

Université
de Liège



**Université de Liège
Faculté des Sciences**

**GIGA-Research
Laboratoire de Chimie Médicale
Unité de Transmission du signal (GIGA-ST)**

**Identification et caractérisation des sous-
unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator
humain**

Magali GILLARD

Promoteurs: Drs. A. Chariot et P. Close

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences

Année académique : 2012-1013

Université
de Liège



**Université de Liège
Faculté des Sciences**

**GIGA-Research
Laboratoire de Chimie Médicale
Unité de Transmission du signal (GIGA-ST)**

**Identification et caractérisation des sous-
unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator
humain**

Magali GILLARD

Promoteurs: Drs. A. Chariot et P. Close

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences

Année académique : 2012-1013

La dysautonomie familiale est une pathologie neurodégénérative qui touche les systèmes nerveux sensoriel et autonome. Cette maladie résulte de mutations de perte de fonction du gène codant pour la protéine ELP1. Celle-ci permet l'assemblage d'Elongator, un complexe doué d'une activité acétyltransférase et composé de six sous-unités réparties en deux sous-complexes protéiques : d'une part le « core-Elongator » (ELP1 à ELP3) et d'autre part le complexe HAP (ELP4 à ELP6). Alors que la sous-unité ELP3 est capable d'acétyler de nombreux substrats dont les histones nucléaires et la tubuline- α cytoplasmique, une activité ATPase a récemment été identifiée dans le complexe ELP4-6. Initialement identifié sur base de son association à l'ARN polymérase II, Elongator a depuis été caractérisé comme un acteur important de l'acétylation des microtubules, de même que comme complexe requis pour certaines modifications des ARNs de transfert. Ces fonctions moléculaires très diverses lui confèrent la capacité de réguler de nombreux processus physiologiques tels que la division ou la migration cellulaire. Une meilleure connaissance des fonctions moléculaires d'Elongator permettrait non seulement d'éclaircir son rôle dans ces différents processus cellulaires mais également de révéler de nouvelles fonctions.

Au moment d'entamer nos travaux, l'identité des sous-unités humaines ELP1, 2, 3 et 4 était connue, à l'inverse des sous-unités ELP5 et ELP6. Nous avons donc entrepris d'identifier et de caractériser ces deux protéines. La purification de la protéine ELP4 humaine nous a permis d'isoler le complexe Elongator dans son intégralité. Ainsi, nous avons pu identifier les protéines DERP6 et C3ORF75 comme étant respectivement les sous-unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator humain. Nous avons en outre démontré qu'ELP5 est indispensable pour permettre l'association entre ELP3 et à ELP4, ceci suggérant qu'ELP5 est également requis pour l'intégrité et la fonction d'Elongator.

Notre laboratoire a précédemment mis en évidence l'importance d'Elongator dans la migration cellulaire. Compte-tenu du fait que la migration est une étape critique dans l'acquisition du pouvoir invasif et métastatique des cellules cancéreuses, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure Elongator intervenait dans ces processus physiopathologiques en étudiant une lignée dérivée de mélanome murin à titre de modèle expérimental. La perte de fonction d'Elongator altère la mobilité de ces cellules de même que leur capacité à former des colonies en agar mou. Les mêmes résultats ont été obtenus en invalidant les sous-unités Elp5 et Elp6 nouvellement identifiées dans ces cellules murines. L'ensemble de nos résultats montre qu'Elongator est requis pour la migration et la tumorigénicité des cellules cancéreuses issues de mélanome murin et que les sous-unités DERP6/ELP5 et C3ORF75/ELP6 confèrent ces propriétés cellulaires en tant que sous-unités de ce complexe.

Familial Dysautonomia is a neurodegenerative disorder that affects the autonomic and sensory nervous systems. This disease results from loss-of-function mutations of the ELP1-encoding gene. ELP1 is required for the integrity of the so-called Elongator complex, which is composed of two sub-proteins complexes, namely the core-Elongator (ELP1 to ELP3) and HAP (ELP4 to ELP6). While ELP3 is acting as an acetyltransferase that target multiple substrates such as nuclear histones and cytoplasmic α -tubulin, the ELP4-6 has been recently described as an ATPase. This complex has been initially identified as a component of a hyperphosphorylated RNA polymerase II holoenzyme. As a result, Elongator is involved in transcriptional elongation. Since, other roles have been assigned. Elongator is indeed also required for some tRNA modifications in the cytoplasm and consequently controls translation fidelity. Those molecular functions underlie the capacity of Elongator to regulate cell division, DNA-damage response and cell motility. It is likely that a better understanding of the molecular functions of Elongator will clarify its role in these cellular processes and probably highlight new features.

The identity of human ELP1 through ELP4 has been reported but human ELP5 and ELP6 have remained uncharacterized. We therefore initiated a study dedicated to the identification and characterization of both proteins. A biochemical purification of ELP4 was conducted to isolate all associated proteins. Such experimental approach led to the identification of DERP6 and C3ORF75 as human ELP5 and ELP6 subunits of the Elongator complex, respectively. We further investigated the cellular functions of both subunits by combining biochemical analysis and cellular assays. Our results show that DERP6/Elp5 is required for the integrity and the function of Elongator and directly connects ELP3 to ELP4.

Our laboratory has previously demonstrated the key role of Elongator in cell migration. As cell motility is required for cell invasion and metastasis, we therefore investigated to which extent Elongator is involved in those processes. The migration and tumorigenicity of melanoma-derived cells are significantly decreased upon Elongator invalidation through Elp1 or Elp3 depletion. Strikingly, DERP6/Elp5 and C3ORF75/Elp6-depleted melanoma cells have similar defects, further supporting the idea that DERP6/Elp5 and C3ORF75/Elp6 are essential for Elongator function. Together, our data identify DERP6/ELP5 and C3ORF75/ELP6 as key players for migration, invasion and tumorigenicity of melanoma cells, as integral subunits of Elongator.

Au terme de ce travail, mes remerciements s'adressent particulièrement à mes promoteurs Alain Chariot et Pierre Close. Alain, merci de m'avoir ouvert la porte de la Science et d'avoir partagé avec moi ton Savoir. Tu as été un promoteur exigeant, disponible, volontaire et tu ne m'as pas laissée de côté en cours de route, pour cela aussi je te remercie. Pierre, merci pour ton encadrement et tes conseils judicieux. Travailler avec toi a été un réel plaisir, j'ai beaucoup apprécié ton aisance didactique et ton optimisme. Ton soutien et tes corrections m'ont été d'une aide précieuse que ce soit lors de la préparation de la présentation pour le Télévie (« Nothing compared ») ou lors de la rédaction de cette thèse et de sa présentation.

En commençant cette aventure, je n'imaginai pas rencontrer de personnes aussi fantastiques qu'Isa, Cath, Layla, Caro, Ayman et Kateryna. Avec vous j'ai eu l'immense plaisir de partager bien des fous rires, des tranches de vie, de bons repas, des chansons, des concerts et plus ou moins de sciences, un tout grand merci !

Sur le long chemin de la thèse, les gens passent et participent tous d'une façon ou d'une autre à l'amélioration de votre travail. Que ce soit pour leur bonne humeur, les grandes conversations, un partage de manips ou de gâteaux, mais également pour leur soutien, je remercie Aurore, Isa, Xin, Aurélie, T-Lan, Muriel(s), Céline(s), Félicia, Jess, Kim, Claire, Renaud, Domi, Emilie, France, Zheshen, Anne, Serkan, Manu, Monique, Laurent, Malou, Lina et Sophie. Je n'oublierai pas toutes les personnes rencontrées au GIGA et avec qui l'on peut partager de grands moments en culture, au L2 ou en chambre noire. Cocotte, merci d'avoir partagé avec moi ton expertise et « ton » stock de collagène. Mes remerciements vont aussi à Fabrice, Benoît et Luc pour toutes les manips qui ne font pas partie de cette thèse...

Cette aventure, je l'ai pleinement partagée avec mes parents et mes beaux-parents, je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements !

Mes amies m'ont également beaucoup soutenue que ce soit dès l'enfance, durant mes études, au cours de ma thèse, mais encore aujourd'hui. C'est pour cela et bien d'autres choses que je vous remercie Lorène, Marie, Sophie, Féridé, Anne-Fran et Ségolène.

Que serais-je sans mes rayons de soleil ? David, je te dis un très très grand merci pour ta patience et tes corrections. Mes petits loulous Ethan et Noémie, merci d'être les plus gentils enfants de la terre entière.

Une pensée également pour mes nouveaux collègues qui sont pressés de ne plus entendre parler de cette thèse... Merci Gwen pour ta relecture et tes commentaires !

A.t.	: <i>Arabidopsis thaliana</i>	HAT	: <i>Histone Acetyl Transferase</i>
Actine-F	: Actine Filamenteuse	HDAC	: <i>Histone Deacetylase</i>
Actine-G	: Actine Globulaire	H.s.	: <i>Homo sapiens</i>
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique	HSP	: <i>Heat Shock Protein</i>
ADNc	: ADN complémentaire	IF	: Immunofluorescence
ADP	: Adénosine DiPhosphate	IκB	: <i>NF-κB Inhibitor</i>
AKT	: <i>Protein Kinase B</i>	IKAP	: <i>IκB Kinase Associated Protein</i>
ARN	: Acide RiboNucléique	IKI3	: <i>Insensitive to Killer toxin 3</i>
ARNi	: ARN interférant	IKK	: <i>IκB kinase</i>
ARNm	: ARN messenger	IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
ARNPII	: ARN Polymérase II	InR-TOR	: <i>Insulin Receptor-Target Of Rapamycin</i>
ARNt	: ARN de transfert	IP	: <i>Immunoprecipitation</i>
Arp 2/3	: <i>Actin related protein 2/3</i>	JIP-1	: <i>JNK Interacting Protein-1</i>
ATM	: <i>Ataxia Telangiectasia Mutant</i>	KAT	: <i>Lysine Acetyl Transferase</i>
ATP	: Adénosine TriPhosphate	kDa	: <i>kiloDalton</i>
β₂AR	: <i>Beta-2 Adrenergic Receptor</i>	KDAC	: <i>Lysine Deacetylase</i>
BDNF	: <i>Brain-Derived Neurotrophic growth Factor</i>	Km	: <i>Constante de Michaelis</i>
C3ORF75	: <i>Chromosome 3 Open Reading Frame 75</i>	Kti11	: <i>K. lactis Toxin Insensitive</i>
CBP	: <i>CREB-Binding Protein</i>	Ltq	: <i>Linear ion Trap Quadrupole</i>
Cdc42	: <i>Cell division cycle 42</i>	MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
CoA	: <i>Co-enzyme A</i>	mcm⁵	: <i>5-methoxycarbonylmethyl</i>
CRM1	: <i>Chromosome Region Maintenance 1 or Exportin1</i>	MEC	: <i>Matrice Extra Cellulaire</i>
CTD	: <i>Carboxy-Terminal Domain</i>	MEF2	: <i>Myocyte enhancer factor-2</i>
DERP6	: <i>Dermal papilla-derived Protein 6</i>	MF	: <i>Microfilament</i>
D.m.	: <i>Drosophila melanogaster</i>	M.m.	: <i>Mus musculus</i>
Elp	: <i>Elongator protein</i>	MMP	: <i>Matrix MetalloProteinase</i>
FAK	: <i>Focal Adhesion Kinase</i>	MPT	: <i>Modification Post-Traductionnelle</i>
FD	: <i>Familial Dysautonomia</i>	MT	: <i>Microtubule</i>
FeS	: <i>Fer-Soufre</i>	MTOC	: <i>MicroTubule Organizing Center</i>
FGFR	: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>	MYST	: <i>MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60</i>
FI	: <i>Filament Intermédiaire</i>	NAD	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
GAP	: <i>GTPase Activating Proteins</i>	ncm⁵	: <i>5-carbamoylmethyl</i>
GDP	: <i>Guanosine DiPhosphate</i>	NES	: <i>Nuclear Export Signal</i>
GEF	: <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>	NF-κB	: <i>Nuclear Factor-κB</i>
GFAP	: <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	NLS	: <i>Nuclear Localisation Signal</i>
GNAT	: <i>Gcn5 related N-Acetyl Transferase</i>	N-WASP	: <i>Neural-WASP</i>
GPCR	: <i>G Protein Coupled Receptor</i>	+TiPs	: <i>plus-end-Tracking Proteins</i>
GTP	: <i>Guanosine TriPhosphate</i>	p130CAS	: <i>p130 Crk-Associated Substrate</i>
Hap2	: <i>Histone acetylation protein 2</i>		

PCAF	: <i>P300/CBP-Associated Factor</i>	SNP	: Système Nerveux Périphérique
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>	SOD1	: <i>SuperOxide Dismutase 1</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>	S.p.	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and TENsin homologue</i>	Src	: <i>Sarcoma</i>
qPCR	: <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>	STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription-3</i>
Rac	: <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	StIP1	: <i>(STAT3-interacting protein)Stress-Induced Phosphoprotein 1</i>
Rb	: Rétinoblastome	TEM	: Transition Epithélio-Mésenchymateuse
Rho	: <i>Ras homology protein</i>	TGFβ	: <i>Tumor Growth Factor β</i>
Rho GDI	: <i>Rho GDP-Dissociation Inhibitor</i>	TOT1	: <i>Toxin target 1</i>
Rho GTPases	: <i>Rho Guanosine TriPhosphatases</i>	3D	: Trois Dimensions
RTK	: <i>Receptor Tyrosine Kinases</i>	TSA	: <i>TrichoStatin A</i>
SAGA	: <i>Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase</i>	USP33	: <i>Ubiquitin-Specific Protease 33</i>
SAHA	: <i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>	VASP	: <i>Vasodilator-Stimulated Phospho protein</i>
SAM	: <i>S-AdenosylMethionine</i>	VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
S.c.	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VEGFR	: <i>VEGF receptor</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>	WAGR	: <i>Wilms tumor-Aniridia-Genitourinary anomalies-mental Retardation</i>
SILAC	: <i>Stable-Isotope Labeling by Amino acid in Cell culture</i>	WASP	: <i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
SIR	: <i>Silent Information Regulator</i>	WB	: <i>Western blot</i>
shRNA	: <i>short-hairpin RNA</i>	ZnF	: <i>Zinc Finger</i>
SLA	: Sclérose Latérale Amyotrophique		
SNC	: Système Nerveux Central		

Introduction	1
Partie n°1 :	1
La migration cellulaire	1
1. Généralités sur la migration.....	2
2. Les acteurs de la migration cellulaire	2
2.1. La matrice extracellulaire	2
2.2. Le cytosquelette	3
3. Le processus de migration cellulaire.....	7
3.1. La polarisation cellulaire	7
3.2. L'extension membranaire	9
3.3. L'adhérence à la matrice extracellulaire	9
3.4. Rétractation de l'arrière de la cellule.....	11
4. La dissémination métastatique	12
Partie n°2 :	16
L'acétylation des lysines	16
1. Généralités	17
2. Les acétyltransférases	18
3. Les lysines déacétylases	19
4. Les cibles des HATs et HDACs	22
4.1. Les histones	22
4.2. Les protéines non-histoniques (l'acétylome).....	24
4.2.1. La régulation du cytosquelette par acétylation	25
4.2.2. Le transport cellulaire	25
5. Les inhibiteurs d'HDACs	26
Partie n°3 :	29
Le complexe Elongator	29
1. Historique	30
2. Caractéristiques des sous-complexes d'Elongator.....	31
2.1. Le core-Elongator: Elp1, Elp2 et Elp3	31
2.2. Les sous-unités HAP : Elp4, Elp5 et Elp6	33
3. Les fonctions d'Elongator	34
3.1. L'élongation transcriptionnelle	35
3.2. La modification des ARNs de transfert.....	36
3.3. La migration cellulaire	38
4. Pathologies neuronales associées à Elongator	40
4.1. La dysautonomie familiale	40
4.2. La sclérose latérale amyotrophique.....	42
Objectifs du travail	45
Résultats	49
1. Introduction	51
2. Résultats.....	51
2.1. Identification des sous-unités ELP5 et ELP6 humaines.....	51

2.2. ELP5 est nécessaire pour l'interaction entre ELP4 et ELP3.....	58
2.3. Etude de l'implication d'Elongator dans la migration et dans l'invasion cellulaire.....	59
2.4. ELP5 et ELP6 régulent la migration cellulaire et le pouvoir transformant en tant que sous-unités du complexe Elongator	66
3. Conclusions.....	71
Discussion et perspectives	73
1. Structure du complexe Elongator.....	75
2. Régulation du complexe Elongator	78
3. Elongator dans les pathologies neurodégénératives	79
4. Elongator dans le cancer et l'invasion métastatique.....	81
Bibliographie	83
Annexes	105

Introduction

Partie n°1 :

La migration cellulaire

La dysautonomie familiale est une pathologie génétique récessive qui affecte le développement et la survie des neurones du système nerveux autonome et sensoriel (Axelrod, 2004). Cette pathologie est provoquée par la perte de fonction du gène codant pour la protéine Elp1 qui est l'une des sous-unités du complexe Elongator (Anderson et al., 2001; Hawkes et al., 2002; Otero et al., 1999; Svejstrup, 2007). Des travaux réalisés notamment dans notre laboratoire ont mis en évidence l'importance de ce complexe dans la migration cellulaire, ce qui expliquerait partiellement les symptômes de cette pathologie (Close et al., 2006; Naumanen et al., 2008). La migration est un processus qui intervient également dans le pouvoir métastatique des cellules malignes (Liotta et al., 1983).

1. Généralités sur la migration

La migration cellulaire est un mécanisme fondamental tant au cours de l'embryogenèse qu'à l'âge adulte en condition physiologique normale ou pathologique (Lauffenburger and Horwitz, 1996). En situation normale, ce processus intervient notamment dans la défense immunitaire et la réparation. En condition pathologique, la migration joue un rôle crucial dans le pouvoir invasif et métastatique des cellules tumorales (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Bien qu'il existe différents modes de déplacement dépendant du type cellulaire et présentant chacun des caractéristiques uniques, le mécanisme général de migration reste commun (Vicente-Manzanares et al., 2005).

2. Les acteurs de la migration cellulaire

2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) fait partie du microenvironnement cellulaire (Hynes, 2009). C'est une structure dynamique composée d'un réseau de macromolécules sécrétées dans l'espace extracellulaire. Elle est formée de protéines, de protéoglycanes et de glycoprotéines (Lu et al., 2011). Les composants de la matrice extracellulaire ne sont pas figés, ils varient de façon continue, notamment en fonction du type de tissu et du stade de développement des cellules. Ils interagissent entre eux et avec les cellules environnantes (Lu et al., 2011) (Fig.1).

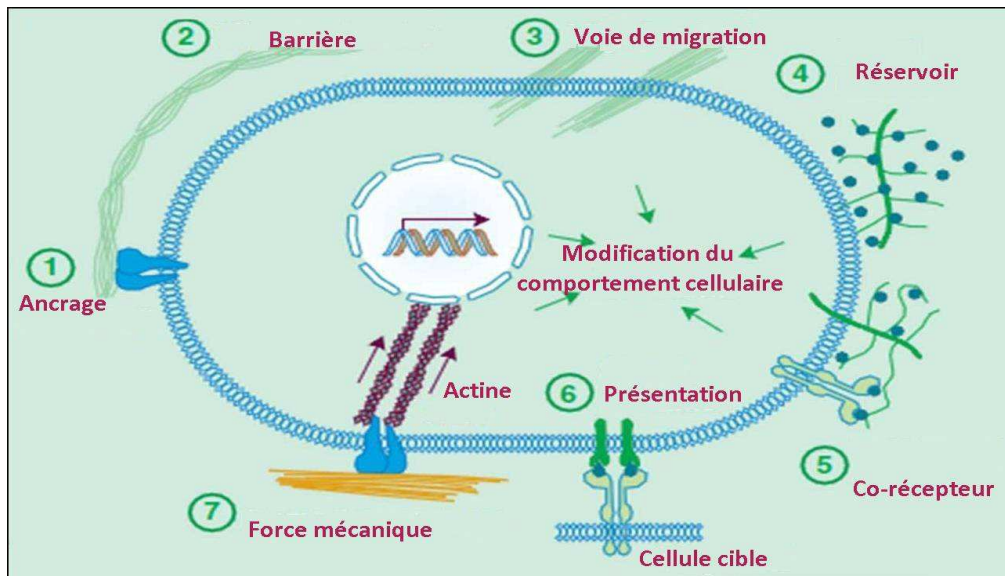


Figure 1. Rôles et conséquences biologiques du dynamisme de la MEC.

1) Ancrage de la cellule à la membrane basale : essentiel pour différents processus biologiques (division asymétrique des cellules souches, maintenance de la polarité cellulaire). 2) Rôle de barrière 3) ou au contraire favorisant la migration cellulaire. 4) Réservoir de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire et mise en place d'un gradient de concentration. 5) Certains composants de la MEC peuvent lier des facteurs de croissance et fonctionner comme corécepteur 6) ou en tant que présentateur. 7) Par ses propriétés biochimiques, la MEC peut influencer le comportement cellulaire, par exemple la différenciation cellulaire. Figure adaptée de (Lu et al., 2011).

Le collagène est le composant majeur de la MEC chez l'homme (Shoulders and Raines, 2009). Il possède des fonctions mécaniques et structurales, mais celui-ci est également impliqué dans l'adhérence, la migration cellulaire, l'angiogenèse, le développement de cancers, la morphogenèse et la réparation des tissus (Kadler et al., 2007).

2.2. Le cytosquelette

Le cytosquelette est une structure dynamique intracellulaire, qui interagit avec tous les organelles de la cellule (Boldogh and Pon, 2006). Il est composé de trois types de fibres : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Etienne-Manneville, 2004a) (Fig.2).

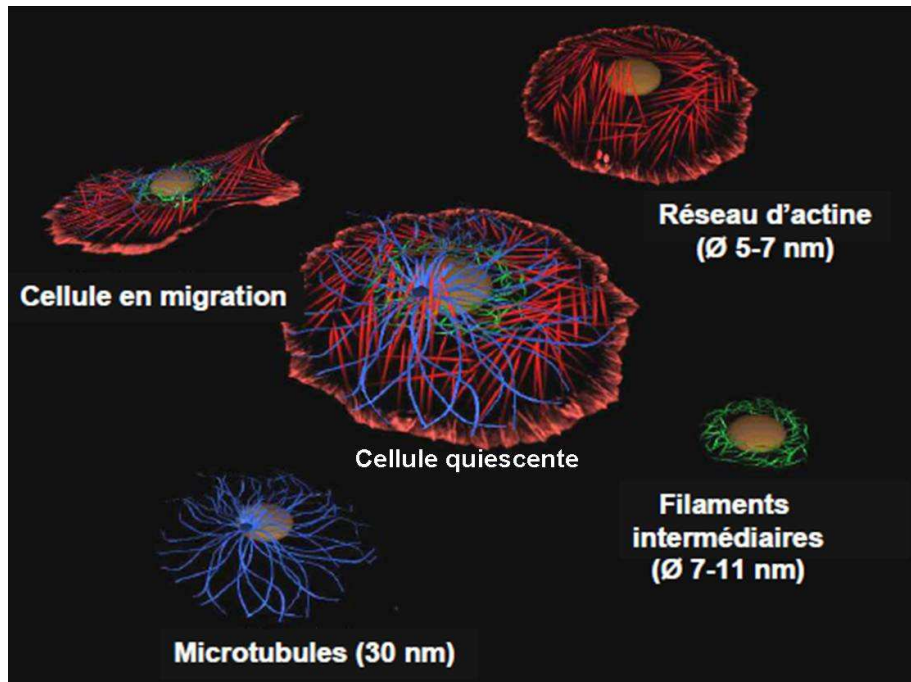


Figure 2. Localisation des molécules du cytosquelette.

Les différents composants du cytosquelette sont marqués : rouge pour l'actine, vert pour les filaments intermédiaires et bleu pour les microtubules (<http://www.lptl.jussieu.fr/user/lesne/CoursMotilite.pdf>).

L'élément de base d'un filament d'actine est un monomère d'actine globulaire couplé à l'ATP (actine-G). Ces monomères d'actine s'associent afin de générer les microfilaments (MFs) (Winder and Ayscough, 2005). Le filament d'actine est asymétrique : il possède une extrémité dite barbée (+) et à l'opposé, une extrémité dite pointue (-) (Fig.3). Il existe une différence de concentration en monomère d'actine-G disponible aux deux extrémités du filament (concentration critique), ce qui fait que l'extrémité barbée grandit 5 à 10 fois plus vite que l'extrémité pointue (Pollard and Cooper, 1986). En phase d'équilibre, il y a ajout de monomère à l'extrémité barbée et perte d'actine-G à l'extrémité pointue (Pollard and Mooseker, 1981). Ce processus est continu dans une cellule immobile et est nommé « treadmilling » ou tapis roulant (Rottner et al., 1999). Afin que ce phénomène génère la force nécessaire pour faire avancer la cellule, il faut que les protrusions membranaires (lamellipodes) contenant les filaments d'actine puissent s'ancrer dans un substrat au niveau de complexes d'adhérence (Rottner et al., 1999). La figure 3 est une représentation schématique des différentes protéines associées à l'actine et qui régulent le dynamisme des MFs (Ridley et al., 2003).

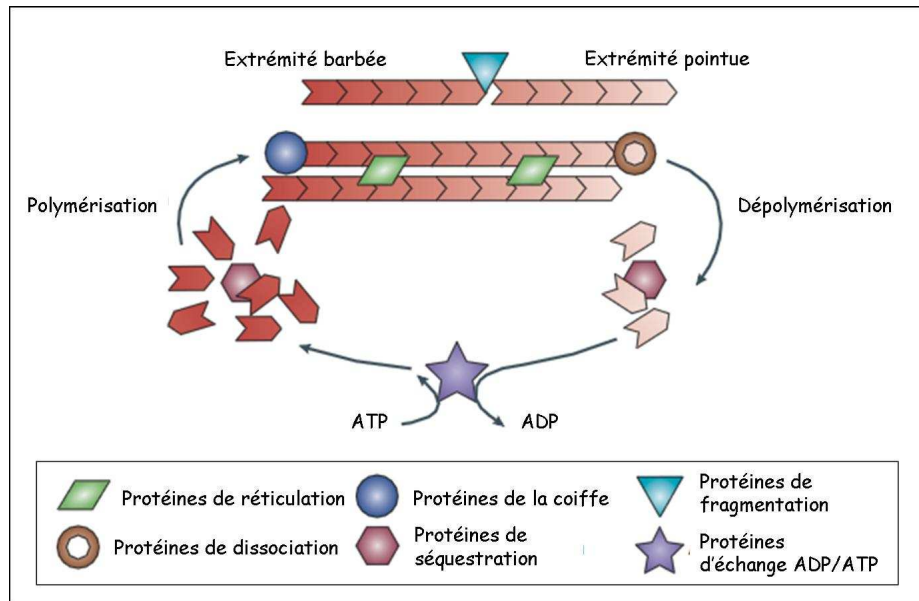


Figure 3. Schématisation des différentes protéines associées à l'actine.

Parmi les protéines associées à l'actine, on retrouve des protéines de réticolation (vert), les protéines de la coiffe (rond bleu), les protéines de fragmentation (triangle bleu) et de dissociation (rond brun). Certaines protéines séquestrent les monomères d'actine (hexagone rose) ou échangent de l'ADP contre de l'ATP (étoile mauve). Figure adaptée de (Revenu et al., 2004).

Parmi les composants du cytosquelette, il y a les microtubules (MTs). Ceux-ci sont constitués de tubuline, un hétérodimère composé des sous-unités α et β (Downing and Nogales, 1998). Les dimères de tubuline s'assemblent en une chaîne stable pour former des protofilaments en présence de GTP. Ces derniers s'associent latéralement pour former les MTs. Ce sont les seuls composants du cytosquelette à posséder une lumière centrale (Downing and Nogales, 1998). Ils sont également polarisés, et l'extrémité «+» polymérise plus rapidement que l'extrémité «-» (Bergen and Borisy, 1980). Les microtubules sont des polymères hautement dynamiques impliqués dans une grande variété de fonctions cellulaires (Desai and Mitchison, 1997). Ils participent à la morphogenèse et à la mobilité, mais ils sont également nécessaires pour le trafic d'organelles et de macromolécules au sein de la cellule en interphase (Gundersen and Cook, 1999; Lippincott-Schwartz et al., 2000). Les MTs sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) incluant la glutamylation, la tyrosination et l'acétylation (Hammond et al., 2008). Le rôle de ces modifications commence seulement à être compris. Ainsi, dans les cellules neuronales différenciées, l'acétylation favorise le recrutement de moteurs moléculaires tels que la kinésine-1 et la dynéine au niveau des MTs, afin de promouvoir le transport rétrograde et antérograde de protéines cargo telles que JIP-1 (*JNK-Interacting Protein-1*) ou des vésicules contenant du

BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic growth Factor*) (Dompierre et al., 2007; Reed et al., 2006) (Fig.4).

