polymorphisms in cytochrome P450 enzymes have been associated with increased susceptibility to different cancers (Johansson and Ingelman-Sundberg, 2011). Consequently, this demonstrates the challenges as well as the importance of better

understanding the mechanisms that underline the crosstalk that exist between dioxin receptor and estrogen receptor signalling, and also rigorously test how different pollutants and pesticides affect this crosstalk.

### **Molecular mechanisms of AhR and ER $\alpha$ crosstalk**

Interaction between the AhR and the ER $\alpha$  signaling pathways has been observed for several years. ER $\alpha$  belongs to the nuclear receptor family of transcription factors and is involved in the regulation of cellular proliferation in response to E2, for example during mammary gland development (Hewitt and Korach, 2002). Numerous laboratories have focused their interests in studying the inhibition of the ER $\alpha$  signaling pathway by AhR. However, the role of ER $\alpha$  in the regulation of the expression of AhR target genes is less documented. Firstly, we will review the main conclusions and mechanisms proposed for the regulation of ER $\alpha$  by AhR. Secondly, we will discuss why the study of the differential regulation of AhR target genes (*CYP1A1* and *CYP1B1*) by ER $\alpha$  is important, and why this can influence mammary carcinogenesis.

### **AhR-mediated repression of the ER $\alpha$ signaling pathway**

The earliest study to establish a link between pollutants and estrogen-induced cancer was carried out by Kociba and collaborators in 1978. They made the striking observation that female Sprague Dawley rats treated with TCDD for two years developed less mammary and uterine tumors than non treated rats (Kociba et al., 1978). Ten years later, other studies showed that TCDD treatment also inhibits proliferation only in ER $\alpha$  positive breast cancer cell lines, but not in ER $\alpha$  negative cell lines (Gierthy and Lincoln, 1988;

Gierthy et al., 1987). The chemopreventive and chemotherapeutic activities of TCDD in breast carcinogenesis triggered the interest of numerous laboratories to find or to develop AhR agonists that possess the antiestrogenic activity of TCDD, but without its acute toxicity. These AhR agonists are called Selective AhR Modulator (SAhRM). One example of such a SAhRM is the DIM, an acid-catalyzed metabolite of I3C, which is a compound found in cruciferous vegetables. Chen and colleagues showed that female rats treated with DIM had a decrease in E2-dependant 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary tumors (Chen et al., 1998). However, DIM, additionally of AhR activation, also activates ER $\alpha$  by ligand-independent pathways mediated by the PKA and MAPK signaling (Leong et al., 2004), which could have deleterious effect.

The regulation of ER $\alpha$  by AhR acts at many levels, for which four different mechanisms have been proposed: firstly, studies showed that AhR and ER $\alpha$  interact with common transcription factors and coactivators in order to modulate transcription (Kobayashi et al., 1997; Kumar and Perdew, 1999; Kumar et al., 1999; Nguyen et al., 1999). Consequently, when the two pathways are activated simultaneously, AhR and ER $\alpha$  compete for the binding of these factors. Secondly, AhR represses some ER target genes by binding directly their promoter. The first example to document this mechanism was discovered at the *cathepsin D* promoter where the sequence of the pentanucleotide core of the XRE is found (Krishnan et al., 1995; Wang et al., 2001). The presence of the inhibitory XRE (iXRE) is necessary for the repression of *cathepsin D* by AhR. Functional iXREs were later identified in the promoter of *c-fos*, *hsp27* and *TFF1* genes (Duan et al., 1999; Gillesby et al., 1997; Porter et al., 2001). Thirdly, the activation of AhR increases the degradation of ER $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway (Harris et al., 1990; Wormke et al., 2003). Ohtake and co-workers showed that AhR is associated with an E3-ubiquitine ligase complex, which is proposed to be involved in ER $\alpha$  degradation (Ohtake et al., 2007). Additionally, using an Estrogen response element (ERE) placed upstream of a luciferase reporter, they showed that the presence of MG132 (a proteasome inhibitor) abrogates the repression elicited by AhR in a ligand-specific manner. However, this result is challenged by other studies showing that MG132 affects the mRNA levels of the ER $\alpha$

target genes, even in the absence of AhR ligands (Lonard et al., 2000; Reid et al., 2003). The discrepancies between these results raise a major concern regarding data obtained with reporter constructs. Nevertheless, activated-AhR and E2-mediated degradation of ER $\alpha$  borrows two different pathways, which could explain why one is necessary for ER $\alpha$  target genes expression and the other one inhibits it (Ohtake et al., 2007). Fourthly, in breast cancer cells, TCDD induces the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*, which encode enzymes that convert E2 into catecholestrogens (Martucci and Fishman, 1993; Tsuchiya et al., 2005). The expression of these enzymes leads to an increase in E2 metabolism and a reduction of intracellular E2 concentration. Although, this mechanism may contribute in the repression of the ER $\alpha$  signaling pathway by AhR, it is not sufficient to explain all the cellular effects that are observed. Indeed, the repression of *cathepsin D* expression mediated by TCDD occurs very quickly after E2 treatment, and at this time point, *CYP1A1* is not yet induced (Krishnan et al., 1995). Moreover, in rats treated with TCDD, the level of E2 circulating in the blood is not affected (Shiverick and Muther, 1982). In conclusion, the pathway involving E2 metabolizing enzymes is not necessary for the inhibitory crosstalk observed between AhR and ER $\alpha$ .

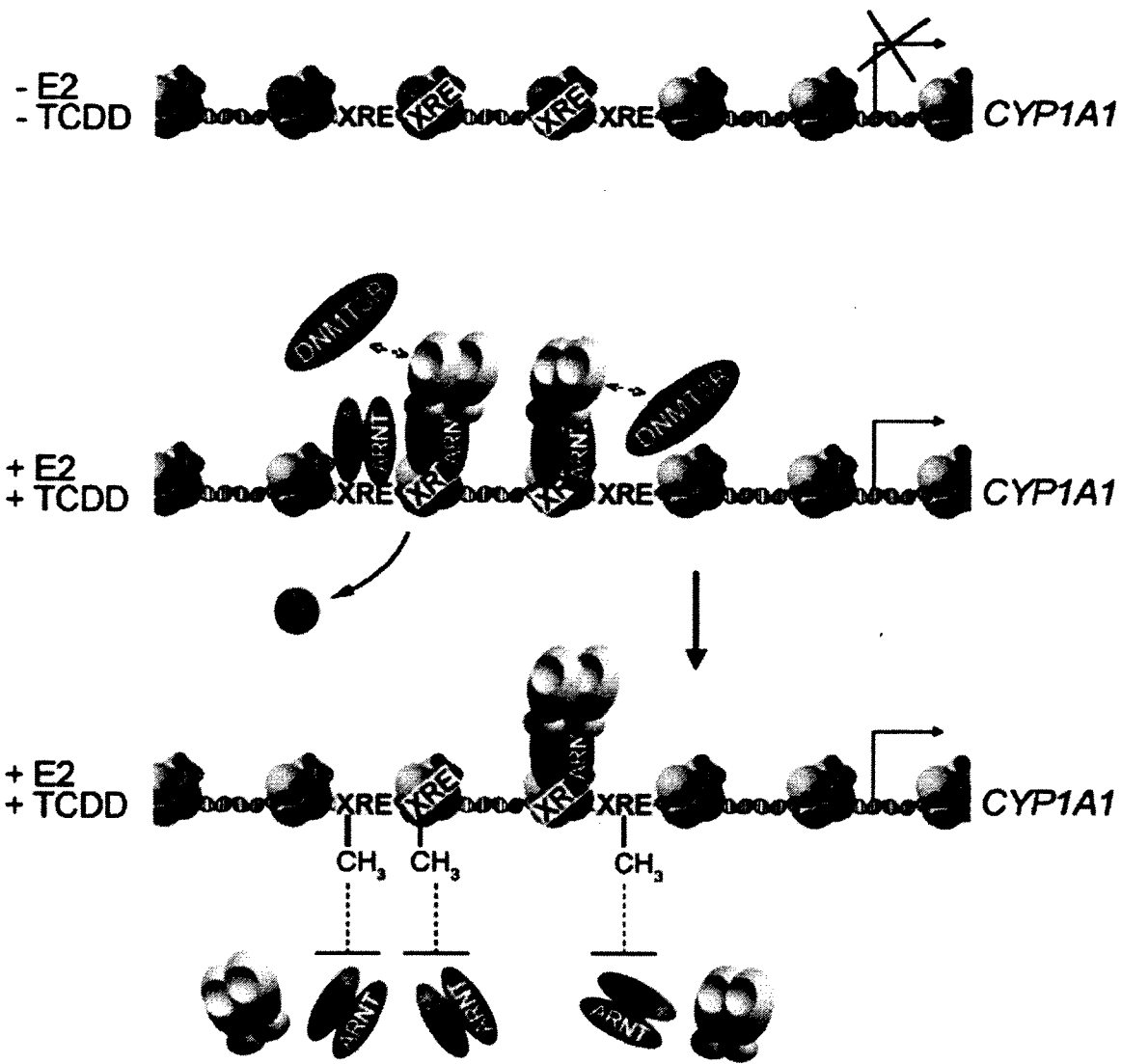
### **ER $\alpha$ -mediated repression of AhR target genes**

In mammary tissues, *CYP1A1* and *CYP1B1* are the two most induced AhR target genes after TCDD treatment. As previously mentioned, the enzymes encoded by these two genes are involved in E2 metabolism: CYP1A1 converts E2 in 2-OHE<sub>2</sub>, while CYP1B1 converts E2 in 4-OHE<sub>2</sub>, one of the most genotoxic estrogen metabolites. Interestingly, ER $\alpha$  specifically represses *CYP1A1* gene expression, but not *CYP1B1*. We propose that action of ER $\alpha$  may constitute another mechanism by which it promotes carcinogenesis.