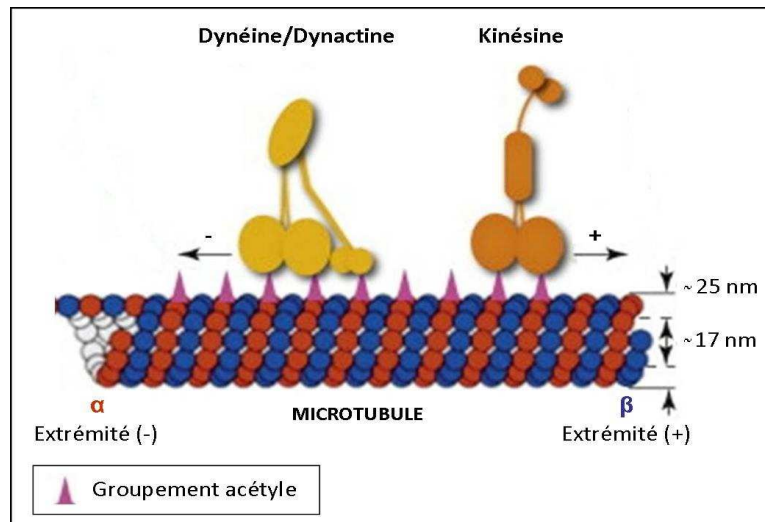


Figure 4. Le transport vésiculaire.

La kinésine (orange) est capable de se déplacer le long des MTs dans le sens antérograde, vers le pôle «+» du MT, alors que la dynéine/dynactine (jaune) est impliquée dans le transport rétrograde, vers le pôle «-» du MT. Ces transports sont favorisés par l'acétylation de la tubuline. Figure adaptée de (Heng et al., 2010).

A la différence des MFs et des MTs, la composition protéique des filaments intermédiaires (FIs) varie en fonction du type cellulaire. Par exemple, la nestine est exprimée dans les cellules souches du système nerveux et la kératine dans l'épithélium (Steinert and Roop, 1988). Les protéines qui composent les FIs possèdent un domaine central formant une hélice α bordée par des extrémités amino et carboxy terminales de tailles et de conformations variables (Steinert and Roop, 1988). Les filaments intermédiaires sont classés en fonction de l'homologie de séquence de l'hélice α . Il existe six types de FIs dont l'organisation des composants est similaire (Steinert and Roop, 1988) (Tableau 1).

Tableau 1. Classement des filaments intermédiaires.

Type I	Kératines acides
Type II	Kératines neutres-basiques
Type III	Vimentine, desmine, protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), périphérine
Type IV	Neurofilaments L, M et H, internexine- α
Type V	Lamine nucléaire
Type VI	Nestine

Les FIs ne sont pas polarisés et leur formation est spontanée (Steinert and Roop, 1988). En effet, elle ne nécessite ni d'apport en ATP ou en GTP, ni de protéines accessoires (Steinert and Roop, 1988).

Les FIs sont nécessaires pour la résistance aux stress mécaniques (Fuchs and Cleveland, 1998) et ils sont dynamiques. Par exemple, la vimentine dans les fibroblastes est constamment assemblée et désassemblée (Goldman et al., 1999). L'importance des FIs réside notamment dans leur capacité à interagir avec les autres composants du cytosquelette (Fuchs 1998 et Chang 2004).

3. Le processus de migration cellulaire

Le déplacement d'une cellule implique différentes étapes dont la première est la polarisation (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Les cellules polarisées émettent des protrusions à l'avant de la cellule dans la direction du déplacement et dans l'axe de polarité. Afin de migrer, les filaments d'actine qui constituent le squelette de ces protrusions sont réorganisés (Pollard and Borisy, 2003; Pollard and Cooper, 2009). La génération de force permettant à la cellule d'avancer nécessite la formation de complexes d'adhérence à l'avant de la cellule (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Les chapitres suivants détaillent ces différentes étapes.

3.1. La polarisation cellulaire

L'établissement d'une polarité cellulaire est essentielle pour la division, la différenciation et la migration cellulaire (Funasaka et al., 2010). Dans les organismes multicellulaires, cette polarisation peut survenir suite à la perception d'un gradient de stimulus (Lauffenburger and Horwitz, 1996). La polarisation ainsi que la migration cellulaire nécessitent le réarrangement dynamique du cytosquelette d'actine et des MTs grâce aux cascades de signalisation impliquant les Rho GTPases (Raftopoulou and Hall, 2004; Ridley et al., 2003). Trois membres de cette famille sont bien caractérisés :

- Rho qui régule l'assemblage des fibres de stress d'actine ;
- Rac qui contrôle la polymérisation de l'actine à la périphérie cellulaire afin de générer des lamellipodes ;

- Cdc42 qui induit la formation de filopodes (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995a; Puls et al., 1999; Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992).

Leur activation dépend de l'activité des GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) et des GAPs (*GTPase Activating Proteins*), permettant le passage d'une forme inactive, couplée au GDP, à une forme active, couplée au GTP et inversement (Fig.5).

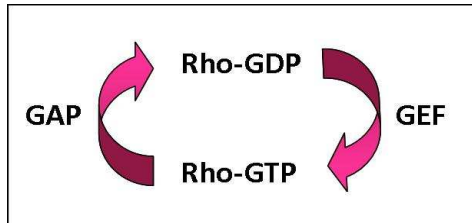


Figure 5. Conformations des Rho-GTPases.

Les enzymes de type GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) catalysent l'échange entre le GDP et le GTP, ce qui active la protéine Rho. Par contre, les GAP (*GTPase Activating Protein*) vont hydrolyser l'ATP et inactiver la protéine Rho.

Cdc42 est l'une des Rho GTPases impliquée dans la réponse au signal de polarisation (Etienne-Manneville, 2004b). Elle est active au niveau du front de migration des cellules qui migrent (Itoh et al., 2002) et influence la polarité cellulaire notamment par la restriction spatiale de la formation des lamellipodes (Srinivasan et al., 2003). Cdc42 peut également affecter la polarité en positionnant le centre organisateur des microtubules (MTOC), et l'appareil de Golgi, en face du noyau et orienté vers l'avant de la cellule (Ridley et al., 2003) (Fig.6).

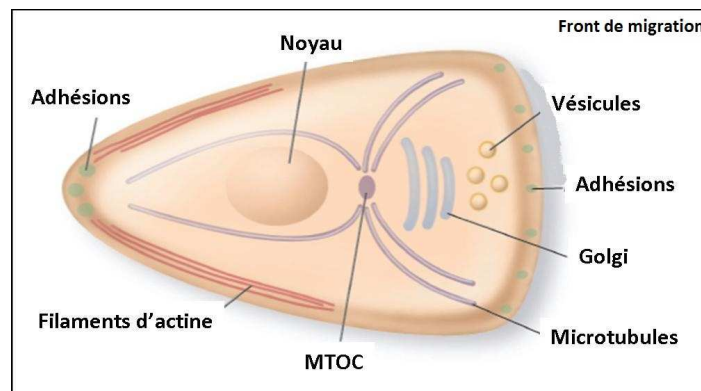


Figure 6. Représentation d'une cellule polarisée.

Le centre organisateur des microtubules (MTOC) et l'appareil de Golgi sont alignés avec le noyau et dirigés vers l'avant de la cellule. Figure adaptée de (Ridley et al., 2003)

La réorientation du MTOC contribue à la migration polarisée en facilitant la croissance des MTs et le transport des vésicules de Golgi vers l'avant de la cellule, soutenant ainsi la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Les cellules qui migrent conserveraient leur polarisation grâce à l'inhibition mutuelle des protéines Rho et Rac (Evers et al., 2000).

3.2. L'extension membranaire

La migration implique le remodelage des filaments d'actine afin d'émettre des protrusions et de générer des forces intracellulaires (Pollard and Cooper, 2009). Lors de la migration, le cytosquelette d'actine forme deux structures principales :

- Les lamellipodes : large structure en forme de feuille contenant un réseau ramifié de filaments d'actine minces et courts (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Ils sont générés par la GTPase Rac et certains de ses effecteurs, dont les complexes WAVE/Scar et N-WASP (Blanchoin et al., 2000) ;
- Les filopodes : longues et minces saillies émergeant de la membrane cellulaire. Ils sont principalement régulés par Cdc42 et sont constitués de longs faisceaux d'actine non-ramifiés souvent décorés de tropomyosine et de fascine (Mattila and Lappalainen, 2008; Mejillano et al., 2004).

Pour générer la force nécessaire au déplacement cellulaire, les protrusions membranaires doivent adhérer à la matrice extracellulaire (Rottner et al., 1999).

3.3. L'adhérence à la matrice extracellulaire

Les adhérences focales ou complexes d'adhérence sont des sites de jonction entre une cellule et la MEC (Zamir and Geiger, 2001). Elles permettent à la cellule de communiquer avec l'environnement extérieur (Berrier and Yamada, 2007) et sont essentielles pour la migration cellulaire, de même que pour l'intégrité des tissus (Webb et al., 2004). La GTPase Rac induit la formation de ces adhérences focales (Nobes and Hall, 1995b; Rottner et al., 1999). Au niveau des complexes d'adhérence, les récepteurs membranaires majeurs sont les intégrines (Zamir and Geiger, 2001). Celles-ci sont des hétéro-dimères composés des sous-unités α et β . Elles possèdent un large domaine extracellulaire responsable de la liaison avec le ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Schwartz et al., 1995). Il existe plusieurs isoformes de ces sous-unités α et β , ce qui permet une grande possibilité de combinaison, dont chacune a des propriétés de liaison spécifique avec un ou plusieurs composants de la MEC (Zamir and Geiger, 2001). Au niveau des complexes d'adhérence, les intégrines sont agrégées (Fig.7 B). Elles permettent l'ancrage du cytosquelette d'actine du côté cytoplasmique et elles activent différentes voies de signalisation intracellulaire en réponse à un signal extracellulaire, notamment en activant FAK (Kinase d'Adhérence Focale)

et Src (Schwartz et al., 1995) (Fig.7). Les intégrines n'ont pas la propriété de lier l'actine, cette liaison nécessite le recrutement d'autres molécules (Jockusch et al., 1995), telles que la taline (Albiges-Rizo et al., 1995) et la paxilline (Liu et al., 1999). De plus, les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique. La transmission du signal extracellulaire nécessite dès lors l'intervention de molécules de signalisation pour activer différentes voies de transduction (Ridley et al., 2003). Par exemple, la tyrosine kinase FAK est recrutée très tôt lors de l'assemblage des complexes d'adhésions. Elle est activée par autophosphorylation, ainsi que par les kinases de la famille Src et permet la transduction du signal provenant des intégrines (Parsons, 2003).

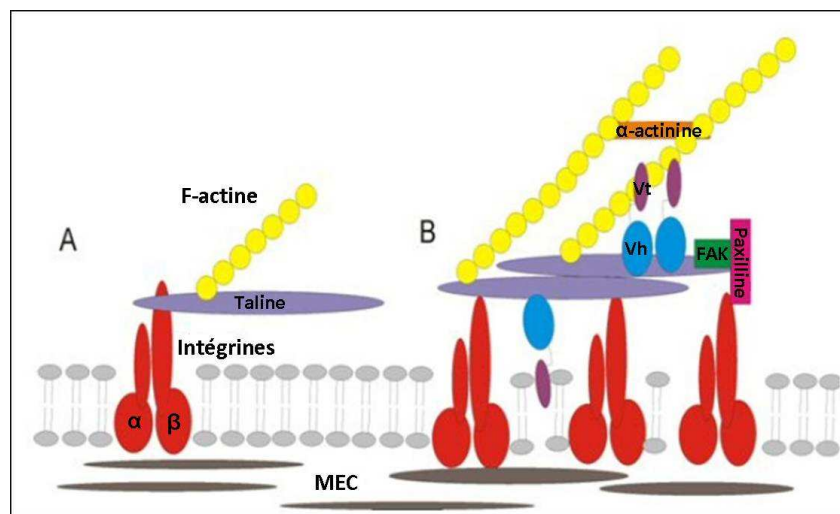


Figure 7. Composition des complexes d'adhésion.

A) Représentation d'un complexe naissant, la connexion entre la MEC et la cellule est établie par les intégrines (rouge). La taline (violet) associe les intégrines aux cytosquelettes d'actine (jaune). B) Maturation du complexe suite à l'ajout de nombreuses protéines telles que : la paxilline (rose), la vinculine (Vh et Vt en bleu et magenta) FAK (vert) et l' α -actinine (orange).
Figure adaptée de http://www.bionmr.soton.ac.uk/people_clare_07.html.

Les filaments d'actine sont ancrés au niveau des adhérences focales sous forme de fibres de stress. La formation et le maintien de ces structures dépendent de facteurs régulant la dynamique de l'actine, tels que la gelsoline, la tensine et VASP (*Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*) (Kwiatkowski, 1999). Certaines kinases participent également à l'assemblage/désassemblage des complexes d'adhésion, par exemple : FAK, Src, PKC et PI3K (Carpenter and Cantley, 1996; Ilic et al., 1995; Xu et al., 1997). Les phosphatases telles que SHP-2 (*Src Homology 2 domain containing PTP2*) et PTEN sont également des composantes des adhérences focales (Yu et al., 1998) (Fig.8). Néanmoins, il existe plus de 150 protéines qui

participent à la régulation des adhérences focales (Zaidel-Bar and Geiger, 2010; Zaidel-Bar et al., 2007).

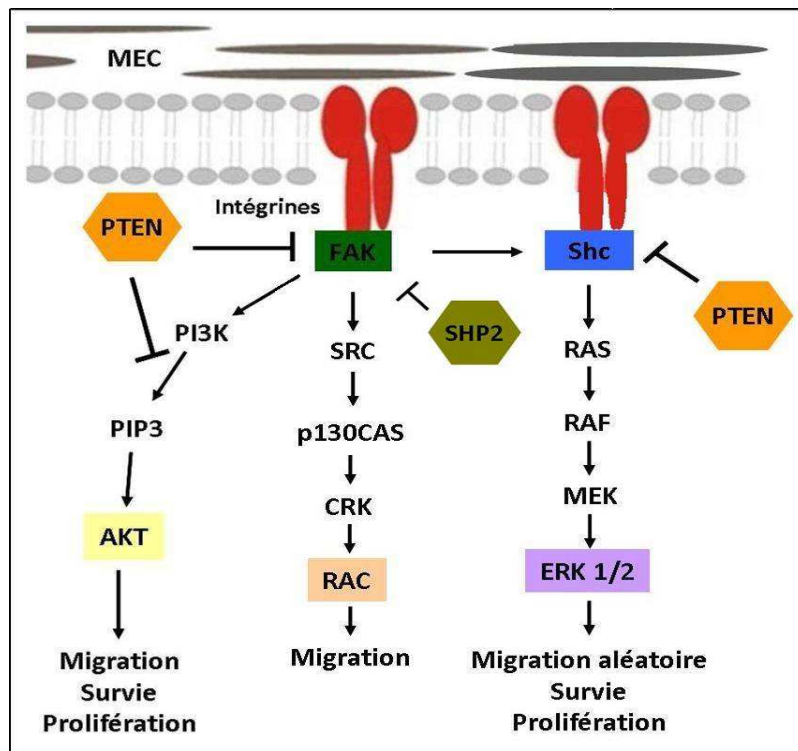


Figure 8. Activité de FAK au niveau des complexes d'adhérence.

L'association des intégrines avec la MEC stimule la phosphorylation de la kinase FAK et de la protéine adaptatrice Shc. Ces protéines conduisent à l'activation de cascades de signalisation qui sont spécifiques. PTEN inhibe la phosphorylation de FAK et Shc, et par conséquent inhibe la migration et la prolifération cellulaire. SHP2 est une autre phosphatase inhibant l'activité de FAK. FAK permet le recrutement de protéines de la famille SRC. Une fois activée, celle-ci recrute p130CAS (p130 *Crk associated substrate*). Cette cascade de signalisation aboutit à l'activation de RAC qui va stimuler la migration. Une fois activée, FAK recrute également la PI3K qui induit la migration cellulaire, la survie et la prolifération via AKT. PTEN inhibe la PI3K par la déphosphorylation de son substrat, le PIP3. Figure adaptée de (Thomas et al., 2010).

En réponse à différents signaux, les adhérences focales sont continuellement modifiées. Elles s'assemblent à l'extrémité des protrusions et se dissocient à l'arrière de la cellule, ce qui leur permet de réguler la mobilité cellulaire (Webb et al., 2004).

3.4. Rétractation de l'arrière de la cellule

Pour que la cellule en migration puisse progresser vers l'avant, l'arrière de la cellule doit se rétracter et les complexes d'adhérence de cette partie de la cellule doivent se dissocier. Cette dissociation fait intervenir la contraction des fibres de stress et les voies de signalisation

impliquées dans la régulation de protéines telles que Rho, la calcineurine et les tyrosines kinases (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Lors de la rétractation, les intégrines situées à l'arrière de la cellule sont internalisées et recyclées vers l'avant (Ballestrem et al., 2001). Ce phénomène aboutit à l'activation de protéines telles que la cofiline, la gelsoline ou la profiline qui vont dépolymériser les filaments d'actine et permettre le recyclage des monomères d'actine-G de l'arrière de la cellule vers l'avant (Kiuchi et al., 2007; Saarikangas et al., 2010). La figure 9 représente les forces et les acteurs majoritaires permettant la migration cellulaire.

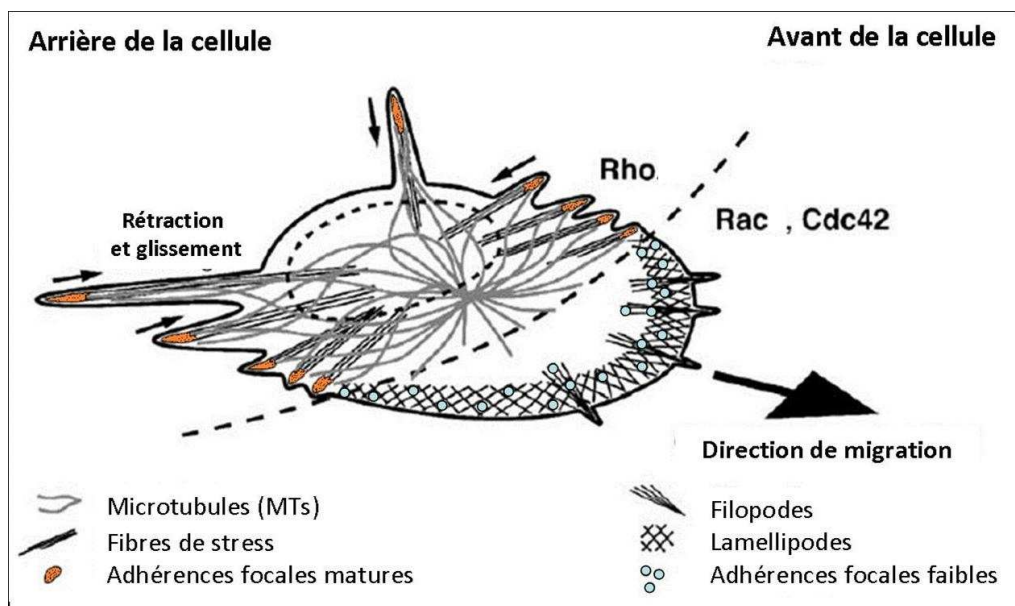


Figure 9. Représentation des principaux acteurs de la migration.

A l'avant de la cellule en migration, Cdc42 et Rac induisent la polymérisation de l'actine conduisant à la formation de lamellipodes et de filopodes. Les lamellipodes s'ancrent dans le substrat grâce aux complexes d'adhérence. Lors de la migration, les adhérences focales de faibles densités présentes sur les côtés du lamellipodium mûrissent et s'associent aux fibres de stress. Cette étape dépend de Rho. A l'arrière de la cellule, les complexes d'adhérence se dissocient et l'arrière de la cellule se rétracte (représenté par des flèches). Les MTs contrôlent le glissement vers l'intérieur de la cellule, permettant ainsi à la cellule de se déplacer vers l'avant. Figure adaptée de (Wehrle-Haller and Imhof, 2003).

La migration est un processus complexe dont le contrôle peut être perdu dans les cellules cancéreuses, ce qui contribue à la dissémination métastatique.

4. La dissémination métastatique

La formation de métastases est l'étape critique de la progression tumorale. Les métastases résultent de la propagation de cellules cancéreuses dans tout l'organisme et sont responsables de plus de 90% de la mortalité des cancers (Chaffer and Weinberg, 2011).

L'invasion métastatique consiste en une succession d'étapes qui sont critiques, étant donné que l'échec de l'une d'entre elles provoque l'arrêt du processus (Geiger and Peeper, 2009). Le point de départ est une lésion épithéliale néoplasique, viennent ensuite la transition épithélio-mésenchymateuse et le franchissement de la membrane basale, la dissociation des cellules cancéreuses de la masse tumorale, l'invasion du tissu voisin, l'entrée dans un vaisseau sanguin ou lymphatique (intravasation), le transport dans ces vaisseaux, la sortie de ceux-ci (extravasation), l'établissement des cellules disséminées au niveau d'un site secondaire et enfin, la croissance métastatique dans ce tissu (Steeg, 2003) (Fig.10). Une étape additionnelle ferait également partie du processus métastatique : la création d'une « niche pré-métastatique » (Geiger and Peeper, 2009; Kaplan et al., 2006).

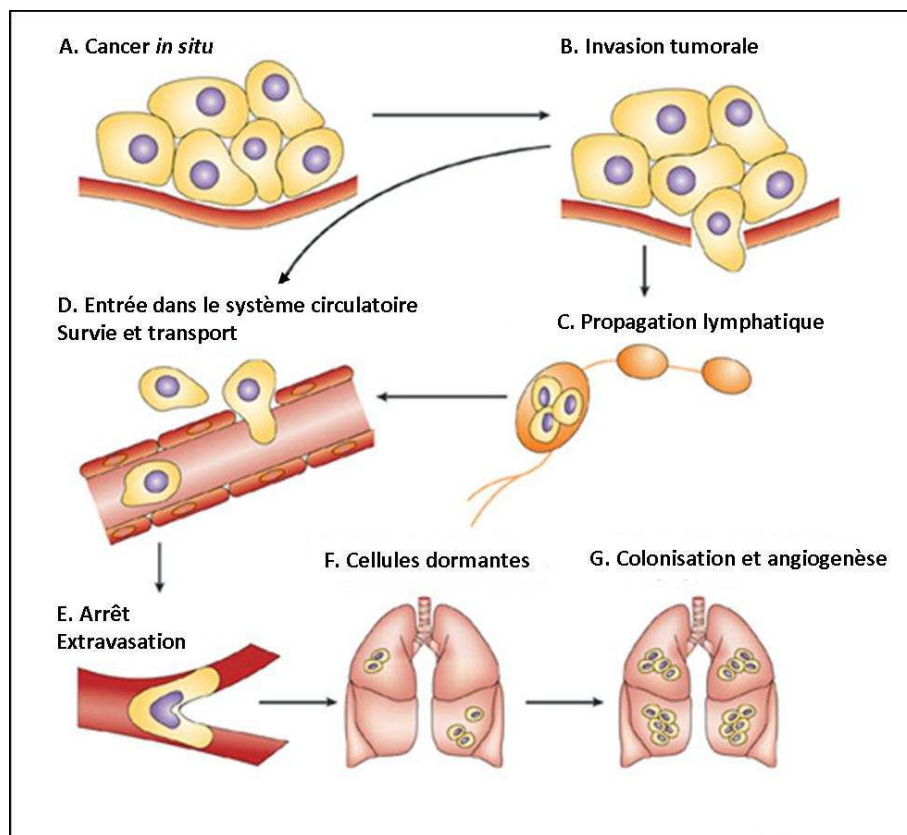


Figure 10. Représentation schématique du processus métastatique.

Le processus métastatique commence avec : A) cancer in situ entouré d'une membrane basale. B) Modifications réversibles de l'adhérence entre cellules et entre les cellules et la MEC, la destruction de protéines de la matrice et du stroma, ainsi que la mobilité des cellules. C) Entrée dans les vaisseaux lymphatiques ou D) dans la circulation sanguine. E) Survie et arrêt des cellules tumorales, extravasation du système circulatoire. F) Colonisation métastatique à un site distant de la tumeur primaire, les cellules peuvent rester dormantes plusieurs années, ensuite G) proliférer et induire l'angiogenèse. Figure adaptée de (Steeg, 2003).

Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses doivent se séparer des cellules voisines et franchir la membrane basale (Fig.11). Ces phénomènes font intervenir le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Thiery, 2002). Durant la TEM, les cellules épithéliales initialement polarisées acquièrent des caractéristiques semblables aux cellules mésenchymateuses et induisent l'invasion des tissus voisins (Thiery and Sleeman, 2006).

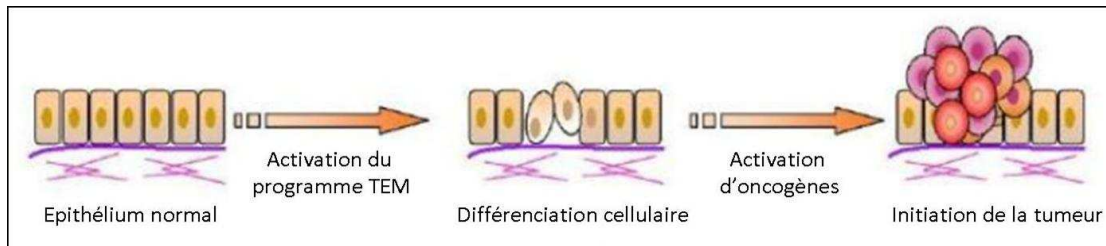


Figure 11. Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans un épithélium normal, les cellules sont polarisées et possèdent des adhésions entre elles. Lorsque la TEM est déclenchée, certaines cellules perdent leur polarisation et les adhésions avec les autres cellules. La membrane basale est représentée par la ligne mauve sous les cellules. Figure adaptée de (Ansieau et al., 2011).

Cette transition est caractérisée par la perte de la polarité cellulaire et l'inhibition de protéines épithéliales transmembranaires telles que l'E-cadhérine (Jechlinger et al., 2003), c'est le point de départ pour la formation de métastases (Derksen et al., 2006; Perl et al., 1998). La perte d'expression de l'E-cadhérine est associée à la surexpression de la N-cadhérine, une protéine mésenchymateuse (Nieman et al., 1999). Cet échange de protéines conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation : les récepteurs tyrosine kinase (RTKs), la superfamille du TGF β (*Transforming Growth Factor* β), ainsi que les voies de signalisation WNT, NOTCH, hedgehog (Huber et al., 2005; Massague, 2008) et NF κ B (Huber et al., 2004). La N-cadhérine peut également interagir avec le récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGFR), entraînant l'activation des MAP kinases. Celles-ci induisent à leur tour la sécrétion des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui permettent l'invasion tumorale par le remodelage de la MEC (Jechlinger et al., 2003).

Suite à la TEM, les cellules ont acquis la capacité de migrer, d'envahir les tissus et les vaisseaux (Nieman et al., 1999). Les Rho GTPases sont des enzymes clés dans le processus de migration cellulaire. Elles régulent de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle du cytosquelette d'actine (Pollard and Borisy, 2003; Wang et al., 2007). Leur activité est souvent dérégulée afin de promouvoir l'invasion (Sanz-Moreno et al., 2008). La voie de signalisation des intégrines, par la régulation de l'activité de FAK/Src et des Rho GTPases, est critique pour le processus de migration et d'invasion (Guo and Giancotti, 2004).

Le processus de migration est donc un phénomène complexe faisant intervenir la matrice extracellulaire, des récepteurs membranaires, des complexes d'adhérence, le cytosquelette et différentes voies de signalisation. Certaines cellules tumorales acquièrent la capacité de déréguler ces différents paramètres, pour détourner le processus de migration et conduire à la dissémination métastatique. La découverte de nouvelles protéines impliquées dans ces phénomènes permettrait de mieux comprendre ce qui conduit à cette invasion et pourrait conduire au développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

Partie n°2 :

L'acétylation des lysines

La migration cellulaire peut notamment être régulée par la modification post-traductionnelle (MPT) des composants du cytosquelette (de Forges et al., 2012; Perdiz et al., 2011). Les MPTs interviennent dans de nombreuses voies de signalisation et régulent l'activité des protéines (Seo and Lee, 2004). L'acétylation des lysines fait partie de ces modifications (Reed et al., 2006). Celle-ci est très courante (Choudhary et al., 2009) et est impliquée dans des maladies neurodégénératives (Nguyen et al., 2010), des cancers (Muraoka et al., 1996), de même que dans des désordres métaboliques (Haigis and Guarente, 2006).

1. Généralités

Les modifications post-traductionnelles (MPT) transforment chimiquement les protéines. Citons par exemple la phosphorylation, l'ubiquitination, la méthylation, mais encore l'acétylation (Seo and Lee, 2004). Ces modifications régulent la fonction des protéines, que ce soit en modifiant leurs activités, leurs localisations cellulaires ou en modifiant leurs interactions avec d'autres protéines (Seo and Lee, 2004). Les MPT interviennent dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'autophagie (Seo and Lee, 2004). Lorsqu'elles ne sont pas bien régulées, ces modifications peuvent contribuer à différentes pathologies telles que le cancer ou des maladies auto-immunes (Close et al., 2010).

L'acétylation des lysines (K) est une MPT catalysée par des acétyltransférases ou acétylases. Ces enzymes utilisent l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) comme donneur du groupement acétyle au niveau de l' ϵ -amine d'un résidu lysine, et les déacétylases catalysent la réaction inverse (Kim et al., 2010a; Sadoul et al., 2008) (Fig.12). Ces enzymes sont nommées histones acétyltransférases (HAT) et histones déacétylases (HDAC) car les premiers substrats découverts étaient les histones. Depuis, de nombreux substrats non histoniques ont été mis à jour et ces enzymes peuvent également être nommées lysines acétylases/déacétylases (KAT/KDAC) (Spange et al., 2009). De nombreuses fonctions cellulaires sont régulées par acétylation : l'interaction ADN-protéine, la localisation cellulaire d'une protéine, l'activité transcriptionnelle, la stabilité de certaines protéines et la régulation de différentes voies de signalisation (Peserico and Simone, 2011).

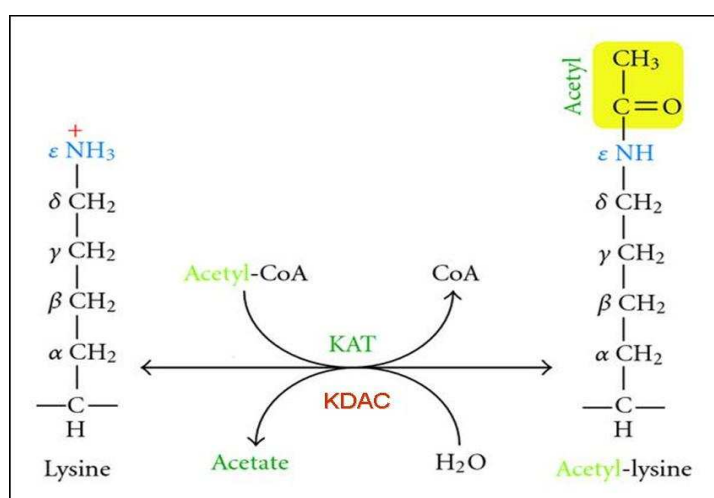


Figure 12. Réactions d'acétylation/déacétylation de la lysine.

Les HAT/KATs catalysent le transfert du groupement acétyle de l'acétyl-CoA sur le groupe aminé en position ϵ de la chaîne latérale de la lysine. L'acétylation neutralise la charge positive de la lysine et provoque la modification des propriétés biochimiques de la protéine cible. Tandis que les HDAC/KDACs catalysent le déplacement de ce groupement acétyle et génère un acétate. Figure adaptée de (Kim et al., 2010a).

2. Les acétyltransférases

Les HAT/KATs sont classées en trois grandes familles : la famille MYST (*MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60*), la famille GNAT (*Gcn5 related N-acetyltransferase*) et la famille p300 (Allis et al., 2007; Hodawadekar and Marmorstein, 2007; Sterner and Berger, 2000) (Tableau 2).

Tableau 2. Les trois grandes familles d'histones acétyltransférases.

Famille	Nom commun ^a	Nouveau nom ^b	Histones cibles	Complexes connus
GNAT	Gcn5	KAT2	H3K9, 14, 36	SAGA, Gcn5/Ada2/Ada3, ATAC, TFTC
	PCAF	KAT2B	H3K14	STAGA
	Elp3 (ELP3 chez l'homme)	KAT9	H3	Elongator
MYST	Esa1 (Tip60 chez l'homme)	KAT5	H4K5, 8, 12, 16 ; Htz1K14	NuA4, Piccolo NuA4
	Sas2 (MOF chez l'homme)	KAT8	H4K16	SAS-1
	Sas3	KAT6	H3K14, 23	NuA3
	MOZ	KAT6A	H3K14	MOZ
p300	CBP	KAT3A	H2AK5 ; H2B	Nombreux
	p300	KAT3B	H2AK5 ; H2B	Nombreux
	Rtt109	KAT11	H3K56, 9, 23	Rtt109 Vps75, Rtt109 Asf1
^a Désignations utilisées dans ce manuscrit. ^b Nomenclature proposée par (Allis et al., 2007). Sources : (Allis et al., 2007; Berndsen and Denu, 2008; Sadoul et al., 2011).				

Les séquences primaires des membres des familles MYST et GNAT n'ont pas de similarité, mais la plupart des acétyltransférases possèdent un domaine de liaison à l'acétyl-CoA ou Motif A et leur site actif possède une structure similaire (Roth et al., 2001).

L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui rivalise avec la phosphorylation (Berndsen and Denu, 2008). Les acétyltransférases sont peu nombreuses, seulement 22 enzymes (Allis et al., 2007; Hodawadekar and Marmorstein, 2007), contrairement aux 518 kinases qui phosphorylent les protéines (Johnson and Hunter, 2005). Bien que de nouvelles HAT/KATs peuvent toujours être découvertes, la capacité de ces enzymes à s'associer à d'autres protéines sous forme de larges complexes protéiques, pourrait expliquer cette rareté (Berndsen and Denu, 2008). Ces protéines additionnelles seraient nécessaires pour la reconnaissance spécifique du substrat, l'activité enzymatique et/ou pour l'interaction avec des protéines régulatrices (Shahbazian and Grunstein, 2007). De

plus, d'autres activités enzymatiques peuvent exister au sein d'un même complexe protéique (Berndsen and Denu, 2008). En effet, le complexe SAGA contient l'histone ubiquitine protéase Ubp8 et l'histone acétyltransférase Gcn5 (Sanders et al., 2002). Le complexe humain NuA4 quant à lui contient l'acétyltransférase Tip60, mais également la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutant*), une enzyme associée aux dommages à l'ADN (Sun et al., 2005; Sun et al., 2007).

Des études cinétiques ont permis de comparer l'activité individuelle d'Esa1 et de Rtt109 avec leur complexe physiologique soit, respectivement, piccolo NuA4 et Vps75 ou Asf1. Celles-ci indiquent que les autres sous-unités augmentent l'efficacité catalytique de l'enzyme, avec un très faible effet sur la constante de Michaelis (K_m) qui reflète l'affinité d'une enzyme pour son substrat (Berndsen et al., 2007; Berndsen et al., 2008; Tsubota et al., 2007). Les protéines additionnelles pourraient induire la conformation active du domaine HAT/KAT, afin d'augmenter le niveau de catalyse. Toutefois, l'effet stimulateur de ces protéines additionnelles sur l'activité de Rtt109 pourrait également être de s'associer et de présenter le substrat dans une orientation correcte pour l'attaque de l'acétyl-CoA qui lui est associé (Berndsen and Denu, 2008). Par contraste, les enzymes Gcn5, PCAF et p300 agiraient de façon constitutive. Elles ne nécessiteraient pas l'aide de protéines additionnelles pour présenter leur capacité catalytique maximum (Berndsen and Denu, 2008). Il existerait donc deux mécanismes de régulation majeurs de l'activité des acétyltransférases. D'un côté, les enzymes Esa1 et Rtt109 qui présentent une faible activité enzymatique et dont les protéines additionnelles stimuleraient l'activité. D'un autre côté, les enzymes Gcn5, PCAF et p300 qui présentent une activité catalytique constitutive et dont les protéines accessoires pourraient fonctionner afin de restreindre l'accès au site actif à des substrats spécifiques (Baker and Grant, 2007; Chan and La Thangue, 2001; Nagy and Tora, 2007). Néanmoins, l'activité enzymatique de ces enzymes requière probablement d'autres mode de régulation, tels que des MPTs ou la disponibilité de courtes chaînes d'acétyl-CoA (Berndsen and Denu, 2008).

3. Les lysines déacétylases

Les HDAC/KDACs sont réparties en quatre classes, selon leur conservation phylogénétique (Gregoretta et al., 2004). Les enzymes de la classe I, II et IV, requièrent l'ion zinc, alors que celles de la classe III dépendent de l'ion NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) pour catalyser la réaction de déacétylation (Sadoul et al., 2011). Les HDACs de

la classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8) sont des protéines orthologues de la protéine Rpd3 de levure (Spange et al., 2009). Les homologues de l'enzyme Hda1 de levure sont les protéines de la classe II, qui peuvent être subdivisées en classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9) et classe IIb (HDAC6 et HDAC10). HDAC11 est le seul membre de la classe IV, il partage des séquences conservées avec Rpd3 et Hda1. La classe III est un groupe phylogénétiquement conservé de sept membres chez l'homme, nommé les Sirtuines (*Silent information regulator 2 (Sir-2)-related protein*) (SIR1 à 7) (Spange et al., 2009) (Fig.13).

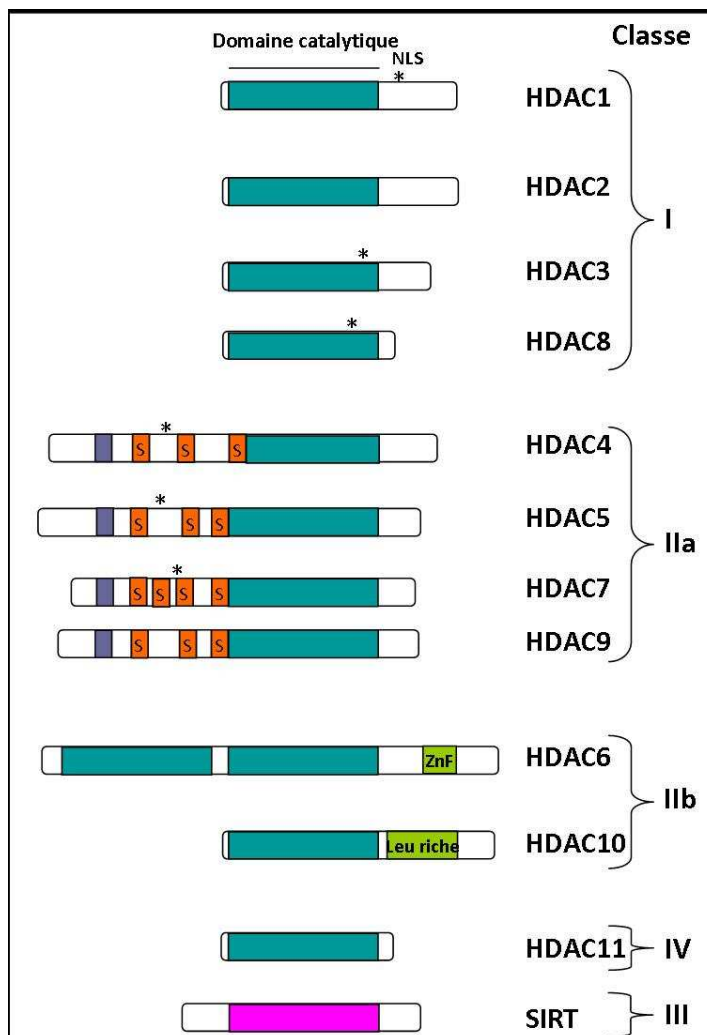


Figure 13. Organisation en superfamilles des HDACs humaines.

Les histones déacétylases sont groupées en différentes classes selon leur similarité de séquences. Le rectangle bleu représente le domaine catalytique des enzymes de classes I, II et IV, dépendantes du zinc ; l'astérisque indique le signal de localisation nucléaire (NLS) ; ZnF correspond au motif à doigt de zinc (*Zinc Finger*) ; le motif de liaison MEF2 (*Myocyte enhancer factor-2*) est représenté en mauve ; les rectangles oranges montrent les sites de liaison de la chaperone 14-3-3 et le 's' signifie la présence d'un site de phosphorylation de sérines. La classe des Sirtuines (SIRT) nécessite le NAD^+ comme co-facteur, le site catalytique de ces enzymes est représenté en rose. Figure adaptée de (Spiegel et al., 2012).

Les HDACs peuvent être localisées dans le cytoplasme ou dans le noyau (Sadoul et al., 2011) (Fig.14). Ces enzymes possèdent soit un domaine d'export nucléaire (NES), soit un signal de localisation nucléaire (NLS) ou les deux. Ces régions régulent la localisation cellulaire des HDACs en réponse à différents signaux intra ou extracellulaires.

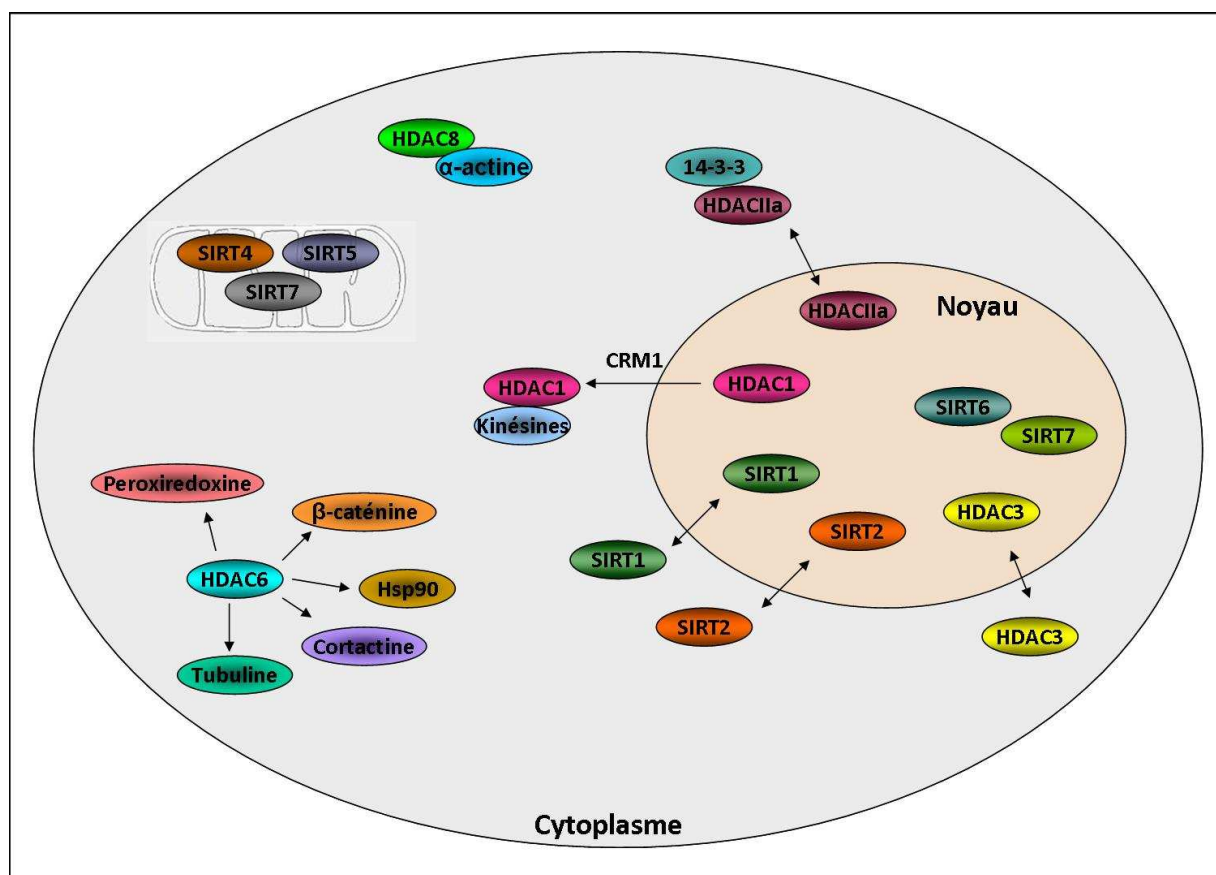


Figure 14. Localisation cellulaire des HDACs.

HDAC1 peut être exportée dans le cytoplasme par CRM1 (*Exportin 1 receptor*), une protéine régulant l'export nucléaire, en condition pathologique. Dans le cytoplasme, elle s'associe aux kinésines et entrave le transport de protéines cargo (Kim et al., 2010b). HDAC3 possède un signal d'export nucléaire (NES) et un signal de localisation nucléaire (NLS). Elle peut-être détectée dans le noyau et dans le cytoplasme (Yang et al., 2002). Dans le cytoplasme, HDAC3 est séquestrée par son association avec I κ B α (Viatour et al., 2003), jusqu'à ce que le TNF- α induise la dégradation de ce dernier (Gao et al., 2006). HDAC8 est majoritairement cytoplasmique. Elle est associée avec l' α -actine dans les muscles lisses (Waltregny et al., 2005). Les déacétylases de la classe IIa voyagent entre le noyau et le cytoplasme (Miska et al., 1999). Elles ont toutes un NLS et un site de liaison pour les protéines de la famille 14-3-3, qui interviennent dans leur séquestration cytoplasmique (Sadoul et al., 2011). HDAC6 est une déacétylase cytoplasmique, elle fait partie de la classe IIb (Sadoul et al., 2011). Elle possède plusieurs substrats dans le cytoplasme : la tubuline- α (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003), la cortactine (Zhang et al., 2007), Hsp90 (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005), la β -caténine (Li et al., 2008) et la peroxiredoxine (Parmigiani et al., 2008). Les SIRT1 et 2 (HDACs de classe III) peuvent être localisées dans le noyau ou dans le cytoplasme (Tanno et al., 2007). Dans le cytoplasme, SIRT1 agit dans l'autophagie et dans la migration cellulaire par la déacétylation de la cortactine (Lee et al., 2008; Zhang et al., 2009). SIRT2 déacétyle la tubuline- α (North et al., 2003) dans des circonstances particulières comme la mitose (Inoue et al., 2007) ou lors de la différenciation des oligodendrocytes (Tang and Chua, 2008). SIRT3 est majoritairement localisée dans les mitochondries, de même que SIRT4 et SIRT5, tandis que SIRT6 et SIRT7 sont strictement nucléaires (Michishita et al., 2005).

4. Les cibles des HATs et HDACs

4.1. Les histones

Le génome eucaryote est compacté dans le noyau sous la forme de chromatine. Celle-ci agit comme une barrière à la transcription et aux autres processus cellulaires nécessitant l'accès à l'ADN. Les histones sont les constituants protéiques majeurs de la chromatine. Lors de la division cellulaire, les histones sont synthétisées pendant la phase S (Lucchini and Sogo, 1995). Elles sont rapidement acétylées, ce qui permet leur reconnaissance par des protéines chaperones qui vont les placer au niveau de l'ADN afin de former les nucléosomes (Verreault, 2000) (Fig.15). Une fois que ces derniers sont formés, les histones sont déacétylées (Ruiz-Carrillo et al., 1975). Par la suite, elles pourront à nouveau être acétylées afin de moduler leur fonction, notamment afin de contrôler le degré de compaction de la chromatine. En effet, selon les besoins de la cellule, la chromatine peut présenter une structure plus relâchée, où les histones sont plus acétylées, ce qui permet un accès plus aisé des facteurs transcriptionnels à l'ADN (Kuo et al., 1998). La neutralisation de la charge positive d'un résidu lysine par acétylation empêcherait les interactions électrostatiques entre la queue des histones et le groupement phosphate de l'ADN, ce qui conduirait à la structure lâche (Mathis et al., 1978; Vidali et al., 1978). Cependant, la chromatine peut également être plus condensée. Dans ce cas, les histones sont peu acétylées, ce qui limite la transcription des gènes (Shahbazian and Grunstein, 2007) (Fig.15).

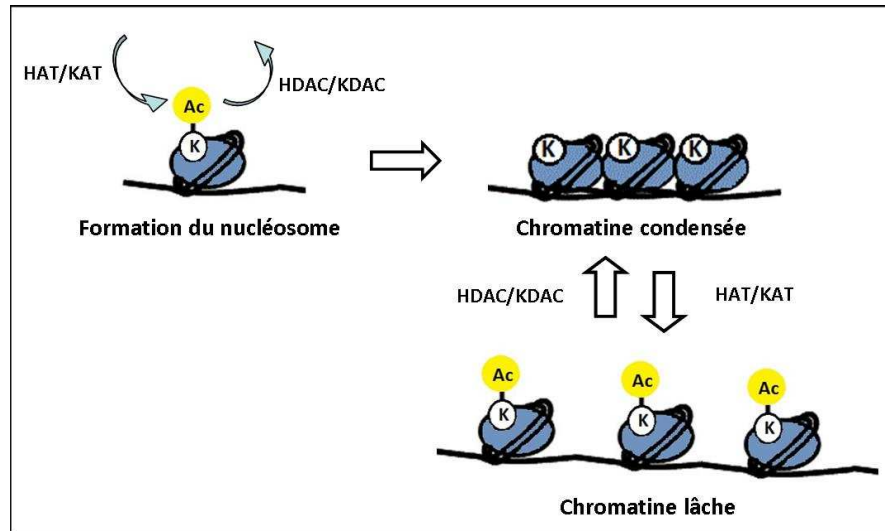


Figure 15. Activité des HAT/KATs et HDAC/KDACs au niveau des histones.

Les histones nouvellement synthétisées sont acétylées par les HAT/KATs et placées au niveau de l'ADN afin de former le nucléosome. Le niveau d'acétylation des lysines des histones régule la compaction de la chromatine. Lorsqu'elle est fortement acétylée, la chromatine est sous forme lâche et permet un accès plus aisé à l'ADN pour la transcription. Quand elle est peu acétylée, la chromatine est condensée et restreint l'accès à l'ADN. (K) représente un résidu lysine ; (Ac) représente le groupement acétyle.

Au niveau de la structure lâche de la chromatine, la transcription des gènes est régulée de deux façons différentes :

- de manière spécifique : les HAT/KATs et les HDAC/KDACs peuvent être recrutés au niveau de séquences régulatrices des gènes par des activateurs ou des répresseurs de la transcription (Brown et al., 2001; Hartman et al., 2005) ;
- de manière globale : ces enzymes fonctionnent de façon indépendante des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels (Vogelauer et al., 2000).

Il y a une régulation très fine de l'activité des HATs et des HDACs. En effet, bien que l'acétylation favorise la transcription et que la déacétylation la réprime, la situation est plus complexe étant donné que les HDACs sont également des régulateurs clés de l'initiation correcte de la transcription (Shahbazian and Grunstein, 2007). En effet, la transcription serait favorisée par un niveau élevé d'acétylation couplé à une déacétylation rapide des histones (Shahbazian and Grunstein, 2007). De plus, les HDACs ne doivent pas empêcher l'élongation transcriptionnelle au niveau des gènes actifs, mais ils doivent tout de même bloquer l'initiation de la transcription de gènes très proches (Spiegel et al., 2012).

4.2. Les protéines non-histoniennes (l'acétylome)

La fonction cellulaire et physiologique de l'acétylation des lysines n'est pas limitée à la régulation de l'expression de gènes. Au niveau du cytoplasme, la première protéine acétylable découverte est la tubuline- α (L'Hernault and Rosenbaum, 1985; Piperno and Fuller, 1985) et de nombreuses autres protéines ont été identifiées par la suite. En effet, l'utilisation de la technologie SILAC (*Stable-Isotope Labeling by Amino acid in Cell culture*) couplée à un spectromètre de masse LTQ Orbitrap a permis l'identification d'un grand nombre de peptides acétylés et a ainsi mis en évidence l'acétylation de plus de 1750 protéines humaines (Choudhary et al., 2009). Cette MPT affecte différents processus physiologiques (Close et al., 2010; Sadoul et al., 2011) (Fig.16).

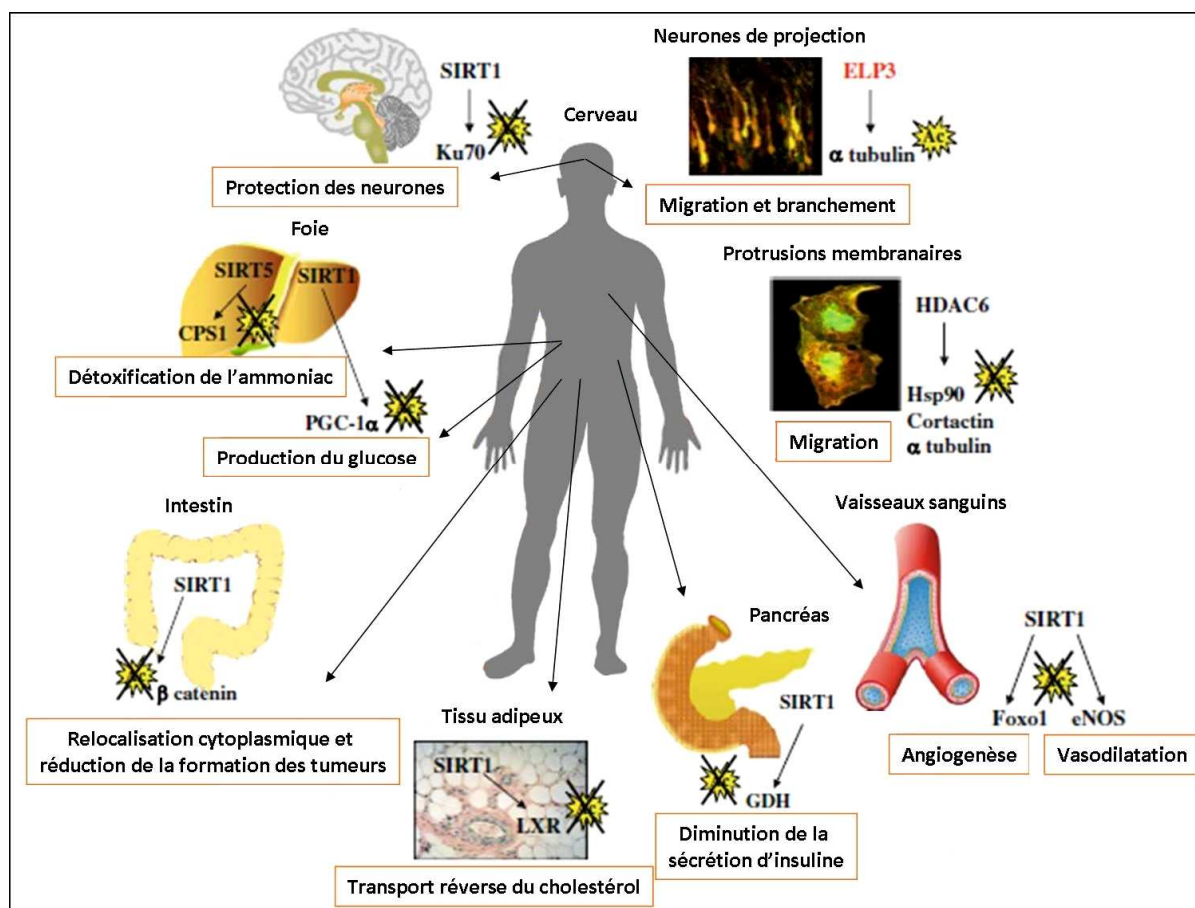


Figure 16. Rôles physiologiques et physiopathologiques de l'acétylation/déacétylation de protéines non-histoniennes.