Our laboratory has focused efforts to unravel the mechanism(s) involved in the *CYP1A1* gene repression by ER $\alpha$  in breast cancer cell lines. We discovered two new key players

in the regulation of *CYP1A1* expression in ER $\alpha$  positive cell lines: the histone variant H2A.Z and the DNA methyltransferase Dnmt3B. Depletion of H2A.Z in MCF7 cells triggers DNA methylation of AhR binding sites in the *CYP1A1* promoter, and thus affects *CYP1A1* induction in the presence of AhR agonists. In cell lines which do not express ER $\alpha$ , the absence of H2A.Z has no effect on the induction of *CYP1A1* (Marques et al., manuscript in preparation). Previous work from the Henikoff laboratory showed that H2A.Z antagonizes DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* (Zilberman et al., 2008) and a similar conclusion has been drawn in a murine model (Conerly et al., 2010). The same mechanism appears to be true at the *CYP1A1* promoter in the presence of ER $\alpha$ . Moreover, we showed that ER $\alpha$  recruitment to the *CYP1A1* promoter in presence of TCDD and E2 decreases AhR binding at its XREs, which leads to two times less induction of *CYP1A1* mRNA level than in presence of TCDD alone. We also discovered that the inhibition of DNA methylation, by either 5-azacytidine treatment or by depleting Dnmt3B, impair specific inhibition of *CYP1A1* by ER $\alpha$  (Marques et al., manuscript in preparation). Taken together, these new findings suggest that DNA methylation plays a central function in the regulation of the *CYP1A1* expression in the presence of ER $\alpha$ . A model is proposed for this mechanism in Figure A1.2.





**FIGURE A1.2: Proposed model for the regulation of the *CYP1A1* gene by ER $\alpha$ .** In absence of estradiol and TCDD, *CYP1A1* is not expressed and H2A.Z is present in its promoter. In the presence of both ligands, H2A.Z is removed and AhR/Arnt/ER $\alpha$  is recruited to the *CYP1A1* promoter. ER $\alpha$  displaces AhR/Arnt by promoting DNA methylation on the XREs in the *CYP1A1* promoter, thus resulting in less AhR activating surfaces available to stimulate *CYP1A1* expression than in presence of TCDD alone.

## **Conclusion**

Industrialized countries generate more and more pesticides and pollutants. However, there is a general concern to fabricate useful chemicals that are not 'as toxic' as older generation pesticides. Nonetheless, there is no way to tell how the pesticides used today in our agricultural practices will influence our health on a long-term basis. It is clear that even though a particular pollutant may not present a high health risk – probably based on toxicological tests performed with laboratory animals – it may still significantly perturb endocrine systems, and lead to the generation of genotoxic metabolites. We believe that genes involved in the regulation of the crosstalk that exists between the dioxin receptor and estrogen receptor signaling could become important molecular sensors, or biomarkers, to assess potential long-term effects of pesticides on certain forms of cancer.

## **Acknowledgments**

Work performed in the laboratory of LG is funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Cancer Research Society, and a Canada Research Chair on Mechanisms of Gene Transcription. We are grateful to Benoît Guillemette and Jean-François Millau for discussions and critical reading of the manuscript. We also thank Benoît Leblanc for artwork in Figures A1.1-2.

## REFERENCES

- Anderson, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., and Bonfeld-Jorgensen, E.C. (2002). Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179, 12.
- Beischlag, T.V., and Perdew, G.H. (2005). ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280, 21607-21611.
- Bulger, W.H., Muccitelli, R.M., and Kupfer, D. (1978). Studies on the in vivo and in vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic monooxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol* 27, 2417-2423.
- Chen, I., McDougal, A., Wang, F., and Safe, S. (1998). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis* 19, 1631-1639.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., and Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.
- Conerly, M.L., Teves, S.S., Diolaiti, D., Ulrich, M., Eisenman, R.N., and Henikoff, S. (2010). Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res* 20, 1383-1390.
- Coosen, R., and van Velsen, F.L. (1989). Effects of the beta-isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 101, 310-318.
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3942-3948.
- Cummings, A.M. (1997). Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit Rev Toxicol* 27, 367-379.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.
- Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhldal, C., Kladd, M., and Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13, 1511-1521.

- Esser, C., Rannug, A., and Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 30, 447-454.
- Garey, J., and Wolff, M.S. (1998). Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 855-859.
- Gierthy, J.F., and Lincoln, D.W., 2nd (1988). Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Breast Cancer Res Treat* 12, 227-233.
- Gierthy, J.F., Lincoln, D.W., Gillespie, M.B., Seeger, J.I., Martinez, H.L., Dickerman, H.W., and Kumar, S.A. (1987). Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 47, 6198-6203.
- Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F., and Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.
- Gupta, M., McDougal, A., and Safe, S. (1998). Estrogenic and antiestrogenic activities of 16alpha- and 2-hydroxy metabolites of 17beta-estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67, 413-419.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.
- Harris, M., Zacharewski, T., and Safe, S. (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 50, 3579-3584.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., and McMahon, M. (2009). Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci* 111, 199-201.
- Hewitt, S.C., and Korach, K.S. (2002). Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 3, 193-200.
- Hurh, Y.J., Chen, Z.H., Na, H.K., Han, S.Y., and Surh, Y.J. (2004). 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health A* 67, 1939-1953.
- Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (2011). Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci* 120, 1-13.

Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 21, 2594-2607.

Kim, D.W., Gazourian, L., Quadri, S.A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D.H., and Sonenshein, G.E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498-5506.

Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 122, 703-710.

Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreon, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnins, R.P., Frauson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., *et al.* (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 279-303.

Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., and Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 112, 524-531.

Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X., and Safe, S. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6710-6719.

Kumar, M.B., and Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.

Kumar, M.B., Tarpey, R.W., and Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.

Leong, H., Riby, J.E., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2004). Potent ligand-independent estrogen receptor activation by 3,3'-diindolylmethane is mediated by cross talk between the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 18, 291-302.

Liehr, J.G., Fang, W.F., Sirbasku, D.A., and Ari-Ulubelen, A. (1986). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem* 24, 353-356.

Linden, J., Lensu, S., Tuomisto, J., and Pohjanvirta, R. (2010). Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 31, 452-478.

Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5, 939-948.

Marinkovic, N., Pasalic, D., Ferencak, G., Grskovic, B., and Stavljenic Rukavina, A. (2010). Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 61, 445-453.

Martucci, C.P., and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther* 57, 237-257.

Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., and Gustafsson, J.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol* 25, 5317-5328.

McMillan, B.J., and Bradfield, C.A. (2007). The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol Pharmacol* 72, 487-498.

Nebert, D.W., and Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945-993.

Newbold, R.R., and Liehr, J.G. (2000). Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res* 60, 235-237.

Nguyen, L.P., and Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21, 102-116.

Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E., and Safe, S. (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 367, 250-257.

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., *et al.* (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., *et al.* (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahn, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., *et al.* (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203.

Poland, A., and Glover, E. (1977). Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* *13*, 924-938.

Porter, W., Wang, F., Duan, R., Qin, C., Castro-Rivera, E., Kim, K., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *J Mol Endocrinol* *26*, 31-42.

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S., and Maier, M.A. (2000). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J Biol Chem* *275*, 2943-2950.

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

Rogan, E.G., Badawi, A.F., Devanesan, P.D., Meza, J.L., Edney, J.A., West, W.W., Higginbotham, S.M., and Cavalieri, E.L. (2003). Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis* *24*, 697-702.

Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., and Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6731-6736.

Shiverick, K.T., and Muther, T.F. (1982). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on serum concentrations and the uterotrophic action of exogenous estrone in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* *65*, 170-176.

Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., and Serrano, F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* *103 Suppl 7*, 113-122.

Stejskalova, L., Dvorak, Z., and Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism* *12*, 198-212.