Les déacétylases (SIRT et HDAC6, en noir), ainsi que l'acétylase (ELP3, en rouge) sont représentées avec leurs substrats respectifs. L'effet biologique de l'acétylation ou de la déacétylation de leurs substrats connus est indiqué. Adapté de (Close et al., 2010).

Les paragraphes suivants illustrent l'importance de l'acétylation dans la régulation du cytosquelette et du transport cellulaire, deux acteurs majeurs de la migration cellulaire.

4.2.1. La régulation du cytosquelette par acétylation

4.2.1.1. Les filaments d'actine

L'acétylation contrôle des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine telles que :

- le complexe de nucléation de l'actine, Arp2/3 (Choudhary et al., 2009) ;
- la cortactine, une protéine qui induit la polymérisation et le branchement des filaments d'actine (Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009) ;
- l'un des inhibiteurs de la dissociation du GDP (RhoGDI) qui inhibe l'activité des membres de la famille Rho (Rac, Rho et CDC42) (Kim et al., 2006).

Toutefois, l'actine peut elle-même être acétylée (Kim et al., 2006). La fonction de cette modification n'est pas encore déterminée.

4.2.1.2. Les microtubules

Le microfilament d'actine n'est pas le seul composant du cytosquelette à être acétylé. Comme décrit au paragraphe 4.2, la tubuline- α est l'un des substrats des acétyltransférases. Elle est acétylée notamment au niveau de la lysine 40 (L'Hernault and Rosenbaum, 1985). Choudhary et al. ont identifié d'autres résidus pouvant être acétylés, et cela, aussi bien dans la tubuline- α que -beta (Choudhary et al., 2009). Les travaux d'Hubbert et al. ont montré que l'acétylation de la tubuline- α influence les capacités migratoires des cellules (Hubbert et al., 2002). Elle intervient également dans le transport cellulaire (Sadoul et al., 2011), comme décrit au paragraphe 4.2.2.

4.2.1.3. Les filaments intermédiaires

Quelques composants de cet élément du cytosquelette sont connus pour être acétylés, comme par exemple la vimentine (Choudhary et al., 2009) et la cytokératine 8 (Leech et al., 2008). Contrairement à ce qui a été suggéré pour l'actine et la tubuline- α , l'acétylation conduirait à la déstabilisation des filaments intermédiaires (Sadoul et al., 2011) et ce phénomène pourrait intervenir dans l'apoptose (Drake et al., 2009).

4.2.2. Le transport cellulaire

Les microtubules sont essentiels pour la rétractation de l'arrière de la cellule et le détachement des complexes d'adhérence lors de la migration cellulaire (Ballestrem et al.,

2000). Par ailleurs, ceux-ci interviennent également dans le transport cellulaire (Nogales, 2000). Les kinésines sont des protéines motrices capables de se déplacer le long des MTs dans le sens antérograde (pôle «-» vers le pôle «+» du MT) afin de transporter des molécules dans la cellule. Les dynéines sont quant à elles impliquées dans le transport rétrograde (Nogales, 2000). L'acétylation de la tubuline- α favorise la liaison et la mobilité de la kinésine-1, ainsi que la livraison de la protéine cargo Jip-1 dans les cellules neuronales différenciées (Reed et al., 2006). La kinésine-1 transporte également plus efficacement le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) le long des MTs acétylés (Dompierre et al., 2007). Chez les patients atteints de la maladie neurodégénérative de Huntington, la protéine huntingtine est modifiée par une extension polyglutamique qui empêche le transport rétrograde et la sécrétion efficace du BDNF, conduisant à une plus grande vulnérabilité des neurones. Toutefois, l'hyperacétylation des microtubules peut restaurer ce déficit (Dompierre et al., 2007). Le transport des vésicules d'exocytose et d'endocytose participerait également à la migration cellulaire. En effet, ces deux mécanismes se déroulent dans les lamellipodes des cellules en migration (Hopkins et al., 1994; Rappoport and Simon, 2003; Schmoranzler et al., 2003). Ils pourraient contribuer à l'extension des bords cellulaires (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998) et/ou fourniraient les récepteurs membranaires impliqués dans le chimiotactisme ou dans l'adhérence des cellules au substrat (Bretscher, 1992; Lawson and Maxfield, 1995). L'acétylation des MTs régule également le trafic des récepteurs en favorisant le transport rapide des endosomes (Deribe et al., 2009). Ces observations indiquent que le transport de protéines cargo individuelles, ainsi que celui de certaines vésicules, est régulé par l'acétylation de la tubuline- α .

5. Les inhibiteurs d'HDACs

Les HDACs sont exprimées de façon ubiquitaire chez les eucaryotes et elles sont essentielles pour la prolifération, la différenciation et l'homéostasie cellulaire (Spiegel et al., 2012). Etant donné que le niveau d'acétylation de la chromatine régule en partie le destin d'une cellule, des drogues qui ciblent spécifiquement cette modification épigénétique ont été développées pour traiter des pathologies neurodégénératives, musculaires ou des cancers (Peserico and Simone, 2011). L'inhibition des HDACs induit un arrêt de la prolifération, la différenciation et l'apoptose de cellules cancéreuses, aussi bien en culture que dans des modèles animaux (Marks et al., 2000; Vigushin and Coombes, 2002). Différentes classes

d'inhibiteurs existent et les variations entre les membres de ces classes sont dûes à leur spécificité ou à leur efficacité (Spiegel et al., 2012). Différents composés ont une activité inhibitrice des HDACs, par exemple :

- les acides hydroxamiques (TSA [*Trichostatin-A*], SAHA [*Suberoylanilide Hydroxamic Acid*], etc.) dont l'action est dirigée contre les HDACs des classes I et IIa/b ;
- des acides gras à courtes chaînes (sodium butyrate, l'acide valproïque) qui ciblent les HDACs des classes I et IIa ;
- les benzamides (SNDX-275 et MGCD0101) dont l'activité est principalement dirigée contre les HDACs de la classe I ;
- les peptides cycliques (romidepsine et apicidine) qui inhibent aussi les HDACs de la classe I ;
- de nouvelles classes ont été identifiées comme les thiolates et les oxadiazoles (Spiegel et al., 2012).

Ces inhibiteurs se sont avérés efficaces dans le traitement de tumeurs aussi bien hématologiques que solides (Grant et al., 2007; Qian et al., 2004; Witta et al., 2006). Leur mode d'action est multiple : ils peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, bloquer la migration cellulaire, l'invasion métastatique, de même que l'angiogenèse (Bolden et al., 2006; Buchwald et al., 2009; Chen et al., 2002; Marks et al., 2000; Mitsiades et al., 2004) (Fig.17).

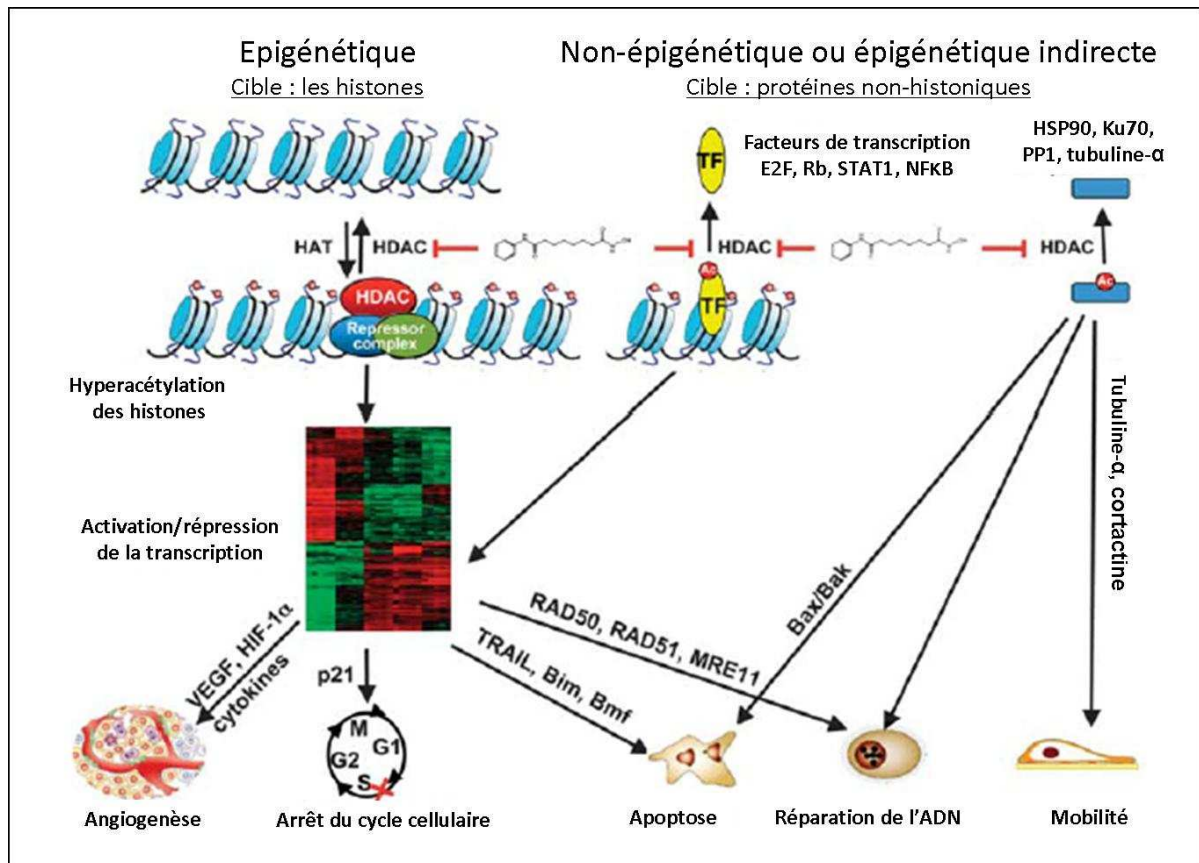


Figure 17. Effets épigénétiques, non épigénétiques ou épigénétiques indirectes des inhibiteurs d'HDACs.

Les inhibiteurs des HDACs bloquent la déacétylation des histones, ce qui conduit à l'activation ou à la répression de la transcription. Ils peuvent également affecter le niveau d'acétylation de facteurs de transcription (E2F, NF-κB, Stats), de même que d'autres protéines importantes pour différents processus biologiques (α -tubuline, Ku70, Hsp90). Figure adaptée de (Spiegel et al., 2012).

Contrairement aux HDACs, les HATs sont très peu considérées comme des cibles thérapeutiques (Spange et al., 2009). Toutefois, différentes molécules ont été développées afin de les inhiber. A titre d'exemple, le MC1626 agit comme inhibiteur de Gcn5 (Smith et al., 2007) tandis que l'isothiazolone réprime PCAF et p300 (Stimson et al., 2005).

L'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation des protéines est dérégulé dans différents types de cancers (Peserico and Simone, 2011). Ces dernières années, de nombreuses molécules ont été développées pour inhiber les HDACs et ainsi favoriser l'acétylation de diverses protéines. Toutefois, les événements moléculaires qui résultent de cette MPT sur la physiologie cellulaire ne sont pas encore clairement définis. De plus, de nombreuses protéines cibles restent à être identifiées, de même que les enzymes responsables de cette modification réversible. Une connaissance accrue des cibles moléculaires permettrait de développer des traitements plus spécifiques.

Partie n°3 :

Le complexe Elongator

L'acétylation est une modification post-traductionnelle intervenant notamment dans la migration cellulaire (Hubbert et al., 2002). Cette MPT peut-être dérégulée dans les cellules cancéreuses (Barneda-Zahonero and Parra, 2012) mais également dans des pathologies neurodégénératives (Mattson, 2003). La dysautonomie familiale est une pathologie neurodégénérative résultant de la perte de fonction du complexe acétyltransférase Elongator (Anderson et al., 2001; Slaugenhaupt et al., 2001). Il a été démontré que ce complexe intervient dans la migration cellulaire (Close et al., 2006), de même que dans la migration et la différenciation neuronale (Creppe et al., 2009).

1. Historique

Elongator a été décrit pour la première fois en 1999 par l'équipe du Dr. Svejstrup. Ils purifièrent trois nouvelles protéines associées à l'ARN polymérase II (ARNPII) en phase d'élongation transcriptionnelle. Ces protéines, Elp1, Elp2 et Elp3, forment le complexe Elongator (Otero et al., 1999). La sous-unité Elp3 possède une activité histone acétyltransférase (HAT) (Wittschieben et al., 1999). Elongator interagit avec l'ARNPII chez la levure (Frohloff et al., 2003; Hawkes et al., 2002; Otero et al., 1999) et chez l'homme (Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002). Cette interaction dépend de l'état hyperphosphorylé du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARNPII (Otero et al., 1999).

Lorsque la forme soluble du complexe a été purifiée, il s'est avéré qu'Elongator est en fait composé de six sous-unités formant l'entité active du complexe : « holo-Elongator » (Krogan and Greenblatt, 2001; Winkler et al., 2001) (Fig.18). Holo-Elongator est un complexe labile pouvant-être dissocié à de hautes concentrations salines (Krogan and Greenblatt, 2001) ou sur une colonne de chromatographie MonoQ (Li et al., 2001; Winkler et al., 2001), en deux sous-complexes. Le premier sous-complexe, nommé « core Elongator », est formé des sous-unités Elp1-Elp2-Elp3. Le second, appelé complexe protéique associé à l'histone acétyltransférase (HAP), est composé des sous-unités Elp4, Elp5 et Elp6 (Krogan and Greenblatt, 2001; Li et al., 2001; Winkler et al., 2001). Le sous-complexe HAP est nécessaire à l'activité enzymatique de la sous-unité Elp3 (Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002; Winkler et al., 2002).

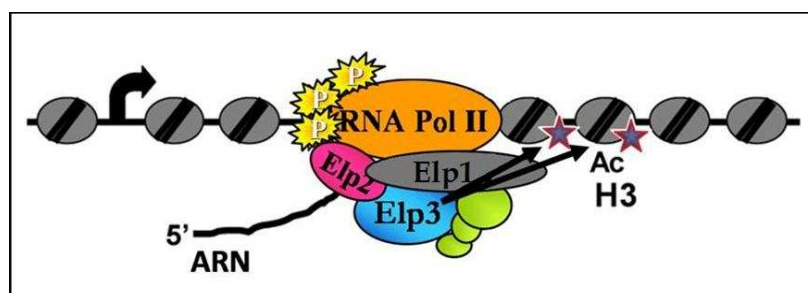


Figure 18. Holo-Elongator associé à l'ARNPII hyperphosphorylée.
Elongator est capable d'acétyler les histones H3, permettant ainsi la progression de la machinerie transcriptionnelle le long de la chromatine. Les sous-unités du sous-complexe HAP sont représentées en vert.

L'association du complexe Elongator en six sous-unités est nécessaire pour que le complexe soit fonctionnel et capable de s'associer à l'ARNPII (Frohloff et al., 2003). Les sous-

unités du complexe HAP permettraient la reconnaissance spécifique du substrat (Glatt et al., 2012; Hawkes et al., 2002; Lin et al., 2012).

2. Caractéristiques des sous-complexes d'Elongator

Il existe des homologues humains aux sous-unités Elp1, Elp2, Elp3 et Elp4 de la levure (Hawkes et al., 2002). Des expériences de complémentation inter-espèces indiquent que ces protéines sont fonctionnellement très conservées (Chen et al., 2009b; Chen et al., 2006; Li et al., 2005). Bien qu'Elongator ait été identifié dans le noyau par son interaction avec l'ARNPII (Otero et al., 1999) les différentes sous-unités sont majoritairement cytoplasmiques (Fichtner et al., 2002b; Hawkes et al., 2002; Johansen et al., 2008; Kim et al., 2002; Pokholok et al., 2002; Rahl et al., 2005).

2.1. Le core-Elongator: Elp1, Elp2 et Elp3

La protéine Elp1 est codée par le gène *ELP1/IKI3/TOT1* chez la levure [*Elongator protein 1* (Otero et al., 1999)/*Insensitive to Killer toxin 3* (Yajima et al., 1997)/*Toxin target 1* (Frohloff et al., 2001)]. Les protéines Elp1 de levure et de l'homme possèdent 27% d'identité et 46% de similarité. L'homologue humain de la protéine Elp1 est nommé IKAP/ELP1 (*IKK-Associated Protein*), suite à son identification en tant que protéine associée au complexe des IκB kinases (Cohen et al., 1998). Cette protéine est codée par le gène *IKBKAP* (Cohen et al., 1998). Le rôle d'IKAP dans l'activation des IKKs a été clairement réfuté depuis par Krappmann et al. (Krappmann et al., 2000). Cette protéine représente la plus large sous-unité du complexe, elle a une masse moléculaire de 150 kDa et possède plusieurs répétitions WD40, connues pour être impliquées notamment dans des interactions protéines-protéines (Frohloff et al., 2003). Elle présente également un domaine NLS au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. Ce domaine est nécessaire pour l'import nucléaire de cette sous-unité et/ou l'import de plusieurs sous-unités en même temps (Fichtner et al., 2002b; Fichtner et al., 2003). La perte de fonction complète de cette sous-unité est létale chez la souris (Chen et al., 2009b). Chez l'homme, une mutation dans le gène codant pour la sous-unité ELP1 est associée à une pathologie neurodégénérative, la dysautonomie familiale (FD) (Anderson et al., 2001; Slaugenhaupt et al., 2001).

Le gène *ELP2/TOT2* code pour une protéine possédant huit répétitions WD40 (Fellows et al., 2000). La protéine ELP2 humaine a une masse moléculaire de 95 kDa (Hawkes et al., 2002). Cette protéine présente 30% d'identité et 43% de similarité avec la protéine de levure (Hawkes et al., 2002). Son homologue murin est StIP1 (*STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3)-interacting protein*). Suite à un traitement à l'IL-6, StIP1 est déplacé dans le noyau (Collum et al., 2000). Dès lors, et à l'image d'autres facteurs de transcription, Elongator pourrait être régulé par sa localisation cellulaire (Kim et al., 2002).

La protéine Elp3 est une des sous-unités catalytiques du complexe. Elle est codée par le gène *ELP3/TOT3*. Le gène humain *ELP3/BAB14193* code pour une protéine dont la masse moléculaire est de 60 kDa (Hawkes et al., 2002). Cette protéine présente 77% d'identité et 82% de similarité avec la protéine de levure (Hawkes et al., 2002). Wittschieben et al. ont démontré que cette sous-unité possède un domaine caractéristique de la famille des GNAT histones acétyltransférases et constitue à ce titre une nouvelle HAT (Wittschieben et al., 1999). Selon la nouvelle nomenclature des lysines acétyltransférases (KATs), Elp3 est également nommée KAT9 (Allis et al., 2007). Une mutation de son site actif inhibe l'activité catalytique d'Elongator, ce qui démontre que l'activité HAT d'Elp3 est essentielle pour la fonction du complexe *in vivo* (Wittschieben et al., 2000). Elp3 est également capable de s'auto-acétyler *in vitro* (Miskiewicz et al., 2011), comme le font la plupart des acétyltransférases (Choudhary et al., 2009). Cette protéine possède également un domaine d'homologie avec les enzymes de la superfamille « Radical-SAM » (*S-adenosylmethionine*), couplé à un cluster fer-soufre (FeS), dans la portion N-terminale (Fig.19) (Chinenov, 2002; Greenwood et al., 2009; Paraskevopoulou et al., 2006). Ces enzymes produisent une espèce radicalaire de haute énergie par la réduction du métabolite SAM, catalysée par le cluster FeS (Atta et al., 2010).

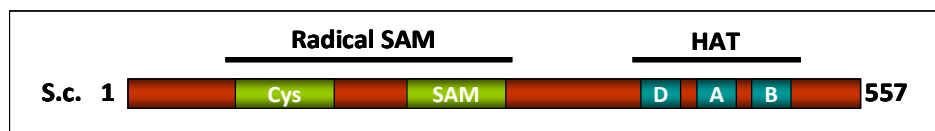


Figure 19. Représentation schématique de la sous-unité Elp3.

Le radical SAM inclut le motif riche en cystéine impliqué dans la formation du cluster FeS et les caractéristiques du site présumé de liaison avec le métabolite SAM (*S-adenosylmethionine*). Le domaine HAT quant à lui comprend les trois séquences de signature HAT : D, A et B. S.c., *Saccaromyces cerevisiae*. Figure adaptée de (Paraskevopoulou et al., 2006).

Le cluster FeS est nécessaire pour l'intégrité structurale du complexe Elongator (Greenwood et al., 2009). Toutefois, des mutations au niveau de ce cluster n'affectent pas son association avec l'ARNPII (Greenwood et al., 2009). Le domaine SAM de la sous-unité Elp3 est essentiel dans le processus de déméthylation du génome paternel qui suit la fertilisation chez la souris. Dans ce cas, le domaine HAT n'est pas requis (Okada et al., 2010). Elp3 a également la capacité d'être associé avec l'ARN messager naissant (pré-ARNm), non épissé, de gènes actifs chez la levure (Gilbert et al., 2004; Metivier et al., 2003; Petrakis et al., 2004).

2.2. Les sous-unités HAP : Elp4, Elp5 et Elp6

Le gène codant pour la sous-unité Elp4 est nommé *ELP4/TOT7*. L'homologue humain de la protéine Elp4 est codé par le gène *PAXNEB* (Miles et al., 1998). Ce gène est localisé dans une région du chromosome 11 (Winkler et al., 2001) qui est impliquée dans le syndrome de WAGR (*Wilm's tumor, Anidria, Genitourinary abnormalities, and mental Retardation*) (Kleinjan et al., 2002). Ce syndrome associe un risque de survenue de tumeur de Wilms (tumeur rénale infantile), une aniridie totale ou partielle, des anomalies génito-urinaires, ainsi qu'un déficit intellectuel de degré variable (www.orpha.net). La perte de fonction de cette sous-unité chez la souris conduit à une létalité précoce (Kleinjan et al., 2001).

Les sous-unités Elp5 et Elp6 sont les moins décrites. Elp5 est codée par le gène *ELP5/IKI1/TOT5* (Krogan and Greenblatt, 2001) et la sous-unité Elp6 par le gène *ELP6/TOT6* (Winkler et al., 2001). Les homologues humains de ces protéines ne sont pas identifiés.

La structure cristallographique du sous-complexe HAP de levure a récemment été résolue (Glatt et al., 2012; Lin et al., 2012). Les trois sous-unités qui forment ce complexe sont présentes en double exemplaire et elles adoptent une conformation de type RecA, structure hétérohexamérique en anneau. La figure 20 représente la structure cristalline du sous-complexe HAP (Glatt et al., 2012).

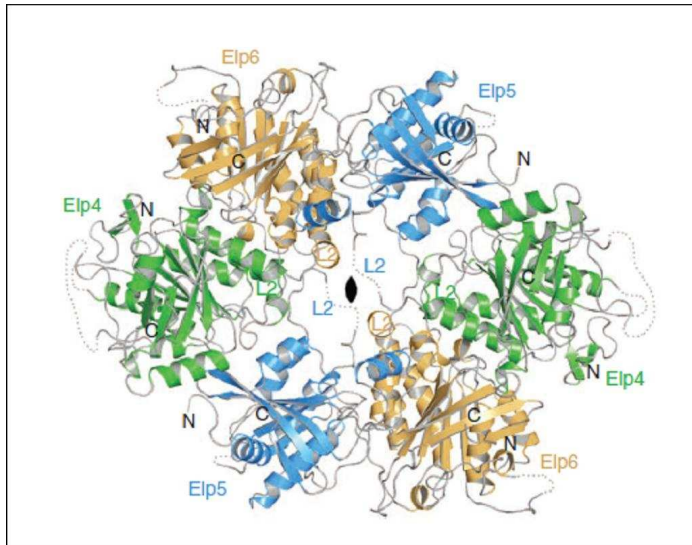


Figure 20. Structure cristalline du sous-complexe HAP d'Elongator.

Les sous-unités Elp4, Elp5 et Elp6 sont présentes en double exemplaire. La sous-unité Elp6 permet l'interaction entre les sous-unités Elp5 et Elp4. Les lignes pointillées représentent des régions peu organisées. Sur la figure, la dyade centrale, nommée boucle L2 par analogie avec RecA, et les portions N- et C-terminales respectives sont indiquées (Glatt et al., 2012).

Contrairement aux autres protéines ayant une conformation de ce type, les sous-unités Elp4, Elp5 et Elp6 ont perdu le motif Walker A (boucle-P) qui est la signature clé des ATPases de type RecA (Glatt et al., 2012; Lin et al., 2012; Ponting, 2002). Glatt et al. ont montré qu'HAP interagit de façon spécifique avec les ARNs de transfert (ARNt). De plus, la dissociation de l'ARNt et du sous-complexe HAP est un processus qui nécessite de l'ATP, ce qui implique que ce sous-complexe d'Elongator possède une activité d'ATPase (Glatt et al., 2012). Enfin, Lin et al. ont démontré une interaction entre HAP et les histones H3 (Lin et al., 2012).

3. Les fonctions d'Elongator

Le premier rôle d'Elongator mis à jour est son implication dans l'élongation transcriptionnelle (Kim et al., 2002; Otero et al., 1999; Wittschieben et al., 1999). Des expériences d'immuno-localisation révèlent que ce complexe est néanmoins majoritairement cytoplasmique, indiquant qu'il pourrait avoir d'autres fonctions dans ce compartiment cellulaire (Fichtner et al., 2003; Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002; Pokholok et al., 2002; Rahl et al., 2005). Il a ainsi été démontré qu'Elongator est un facteur clé pour la modification de certains ARNs de transfert (ARNt) dans le cytoplasme (Esberg et al., 2006; Huang et al., 2005). En outre, des modèles de perte de fonction de ce complexe dans différents organismes révèlent qu'il serait impliqué dans divers processus cellulaires. En effet, Elongator intervient notamment dans l'exocytose (Rahl et al., 2005) et dans la résistance aux dommages à l'ADN chez la levure (Chen et al., 2011; Li et al., 2009). Chez les eucaryotes supérieurs, ce complexe

affecte particulièrement la migration (Boone et al., 2010; Close et al., 2006; Johansen et al., 2008; Lee et al., 2009) et la différenciation des neurones corticaux (Creppe et al., 2009), ainsi que la cascade de signalisation InR-TOR (Bolukbasi et al., 2012). Les fonctions moléculaires d'Elongator dans l'élongation transcriptionnelle et dans la modification des ARNt, de même que son implication dans la migration cellulaire vont être décrites dans la suite du manuscrit.

3.1. L'élongation transcriptionnelle

La sous-unité Elp3 du complexe Elongator possède une activité acétyltransférase dirigée contre les histones H3 et dans une moindre mesure, contre les histones H4 *in vitro* (Kim et al., 2002; Winkler et al., 2002; Wittschieben et al., 1999). La perte de fonction d'Elp3 chez la levure conduit à la diminution du niveau d'acétylation des histones H3 dans la chromatine *in vivo* (Kristjuhan et al., 2002; Winkler et al., 2002). L'activité HAT d'Elongator contre les histones H3 est conservée chez la plante (Nelissen et al., 2010), mais également chez l'homme (Chen et al., 2009b; Close et al., 2006). Ce complexe est recruté au niveau des gènes seulement après l'hyperphosphorylation de la partie CTD de l'ARNPII (Metivier et al., 2003), une modification caractéristique de la phase d'élongation du transcrit (Shilatifard et al., 2003). Elongator est principalement associé avec la région à transcrire des gènes (Close et al., 2006; Gilbert et al., 2004; Han et al., 2007; Kouskouti and Talianidis, 2005; Kristjuhan et al., 2002). Toutefois, seuls l'expression de certains gènes, par exemple la gelsoline et la becline, est affectée par la perte de fonction du complexe Elongator humain bien qu'il soit recruté au niveau d'autres régions à transcrire telles que celles de la tubuline- α (Close et al., 2006). Bien que les gènes cibles d'Elongator varient en fonction de l'espèce étudiée, des gènes impliqués dans la réponse au stress semblent être régulés dans toutes les espèces étudiées : chez la levure (Krogan and Greenblatt, 2001; Otero et al., 1999), chez la plante (Chen et al., 2006; Nelissen et al., 2005), chez la drosophile (Walker et al., 2011) et chez l'homme (Han et al., 2007). L'ensemble de ces données confirme qu'Elongator assiste l'ARNPII durant l'élongation transcriptionnelle, et que ce rôle a été conservé durant l'évolution des espèces (Fig.21).