Stevens, E.A., Mezrich, J.D., and Bradfield, C.A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* *127*, 299-311.

Stone, R. (2007). Epidemiology. Agent Orange's bitter harvest. *Science* *315*, 176-179.

Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T., and Kojima, H. (2008). In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly

sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere* 74, 155-165.

Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B., and Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274, 510-515.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., and Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227, 115-124.

Wang, F., Samudio, I., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 172, 91-103.

Wang, F., Wang, W., and Safe, S. (1999). Regulation of constitutive gene expression through interactions of Sp1 protein with the nuclear aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* 38, 11490-11500.

Welch, R.M., Levin, W., and Conney, A.H. (1969). Estrogenic action of DDT and its analogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 14, 358-367.

Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G., and Hahn, M.E. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science* 331, 1322-1325.

Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., and Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23, 1843-1855.

Yager, J.D., and Liehr, J.G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 203-232.

Zhao, Z., Kosinska, W., Khmelnsky, M., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Chakravarti, D., Sacks, P.G., and Guttenplan, J.B. (2006). Mutagenic activity of 4-hydroxyestradiol, but not 2-hydroxyestradiol, in BB rat2 embryonic cells, and the mutational spectrum of 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol* 19, 475-479.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.



## ANNEXE 2

### **The positive and negative sides of histone H2A.Z**

Maud Marques, Liette Laflamme, Alain L Gervais, and Luc Gaudreau\*.

Université de Sherbrooke, Département de Biologie, 2500 boul. de l'Université  
Sherbrooke QC J1K 2R1 Canada

[Maud.Marques@Usherbrooke.ca](mailto:Maud.Marques@Usherbrooke.ca)

[Liette.Laflamme@Usherbrooke.ca](mailto:Liette.Laflamme@Usherbrooke.ca)

[Alain.Gervais@Usherbrooke.ca](mailto:Alain.Gervais@Usherbrooke.ca)

[Luc.Gaudreau@Usherbrooke.ca](mailto:Luc.Gaudreau@Usherbrooke.ca) (corresponding author)

Running title: Roles of H2A.Z in gene expression

## Abstract

The incorporation of variant histone H2A.Z within chromatin is important for proper gene expression and genome stability. H2A.Z is inserted at discrete loci by the Swr1 or Swr1-like remodeling complexes, although very little is known about the nature of the targeting mechanism involved. Replacement of canonical histone H2A for H2A.Z has been shown to modify nucleosome dynamics, although discrepancies still exist in the literature regarding the mechanisms. Recent experiments have shown that H2A.Z can allow nucleosomes to adopt stable translational positions as compared to H2A, which could influence the accessibility to DNA regulatory proteins. This review provides a brief overview of H2A.Z biology and presents hypotheses that could reconcile contradictory reports that are found in the literature regarding the influence of H2A.Z on nucleosome stability.

## Introduction

Eukaryotic chromatin is characterized by a periodic association of nucleosomes, each of which is composed of 146 bp of DNA wrapped around a histone octamer containing two copies each of the canonical histone proteins (H2A, H2B, H3 and H4)(McGhee and Felsenfeld, 1980; Thatcher and Gorovsky, 1994). The compaction of chromatin by nucleosomes is an impediment to all DNA-related processes such as replication, repair and transcription. Multiple mechanisms exist to alter chromatin structure and dynamics, which facilitates these processes by allowing access of regulatory proteins to DNA. These include ATP-dependent chromatin remodelling (Choudhary and Varga-Weisz, 2007; Flaus and Owen-Hughes, 2004), post-translational histone modifications (Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007) and histone variant incorporation (Henikoff and Ahmad, 2005;

Kamakaka and Biggins, 2005; Redon et al., 2002). This first of these mechanisms facilitates localized DNA accessibility by, for example, “mechanically” displacing nucleosomes. The second mechanism involves the covalent modification of protruding N-terminal histone tails, modifications such as acetylation, methylation, and ubiquitylation. These modifications can either alter the structure of nucleosomes or they can act as specific marks that are recognized by downstream effector regulatory proteins. The third mechanism consists of introducing histone variants within nucleosomes at specific chromatin loci, which has the effect of defining specialized chromatin domains, and potentially altering its permissiveness to DNA transactions. Histone variants, as opposed to canonical histones, are generally expressed throughout the cell cycle and are incorporated into chromatin in a replication-independent manner at specific loci (Ahmad and Henikoff, 2002; Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003). Amongst the canonical histones, H2A possesses the greatest number of variants. H2A variants are involved in numerous functions such as DNA repair (variant H2A.X) or in the regulation of gene expression (variants H2ABbd and H2A.Z)(Altaf et al., 2009; Thambirajah et al., 2009). Here we discuss and present some potential explanations regarding several discrepancies observed in the literature as to the stability and function of H2A.Z containing nucleosomes.

## Histone H2A.Z

H2A.Z is a highly conserved histone variant, even more so than regular H2A. Although not essential to yeast cells, the loss of H2A.Z is lethal in others species, such as *Tetrahymena thermophile* (Liu et al., 1996), *Xenopus laevis*(Iouzalén et al., 1996; Ridgway et al., 2004), *Drosophila melanogaster* (Clarkson et al., 1999; van Daal and Elgin, 1992) and mice (Faast et al., 2001), suggesting that it may provide distinct functions among different organisms. In budding yeast, loss of H2A.Z leads to defects in transcriptional activation, alterations in transcriptional silencing, and increased chromosome loss (Adam et al., 2001; Carr et al., 1994; Jackson and Gorovsky, 2000;

Krogan et al., 2004; Larochelle and Gaudreau, 2003; Santisteban et al., 2000). In mammalian cells, H2A.Z is important for chromosome segregation, centromeric functions, and transcriptional regulation (Gevry et al., 2007; Gevry et al., 2009; Rangasamy et al., 2003; Rangasamy et al., 2004). To date, H2A.Z has been reported to be acetylated, ubiquitylated and sumoylated, but little is known about the functional role of these post-translational modifications. As such, ubiquitylated H2A.Z is found predominantly on the inactive X chromosome (Sarcinella et al., 2007), which suggests that this mark is involved in the maintenance or formation of heterochromatin. In *Schizosaccharomyces pombe*, an acetylated form of H2A.Z regulates chromosome architecture (Kim et al., 2009). In *Saccharomyces cerevisiae*, the sumoylation of H2A.Z is important for chromosome fixation to the nuclear periphery after a persistent DNA double-stranded-break (Kalocsay et al., 2009). For more details on H2A.Z post-translational modifications, see Refs (Draker and Cheung, 2009; Thambirajah et al., 2009).

Genome-wide studies have provided strong evidence of the non-random pattern of H2A.Z distribution. In euchromatic regions, a sharp peak of H2A.Z is observed at the 5' end of numerous genes, as well as in enhancers and in insulators. In budding yeast, H2A.Z nucleosomes are observed in regions flanking the transcriptional start site, with a region that is devoid of nucleosomes in between, thus forming a nucleosome-free region (NFR) over the start site (Albert et al., 2007; Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005; Zhang et al., 2005). A similar situation is observed in human cells (Barski et al., 2007). However, in *Drosophila*, although there is also formation of a NFR bordered by well-positioned nucleosomes, only the downstream nucleosome contains histone variant H2A.Z (Mavrigh et al., 2008). In yeast cells, the presence of H2A.Z at gene promoters is generally inversely correlated with transcription levels (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005; Zhang et al., 2005). In contrast to the situation in yeast, the presence of H2A.Z at promoters is positively correlated with transcription in human cells (Barski et al., 2007), and in *Drosophila* (Mavrigh et al., 2008). Moreover and importantly, H2A.Z appears to tightly co-localize with RNA polymerase in human cells, whether or not the latter is

engaged in transcription (Hardy et al., 2009). Intriguingly, in heterochromatic, pericentromeric or subtelomeric regions, H2A.Z is found on vast chromosomal regions of several hundred kilobases wide. In these regions, H2A.Z is non-acetylated and colocalizes with marks associated with facultative heterochromatin, such as dimethylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9me<sub>2</sub>) (Hardy et al., 2009).

The deposition of H2A.Z within chromatin is thought to be generally catalyzed by ATP-dependent protein complexes. In budding yeast, the Swr1 complex (Swr1.com), named after its catalytic subunit Swr1, interacts with H2A.Z and is necessary for H2A.Z deposition (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Wu et al., 2005). Orthologs of the catalytic subunit Swr1 in metazoan cells are suggested to be SRCAP and p400 (Cai et al., 2005; Wu et al., 2005). Indeed, in accord with findings pertaining to Swr1.com, both SRCAP and p400 complexes have been shown to independently catalyze the ATP-dependent exchange of H2A/H2B dimers for H2A.Z/H2B *in vitro* (Gevry et al., 2007; Ruhl et al., 2006). No functional evidence of overlap between the SRCAP and p400 complexes in the targeting of H2A.Z incorporation has yet been reported.