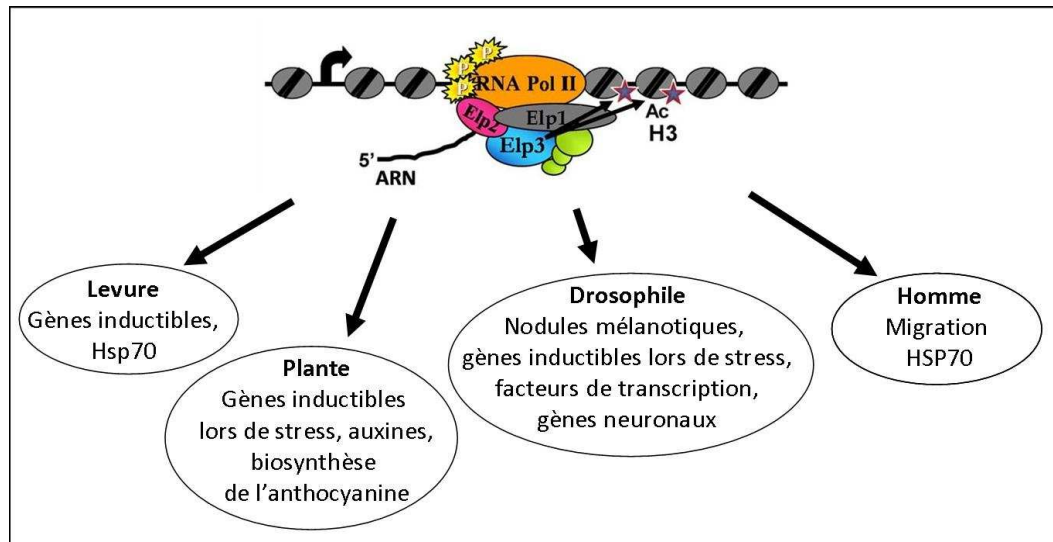


Figure 21. Aperçu de différents gènes cibles d'Elongator en fonction de l'espèce étudiée.

A l'heure actuelle, le rôle direct d'Elongator dans l'élongation transcriptionnelle est remis en question, notamment suite à la publication de résultats démontrant que chez la levure, tous les phénotypes observés dans les mutants d'Elongator peuvent être abolis suite à la surexpression de deux ARNs de transfert spécifiques (ARNt^{Lys} et ARNt^{Gln}) (Esberg et al., 2006).

3.2. La modification des ARNs de transfert

Huang et al. ont démontré qu'Elongator est nécessaire, chez la levure, pour la maturation d'ARNt. Il intervient dans une étape de maturation précoce commune aux modifications 5-méthoxycarbonylméthyl (mcm^5) et 5-carbamoylméthyl (ncm^5) des nucléosides uridines (U) localisés en position 34 ou « wobble position » d'ARNt spécifiques (Huang et al., 2005) (Fig.22). Dans les souches de levure ayant perdu la fonction du complexe Elongator, ces modifications sont abolies (Huang et al., 2005).

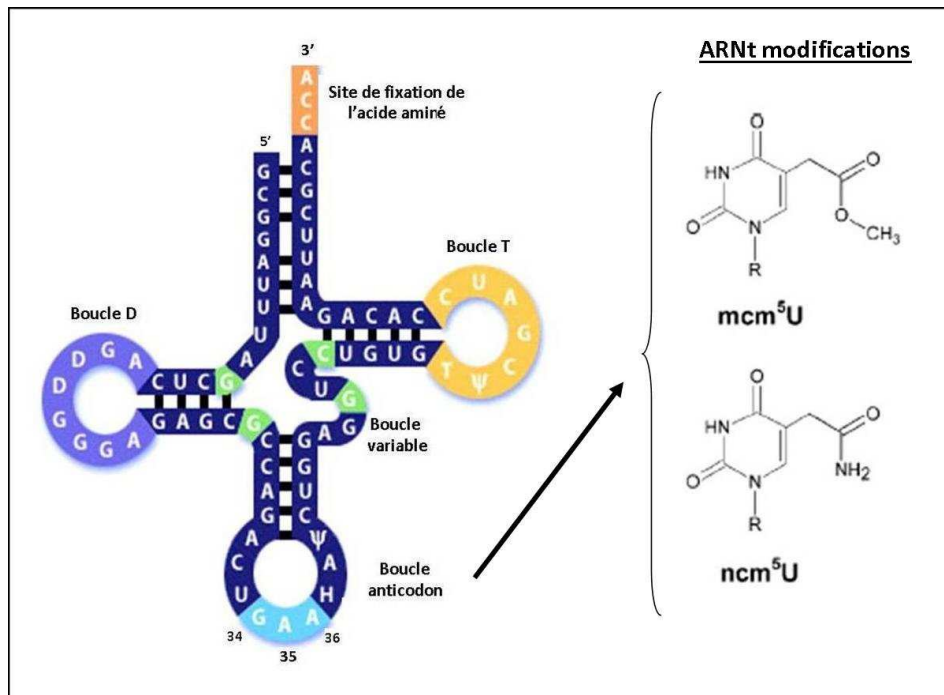


Figure 22. Structure en feuille de trèfle des ARNt.

La position des nucléosides de l'anticodon de l'ARNt est indiquée. Les modifications mcm⁵U et ncm⁵U qui requièrent le complexe Elongator sont représentées à droite.

L'invalidation du domaine acétyltransférase de la sous-unité Elp3 empêche la formation des modifications mcm⁵ et ncm⁵, ce qui indique que cette protéine est nécessaire pour ces modifications (Huang et al., 2005). De la même façon, la perte de fonction des autres sous-unités bloque la formation de ces modifications, ce qui démontre que toutes les sous-unités du complexe sont indispensables pour cette fonction (Huang et al., 2005). L'absence de ces modifications concerne 11 ARNt parmi les 42 ARNt de la levure et affecte en conséquence l'efficacité et la fidélité de la traduction (Huang et al., 2005). Des études menées chez le nématode (Chen et al., 2009a) et chez la plante (Mehlgarten et al., 2010) montrent qu'Elongator intervient également dans la modification des ARNt de ces organismes. Ces données indiquent que cette fonction est conservée chez les eucaryotes. De plus, les sous-unités Elp4, Elp5 et Elp6 de levure interagissent directement avec les ARNt et la fonction ATPase de ce sous-complexe est nécessaire pour la libération de l'ARNt modifié (Glatt et al., 2012). Chez la levure, le rôle d'Elongator dans la traduction serait un rôle majeur (Chen et al., 2011). En effet, la perte de fonction de ce complexe conduit à un défaut dans la modification de deux ARNs de transfert : ARNt^{Lys}_{s2UUU} et ARNt^{Gln}_{s2UUG}, ce qui diminue l'efficacité et la fidélité de la traduction (Esberg et al., 2006). L'équipe de Byström a démontré que la surexpression de ces ARNt, qui ne contiennent pas les modifications mcm⁵ et ncm⁵, compense tous les phénotypes observés dans les souches de levure mutées pour Elongator, ceux-ci

incluent le défaut d'élongation transcriptionnelle et l'exocytose (Esberg et al., 2006). De plus, l'absence de ces modifications entraîne un défaut de réponses aux dommages à l'ADN ainsi que la dérégulation des gènes silencieux par les télomères (Chen et al., 2011). Toutefois, à l'heure actuelle, aucune publication ne peut confirmer ou infirmer l'importance d'Elongator dans la modification des ARNt chez les mammifères.

3.3. La migration cellulaire

Notre laboratoire a démontré qu'Elongator joue un rôle dans la migration cellulaire de cellules humaines (Close et al., 2006). L'utilisation de la technique d'ARN interférant (ARNi) a permis de diminuer l'expression de la sous-unité ELP1 et donc d'invalider Elongator dans des cellules HeLa. Grâce à l'étude du profil d'expression génique par puce à ADN dans ces cellules, il a été montré que l'expression de gènes impliqués notamment dans la migration cellulaire était diminuée. Parmi ceux-ci, nous retrouvons la gelsoline et la paxilline. La gelsoline est une protéine capable de s'associer aux filaments d'actine et de les découper. Elle peut aussi inhiber la polymérisation de MFs en « coiffant » les extrémités barbées et donc par l'inhibition de l'ajout de monomères d'actine-G (Nyakern-Meazza et al., 2002; Pontrello and Ethell, 2009). Quant à la paxilline, elle est associée aux adhérences focales. Son principal rôle est d'intégrer et de transmettre les signaux venant de récepteurs membranaires tels que les intégrines, afin de moduler la mobilité cellulaire (Brown and Turner, 2004). Un retard de migration dans les cellules invalidées pour le complexe Elongator a été démontré en réalisant une brèche dans une monocouche de cellules (*wound healing assay*), par l'utilisation de chambre de Boyden, de même que par des expériences de contraction de gel (Close et al., 2006).

Johansen et al. ont montré un défaut de localisation de la filamine A au niveau des extensions membranaires de cellules neuronales déficientes pour le complexe Elongator (Johansen et al., 2008). La filamine A intervient dans la migration cellulaire par la réorganisation des filaments d'actine aux extrémités cellulaires et par la génération d'une force de traction nécessaire pour la mobilité. Ce défaut de localisation conduit à une désorganisation du cytosquelette d'actine et par conséquent, à un défaut migratoire (Naumanen et al., 2008). Elp1 co-localise mais interagit de façon indirecte avec la filamine A (Johansen et al., 2008). Barton et al. ont démontré par immunofluorescence que la sous-unité

Elp3 co-localise avec l'actine-F au niveau des extensions membranaires et des fibres de stress (Barton et al., 2009). Ces données indiquent que l'une des cibles d'Elongator pourrait intervenir dans la régulation du cytosquelette d'actine, ce qui expliquerait sa capacité à promouvoir la migration cellulaire.

Creppe et al. ont montré que la perte de fonction d'Elongator conduit à une diminution du niveau d'acétylation de la tubuline- α (Creppe et al., 2009). L'acétylation de cette protéine est une modification post-traductionnelle connue pour augmenter la liaison de protéines motrices (Reed et al., 2006). Ces dernières régulent le transport moléculaire bidirectionnel au niveau des neurones (Gardiner et al., 2007; Reed et al., 2006). De plus, Elongator intervient dans la migration des neurones de projection du cortex cérébral en acétylant la tubuline- α (Creppe et al., 2009). Ces données suggèrent que ce complexe régule la migration cellulaire via le contrôle de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la mobilité, mais également via l'acétylation de la tubuline- α cytoplasmique. En outre, Elongator régule la différenciation des neurones de projection par l'acétylation de la tubuline- α (Creppe et al., 2009). Une étude menée chez le nématode est venue renforcer le fait qu'Elongator est nécessaire pour l'acétylation de la tubuline- α et qu'il intervient également dans des processus neurologiques chez cette espèce (Solinger et al., 2010). Elongator intervient également dans la formation des boutons synaptiques chez la drosophile (Singh et al., 2010) où il favorise notamment l'acétylation des protéines Bruchpilot (Miskiewicz et al., 2011).

Le rôle du complexe Elongator a été conservé au cours de l'évolution au niveau de l'élongation transcriptionnelle de même que dans la modification des ARNt. En fonction de l'organisme étudié, les rôles d'Elongator peuvent varier et être spécifiques au règne. Ainsi, il intervient dans la résistance à la zymocine chez la levure (Fichtner et al., 2002a), la biologie des auxines chez la plante (Nelissen et al., 2010) et le développement neuronal chez les animaux (Creppe et al., 2009).

4. Pathologies neuronales associées à Elongator

4.1. La dysautonomie familiale

La dysautonomie familiale (FD) ou Riley-Day Syndrome est une pathologie autosomale récessive, classée parmi les neuropathies sensorielles et autonomes les plus fréquentes (Slaugenhaupt and Gusella, 2002). Elle affecte le développement et la survie de neurones sensoriels, sympathiques et quelques neurones parasympathiques. Elle touche essentiellement la population juive Ashkénaze, avec une incidence annuelle de 1 sur 3600 naissances (Anderson et al., 2001). Les principaux critères de diagnostic sont les suivants :

- absence de larme ;
- absence de papilles fongiformes sur la langue ;
- diminution des réflexes rotuliens ;
- réponse anormale au test histaminique ;
- descendance Juive Ashkenaze (Slaugenhaupt et al., 2001).

Les patients présentent une grande variété de symptômes incluant des dysfonctionnements intestinaux, des crises de vomissement, des pneumonies récurrentes, une scoliose, une perception altérée de la douleur et de la température, ainsi qu'une instabilité cardio-vasculaire. Cette pathologie est inévitablement fatale et seulement 50% des patients atteignent l'âge de 40 ans (Axelrod, 2004).

Caractéristiques génétiques

La FD est provoquée par la mutation du gène *IKBKAP* localisé sur le chromosome 9, codant pour la sous-unité ELP1/IKAP d'Elongator (Anderson et al., 2001). Trois mutations distinctes ont été associées avec cette pathologie. La mutation majeure est provoquée par une mutation non codante, une transition T→C au niveau de la sixième base de l'intron 20. C'est un site « donneur » lors de l'épissage, la mutation de celui-ci provoque une diminution de l'efficacité de l'épissage de ce transcrit, conduisant à un saut de l'exon 20. Ce site est conservé chez la souris (Coli et al., 2001; Cuajungco et al., 2001). Le défaut d'épissage provoque une modification du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon STOP précoce qui génère une protéine tronquée, instable, nommée IKAP-FD (Anderson et al., 2001; Slaugenhaupt et al., 2001; Slaugenhaupt et al., 2004) (Fig.23).

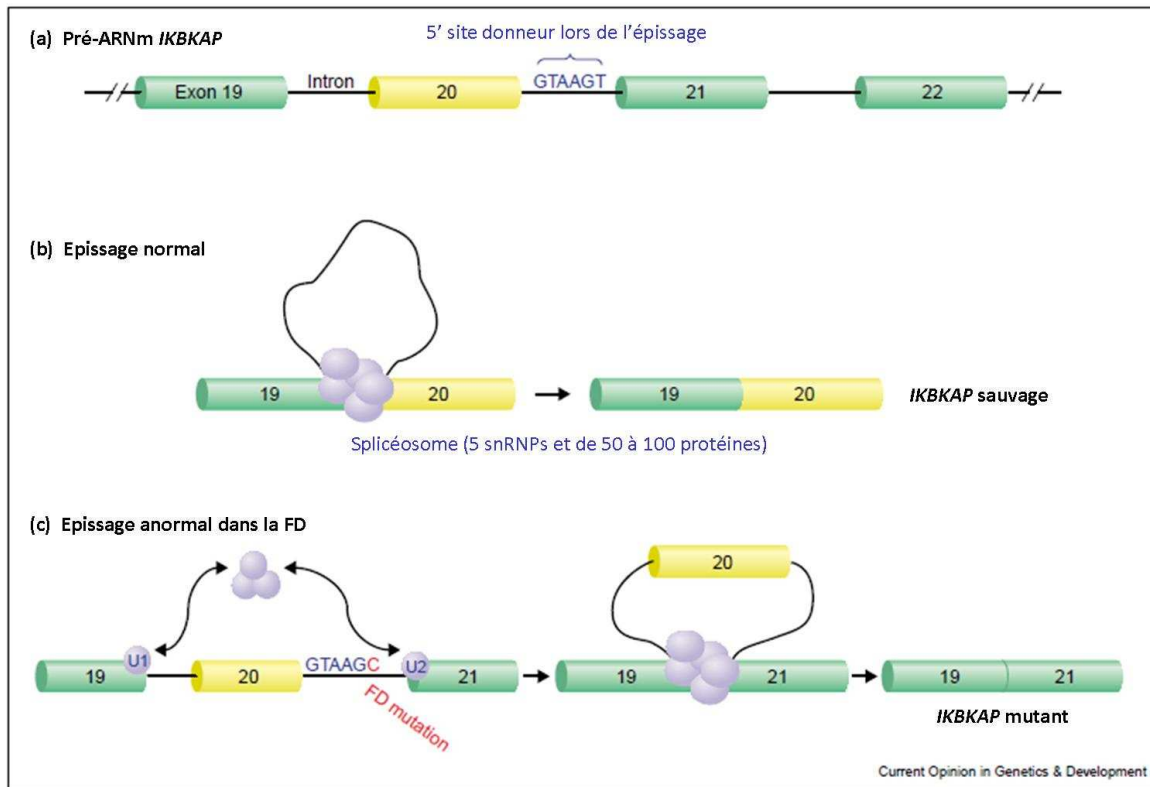


Figure 23. Représentation schématique du défaut d'épissage suite à la mutation du gène *IKBKAP*.

a) Le site d'épissage normal du pré-ARNm est la séquence GTAAGT. b) La forme sauvage du pré-ARNm est épissée normalement, seul l'intron 19 est éliminé. c) Suite à la mutation majeure du gène *IKBKAP* au niveau de la base 6 de l'intron 20 (en rouge), le site d'épissage est muté en GTAAGC, il en résulte un défaut d'épissage conduisant à l'élimination des introns 19 et 20, mais également de l'exon 20. Figure adaptée de (Slaughaupt and Gusella, 2002).

Dans les tissus des patients touchés par cette maladie, l'ARNm du gène *IKBKAP* est exprimé sous les deux formes : muté et normal, mais la proportion varie en fonction du type tissulaire. Parmi les différents tissus examinés, les systèmes nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) expriment le plus faible niveau d'ARNm *IKBKAP* normal et ces tissus sont les plus affectés par la maladie (Cuajungco et al., 2001; Slaughaupt et al., 2001). Les cellules les plus touchées par la FD dérivent de cellules de la crête neurale, une population cellulaire capable de migrer chez l'embryon jusque différents sites bien définis (Hunnicut et al., 2012) où elles formeront notamment les os du crâne, les mélanocytes et les neurones périphériques (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

Deux autres mutations, mineures, sont également associées à la FD :

- une transversion G→C au niveau de l'exon 19 résultant en une substitution arginine en proline (R696P) et ainsi à la destruction d'un site consensus de phosphorylation serine/thréonine kinase (RIVT→pIVT). Cette mutation n'a été observée que chez 4 patients FD (Slaughaupt et al., 2001).

- la dernière mutation est une transition C→T au niveau de l'exon 26, résultant en une mutation faux-sens proline en leucine (P914L). Cette mutation a été identifiée chez un patient n'ayant pas une descendance pure juive Ashkénaze et elle détruit également un site de phosphorylation (Leyne et al., 2003).

Toutes les personnes atteintes de la FD possèdent au moins une copie de la mutation majeure. 99,8 % des patients sont homozygotes pour cette mutation. Seulement 5 individus malades sont hétérozygotes pour cette mutation majeure mais ils présentent en plus l'une des deux mutations mineures (Hims et al., 2007).

4.2. La sclérose latérale amyotrophique

Des variations au niveau du gène codant pour la sous-unité Elp3 ont récemment impliqué Elongator dans une autre pathologie neurodégénérative, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Simpson et al., 2009). La SLA est la plus fréquente maladie des neurones moteurs chez l'homme. Elle entraîne généralement la mort dans les trois à cinq ans suite à l'affaiblissement puis à la paralysie des muscles respiratoires. Les fonctions intellectuelles et sensorielles ne sont pas touchées. Cette pathologie se déclare généralement entre 50 et 70 ans et touche une population très active (les grands sportifs sont les plus fréquemment touchés) (www.orpha.net).

Des variations dans le gène *ELP3* ont été révélées et celles-ci provoquent une diminution de l'expression de la protéine ELP3 (Simpson et al., 2009). Les variants d'ELP3 sont impliqués dans cette pathologie suite à un défaut probable d'acétylation des histones du gène codant pour la HSP70 (*Heat Shock Protein 70*), une protéine chaperone régulée directement par ELP3 (Han et al., 2007). Etant donné que l'expression de protéines chaperones augmente rapidement en réponse à un stress (Han et al., 2008), la protéine ELP3 native aurait donc un rôle protecteur pour les neurones. Chez l'homme, l'expression élevée d'ELP3 protégerait les neurones moteurs de la dégénérescence par une augmentation de la transcription d'HSP70 (Simpson et al., 2009).

Elongator est un complexe protéique de six sous-unités, dont la structure exacte reste encore à déterminer, en particulier chez l'homme. Il possède de nombreux rôles biologiques et une perte de fonction de ce complexe est associée à différentes pathologies. L'étude

biochimique, structurale et biologique de ce complexe devrait notamment permettre de comprendre le rôle des différentes sous-unités au sein du complexe.

Objectifs du travail

Le complexe Elongator est composé de six sous-unités, nommées Elp1 à Elp6 (Krogan and Greenblatt, 2001; Winkler et al., 2001). Il a été initialement décrit comme un régulateur de l'élongation transcriptionnelle de certains gènes. Cette fonction se base notamment sur l'interaction entre Elongator et l'ARNPII hyperphosphorylée (Otero et al., 1999), de même que par la capacité de la sous-unité Elp3 à acétyler les histones. (Wittschieben et al., 1999). Néanmoins, les sous-unités formant ce complexe sont majoritairement cytoplasmiques. Différentes études ont démontré qu'Elongator intervient également dans la modification des ARN de transfert (Huang et al., 2005), dans l'exocytose (Rahl et al., 2005), mais encore dans l'acétylation de la tubuline- α (Creppe et al., 2009) dans ce compartiment cellulaire.

Notre laboratoire a précédemment montré le rôle d'Elongator dans l'élongation transcriptionnelle de gènes requis pour la migration cellulaire (Close et al., 2006), sans toutefois exclure la possibilité qu'Elongator puisse réguler la migration par d'autres mécanismes. La dérégulation de la migration est notamment impliquée dans le processus métastatique de cellules cancéreuses.

La perte de fonction du complexe Elongator est exemplifiée par une pathologie neurodégénérative nommée la dysautonomie familiale (Anderson et al., 2001; Slaugenhaupt et al., 2001). Les patients affectés par cette maladie présentent un défaut au niveau du développement et de la survie des neurones autonomes et sensoriels (Anderson et al., 2001). Notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Dr. L. Nguyen, a mis en évidence l'implication d'Elongator dans la migration et la différenciation des neurones de projection dans le cortex cérébral. Les imperfections dans ces processus peuvent notamment s'expliquer par un défaut d'acétylation de la tubuline- α (Creppe et al., 2009).

Dans ce travail, nous avons premièrement étudié le complexe Elongator humain au niveau biochimique, afin d'identifier pour la première fois les sous-unités ELP5 et ELP6. Ensuite, nous avons investigué le rôle de ces protéines au sein du complexe. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'implication du complexe Elongator dans la migration et le pouvoir invasif de cellules cancéreuses dérivées de mélanomes malins.

Résultats

1. Introduction

Le complexe Elongator humain a précédemment été purifié à partir d'extraits de cellules HeLa, ce qui a permis l'identification des sous-unités ELP1, ELP2 et ELP3, décrites comme faisant partie du complexe « core » (Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002). Or, chez la levure, Elongator existe également sous forme d'un large complexe contenant six sous-unités (Krogan and Greenblatt, 2001; Li et al., 2001; Winkler et al., 2001). Dans cette configuration, il est également nommé « holo-Elongator ». Les trois sous-unités additionnelles forment le sous-complexe « HAP » et sont nommées : Elp4, p38 (Elp5) et p30 (Elp6) (Hawkes et al., 2002). Les peptides humains p38 et p30 ne sont pas caractérisés à ce jour. Ces protéines sont susceptibles d'être codées chez l'homme par des gènes homologues d'*Elp5* et d'*Elp6* de levure. Notre travail porte sur l'identification de ces sous-unités humaines et leur caractérisation. Ces données permettront de mieux comprendre la structure du complexe Elongator et ses rôles biologiques. Ces résultats font l'objet d'une publication qui est jointe en annexe 1 :

DERP6 (ELP5) and C3ORF75 (ELP6) Regulate Tumorigenicity and Migration of Melanoma Cells as Subunits of Elongator.

Pierre Close, Magali Gillard, Aurélie Ladang, Zheshen Jiang, Jessica Papuga, Nicola Hawkes, Laurent Nguyen, Jean-Paul Chapelle, Fabrice Bouillenne, Jasper Svejstrup, Marianne Fillet and Alain Chariot. The Journal of Biological Chemistry, 287 (39), 32535-32545, September 21, 2012.

Les approches expérimentales utilisées dans ce travail sont décrites dans la partie « Experimental procedures » de cet article et ne sont dès lors pas présentées ici.

2. Résultats

2.1. Identification des sous-unités ELP5 et ELP6 humaines

Afin d'identifier les sous-unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator humain, nous avons purifié ce complexe à partir de cellules HEK293 grâce à l'une des sous-unités structurale, ELP4. A cette fin, nous avons généré un vecteur qui permet l'expression de la protéine ELP4 humaine couplée à un épitope FLAG. Les cellules humaines HEK293 ont été transfectées avec ce vecteur, afin de produire de façon stable la protéine ELP4 humaine couplée à l'épitope

FLAG. La lignée cellulaire qui en dérive a été nommée ELP4-FLAG. Nous avons utilisé cette lignée comme outil pour purifier le complexe Elongator humain. En parallèle, nous avons produit une lignée contrôle où les cellules HEK293 expriment un vecteur possédant uniquement la séquence FLAG (Fig.24). Par Western blot (WB), nous contrôlons l'expression de la protéine ELP4-FLAG (Fig.24).

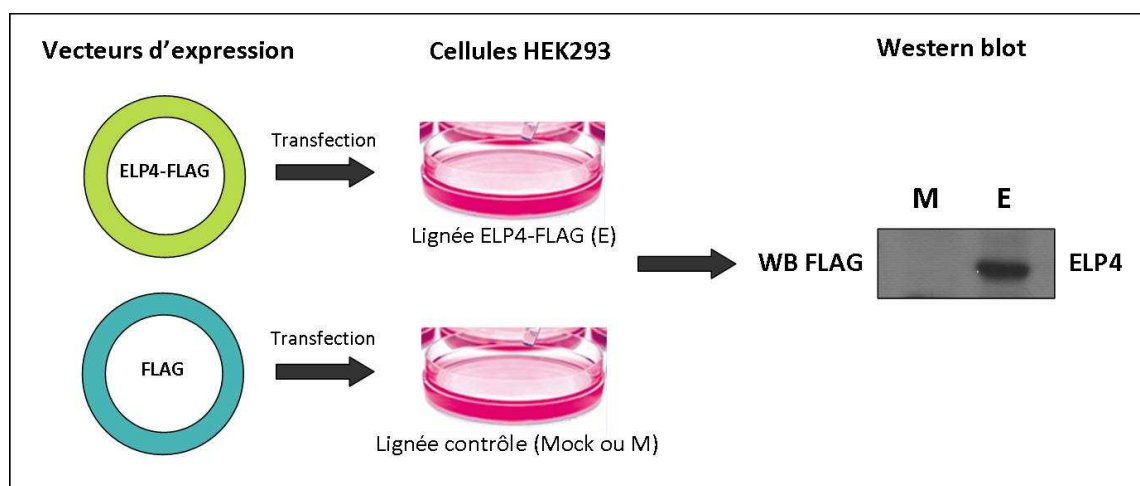


Figure 24. Expression de la protéine ELP4-FLAG.

Les cellules HEK293 sont transfectées avec les vecteurs d'expression ELP4-FLAG ou FLAG (contrôle), afin de générer une lignée cellulaire exprimant la protéine ELP4 humaine couplée à l'épitope FLAG ou une lignée cellulaire contrôle (Mock) n'exprimant pas cette protéine. Le niveau d'expression de la protéine ELP4-FLAG est contrôlé par Western blot (WB) grâce à un anticorps anti-FLAG. M=Mock et E= ELP4-FLAG.

Afin d'immunoprécipiter la protéine ELP4-FLAG, nous avons utilisé un anticorps anti-FLAG couplé à une résine. Les lysats provenant des deux lignées cellulaires ont été incubés avec cet anticorps. Ensuite, la résine a été lavée intensivement afin de ne garder que les protéines qui sont fixées de façon spécifique aux anticorps. Enfin, par compétition avec un peptide FLAG, les protéines associées à l'anticorps ont été détachées et solubilisées. Elles ont ensuite été analysées par SDS-PAGE, un gel dénaturant permettant de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Les protéines d'intérêt, présentes uniquement dans l'extrait ELP4-FLAG, ont été extraites du gel et analysées par spectrométrie de masse (Fig.25).

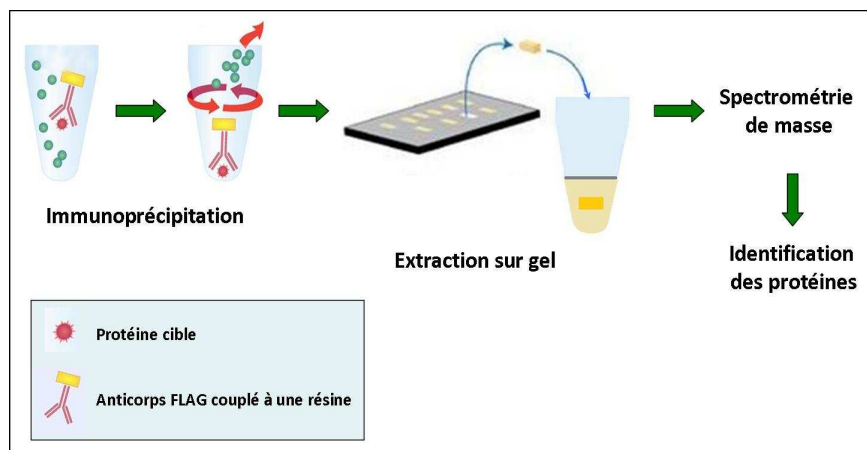


Figure 25. Etapes conduisant à l'identification des protéines p38 et p30.

Les lysats sont incubés avec un anticorps anti-FLAG couplé à une résine. La résine est ensuite lavée et les protéines éluées. Les éluats sont déposés sur un gel dénaturant. Les protéines d'intérêts sont extraites du gel, analysées et identifiées par spectrométrie de masse.

Comme attendu, les sous-unités ELP1, ELP2, ELP3 et ELP4 ont été identifiées ainsi que deux produits de 38 et 30 kDa, nommés respectivement DERP6 et C3ORF75. La masse de ces deux protéines correspond à celle des sous-unités humaines d'Elongator non caractérisées (Fig.26, piste 2).

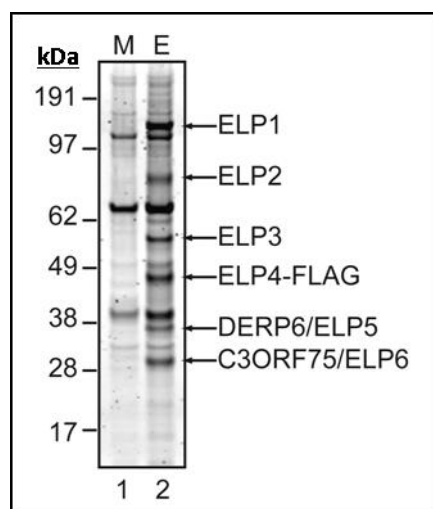


Figure 26. Purification du complexe Elongator humain.

Elongator est purifié à partir du lysat de cellules HEK293 exprimant ELP4-FLAG. Une quantité égale d'éluat de purification FLAG venant de cellules exprimant ELP4-FLAG (E) ou non (Mock : M) est séparée par un gel SDS-PAGE 4-12% et coloré avec le SYPRO-Ruby. Les bandes d'intérêt sont extraites et analysées par spectrométrie de masse. Les sous-unités du complexe Elongator qui ont co-élué sont indiquées par des flèches.

Les séquences protéiques de DERP6 et C3ORF75 ont été alignées avec les sous-unités Elp5 et Elp6 de levure, ainsi que leurs homologues dans différentes espèces, ce qui a permis de confirmer que ces deux protéines correspondent aux sous-unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator humain (Fig.27, A et B). Yuan et al. ont préalablement cloné l'ADN complémentaire (ADNc) qui correspond à la protéine DERP6 à partir d'une librairie d'ADNc de testicule humain. Ils ont suggéré que cette protéine régulerait positivement l'activité transcriptionnelle de p53. Toutefois, le mécanisme sous-jacent reste à définir (Yuan et al., 2006). Quant à la protéine C3ORF75, elle n'a jamais été décrite auparavant.

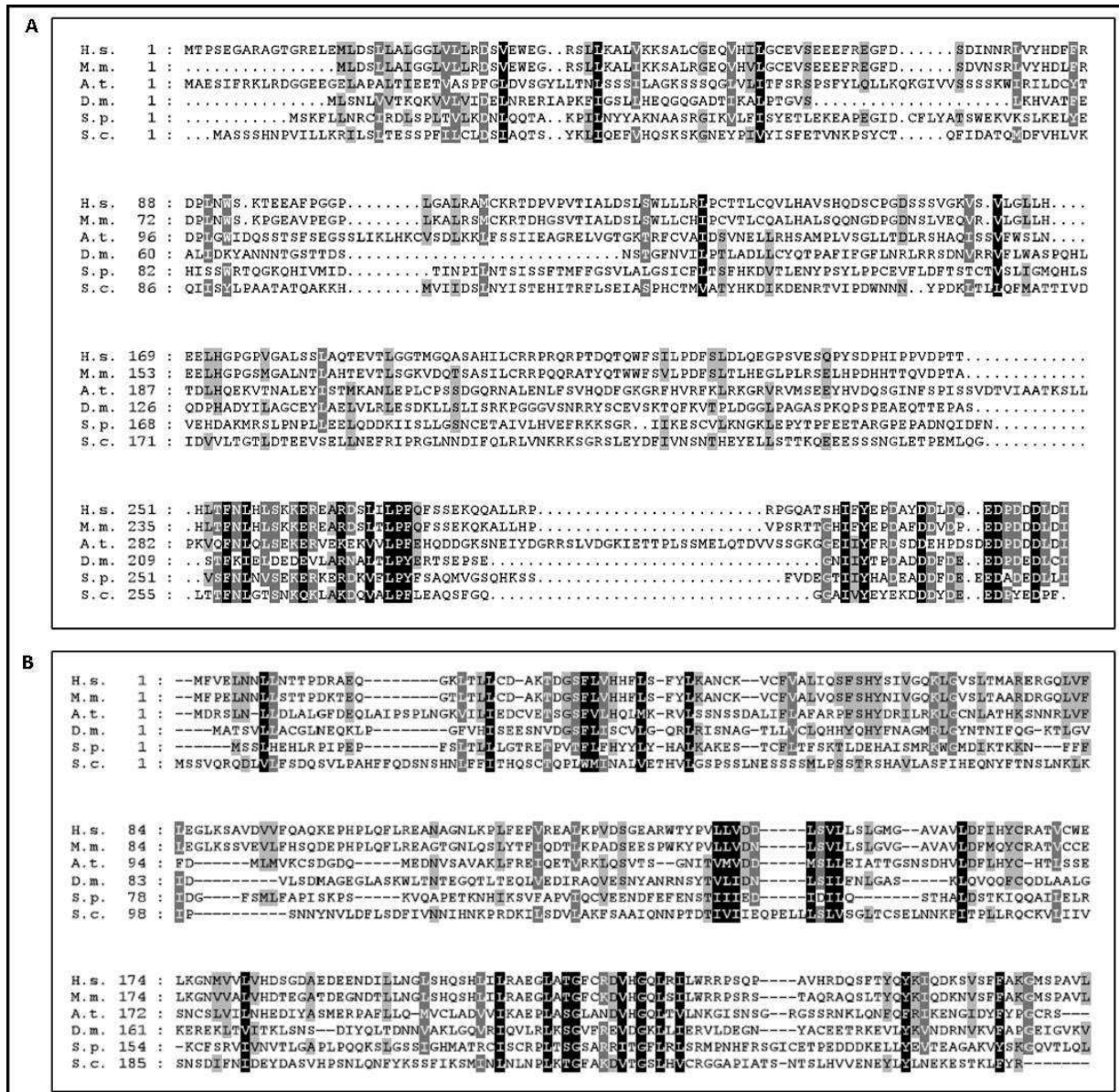


Figure 27. Alignement de séquences des protéines humaines DERP6 et C3ORF75 avec leurs homologues de différentes espèces.

A) Alignement de séquences entre DERP6 et ses homologues. DERP6 présente 15% d'identité et 29% de similarité avec la protéine Elp5 de levure. L'homologie entre ces différentes séquences varie de 8% d'identité et 25% de similarité (*A. thaliana* et *S. cerevisiae*) à 71% d'identité et 80% de similarité (*H. sapiens* et *M. musculus*). B) Alignement de séquences entre C3ORF75 et ses homologues. C3ORF75 présente 9% d'identité et 25% de similarité avec la protéine Elp6 de levure. L'homologie entre ces différentes séquences varie de 8% d'identité et 26% de similarité (*A. thaliana* et *S. cerevisiae*) à 80% d'identité et 90% de similarité (*H. sapiens* et *M. musculus*). Ces résultats ont été créés en utilisant le programme ClustalW2 et l'option groupe de similarité a été activée lors de la génération de ces données (Larkin et al., 2007). *H.s.*, *Homo sapiens* ; *M.m.*, *Mus musculus* ; *A.t.*, *Arabidopsis thaliana* ; *D.m.*, *Drosophila melanogaster* ; *S.p.*, *Schizosaccharomyces pombe* ; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*. Les résidus conservés à 60% sont surlignés en gris clair, ceux conservés à 80% sont surlignés en gris foncé et les résidus identiques sont surlignés en noir.

Afin de conforter la notion que DERP6/ELP5 et C3ORF75/ELP6 font partie du complexe Elongator humain, nous avons établi une lignée cellulaire qui exprime de façon stable la protéine DERP6/ELP5 couplée à l'épitope FLAG. Nous avons ensuite appliqué le même

protocole de purification que celui décrit pour identifier les protéines associées à ELP4. Nos résultats indiquent que DERP6/ELP5-FLAG interagit avec les sous-unités endogènes ELP1, ELP3 et ELP4, ainsi qu'avec C3ORF75/ELP6 (Fig.28, A et B). De plus, l'immunoprécipitation (IP) de la protéine ELP4 endogène, dans des lysats de cellules exprimant DERP6/ELP5-FLAG ou non (Mock), montre une interaction entre ELP4 et la protéine DERP6/ELP5-FLAG (Fig.28 C).

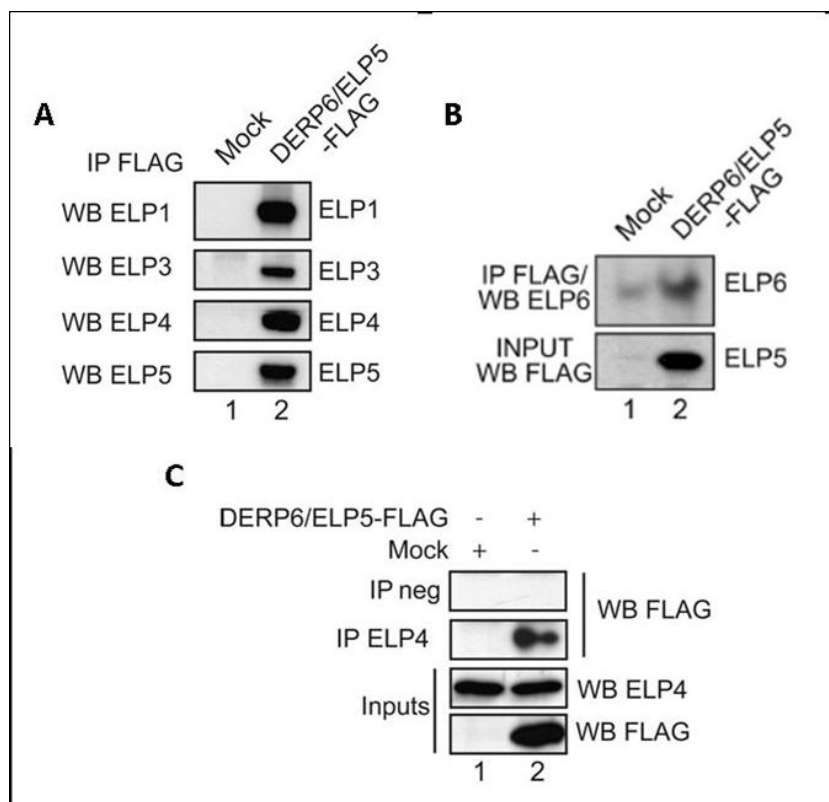


Figure 28. DERP6/ELP5 et C3ORF75/ELP6 sont des sous-unités du complexe Elongator humain.

A) Analyse par WB d'éluat FLAG venant de cellules exprimant DERP6/ELP5-FLAG ou de cellules exprimant le vecteur contrôle (Mock). Les protéines sont détectées grâce aux anticorps correspondants, indiqués à gauche. B) Détection par WB de la sous-unité ELP6 endogène suite à l'IP avec un anticorps FLAG de la protéine DERP6/ELP5 dans les cellules exprimant le vecteur contrôle (Mock) ou exprimant DERP6/ELP5-FLAG (partie supérieure). Partie inférieure, WB réalisé sur les extraits avant IP (input) afin de confirmer l'expression de DERP6/ELP5-FLAG. Les protéines sont détectées grâce aux anticorps listés à gauche. C) La sous-unité ELP4 endogène est immunoprécipitée à partir de cellules exprimant DERP6/ELP5-FLAG ou non (Mock). Les protéines sont détectées grâce aux anticorps listés à droite. IP neg = contrôle négatif, réalisé avec du sérum pré-immun.

La technique de filtration sur gel permet d'isoler au même moment les protéines formant un complexe. Le principe de ce test est de séparer les protéines selon leur taille, pendant leur passage dans une colonne contenant une matrice poreuse. La matrice que nous avons utilisée est une Superdex 200, composée de dextran et d'agarose. En utilisant le même éluat que

pour la purification DERP6/ELP5-FLAG, nous avons pu co-éluer les protéines ELP1, ELP3, ELP4 et DERP6/ELP5-FLAG dans un même complexe dont la masse avoisine 600 KDa (Fig.29), comme cela a déjà été démontré (Glatt et al., 2012; Otero et al., 1999). Ces résultats confirment que les protéines DERP6/ELP5 et C3ORF75/ELP6 font partie du complexe Elongator humain.

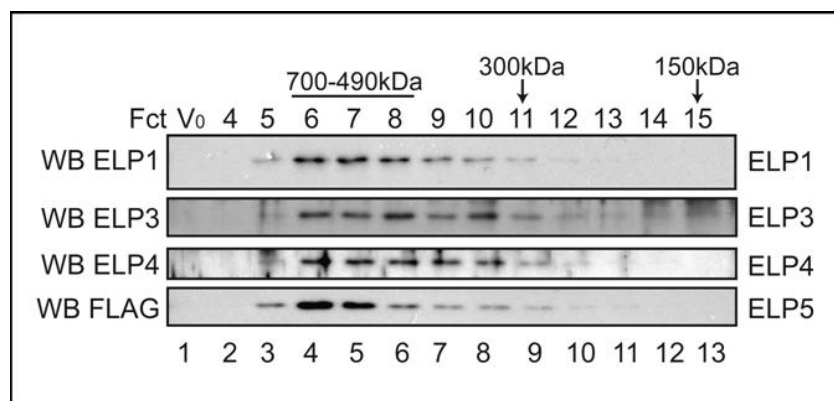


Figure 29. Analyse par gel filtration.

Le complexe Elongator, issu de la même purification FLAG que dans la figure 28 A, est analysé par filtration sur gel. Les protéines sont détectées par WB et les anticorps utilisés sont indiqués à gauche de la figure. V0 représente le volume mort. Les fractions (Fct) issues de la filtration, et analysées par WB, sont indiquées en haut de la figure.

Afin de déterminer la localisation cellulaire de DERP6/ELP5, des expériences d'immunofluorescence (IF) ont été réalisées. Nous avons transfecté des cellules HEK293 avec des vecteurs d'expression pour les sous-unités ELP1, ELP3, ELP4 et ELP5 couplées à l'épitope FLAG ou Myc. Grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes, nous avons pu analyser la localisation cellulaire de ces protéines. Nous pouvons voir sur la figure 30 que ces protéines sont majoritairement, mais pas exclusivement, cytoplasmiques. Grâce à une lyse spécifique, nous avons pu extraire séparément les protéines cytoplasmiques et nucléaires. Les extraits protéiques issus de cellules HEK293 qui expriment de façon ectopique la protéine DERP6/ELP5 ont été analysés par WB (Fig.31). Nous pouvons voir sur la figure 31 que la protéine DERP6/ELP5-FLAG est bien majoritairement cytoplasmique (86%), ce qui confirme les données obtenues par IF.

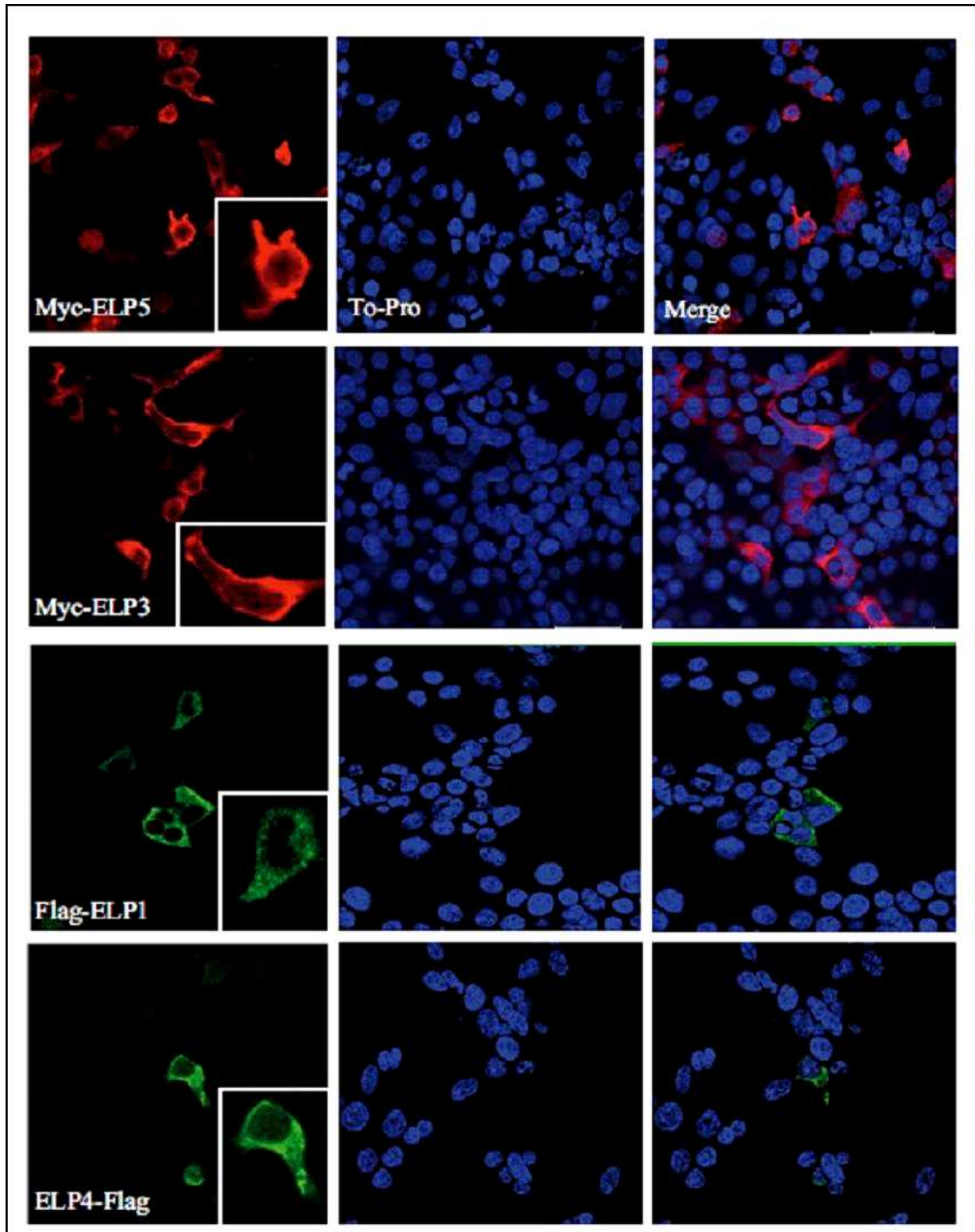


Figure 30. Localisation cellulaire des sous-unités du complexe Elongator.

Les cellules HEK293 sont transfectées avec le vecteur d'expression indiqué sur les photos dans la première colonne, en bas à gauche. Les anticorps Myc (rouge) ou FLAG (vert) permettent de détecter les protéines du complexe Elongator qui sont couplées soit à l'épitope Myc, soit à l'épitope FLAG. Le To-Pro (bleu) permet de visualiser le noyau.

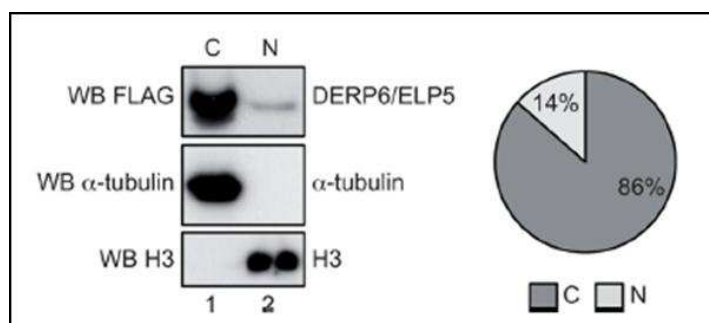


Figure 31. Localisation cellulaire de la sous-unité DERP6/ELP5.

Des extraits protéiques cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont réalisés à partir de cellules HEK293 exprimant DERP6/ELP5-FLAG. Les protéines contenues dans ces fractions sont analysées par WB et les anticorps utilisés sont indiqués à gauche. La tubuline- α est un marqueur de la fraction cytoplasmique, alors que l'histone H3 est un marqueur de la fraction nucléaire. La distribution de la protéine DERP6/ELP5 dans ces compartiments cellulaires est quantifiée, comme illustré à droite.

L'ensemble de ces données indique que les protéines DERP6 et C3ORF75 font partie du complexe Elongator et que ce sont des homologues humains des sous-unités Elp5 et Elp6 de levure. En conséquence, nous proposons de renommer respectivement ces deux protéines ELP5 et ELP6.

2.2. ELP5 est nécessaire pour l'interaction entre ELP4 et ELP3

Afin de déterminer la fonction d'ELP5 au sein du complexe Elongator, nous avons testé les interactions entre différentes sous-unités d'Elongator en présence ou en absence d'ELP5. Pour ce faire, nous avons généré des cellules HEK293 déficientes ou non pour la protéine ELP5 (Fig.32 A, comparer les pistes 2 et 4 avec les pistes 1 et 3 ; B, comparer les pistes 1 et 3 avec les pistes 2 et 4). Les lysats de ces cellules ont été utilisés afin de purifier le complexe Elongator soit à partir de la sous-unité ELP4-FLAG (Fig.32 A), soit à partir de la sous-unité FLAG-ELP3 (Fig.32 B). Les sous-unités ELP1 et ELP3 endogènes sont détectées lors de l'IP de la protéine ELP4-FLAG dans les cellules contrôles (Fig.32 A, piste 3). La protéine ELP1 est associée à ELP4 indépendamment de la présence d'ELP5 (Fig.32 A, comparer les pistes 3 et 4). Par contre, l'interaction entre ELP3 et ELP4 nécessite la présence d'ELP5. En effet, en l'absence d'ELP5, le complexe Elongator purifié à partir d'ELP4-FLAG ne contient plus de sous-unité catalytique ELP3 (Fig.32 A, comparer les pistes 3 et 4). Pour confirmer ces résultats, nous avons purifié Elongator à partir de cellules HEK293 exprimant la protéine FLAG-ELP3, en présence ou non d'ELP5 (Fig.32 B, comparer les pistes 1 et 3 avec les pistes 2 et 4). Nous pouvons constater que l'interaction entre la protéine FLAG-ELP3 et la sous-unité ELP1

endogène ne dépend pas de la présence d'ELP5 (Fig.32 B, comparer les pistes 3 et 4). Par contre la présence de la sous-unité ELP4 est fortement compromise en l'absence d'ELP5 (Fig.32 B, comparer les pistes 3 et 4).

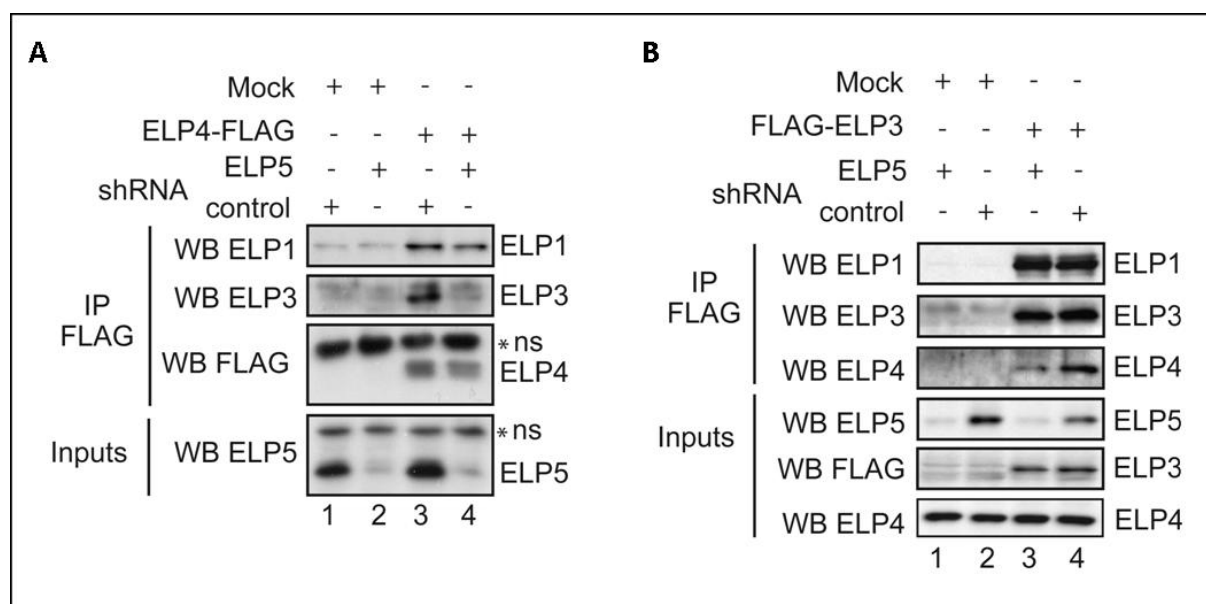


Figure 32. ELP5 connecte les sous-unités ELP3 et ELP4.

A) et B) Les cellules HEK293 déficientes ou non pour ELP5 sont transfectées soit avec le vecteur d'expression contrôle (Mock), soit avec le vecteur d'expression ELP4-FLAG (A) ou FLAG-ELP3 (B). Les extraits cellulaires provenant de ces cellules sont soumis à une IP FLAG, suivie d'un WB anti-ELP1 (A et B), -ELP3 (A et B), -FLAG (A) et -ELP4 (B). L'expression des constructions ELP4-FLAG (A) et FLAG-ELP3 (B) est détectée avec un anticorps anti-FLAG sur les extraits cellulaires avant l'IP (inputs), partie inférieure de la figure. L'expression d'ELP5 est détectée grâce à un anticorps anti-ELP5. *ns indiquent les protéines non spécifiques.

Nous pouvons conclure qu'ELP5 est essentiel à l'intégrité et donc à la fonction d'Elongator en permettant un assemblage correct des sous-unités ELP3 et ELP4, alors que sa présence n'est pas nécessaire pour l'interaction entre ELP1 et ELP3. Dès lors, ces résultats suggèrent qu'ELP5 promeut l'interaction entre les deux sous-complexes d'Elongator (« core » et « HAP »).