The mechanism by which H2A.Z is targeted to chromatin by Swr1-like complexes is still a matter that needs to be resolved, and one which could differ between species. In yeast, it has been shown that a 22 bp DNA segment that contains a consensus sequence similar to the Reb1 binding site, followed by a (dT:dA)<sub>7</sub> track, is sufficient for the formation of a nucleosome free region (NFR) bordered by two H2A.Z-containing nucleosomes (Raisner et al., 2005). The possibility thus exists that Reb1 could recruit Swr1.com; however the same laboratory has shown that Reb1 is not implicated in the formation of most NFRs since only 12% of the NFRs tested had Reb1-binding sites (Hartley and Madhani, 2009). Hence, it appears that the NFR can promote the incorporation of H2A.Z independently of the presence of Reb1 (Hartley and Madhani, 2009). Moreover in yeast, the deletion of either the Gal4 or Pho4 activators did not influence the ability of H2A.Z to be enriched at model target genes of these respective activators (K. Lemieux and L.G., unpublished data; see review ref.) (Zlatanova and Thakar, 2008). Conversely, in human cells, results obtained by our and other laboratories suggest that targeting of H2A.Z, by virtue of the

p400 or SRCAP complexes, could indeed be mediated by natural activators. By using CHIP experiments we were able to show that in cells that express functional p53 activator molecules, H2A.Z is localized to p53 binding sites of the *p21* gene. However, in cells that lack p53, H2A.Z is delocalized from the p53 binding sites (Gevry et al., 2007). We have also shown that p400 is able to directly interact with the ER $\alpha$ , which could be responsible for the recruitment of the complex to ER $\alpha$  target genes, and subsequent H2A.Z incorporation (Gevry et al., 2009). Furthermore, a similar scenario could be possible for SRCAP-mediated incorporation of H2A.Z since it interacts with the CREB-binding protein (CBP) co-activator (Johnston et al., 1999), which in turn interacts with several transcriptional activators (Lill et al., 1997; Oelgeschlager et al., 1996). Additionally, another study has shown a strong correlation between the presence of Myc and that of H2A.Z to promoter regions (Martinato et al., 2008). Until recently, most reports concerned epigenetic marks that have been found to correlate with, rather than against, H2A.Z presence. New results suggest that epigenetic marks could be antagonistic with the incorporation of H2A.Z, such as DNA methylation (Zilberman et al., 2008).

## H2A.Z and DNA methylation

DNA methylation is one of the most extensively studied epigenetic modifications, and it is found in all vertebrates and plants. In mammals, the addition of a methyl group to cytosines occurs on the fifth carbon position and predominantly in the context of CpG dinucleotides (Suzuki and Bird, 2008). The distribution of CpG dinucleotides across the human genome is irregular and their concentrations in short CpG-rich DNA stretches are called 'CpG islands'. CpG islands, which are mostly located at 5' end of genes, are usually unmethylated irrespective of the transcriptional status, while non-island CpG dinucleotides are usually methylated (Graff et al., 1997; Siegfried and Cedar, 1997). DNA methylation is important for gene expression regulation, as is demonstrated by the fact that tumor suppressor genes are often inactivated by methylation of their promoter region. It has been found that ATP-dependant complexes and covalent histone

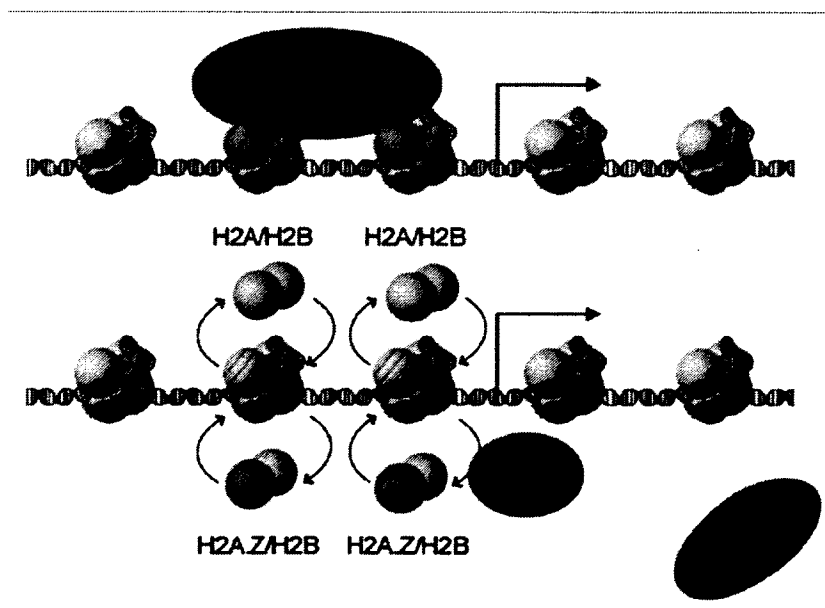
modifications are able to influence DNA methylation and vice versa (Fuks et al., 2003; Jones et al., 1998; Lehnertz et al., 2003; Nan et al., 1998; Tachibana et al., 2008; Zhao et al., 2009). Until recently, histone variants had never been implicated in this type of regulation. In 2008, the Zilberman and Henikoff laboratories showed, using genome-wide studies that in *Arabidopsis thaliana*, H2A.Z and DNA methylation occupied distinct genomic regions. Moreover, these two epigenetic marks are mutually exclusive (Zilberman et al., 2008). The authors suggest that H2A.Z exclusion could be a new mechanism for gene silencing by DNA methylation, and that H2A.Z incorporation prevents this event. Still, some questions remain unanswered. First, is this mechanism conserved in mammals? Indeed, in plants, DNA methylation can occur on all cytosines, whereas in mammals only cytosines in CG dinucleotides can be methylated (Gehring and Henikoff, 2007). This difference prevents us from inferring directly from what has been found in plants, so further experimental investigation will be required. Second, how is the methylation machinery able to distinguish between H2A.Z and H2A containing nucleosomes? It could be hypothesized that histone post-translational modifications in nucleosomes-containing H2A.Z (or not) would be detrimental to the recruitment of enzymes involved in DNA methylation (DNA methyltransferases and histone methyltransferases). Studies in yeast have shown that H3 and H4 acetylation is required prior to H2A.Z deposition (Raisner et al., 2005; Shia et al., 2006). And in human cells, the H3K18Ac mark was suggested to be the best epigenetic modification predictive of H2A.Z presence in nucleosomes (Gervais and Gaudreau, 2009). Another hypothesis would be that H2A.Z is able to recruit specific proteins or complexes involved in DNA demethylation or in masking methylation sites. Elucidation of the mechanism by which H2A.Z affects DNA methylation will require the determination of its interaction partners.

## Properties of H2A.Z-containing nucleosomes

Data obtained from the crystal structure of the H2A.Z nucleosome has been used to make two important statements regarding H2A.Z-containing nucleosomes that have been the subject of much debate (Suto et al., 2000). The first statement is that the coexistence of H2A.Z and H2A within the same nucleosome would be hindered by steric clashes caused by the L1 regions of both histones (Suto et al., 2000). This prediction has been invalidated by the fact that hybrid nucleosomes carrying both H2A.Z and H2A were observed both *in vivo* and *in vitro* (Chakravarthy et al., 2004; Viens et al., 2006). Second, subtle localized changes in the interaction of H2A.Z with H3 would result in a decreased stability of the nucleosome. Numerous *in vitro* studies aimed at investigating the structural impact of the incorporation of H2A.Z on nucleosome dynamics have generated contradictory observations with respect to its stability (Hoch et al., 2007; Ishibashi et al., 2009). Differences in the methodologies used in these studies may explain at least part of the discrepancies observed. A number of these studies were conducted with nucleosomes assembled *in vitro* using bacterially purified recombinant histones (Fan et al., 2002; Hoch et al., 2007; Ishibashi et al., 2009; Park et al., 2004). These artificial nucleosomes were shown to have different characteristics when compared to native nucleosomes (Tolstorukov et al., 2009). It appears that *in vitro* assembly of histones does not perfectly mimic the native folding of histones and/or that chaperone-assisted folding of nucleosomes is important for proper nucleosome assembly. One other important difference is that bacterially expressed recombinant histones are devoid of post-translational modifications, while histones in their natural environment are subjected to a wide variety of modifications that can alter nucleosome dynamics and have profound effects on diverse biological processes. This is well demonstrated by the loss of viability of *Tetrahymena thermophila* when the acetylation of the N-terminal tail of H2A.Z is impaired (Ren and Gorovsky, 2001). This modification neutralizes the charge on the N-terminal tail of H2A.Z, resulting in relaxed binding of the histone to DNA that may facilitate accessibility for regulatory factors that promote active chromatin structures (Tolstorukov et al., 2009). Furthermore, on all the genes regulated by H2A.Z that we



have analyzed, we have observed that the presence of H2A.Z within chromatin is always associated with the presence of p400 in human cells (unpublished data)(Gevry et al., 2007; Gevry et al., 2009). We could hypothesize that, *in vivo*, these complexes help in maintaining H2A.Z stably associated to chromatin. Therefore, the differences in stability observed between H2A and H2A.Z *in vitro* may very well be undetectable *in vivo* because of the presence of these chaperones or complexes (Figure 1). In line with this possibility is the fact that upon subjecting purified yeast chromatin to salt-dependent washes of increasing ionic strength, H2A.Z-bearing nucleosomes were shown to be less stable than H2A-bearing nucleosomes (Zhang et al., 2005). We could argue in this case that if Swr1-like complexes are required to stabilize H2A.Z nucleosomes *in vivo*, and given the fact that the salt treatment of chromatin is expected to easily disrupt Swr1-like complexes, the diminished stability of H2A.Z-containing nucleosomes (as compared to regular H2A-containing nucleosomes) could be attributable to the loss of stabilizing complexes. Taken together, these observations indicate that post-translational modifications, *in vivo* histone folding, and chaperone interactions can significantly affect nucleosome function, and it might explain some of the discrepancies found in the literature.