2.3. Etude de l'implication d'Elongator dans la migration et dans l'invasion cellulaire

Notre laboratoire a précédemment montré que les cellules HeLa déficientes pour Elongator présentaient un déficit de migration qui serait partiellement dû à un défaut d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la mobilité (Close et al., 2006). Ce processus cellulaire intervient dans le pouvoir métastatique des cellules tumorales. Toutefois, les mécanismes moléculaires conduisant à l'invasion métastatique restent encore

mal compris, nous avons dès lors étudié l'implication potentielle d'Elongator dans les capacités migratoires et invasives de cellules hautement métastatiques.

Afin d'étudier le rôle d'Elongator dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, nous avons utilisé comme modèle une lignée cellulaire issues de mélanome murin : les B16-F10. Ces cellules sont caractérisées par leur haut pouvoir migratoire et invasif (Fidler, 1975). Grâce à une méthode basée sur l'interférence d'ARN messenger (ARNi), nous avons généré une lignée B16-F10 ayant perdu de façon stable l'expression de la sous-unité Elp1 du complexe Elongator. La perte d'expression de cette sous-unité invalide la fonction d'Elongator. En effet, Elp1 est nécessaire pour l'intégrité du complexe et son absence conduit à l'instabilité de la sous-unité catalytique Elp3 (Close et al., 2006; Petrakis et al., 2004). Le principe de cette méthode est d'infecter les cellules cibles avec un lentivirus qui délivre un shRNA (*short hairpin RNA*) spécifique dirigé contre le transcrite codant pour la protéine cible. L'hybridation de cette molécule avec l'ARNm cible entraîne la perte d'expression de la protéine correspondante. Cette technique permet d'éteindre l'expression d'un gène de façon stable et efficace (Kumar and Clarke, 2007).

Dans le but de générer les cellules B16-F10 déficientes pour la protéine Elp1, nous avons utilisé deux séquences distinctes de shRNA ciblant le transcrite d'Elp1 (« shRNA Elp1#1 » et « shRNA Elp1#2 »), de même qu'une séquence contrôle (« shRNA CTR ») ne ciblant aucun transcrite. Comme nous pouvons le voir dans le WB dans la figure 33, l'expression d'Elp1 est fortement diminuée dans ces cellules, et ce de façon indépendante de l'identité de la séquence du shRNA. Comme attendu, la perte de la sous-unité Elp1 dans cette lignée entraîne également une altération de l'expression de la protéine Elp3. Ceci démontre que le complexe Elongator n'est plus fonctionnel dans les lignées B16-F10 infectées par les lentivirus délivrant des shRNAs ciblant Elp1.

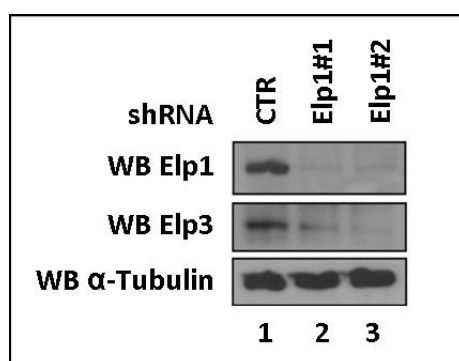


Figure 33. Génération de cellules déficientes pour Elongator.

Analyse par WB de l'expression des protéines Elp1 et Elp3 dans des cellules B16-F10 infectées par un lentivirus délivrant respectivement soit un shRNA CTR, ou un des shRNAs ciblant ELP1 (shRNA Elp1#1 ou shRNA Elp1#2). Les anticorps correspondants sont indiqués à gauche. Le contrôle de la quantité de protéines déposées est réalisé par la détection de la tubuline- α .

Les capacités migratoires de ces cellules ont été testées par « *wound healing assay* ». Cette expérience consiste à réaliser une déchirure dans une monocouche de cellules confluentes. La prolifération cellulaire est bloquée 2 heures avant de réaliser la brèche par l'ajout de mitomycine C. Nous pouvons ensuite comparer le temps nécessaire pour recouvrir la brèche, par migration, de différentes lignées cellulaires. Comme nous pouvons le voir dans la figure 34, les cellules contrôles sont capables de migrer et de fermer la brèche en 7 heures. Au contraire, les cellules dont l'expression d'Elp1 est diminuée présentent un retard significatif de migration, et cela de façon indépendante de l'identité de la séquence utilisée pour cibler le transcrite d'Elp1 (Fig.34).

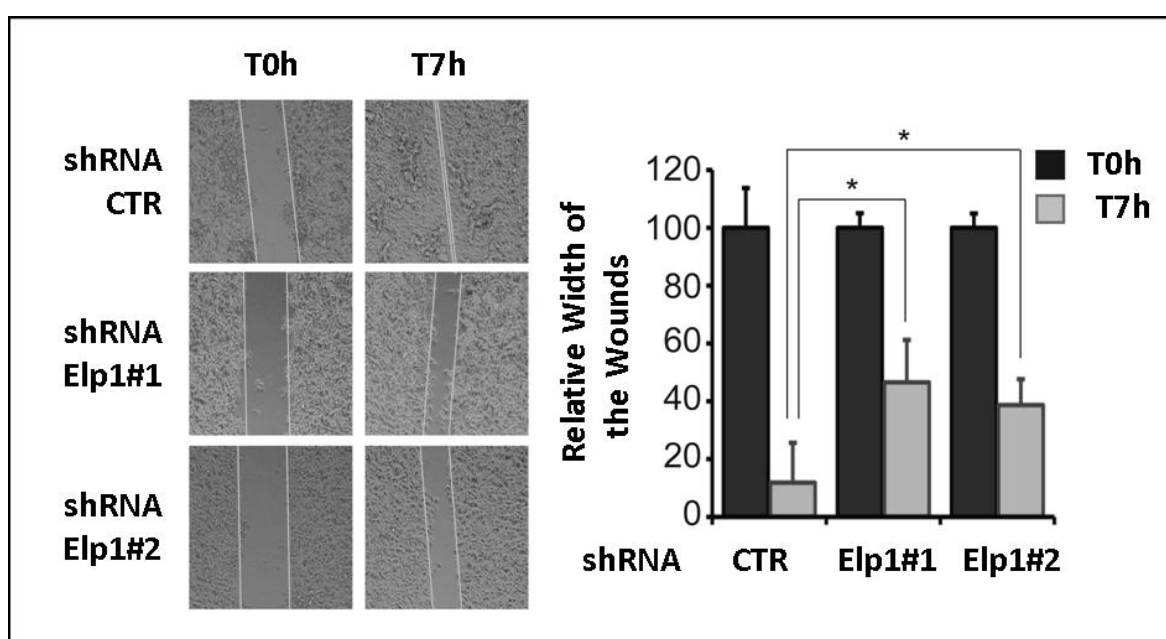


Figure 34. Elp1 régule la migration cellulaire de cellules issues de mélanome murin, les B16-F10.

Les capacités migratoires de ces cellules sont évaluées par « *wound healing assay* ». Des photos sont prises après la création de la brèche aux temps indiqués. Les données sont quantifiées et les résultats sont illustrés sur la droite de la figure. Pour chaque condition expérimentale, la largeur de la brèche est fixée à 100% au temps 0 et la largeur de la brèche au temps suivant est exprimée par rapport à cette valeur. L'expérience est réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif.

En parallèle, nous avons utilisé les chambres de Boyden. Le principe de ce test est basé sur la migration des cellules en réponse à un gradient de sérum. Les cellules sont placées dans des inserts perforés de pores de 8 μm de diamètre et ceux-ci sont posés dans des plaques multi-puits. Afin d'induire la migration, le milieu de culture dans cet insert est dépourvu de sérum, alors que celui dans le puits contient 10% de sérum (Close et al., 2006)(Fig.35).

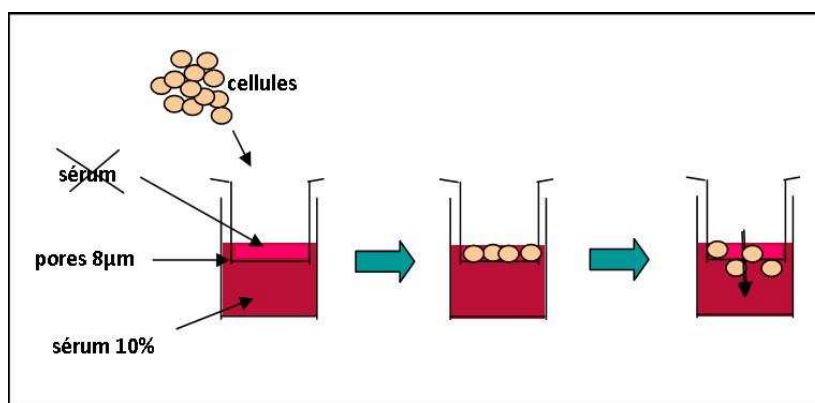


Figure 35. Représentation du test de migration en chambre de Boyden.

Les cellules sont placées dans un insert perforé de pores et cultivées dans un milieu sans sérum. L'insert est installé dans un puit contenant un milieu de culture avec du sérum. Ce gradient de sérum va induire la migration des cellules capables de migrer, placées dans l'insert. A la fin de l'expérience, les cellules qui sont parvenues à traverser les pores sont dénombrées.

Après 24 heures de culture, les cellules qui n'ont pas migré sont éliminées en raclant la surface supérieure de l'insert. Celles qui se trouvent sur la face inférieure sont fixées à l'éthanol, colorées au Giemsa 4% et comptées au microscope optique (10 champs par inserts). Les cellules B16-F10 déficientes pour Elp1 présentent les mêmes défauts migratoires que ceux observés dans le « *wound healing assay* », alors que les cellules contrôles migrent efficacement (Fig.36).

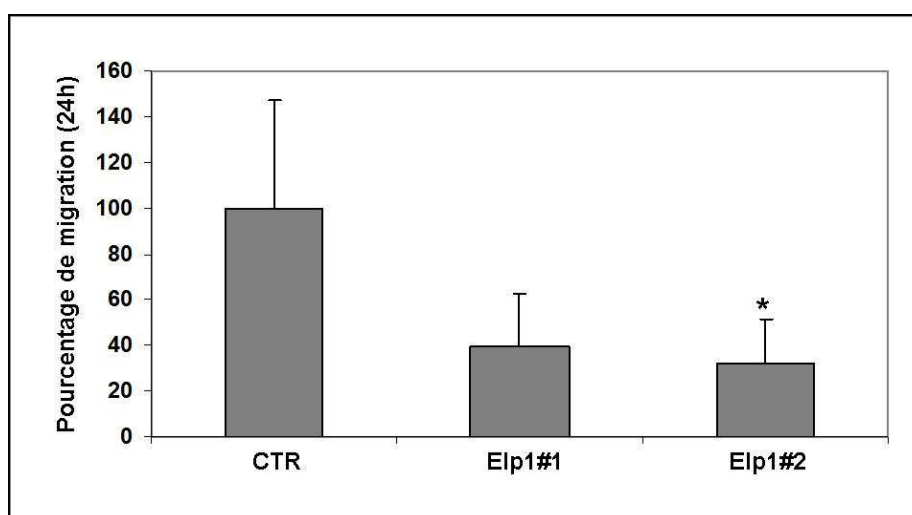


Figure 36. Migration en chambre de Boyden.

Quantification des données obtenues en chambre de Boyden avec les cellules B16-F10 déficientes ou non pour Elp1, après 24h de culture. Le nombre de cellules ayant migré est fixé à 100% dans la condition contrôle. Celui correspondant aux cellules déficientes pour Elp1 est exprimé par rapport à cette valeur. L'expérience a été réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type).

Afin de contrôler le lien entre le défaut de migration et la perte de fonction du complexe Elongator, nous avons généré des cellules déplétées pour Elp3 à l'aide de lentivirus délivrant des shRNAs spécifiques («shRNA CTR», «shRNA Elp3#1» et «shRNA Elp3#2») (Fig.37 A). Nous avons testé leurs capacités migratoires par « *wound healing assay* ». Comme attendu, nous pouvons voir sur la figure 37 B que les cellules B16-F10 déficientes pour Elp3 présentent un défaut de migration après 6 heures par rapport aux cellules contrôles (Fig.37 C).

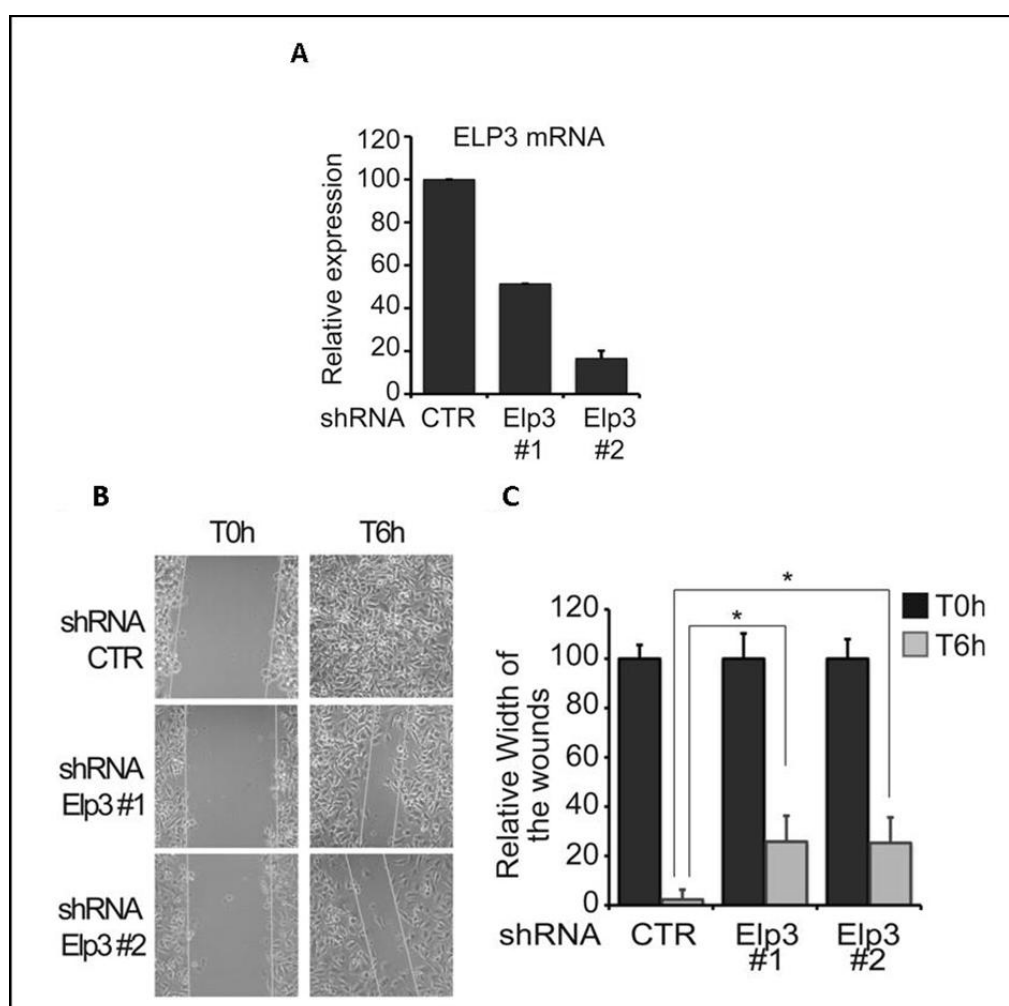


Figure 37. Elp3 régule la migration cellulaire des cellules cancéreuses B16-F10.

A) Génération de cellules B16-F10 déficientes pour Elp3. Détection du niveau d'expression de l'ARNm d'Elp3 par PCR quantitative (qPCR) dans des cellules B16-F10 infectées par des lentivirus délivrant soit un shRNA contrôle (shRNA CTR), soit un shRNA ciblant Elp3 (shRNA Elp3#1 ou shRNA Elp3#2). Le niveau d'expression de l'ARNm d'Elp3 dans les cellules contrôles est fixé à 100% et le niveau d'expression dans les autres conditions est exprimé par rapport à cette valeur. B) Les capacités migratoires de ces cellules sont évaluées par « *wound healing assay* ». Des photos sont prises après la création de la brèche aux temps indiqués. C) Quantification des données. Pour chaque condition expérimentale, la largeur de la brèche a été fixée à 100% au temps 0 et la largeur de la brèche aux temps suivants est exprimée par rapport à cette valeur. L'expérience est réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif.

Nos résultats montrent également que le défaut de migration est complètement dépendant de l'expression d'ELP3. En effet, l'expression ectopique d'ELP3 dans les cellules déplétées pour cette même protéine permet aux cellules de retrouver une capacité migratoire comparable aux cellules contrôles, comme l'indique la figure 38 au temps 6 heures. Ces données suggèrent que les sous-unités Elp1 et Elp3 du complexe Elongator contrôlent la migration cellulaire dans les cellules dérivées de mélanome murin. La perte de fonction de ces protéines conduit bien à la perte de fonction d'Elongator dans son entièreté.

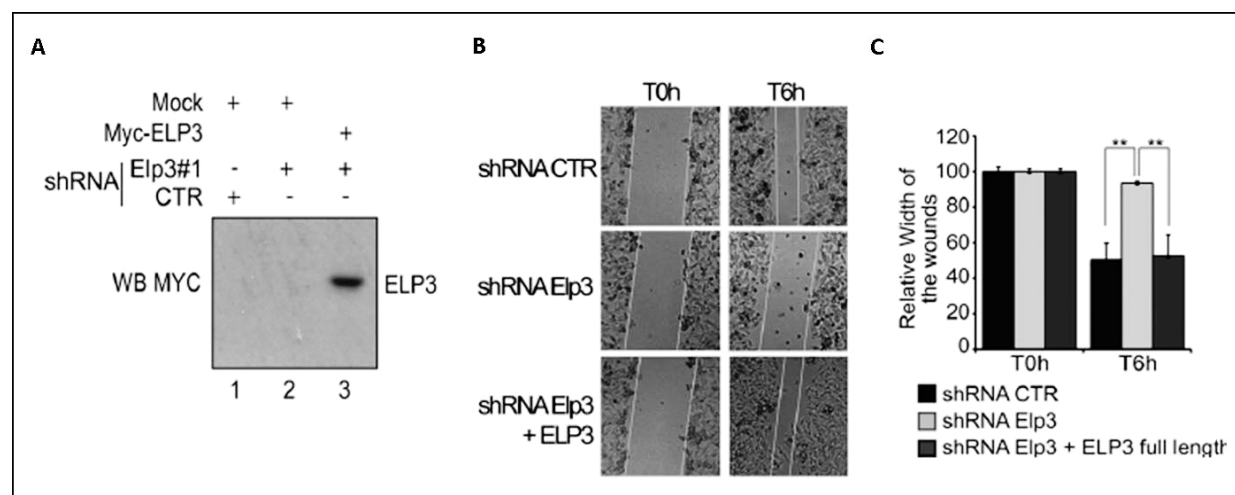


Figure 38. Restauration de la migration cellulaire par l'expression d'Elp3.

« Wound healing assay » effectué sur des cellules B16-F10 déficientes pour Elp3 (shRNA Elp3#1) ou non (shRNA CTR) et transfectées avec un vecteur permettant l'expression d'Elp3 (Myc-Elp3) ou un vecteur vide (Mock). A) WB anti-Myc réalisé sur les extraits protéiques des différentes cellules collectées après le test de migration. B) « Wound healing assay » effectué sur les cellules B16-F10 déficientes pour Elp3 ou non, transfectées avec Myc-Elp3 ou Mock. C) La largeur de la brèche est quantifiée et les données obtenues sont illustrées à droite de la figure. Les photos sont représentatives de l'expérience réalisée trois fois (moyenne +/- écart-type).

Etant donné qu'Elongator intervient dans la migration de cellules cancéreuses, nous avons voulu investiguer dans quelle mesure il pouvait également être important dans la régulation du pouvoir transformant de ces cellules. La transformation néoplasique des cellules cancéreuses résulte d'une série d'altérations génétiques et épigénétiques qui confèrent à une population cellulaire la capacité de proliférer de façon indépendante des signaux intra et extracellulaires qui, en conditions normales, régulent la croissance. La croissance indépendante d'ancrage est l'une des caractéristiques de la transformation cellulaire et cette caractéristique est utilisée *in vitro* afin de détecter la transformation maligne des cellules. Le test de formation de colonies en agar mou ou « *soft agar* » est une méthode permettant de suivre la croissance cellulaire de façon indépendante d'ancrages. Cette approche expérimentale permet de mesurer les capacités prolifératives des cellules en milieu semi-solide et isolées les unes des autres. Elles perdent ainsi les contacts entre elles et

avec le support (Hamburger and Salmon, 1977). Grâce au « *soft agar* », nous avons étudié le rôle d'Elongator dans la transformation maligne des cellules issues de mélanome murin. Les lignées cellulaires B16-F10 déficientes ou non pour Elp1 ou Elp3 ont été cultivées dans un gel d'agar mou. Après deux semaines, les cellules sont colorées et les colonies formées sont dénombrées dans chaque condition. Comme nous pouvons le voir sur la figure 39, les cellules B16-F10 contrôles sont capables de générer un grand nombre de colonies, alors que l'absence d'Elp1 (Fig.41 A) ou d'Elp3 (Fig.41 B) conduit à une diminution significative du nombre de colonies observées.

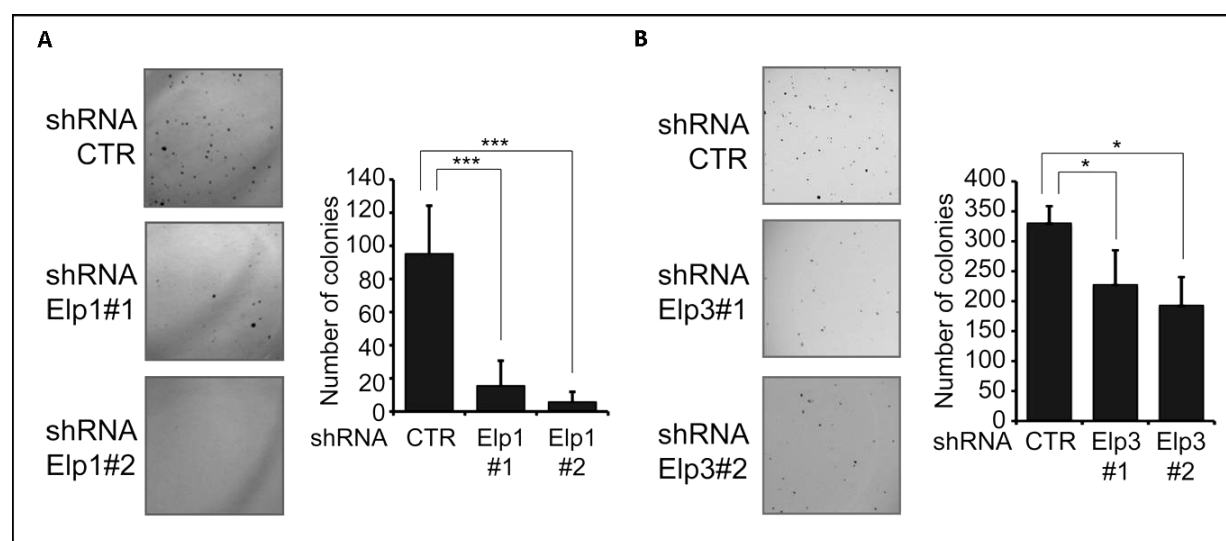


Figure 39. Elp1 et Elp3 affectent le pouvoir transformant des cellules issues de mélanome murin.

Les cellules contrôles (shRNA CTR) ou déficientes pour Elp1 (shRNA Elp1#1 et shRNA ELP1#2) (A) ou Elp3 (shRNA Elp3#1 et shRNA Elp3#2) (B) sont placées dans un milieu de culture contenant de l'agar durant deux semaines. Ensuite, les cellules sont colorées au cristal violet et le nombre de colonies dans chaque condition est compté. L'expérience est réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif.

Comme Elongator intervient dans le pouvoir transformant de cellules cancéreuses, son rôle dans le pouvoir invasif de ces cellules a ensuite été investigué en utilisant la culture cellulaire en trois dimensions (3D) (Doillon et al., 2004). Dans cette approche expérimentale, un amas de cellules est enfermé entre deux couches de collagène. Des cellules cancéreuses acquièrent la capacité de quitter cet amas cellulaire, représentant la tumeur primaire, et d'envahir le collagène afin de générer des colonies dites « satellites », reproduisant ainsi la formation de métastases (tumeurs secondaires). Le collagène est l'un des composants majoritaires de la matrice extracellulaire. Cette technique permet ainsi de récapituler différentes étapes du pouvoir métastatique (Gobeil et al., 2008). Nous avons utilisé les B16-F10 déficientes ou non pour Elongator afin d'évaluer dans quelle mesure son absence avait un

impact sur le pouvoir invasif de ces cellules. Après trois semaines de culture en 3D, les cellules sont colorées avec du bleu de méthylène et comptées. Comme illustré dans la figure 40, les cellules B16-F10 contrôles sont capables de générer de nombreuses colonies satellites, alors que cette capacité est dramatiquement et significativement diminuée dans les cellules déficientes pour Elongator.

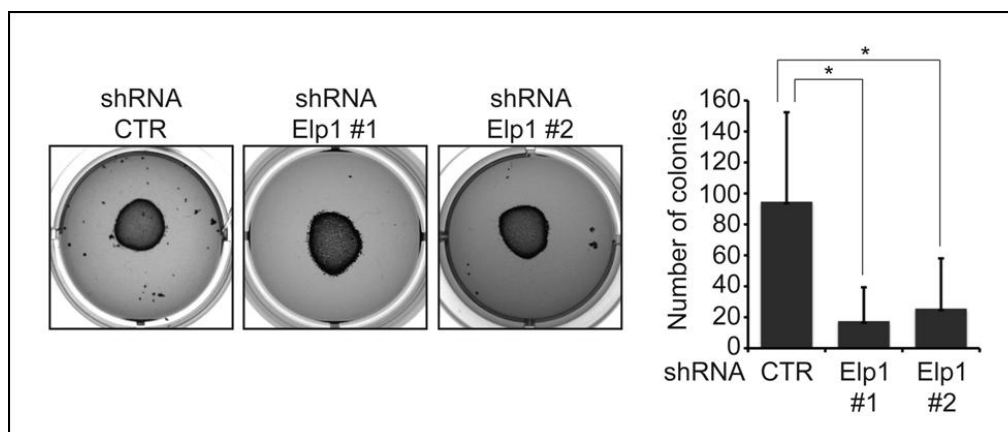


Figure 40. Elp1 est nécessaire pour l'invasion des cellules B16-F10.

La culture en 3D dans du collagène permet d'évaluer le pouvoir invasif des cellules B16-F10 déficientes ou non pour Elp1. Après trois semaines de culture dans ces conditions, les cellules sont colorées au bleu de méthylène (0,2% en suspension dans 50% de méthanol). Des photos sont prises et les colonies satellites sont comptées. L'expérience est réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les images montrent les résultats d'un test représentatif.

En conclusion, les données du « *soft agar* » et de la culture en 3D nous indiquent qu'Elongator intervient dans la transformation et le pouvoir invasif des cellules dérivées de mélanome.

2.4. ELP5 et ELP6 régulent la migration cellulaire et le pouvoir transformant en tant que sous-unités du complexe Elongator

De la même façon que nous avons généré des cellules déficientes pour Elp1 et Elp3, nous avons produit des cellules B16-F10 ayant perdu la fonction d'Elp5 ou d'Elp6. En effet, comme nous avons précédemment identifié les sous-unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator, nous avons voulu examiner si ces protéines étaient requises pour les fonctions cellulaires précédemment identifiées pour Elongator, à savoir la migration cellulaire, le pouvoir transformant et l'invasion. Sur la figure 41, nous pouvons voir par qPCR que les niveaux d'expression d'Elp5 (Fig.41 A) et Elp6 (Fig.41 B) sont diminués suite à l'infection lentivirale avec un virus délivrant des shRNAs spécifiques par rapport aux cellules contrôles. L'analyse des

capacités migratoires de ces cellules par « *wound healing assay* » montre que les protéines Elp5 et Elp6 interviennent également dans la migration cellulaire (Fig.41 C et D au temps 6h).