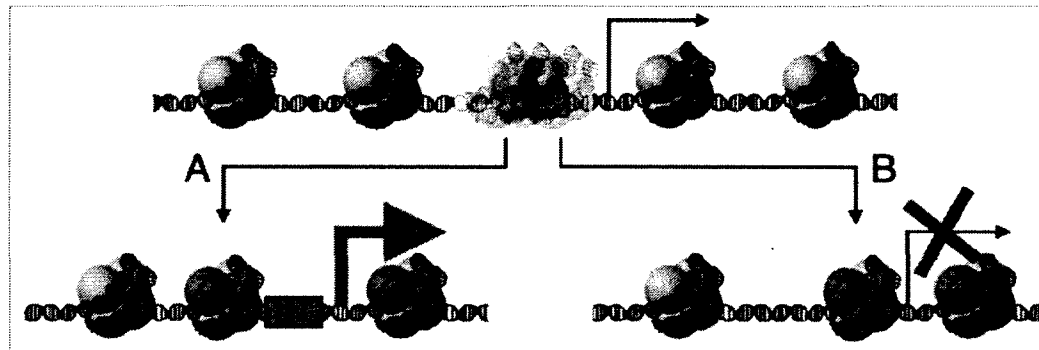
**Figure A2.1: Model of H2A.Z stabilization into chromatin by chaperones.**

*In vivo*, complexes such as p400 or SRCAP could remain associated with the H2A.Z nucleosome and therefore increase the stability of H2A.Z within chromatin. In the absence of these complexes, dynamic exchange of H2A.Z/H2B and H2A/H2B dimers could occur. Although the complexes responsible for H2A.Z eviction are not known yet, one potential candidate could be ISWI (Goldman et al., 2009).

Nucleosomes containing H2A.Z are preferentially localized to gene promoters, where many regulatory proteins compete with each other and with histone octamers for DNA accessibility. Although DNA contacts the octamer surface at 14 different locations, biophysical studies have shown that nucleosomes exist in a dynamic equilibrium between a fully and partially wrapped state that enables the spontaneous sliding movement of the nucleosome along DNA (Li and Widom, 2004; Widom, 1998). This transient unwrapping could allow binding of regulatory proteins to nucleosomal DNA and drive the equilibrium towards the unwrapped state. The biological importance of fine nucleosome positioning is made clear by the topological relationship of transcription factor binding sites and transcriptional start sites with the DNA wrapped in a nucleosome (Albert et al., 2007). In yeast, it has been demonstrated that transcription factor binding sites tend to be rotationally exposed on the H2A.Z nucleosome surface near its border, while transcriptional start sites tend to reside about one helical turn inside the nucleosome border (Albert et al., 2007).

*In vitro*, H2A.Z-containing nucleosomes have also been shown to be more mobile, even in the absence of chromatin remodelers (Flaus et al., 2004), which may explain the high dependence of cells on SWI/SNF remodelling complex when H2A.Z is absent (Santisteban et al., 2000). This is in contrast with other *in vitro* and *in vivo* experiments, where H2A.Z seems to reduce translational mobility of nucleosomes (Fan et al., 2002; Gevry et al., 2009; Guillemette et al., 2005; Schones et al., 2008). We and others have observed that H2A.Z incorporation within a nucleosome leads to repositioning of a subset of nucleosomes to a new position. Indeed, this stabilization leads to less variability in

H2A.Z nucleosome positions in a population of cells, when compared to H2A nucleosome positions (Fan et al., 2002; Gevry et al., 2009; Guillemette et al., 2005; Kumar and Wigge). One can imagine that depending on where nucleosomes are repositioned, positive or negative effects on gene expression could be observed (Figure 2). We thus propose that H2A.Z, by virtue of its ability to reprogram nucleosome positioning, can regulate gene transcription either positively or negatively by using the same mechanism of action.



**Figure A2.2: Model for H2A.Z mechanisms of action in transcriptional regulation.**

In the absence of H2A.Z, nucleosome positioning is less well defined with key promoter nucleosomes. Incorporation of H2A.Z within a nucleosome leads to repositioning to another position. If the new position blocks the access to a positive regulatory sequence, H2A.Z incorporation will have a repressive impact (A), and if it allows access to the sequence it will have positive impact on transcription (B).

## Conclusion

H2A.Z is a well-conserved histone variant, and it is essential in higher eukaryotes. Genome-wide localization studies have demonstrated non-random incorporation of H2A.Z within specific chromatin regions of all species investigated to date, but the targeting mechanism is still under investigation and could differ among species. In

contrast to yeast, human cells have at least two distinct complexes involved in H2A.Z incorporation. Further analysis will be necessary to distinguish the contribution of these complexes in targeting H2A.Z to chromatin. It will also be interesting to see if these enzymatic complexes remain generally associated to H2A.Z it is incorporated into chromatin something which would be expected to influence the stability of the H2A.Z nucleosome. Recent *in vitro* studies have revealed that the ISWI remodeling complexes remodels a H2A.Z nucleosome more readily than do the SWI/SNF complexes (Goldman et al., 2009). It will be exciting to test whether this also holds true *in vivo*.

## References

Adam, M., Robert, F., Laroche, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* 21, 6270-6279.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.

Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C., and Pugh, B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 446, 572-576.

Altaf, M., Auger, A., Covic, M., and Cote, J. (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem Cell Biol* 87, 35-50.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669-681.

Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* 280, 13665-13670.

- Carr, A.M., Dorrington, S.M., Hindley, J., Phear, G.A., Aves, S.J., and Nurse, P. (1994). Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *Mol Gen Genet* 245, 628-635.
- Chakravarthy, S., Bao, Y., Roberts, V.A., Tremethick, D., and Luger, K. (2004). Structural characterization of histone H2A variants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 227-234.
- Choudhary, P., and Varga-Weisz, P. (2007). ATP-dependent chromatin remodelling: action and reaction. *Subcell Biochem* 41, 29-43.
- Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D.J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694-697.
- Draker, R., and Cheung, P. (2009). Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 87, 19-25.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11, 1183-1187.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., and Tremethick, D.J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9, 172-176.
- Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2004). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: farewell to the tuna-can octamer? *Curr Opin Genet Dev* 14, 165-173.
- Flaus, A., Rencurel, C., Ferreira, H., Wiechens, N., and Owen-Hughes, T. (2004). Sin mutations alter inherent nucleosome mobility. *EMBO J* 23, 343-353.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278, 4035-4040.
- Gehring, M., and Henikoff, S. (2007). DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim Biophys Acta* 1769, 276-286.
- Gervais, A.L., and Gaudreau, L. (2009). Discriminating nucleosomes containing histone H2A.Z or H2A based on genetic and epigenetic information. *BMC Mol Biol* 10, 18.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.
- Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., and

- Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.
- Goldman, J.A., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2009). Chromatin remodeling by imitation switch (ISWI) class ATP-dependent remodelers is stimulated by histone variant H2A.Z. *J Biol Chem*.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Myohanen, S., Baylin, S.B., and Vertino, P.M. (1997). Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem* 272, 22322-22329.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.
- Hardy, S., Jacques, P.E., Grévy, N., Forest, A., Fortin, M.E., Laflamme, L., Gaudreau, L., and Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet*.
- Hartley, P.D., and Madhani, H.D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137, 445-458.
- Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 133-153.
- Hoch, D.A., Stratton, J.J., and Gloss, L.M. (2007). Protein-protein Förster resonance energy transfer analysis of nucleosome core particles containing H2A and H2A.Z. *J Mol Biol* 371, 971-988.
- Iouzalén, N., Moreau, J., and Mechali, M. (1996). H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res* 24, 3947-3952.
- Ishibashi, T., Dryhurst, D., Rose, K.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Ausio, J. (2009). Acetylation of vertebrate H2A.Z and its effect on the structure of the nucleosome. *Biochemistry* 48, 5007-5017.
- Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res* 28, 3811-3816.
- Johnston, H., Kneer, J., Chackalaparampil, I., Yaciuk, P., and Chrivia, J. (1999). Identification of a novel SNF2/SWI2 protein family member, SRCAP, which interacts with CREB-binding protein. *J Biol Chem* 274, 16370-16376.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* *19*, 187-191.

Kalocsay, M., Hiller, N.J., and Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* *33*, 335-343.

Kamakaka, R.T., and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* *19*, 295-310.

Kim, H.S., Vanoosthuyse, V., Fillingham, J., Roguev, A., Watt, S., Kislinger, T., Treyer, A., Carpenter, L.R., Bennett, C.S., Emili, A., *et al.* (2009). An acetylated form of histone H2A.Z regulates chromosome architecture in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1286-1293.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* *2*, E131.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.

Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., *et al.* (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13513-13518.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* *12*, 1565-1576.

Kumar, S.V., and Wigge, P.A. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* *140*, 136-147.

Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* *22*, 4512-4522.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* *13*, 1192-1200.

Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J.L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl*

Acad Sci U S A *102*, 18385-18390.

Li, G., and Widom, J. (2004). Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 763-769.

Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D.M. (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* *387*, 823-827.

Liu, X., Li, B., and GorovskyMa (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* *16*, 4305-4311.

Martinato, F., Cesaroni, M., Amati, B., and Guccione, E. (2008). Analysis of Myc-induced histone modifications on target chromatin. *PLoS One* *3*, e3650.

Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., *et al.* (2008). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* *453*, 358-362.

McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* *49*, 1115-1156.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386-389.

Oelgeschlager, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S., and Luscher, B. (1996). Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *EMBO J* *15*, 2771-2780.

Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* *279*, 24274-24282.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* *123*, 233-248.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J* *22*, 1599-1607.

Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 650-655.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 162-169.



- Ren, Q., and Gorovsky, M.A. (2001). Histone H2A.Z acetylation modulates an essential charge patch. *Mol Cell* 7, 1329-1335.
- Ridgway, P., Brown, K.D., Rangasamy, D., Svensson, U., and Tremethick, D.J. (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J Biol Chem* 279, 43815-43820.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.
- Sarcinella, E., Zuzarte, P.C., Lau, P.N., Draker, R., and Cheung, P. (2007). Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 27, 6457-6468.
- Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887-898.
- Shia, W.J., Li, B., and Workman, J.L. (2006). SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 2507-2512.
- Siegfried, Z., and Cedar, H. (1997). DNA methylation: a molecular lock. *Curr Biol* 7, R305-307.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.
- Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9, 465-476.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* 27, 2681-2690.
- Thambirajah, A.A., Li, A., Ishibashi, T., and Ausio, J. (2009). New developments in post-translational modifications and functions of histone H2A variants. *Biochem Cell Biol* 87, 7-17.

Thatcher, T.H., and Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22, 174-179.

Tolstorukov, M.Y., Kharchenko, P.V., Goldman, J.A., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2009). Comparative analysis of H2A.Z nucleosome organization in the human and yeast genomes. *Genome Res* 19, 967-977.

van Daal, A., and Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 3, 593-602.

Viens, A., Mechold, U., Brouillard, F., Gilbert, C., Leclerc, P., and Ogryzko, V. (2006). Analysis of human histone H2AZ deposition in vivo argues against its direct role in epigenetic templating mechanisms. *Mol Cell Biol* 26, 5325-5335.

Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 285-327.

Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064-1071.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.

Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y.T., Li, H., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Cerruti, L., Curtis, D.J., Patel, D.J., Allis, C.D., *et al.* (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 16, 304-311.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16, 166-179.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., et Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* *21*, 6270-6279.
- Ahmad, K., et Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* *9*, 1191-1200.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., et Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* *407*, 102-106.
- Allis, C.D., Glover, C.V., Bowen, J.K., et Gorovsky, M.A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell* *20*, 609-617.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L., et Katzenellenbogen, B.S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8517-8521.
- Babiarz, J.E., Halley, J.E., et Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* *20*, 700-710.
- Bai, Z., et Gust, R. (2009). Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch Pharm (Weinheim)* *342*, 133-149.
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., *et al.* (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* *445*, 671-675.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., et Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* *129*, 823-837.
- Barth, T.K., et Imhof, A. (2010). Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem Sci* *35*, 618-626.
- Beaulieu, N., Morin, S., Chute, I.C., Robert, M.F., Nguyen, H., et MacLeod, A.R. (2002). An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J Biol Chem* *277*, 28176-28181.

- Becker, P.B., Tsukiyama, T., et Wu, C. (1994). Chromatin assembly extracts from *Drosophila* embryos. *Methods Cell Biol* 44, 207-223.
- Bedford, M.T., et Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33, 1-13.
- Beischlag, T.V., et Perdew, G.H. (2005). ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280, 21607-21611.
- Bell, A.C., et Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482-485.
- Beresford, A.P. (1993). CYP1A1: friend or foe? *Drug Metab Rev* 25, 503-517.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Bernardino, J., Roux, C., Almeida, A., Vogt, N., Gibaud, A., Gerbault-Seureau, M., Magdelenat, H., Bourgeois, C.A., Malfoy, B., et Dutrillaux, B. (1997). DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression? *Cancer Genet Cytogenet* 97, 83-89.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., et Szyf, M. (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583.
- Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S.Y., et Blau, H.M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042-1047.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., et Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40, 91-99.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., et Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9543-9547.

- Bonner, W.M., Wu, R.S., Panusz, H.T., et Muneses, C. (1988). Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis. *Biochemistry* 27, 6542-6550.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., et Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536-2539.
- Boyd, D.R., et Genuis, S.J. (2008). The environmental burden of disease in Canada: respiratory disease, cardiovascular disease, cancer, and congenital affliction. *Environ Res* 106, 240-249.
- Brown, S.E., Suderman, M.J., Hallett, M., et Szyf, M. (2008). DNA demethylation induced by the methyl-CpG-binding domain protein MBD3. *Gene* 420, 99-106.
- Brown, T.C., et Brown-Luedi, M.L. (1989). G/U lesions are efficiently corrected to G/C in SV40 DNA. *Mutat Res* 227, 233-236.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., et Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., et Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.
- Butler, M.A., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., et Kadlubar, F.F. (1989). Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7696-7700.
- Chadwick, B.P., et Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 152, 375-384.
- Chang, X., Firestone, G.L., et Bjeldanes, L.F. (2006). Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane. *Carcinogenesis* 27, 541-550.
- Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., et Bjeldanes, L.F. (2005). 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis* 26, 771-778.
- Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C., et Ali, S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 19, 1002-1015.

- Chen, H.Y., Sun, J.M., Zhang, Y., Davie, J.R., et Meistrich, M.L. (1998a). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 273, 13165-13169.
- Chen, I., McDougal, A., Wang, F., et Safe, S. (1998b). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis* 19, 1631-1639.
- Chen, J.D., et Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., et Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* 15, 3319-3329.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., et Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
- Choi, H.J., Lim do, Y., et Park, J.H. (2009). Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol* 9, 39.
- Conerly, M.L., Teves, S.S., Diolaiti, D., Ulrich, M., Eisenman, R.N., et Henikoff, S. (2010). Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res* 20, 1383-1390.
- Costanzi, C., et Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599-601.
- Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J., et Gilbert, W. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274, 775-780.
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., et Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3942-3948.
- Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., et Parker, M.G. (1997). Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272, 19858-19862.
- Cox, M.B., et Miller, C.A., 3rd (2004). Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress Chaperones* 9, 4-20.
- Dahmus, M.E. (1996). Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol* 273, 185-193.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., *et al.* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7, 663-676.

Denison, M.S., Fisher, J.M., et Whitlock, J.P., Jr. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263, 17221-17224.

Denison, M.S., et Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.

Detich, N., Theberge, J., et Szyf, M. (2002). Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 277, 35791-35794.

Dhillon, N., et Kamakaka, R.T. (2000). A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol Cell* 6, 769-780.

Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S.J., Aparicio, O.M., et Kamakaka, R.T. (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol* 26, 489-501.

Du, Z., Song, J., Wang, Y., Zhao, Y., Guda, K., Yang, S., Kao, H.Y., Xu, Y., Willis, J., Markowitz, S.D., *et al.* (2010). DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* 3, ra80.

Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhlidal, C., Kladde, M., et Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13, 1511-1521.

Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Danenberg, P.V., et Laird, P.W. (1999). CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 59, 2302-2306.

Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., et Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.

Edwards, J.R., O'Donnell, A.H., Rollins, R.A., Peckham, H.E., Lee, C., Milekic, M.H., Chanrion, B., Fu, Y., Su, T., Hibshoosh, H., *et al.* (2010). Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns. *Genome Res* 20, 972-980.

Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., et Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19, 5363-5372.

- Esser, C., Rannug, A., et Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 30, 447-454.
- Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., *et al.* (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92, 564-569.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., et Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11, 1183-1187.
- Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S., et Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 309, 1189-1199.
- Felsenfeld, G., et Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., et Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.
- Ge, K., Cho, Y.W., Guo, H., Hong, T.B., Guermah, M., Ito, M., Yu, H., Kalkum, M., et Roeder, R.G. (2008). Alternative mechanisms by which mediator subunit MED1/TRAP220 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-stimulated adipogenesis and target gene expression. *Mol Cell Biol* 28, 1081-1091.
- Ge, K., Guermah, M., Yuan, C.X., Ito, M., Wallberg, A.E., Spiegelman, B.M., et Roeder, R.G. (2002). Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417, 563-567.
- Gervais, A.L., et Gaudreau, L. (2009). Discriminating nucleosomes containing histone H2A.Z or H2A based on genetic and epigenetic information. *BMC Mol Biol* 10, 18.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., et Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.
- Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., et Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.



Gierthy, J.F., Lincoln, D.W., Gillespie, M.B., Seeger, J.I., Martinez, H.L., Dickerman, H.W., et Kumar, S.A. (1987). Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 47, 6198-6203.

Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F., et Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.

Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Alexandersson, M., Fernstrom, B., et Gustafsson, J.A. (1993). Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Mol Pharmacol* 44, 336-345.

Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., et Gustafsson, J.A. (1989). Interactions of rutaecarpine alkaloids with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 10, 651-654.

Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R., et Bieche, I. (2003). Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 9, 4415-4422.

Grilli, S. (2006). Tamoxifen (TAM): the dispute goes on. *Ann Ist Super Sanita* 42, 170-173.

Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P.L., Liu, F., Tracy, J.H., Bammler, T.K., Quigley, S.D., Farin, F.M., Buhler, D.R., Safe, S.H., Strom, S.C., et al. (2004). Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes. *Xenobiotica* 34, 619-632.

Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P.L., Tracy, J.H., Bammler, T.K., Strom, S.C., Buhler, D.R., et Eaton, D.L. (2009). Modulation of aflatoxin B1-mediated genotoxicity in primary cultures of human hepatocytes by diindolylmethane, curcumin, and xanthohumols. *Toxicol Sci* 112, 303-310.

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

Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., et Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., et Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Hafeez, S., Ahmed, A., Rashid, A.Z., et Kayani, M.A. (2012). Down-Regulation of CYP1A1 Expression in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 1757-1760.

Hampsey, M., et Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429-432.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.

Hardy, S., Jacques, P.E., Grévry, N., Forest, A., Fortin, M.E., Laflamme, L., Gaudreau, L., et Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet*.

Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., et Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486-489.

Harris, M., Zacharewski, T., et Safe, S. (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 50, 3579-3584.

Hata, K., Okano, M., Lei, H., et Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983-1993.

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., et McMahon, M. (2009). Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci* 111, 199-201.

Heard, E., Rougeulle, C., Arnaud, D., Avner, P., Allis, C.D., et Spector, D.L. (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* 107, 727-738.

Helferich, W.G., et Denison, M.S. (1991). Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol* 40, 674-678.

Helfrich, M.H., Livingston, E., Franklin, I.M., et Soutar, R.L. (1997). Expression of adhesion molecules in malignant plasma cells in multiple myeloma: comparison with normal plasma cells and functional significance. *Blood Rev* 11, 28-38.

Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., et Bird, A. (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304.

Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S., et Young, R.A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.

Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., et Berger, S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648-2663.

Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., et Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.

Hittelman, A.B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J.A., Freedman, L.P., et Garabedian, M.J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18, 5380-5388.

Ho, C.K., Sriskanda, V., McCracken, S., Bentley, D., Schwer, B., et Shuman, S. (1998). The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 273, 9577-9585.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., et Eden, A. (2008). Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 27, 404-408.

Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., et al. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41, 178-186.

Issa, J.P., Vertino, P.M., Wu, J., Sazawal, S., Celano, P., Nelkin, B.D., Hamilton, S.R., et Baylin, S.B. (1993). Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 85, 1235-1240.

Jackson, J.D., Falciano, V.T., et Gorovsky, M.A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci* 21, 466-467.

Jensen, B.L., Skouv, J., Lundholt, B.K., et Lykkesfeldt, A.E. (1999). Differential regulation of specific genes in MCF-7 and the ICI 182780-resistant cell line MCF-7/182R-6. *Br J Cancer* 79, 386-392.

- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., et Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* *41*, 941-945.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430-435.
- Kamakaka, R.T., et Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* *19*, 295-310.
- Kanduri, C., Holmgren, C., Pilartz, M., Franklin, G., Kanduri, M., Liu, L., Ginjala, V., Ulleras, E., Mattsson, R., et Ohlsson, R. (2000). The 5' flank of mouse H19 in an unusual chromatin conformation unidirectionally blocks enhancer-promoter communication. *Curr Biol* *10*, 449-457.
- Kang, Y.K., Guermah, M., Yuan, C.X., et Roeder, R.G. (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2642-2647.
- Kao, C.F., Hillyer, C., Tsukuda, T., Henry, K., Berger, S., et Osley, M.A. (2004). Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* *18*, 184-195.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* *270*, 1491-1494.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., et Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* *21*, 2594-2607.
- Keogh, M.C., Mennella, T.A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., *et al.* (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev* *20*, 660-665.
- Kharat, I., et Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* *271*, 10533-10537.

Kietz, S., Feng, S., Agoulnik, A., et Hombach-Klonisch, S. (2009). Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1160, 367-373.

Kim, D.W., Gazourian, L., Quadri, S.A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D.H., et Sonenshein, G.E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498-5506.

Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., et Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.

Kingston, R.E., et Narlikar, G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352.

Klar, A.J., et Bonaduce, M.J. (1991). *swi6*, a gene required for mating-type switching, prohibits meiotic recombination in the *mat2-mat3* "cold spot" of fission yeast. *Genetics* 129, 1033-1042.

Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.

Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., et Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 122, 703-710.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., et Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131.

Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreon, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnins, R.P., Frauson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., *et al.* (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 279-303.

Koleske, A.J., et Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.

Komarnitsky, P., Cho, E.J., et Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14, 2452-2460.

Kornberg, R.D., et Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.

Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X., et Safe, S. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6710-6719.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12, 1565-1576.

Kumar, M.B., et Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.

Kumar, M.B., Tarpey, R.W., et Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.

Kundu, T.K., et Rao, M.R. (1999). CpG islands in chromatin organization and gene expression. *J Biochem* 125, 217-222.

Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., *et al.* (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* 2, 33-42.

Langouet, S., Coles, B., Morel, F., Becquemont, L., Beaune, P., Guengerich, F.P., Ketterer, B., et Guillouzo, A. (1995). Inhibition of CYP1A2 and CYP3A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B1 metabolism in human hepatocytes in primary culture. *Cancer Res* 55, 5574-5579.

Larochelle, M., et Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* 22, 4512-4522.

Laurent, B.C., Treitel, M.A., et Carlson, M. (1991). Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2687-2691.

Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., *et al.* (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2920-2925.

Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., *et al.* (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301-313.

Leong, H., Firestone, G.L., et Bjeldanes, L.F. (2001). Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor- $\alpha$  expression. *Carcinogenesis* 22, 1809-1817.

Leong, H., Riby, J.E., Firestone, G.L., et Bjeldanes, L.F. (2004). Potent ligand-independent estrogen receptor activation by 3,3'-diindolylmethane is mediated by cross talk between the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 18, 291-302.

LeRoy, G., Loyola, A., Lane, W.S., et Reinberg, D. (2000). Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J Biol Chem* 275, 14787-14790.

Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, et Workman, J.L. (2003). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 278, 8897-8903.

Li, E., Bestor, T.H., et Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

Linden, J., Lensu, S., Tuomisto, J., et Pohjanvirta, R. (2010). Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 31, 452-478.

Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.

Liu, X., Li, B., et GorovskyMa (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 16, 4305-4311.

Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., et O'Malley, B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor- $\alpha$  and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- $\alpha$  transactivation. *Mol Cell* 5, 939-948.

Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., et Reinberg, D. (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10004-10008.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., et Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

- Ma, Q., et Whitlock, J.P., Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272, 8878-8884.
- Macdonald, N., Welburn, J.P., Noble, M.E., Nguyen, A., Yaffe, M.B., Clynes, D., Moggs, J.G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J.W., *et al.* (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* 20, 199-211.
- Malik, H.S., et Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10, 882-891.
- Malik, S., Jiang, S., Garee, J.P., Verdin, E., Lee, A.V., O'Malley, B.W., Zhang, M., Belaguli, N.S., et Oesterreich, S. (2010). Histone deacetylase 7 and FoxA1 in estrogen-mediated repression of RPRM. *Mol Cell Biol* 30, 399-412.
- Malik, S., et Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* 11, 761-772.
- Marmorstein, R., et Roth, S.Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 155-161.
- Marques, M., Laflamme, L., Gervais, A.L., et Gaudreau, L. (2010). Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics* 5, 267-272.
- Martucci, C.P., et Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther* 57, 237-257.
- Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., et Gustafsson, J.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol* 25, 5317-5328.
- McFadyen, M.C., Cruickshank, M.E., Miller, I.D., McLeod, H.L., Melvin, W.T., Haites, N.E., Parkin, D., et Murray, G.I. (2001). Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer. *Br J Cancer* 85, 242-246.
- McMillan, B.J., et Bradfield, C.A. (2007). The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol Pharmacol* 72, 487-498.
- Meneghini, M.D., Wu, M., et Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.



Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B., et Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1, 686-692.

Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R., et Schule, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-439.

Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., et Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 18, 978-988.

Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K., et Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* 20, 711-722.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., *et al.* (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., et Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.

Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y., et Sasaki, H. (2001). Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 97, 1172-1179.

Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D., et Melvin, W.T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57, 3026-3031.

Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., et Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* 39, 1507-1511.

Musselman, C.A., Ramirez, J., Sims, J.K., Mansfield, R.E., Oliver, S.S., Denu, J.M., Mackay, J.P., Wade, P.A., Hagman, J., et Kutateladze, T.G. (2012). Bivalent recognition of nucleosomes by the tandem PHD fingers of the CHD4 ATPase is required for CHD4-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 787-792.

Nebert, D.W., et Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945-993.

- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., et Dalton, T.P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59, 65-85.
- Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., et Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66, 407-422.
- Ngo, A.D., Taylor, R., Roberts, C.L., et Nguyen, T.V. (2006). Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 35, 1220-1230.
- Nguyen, L.P., et Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21, 102-116.
- Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E., et Safe, S. (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 367, 250-257.
- Nickel, B.E., Allis, C.D., et Davie, J.R. (1989). Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry* 28, 958-963.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., et al. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., et al. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., et Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- Okano, M., Xie, S., et Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19, 219-220.
- Okino, S.T., Pookot, D., Li, L.C., Zhao, H., Urakami, S., Shiina, H., Igawa, M., et Dahiya, R. (2006). Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 66, 7420-7428.
- Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203.

Ostler, K.R., Davis, E.M., Payne, S.L., Gosalia, B.B., Exposito-Cespedes, J., Le Beau, M.M., et Godley, L.A. (2007). Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene* 26, 5553-5563.

Paine, A.J. (1976). Induction of benzo[a]pyrene Mono-oxygenase in liver cell culture by the photochemical generation of active oxygen species. Evidence for the involvement of singlet oxygen and the formation of a stable inducing intermediate. *Biochem J* 158, 109-117.

Paine, A.J., et Francis, J.E. (1980). The induction of benzo[a]pyrene-3-mono-oxygenase by singlet oxygen in liver cell culture is mediated by oxidation products of histidine. *Chem Biol Interact* 30, 343-353.

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., et Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200-213.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., et Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.

Perdew, G.H., et Babbs, C.F. (1991). Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. *Nutr Cancer* 16, 209-218.

Peterson, C.L., et Herskowitz, I. (1992). Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573-583.

Petrulis, J.R., Hord, N.G., et Perdew, G.H. (2000). Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *J Biol Chem* 275, 37448-37453.

Pham, A.D., et Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289, 2357-2360.

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., et Zhang, Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131-135.

Poland, A., et Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554.

Pongratz, I., Mason, G.G., et Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require

hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem* 267, 13728-13734.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101-1105.

Porter, W., Wang, F., Duan, R., Qin, C., Castro-Rivera, E., Kim, K., et Safe, S. (2001). Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *J Mol Endocrinol* 26, 31-42.

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S., et Maier, M.A. (2000). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 275, 2943-2950.

Rachez, C., Lemon, B.D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Freedman, L.P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398, 824-828.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., et Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., et Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J* 22, 1599-1607.

Rangasamy, D., Greaves, I., et Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 650-655.

Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., et Grafstrom, A.K. (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* 262, 15422-15427.

Rappe, C., Buser, H.R., et Bosshardt, H.P. (1979). Dioxins, dibenzofurans and other polyhalogenated aromatics: production, use, formation and destruction. *Ann N Y Acad Sci* 320.

Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S., et Almouzni, G. (2005). [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)* 21, 384-389.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., et Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12, 162-169.

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

Reik, W., et Murrell, A. (2000). Genomic imprinting. Silence across the border. *Nature* 405, 408-409.

Risebrough, R.W., Rieche, P., Peakall, D.B., Herman, S.G., et Kirven, M.N. (1968). Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature* 220, 1098-1102.

Robert, M.F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I.C., Barsalou, A., et MacLeod, A.R. (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 33, 61-65.

Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G., Ribas, M., *et al.* (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* 66, 8462-9468.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., et Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.

Santi, D.V., Norment, A., et Garrett, C.E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6993-6997.

Sarcinella, E., Zuzarte, P.C., Lau, P.N., Draker, R., et Cheung, P. (2007). Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 27, 6457-6468.

Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., et Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6731-6736.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., et Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887-898.

Sharma, R., Panda, N.K., et Khullar, M. (2010). Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis* 16, 668-673.

- Shen, E.S., et Whitlock, J.P., Jr. (1989). The potential role of DNA methylation in the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 264, 17754-17758.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., et Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-544.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., et Casero, R.A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., et Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 19, 857-864.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., et Sutter, T.R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56, 2979-2984.
- Shoker, B.S., Jarvis, C., Sibson, D.R., Walker, C., et Sloane, J.P. (1999). Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *J Pathol* 188, 237-244.
- Soares, J., Pinto, A.E., Cunha, C.V., Andre, S., Barao, I., Sousa, J.M., et Cravo, M. (1999). Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer* 85, 112-118.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., et Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism* 12, 198-212.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., et Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., et Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.
- Sved, J., et Bird, A. (1990). The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4692-4696.
- Szabo, P., Tang, S.H., Rentsendorj, A., Pfeifer, G.P., et Mann, J.R. (2000). Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 10, 607-610.
- Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T., et Kojima, H. (2008). In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere* 74, 155-165.

- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., et Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.
- Tekli, X., Zienolddiny, S., Skaug, V., Stangeland, L., Haugen, A., et Mollerup, S. (2012). DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer* 131, 1509-1516.
- Teperek-Tkacz, M., Pasque, V., Gentsch, G., et Ferguson-Smith, A.C. (2011). Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* 142, 621-632.
- Thatcher, T.H., et Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22, 174-179.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., et Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B., et Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274, 510-515.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., et Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., et Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3, 513-519.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., et Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227, 115-124.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., et Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C.C., Shiloach, J., et Wu, C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 13, 686-697.
- Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., et Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379-383.

- van Daal, A., et Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 3, 593-602.
- Vivar, O.I., Lin, C.L., Firestone, G.L., et Bjeldanes, L.F. (2009). 3,3'-Diindolylmethane induces a G(1) arrest in human prostate cancer cells irrespective of androgen receptor and p53 status. *Biochem Pharmacol* 78, 469-476.
- Wang, F., Samudio, I., et Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 172, 91-103.
- Wang, F., Wang, W., et Safe, S. (1999). Regulation of constitutive gene expression through interactions of Sp1 protein with the nuclear aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* 38, 11490-11500.
- Wang, R.Y., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., Huang, L.H., et Ehrlich, M. (1982). Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim Biophys Acta* 697, 371-377.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q., et al. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40, 897-903.
- Wei, Y.D., Bergander, L., Rannug, U., et Rannug, A. (2000). Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Arch Biochem Biophys* 383, 99-107.
- Wei, Y.D., Rannug, U., et Rannug, A. (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact* 118, 127-140.
- Wiebauer, K., Neddermann, P., Hughes, M., et Jiricny, J. (1993). The repair of 5-methylcytosine deamination damage. *EXS* 64, 510-522.
- Wilson, A.S., Power, B.E., et Molloy, P.L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775, 138-162.
- Wolffe, A.P., Urnov, F.D., et Guschin, D. (2000). Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem Soc Trans* 28, 379-386.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., et Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23, 1843-1855.
- Wurtele, H., Li, Q., Zhou, H., Zhang, Z., et Verreault, A. (2009). [Histone acetylation and chromatin assembly]. *Med Sci (Paris)* 25, 121-122.



Yang, X., Noushmehr, H., Han, H., Andreu-Vieyra, C., Liang, G., et Jones, P.A. (2012). Gene reactivation by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation requires SRCAP-mediated H2A.Z insertion to establish nucleosome depleted regions. *PLoS Genet* 8, e1002604.

Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., et Young, R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* 39, 1512-1516.

Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., et Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328, 916-919.

Zhang, N. (2011). The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *J Cardiovasc Dis Res* 2, 91-95.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., et Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.