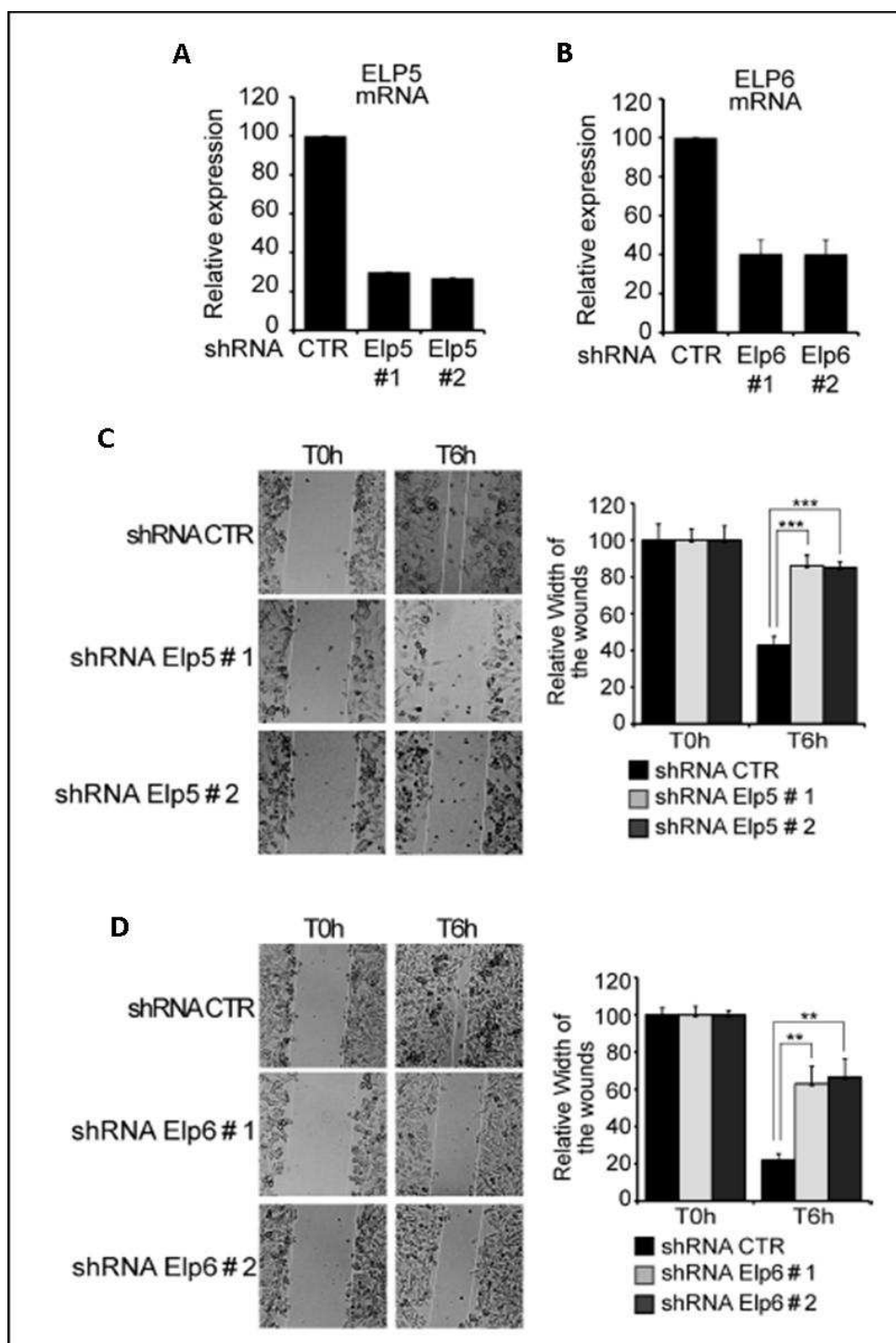


Figure 41. Elp5 et Elp6 sont essentielles pour la migration des cellules dérivées de mélanome murin.

A et B) Contrôle par qPCR de l'expression d'Elp5 (A) et d'Elp6 (B) dans les cellules B16-F10 infectées avec un lentivirus délivrant un shRNA spécifique ou non (shRNA CTR, shRNA Elp5#1, shRNA Elp5#2, shRNA Elp6#1 et shRNA Elp6#2). C) Les capacités migratoires de ces cellules sont évaluées par « *wound healing assay* ». Les photos sont prises aux temps indiqués. Pour chaque condition expérimentale, la largeur de la brèche a été fixée à 100% au temps 0 et la largeur de la brèche au temps suivant est exprimée par rapport à cette valeur. Les expériences sont réalisées trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif pour chacune d'elles.

De la même façon que pour les sous-unités Elp1 et Elp3, nous avons étudié le rôle des protéines Elp5 et Elp6 dans le pouvoir transformant des B16-F10. Nous pouvons voir dans la figure 42 que les cellules déficientes pour Elp5 (Fig.42 A) et Elp6 (Fig.42 B) présentent également un défaut de formation de colonies en « *soft agar* » par rapport aux cellules contrôles.

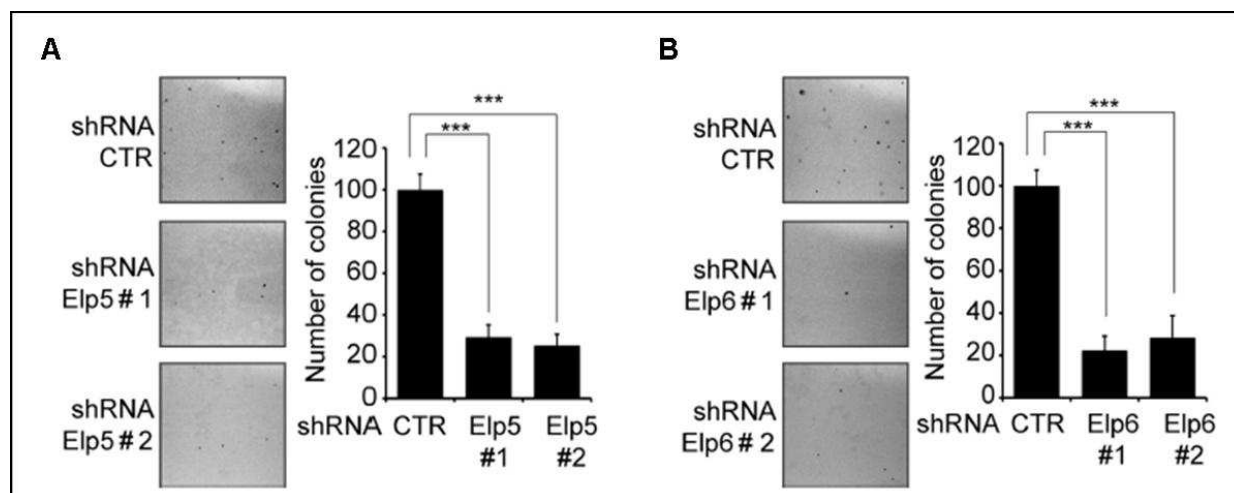


Figure 42. Elp5 et Elp6 affectent le pouvoir transformant des cellules issues de mélanome murin.

Après 2 semaines de culture en « *soft agar* », les cellules contrôles (shRNA CTR) ou déficientes pour Elp5 (shRNA Elp5#1 et shRNA Elp5#2) ou Elp6 (shRNA Elp6#1 et shRNA Elp6#2) sont colorées au cristal violet et les colonies sont dénombrées dans chaque condition. L'expérience est réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif.

Afin de conforter l'idée qu'Elp5 contrôle la migration cellulaire en tant que sous-unité d'Elongator, nous avons généré différents mutants de cette protéine. Nous avons ainsi créé des vecteurs d'expression qui codent pour la protéine Elp5 ayant perdu 50, 100 ou 150 acides aminés dans la portion N- ou C-terminale. Ces mutants sont nommés : $\Delta N50$, $\Delta N100$, $\Delta N150$, $\Delta C50$, $\Delta C100$, $\Delta C150$ et sont couplés à l'épitope FLAG (Fig.43).

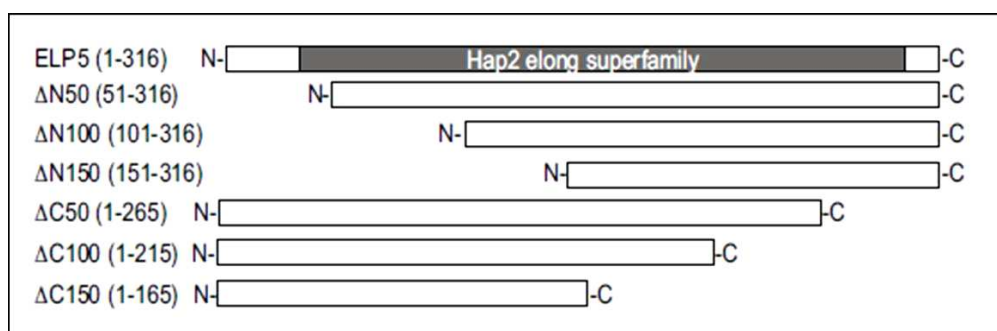


Figure 43. Illustration des mutants de la sous-unité ELP5.

La protéine ELP5 humaine possède 316 acides aminés. Elle contient un motif conservé, le domaine de la superfamille Hap2 (*Histone acetylation protein 2*) décrit par (Li et al., 2001). Les mutants générés ont perdu de 50 à 150 acides aminés dans la partie N- ou C-terminale de la protéine sauvage.

Nous avons testé la capacité de ces mutants à s'associer avec les autres sous-unités du complexe Elongator par IP. Le mutant ELP5- Δ C50 est capable de lier la sous-unité ELP4 endogène, alors que le mutant ELP5- Δ N50 en est incapable (Fig.44 A, comparer les pistes 6 et 3). Ces données suggèrent que les 50 premiers acides aminés sont nécessaires pour l'interaction entre ELP5 et ELP4 (Fig.44 A, comparer les pistes 2,3 et 6 respectivement). Le mutant ELP5- Δ C100 a perdu la capacité de s'associer à ELP4, ce qui suggère que la protéine ELP5 présente un deuxième domaine d'interaction pour ELP4, entre les acides aminés 216 et 265 (Fig.44 A, comparer les pistes 2 et 7). Malgré son incapacité à lier ELP4, le mutant ELP5- Δ N50 reste capable de s'associer à la sous-unité ELP1 endogène, de même qu'à la sous-unité ELP3 exprimée de façon ectopique (Fig.44 B, comparer les pistes 3 et 4). Ces résultats sont les mêmes pour le mutant ELP5- Δ C100, suggérant que la sous-unité ELP5 lie ELP4 et ELP3 (ou ELP1) via des domaines distincts (Fig.44 B, comparer les pistes 3 et 8). La perte des 150 premiers (Δ N150) ou des 150 derniers (Δ C150) acides aminés est nécessaire pour abolir l'interaction entre ELP5 et ELP3 ou ELP1 (Fig.44 B, comparer les pistes 6 et 9).

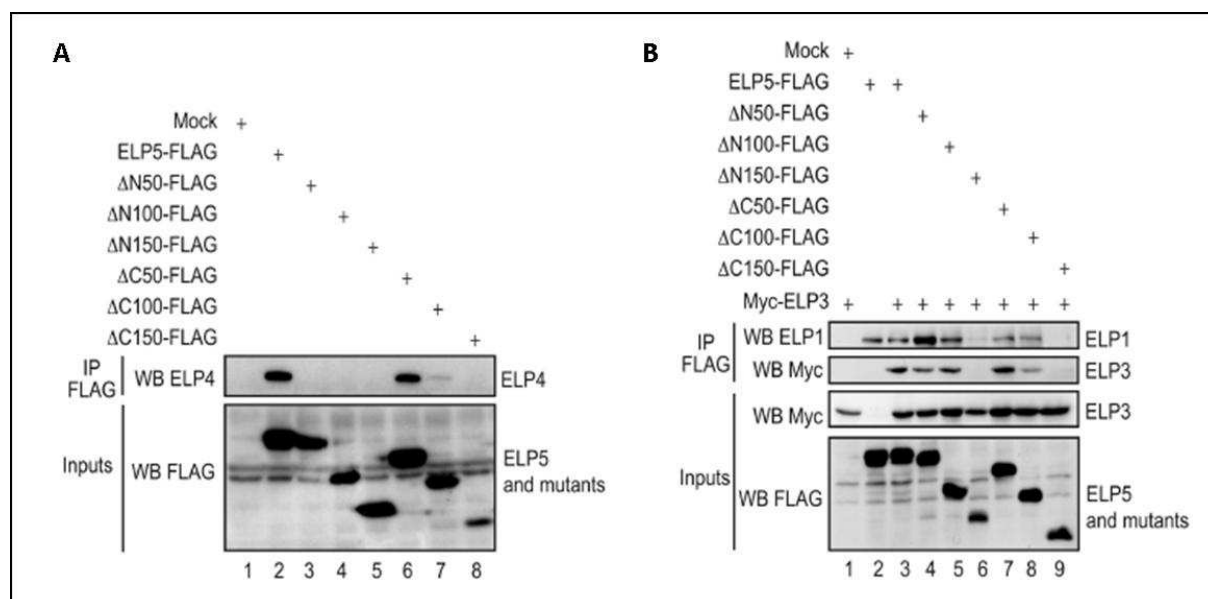


Figure 44. Importance de la structure d'ELP5 au sein d'Elongator.

A) Les cellules HEK293 sont transfectées avec les plasmides d'expression indiqués dans la partie supérieure de la figure (Mock, ELP5-FLAG ou les mutants). Les extraits cellulaires sont soumis à une IP FLAG suivie d'un WB avec un anticorps anti-ELP4 (partie supérieure de la figure). L'expression des mutants ELP5-FLAG est détectée par WB à partir des extraits cellulaires avant l'IP (inputs) avec un anticorps anti-FLAG (partie inférieure de la figure). B) Les cellules HEK293 sont transfectées avec les plasmides d'expression indiqués (Mock, ELP5-FLAG ou les mutants) et les extraits cellulaires sont soumis à une IP FLAG suivie d'un WB avec un anticorps anti-ELP1 ou anti-Myc (partie supérieure de la figure). L'expression des mutants ELP5-FLAG est détectée à partir des extraits cellulaires avant l'IP (inputs) par WB avec un anticorps anti-FLAG. L'expression de la protéine Myc-ELP3 est détectée par WB avec un anticorps anti-Myc dans ces extraits (partie inférieure de la figure).

Toujours dans le but de préciser qu'Elp5 régule la migration en tant que sous-unité d'Elongator, nous avons complétement les cellules B16-F10 déficientes pour Elp5 avec le mutant ELP5- Δ N150 qui est incapable de s'associer aux autres sous-unités d'Elongator testées. Nous avons examiné la capacité de ce mutant à restaurer le défaut de migration observé dans les cellules B16-F10 déficientes pour Elp5. Pour ce faire, nous avons introduit en parallèle le vecteur d'expression codant pour la protéine ELP5 sauvage, le vecteur d'expression du mutant ELP5- Δ N150 ou un vecteur n'exprimant aucune protéine, dans des cellules B16-F10 contrôles ou déficientes pour Elp5. Ces cellules ont ensuite été soumises au « *wound healing assay* ». L'expression de ces différents vecteurs est contrôlée par WB dans les lysats des cellules collectées au terme de l'expérience (Fig.45, à gauche). Nous pouvons voir dans la figure 45 que la protéine ELP5 sauvage restaure le défaut de migration observé dans les cellules déficientes pour Elp5 (shRNA ELP5 + ELP5-full length) après 7 heures, alors que le mutant ELP5- Δ N150 en est incapable (Fig.45, shRNA Elp5 + ELP5- Δ N150, temps 7h). Ces résultats montrent qu'ELP5 régule la mobilité cellulaire en tant que sous-unité du complexe Elongator.

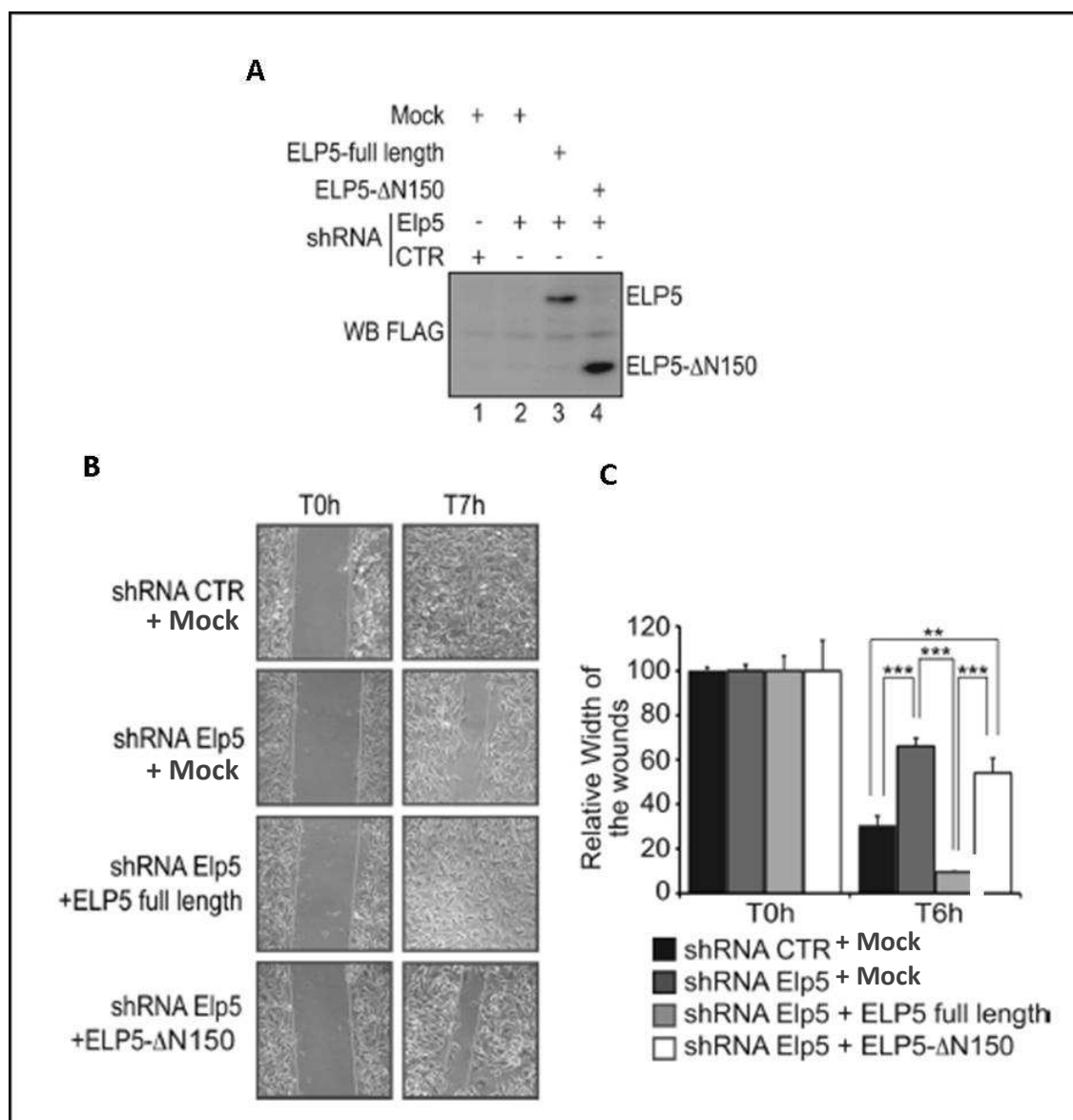


Figure 45. Relation entre la structure et la fonction d'Elp5 au sein d'Elongator.

A) WB réalisé avec un anticorps anti-FLAG, sur les extraits cellulaires collectés après le « *wound healing assay* » des cellules B16-F10 déficientes ou non pour Elp5 et transfectées soit avec le vecteur d'expression codant pour la protéine Elp5 sauvage, soit avec un vecteur vide (Mock), soit avec le mutant ELP5-ΔN150, ayant perdu les 150 premiers acides aminés et n'interagissant plus avec les autres sous-unités d'Elongator. B) « *Wound healing assay* » réalisé avec des cellules B16-F10 déficientes ou non pour Elp5 et transfectées soit avec le vecteur ELP5 codant pour la protéine sauvage (ELP5-full length), soit avec un vecteur vide (Mock), soit avec ELP5-ΔN150. Les photos sont prises aux temps indiqués. C) Quantification des résultats. Pour chaque condition expérimentale, la largeur de la brèche a été fixée à 100% au temps 0 et la largeur de la brèche au temps suivant est exprimée par rapport à cette valeur. L'expérience a été réalisée trois fois (valeur moyenne +/- écart-type). Les photos montrent les résultats d'un test représentatif.

3. Conclusions

Dans la première partie de notre travail, nous avons identifié DERP6 et C3ORF75 comme étant respectivement les sous-unités ELP5 et ELP6 du complexe Elongator humain. Ces sous-unités, tout comme les autres protéines du complexe, sont majoritairement localisées dans le

cytoplasme. Nous avons démontré qu'ELP5 est essentiel pour l'intégrité du complexe en assurant une interaction optimale entre les sous-unités ELP3 et ELP4.

La seconde partie de nos résultats porte sur l'étude de la contribution d'Elongator dans les capacités migratoires des cellules cancéreuses. Etant donné qu'Elongator intervient dans la migration de plusieurs types cellulaires (Close et al., 2006), nous avons utilisé des cellules issues de mélanome murin déficientes pour Elongator comme modèle cellulaire. Grâce au « *wound healing assay* », nous avons montré que l'inactivation des sous-unités Elp1, Elp3, Elp5 ou Elp6 affecte la migration cellulaire dans les cellules cancéreuses B16-F10. La protéine Elp5 doit interagir avec les autres protéines du complexe pour restaurer le défaut de migration observé dans les cellules B16-F10 déficientes pour cette sous-unité. De plus, nous avons pu mettre à jour le rôle d'Elongator dans le pouvoir transformant des B16-F10 par un test de « *soft agar* », ainsi que son rôle dans le pouvoir invasif de ces cellules grâce à une culture en 3D. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus ne sont pas encore identifiés.

Discussion et perspectives

Nous décrivons ici l'identification et la caractérisation des deux sous-unités humaines du complexe Elongator encore inconnues lorsque nous avons commencé ce travail. Ces protéines, préalablement nommées DERP6 et C3ORF75, s'avèrent être respectivement ELP5 et ELP6. Nous avons montré que des cellules déficientes pour Elp5 et Elp6 présentent le même phénotype que celui observé précédemment pour Elp1 et Elp3, c'est-à-dire, une déficience dans le processus de migration, une dérégulation de la croissance indépendante d'ancrage et un déficit d'invasion dans une matrice de collagène. Nos résultats montrent également que la sous-unité ELP5 intervient dans la migration cellulaire au moins en permettant l'interaction entre les sous-unités ELP3 et ELP4. Nos données renforcent la notion que les sous-unités ELP1 à ELP6 agissent en un seul complexe pour réguler la migration cellulaire et la croissance indépendante d'ancrage. Elles fournissent également de nouvelles informations par rapport à la structure et à la fonction de ce complexe acétyltransférase.

1. Structure du complexe Elongator

Le complexe Elongator est composé de deux sous-complexes, le premier est nommé « core », il contient les sous-unités ELP1 à ELP3 et possède une activité acétyltransférase. Le deuxième sous-complexe est nommé « HAP », il comprend les sous-unités ELP4 à ELP6 (Krogan and Greenblatt, 2001; Li et al., 2001; Winkler et al., 2001). Le sous-complexe « HAP » a récemment été décrit comme une ATPase hexamérique de type RecA (Glatt et al., 2012; Lin et al., 2012). Différentes équipes ont déjà réalisés des études afin de mettre en évidence la relation entre la structure et la fonction d'Elongator. Des expériences de co-immunoprécipitation ont notamment démontré que les sous-unités Elp1 et Elp3 sont requises pour l'intégrité structurelle du complexe Elongator (Fichtner et al., 2002b; Petrakis et al., 2004). De plus, la sous-unité ELP3 est fortement déstabilisée après la perte d'expression de la protéine ELP1, ce qui confirme que cette dernière est cruciale pour l'assemblage d'Elongator en un complexe fonctionnel chez la levure, mais également chez l'homme (Close et al., 2006; Petrakis et al., 2004). En plus de son domaine HAT en C-terminal, la sous-unité Elp3 de levure possède un cluster FeS du côté N-terminal. Ce cluster n'a pas d'activité catalytique décrite mais il est nécessaire pour l'intégrité d'Elongator chez la levure (Greenwood et al., 2009). Notons que la mutation du domaine HAT d'Elp3 ne perturbe pas l'intégrité du complexe Elongator (Li et al., 2009). Dans des souches de levure mutées pour le gène *ELP2*, Petrakis et

al. ont montré qu'Elp1 pouvait toujours interagir avec les autres sous-unités du complexe. Ces données montrent qu'Elp2 n'est pas nécessaire pour l'intégrité fonctionnelle d'Elongator (Petrakis et al., 2004) et ces résultats ont été confirmés par Li et al. (Li et al., 2009). Nous pouvons noter qu'il est impossible de reconstituer un complexe actif en mélangeant les deux sous-complexes *in vitro*, ce qui indique que la dissociation du complexe est fonctionnellement irréversible (Winkler et al., 2002).

Nous montrons ici qu'ELP5 s'associe à ELP1 et ELP3, mais il permet également l'association entre ELP3 et ELP4. Nos données suggèrent que cette sous-unité assure l'intégrité et la fonction d'Elongator. Au vu des résultats parfois contradictoires dans la littérature concernant les interactions protéines-protéines du complexe chez la levure (Tableau 3), il serait également intéressant de générer des cellules humaines déficientes pour d'autres sous-unités du complexe (par exemple : Elp2 et Elp4) et d'observer après IP quelles interactions subsistent, afin d'identifier clairement la structure du complexe. Ces données pourraient également être fournies par cristallographie.

Tableau 3. Interaction connue entre les différentes sous-unités d'Elongator chez la levure et chez l'homme.

Interaction	Conclusion	Cellule	Référence
Elp1 et Elp2	Indépendante d'Elp3	Humaine	Kim et al., 2002
	Dépendante d'Elp3	Levure	Fichtner et al., 2002 ; Petrakis et al., 2004
Elp1 et Elp3	Indépendante d'Elp2	Humaine	Kim et al., 2002
	Indépendante d'Elp2	Levure	Fichtner et al., 2002 ; Frohloff et al., 2003 ; Petrakis et al., 2004
	Indépendante d'Elp5	Humaine	(Close et al., 2012)
Elp2 et Elp3	Dépendante d'Elp1	Humaine	Kim et al., 2002
	Indépendante d'Elp1	Levure	Li et al., 2009
	Dépendante d'Elp1	Levure	Frohloff et al., 2003
Elp1 et Elp4	Dépendante d'Elp3	Levure	Petrakis et al., 2004
	Indépendante d'Elp3	Levure	Li et al., 2009
Elp1 et Elp5	Dépendante d'Elp3	Levure	Petrakis et al., 2004
	Indépendante d'Elp3	Levure	Li et al., 2009

Elp1 et Elp6	Dépendante d'Elp3	Levure	Petrakis et al., 2004
	Indépendante d'Elp3	Levure	Li et al., 2009
Elp2 et Elp5	Dépendante d'Elp3	Levure	Fichtner et al., 2002
	Dépendante d'Elp1, Elp4 et Elp6	Levure	Frohloff et al., 2003
Elp3 et Elp5	Indépendante d'Elp2	Levure	Fichtner et al., 2002 ; Frohloff et al., 2003
	Dépendante d'Elp1	Levure	Frohloff et al., 2003
Elp3 et Elp4	Indépendante d'Elp5 et Elp6	Levure	Petrakis et al., 2004
	Dépendante d'Elp5	Humaine	Close et al., 2012
Elp4 et Elp6	Indépendante d'Elp5	Levure	Petrakis et al., 2004

Nos résultats montrent d'une part que l'association entre ELP5 et ELP1/ELP3 nécessite les acides aminés 101 à 150 et les acides aminés 166 à 216. D'autre part, nous avons montré que l'interaction entre ELP5 et ELP4 nécessite également deux domaines : les acides aminés 1 à 50 et les acides aminés 217 à 266. La portion C-terminale d'ELP5 est hautement conservée au cours de l'évolution (Fig.27 A et 46) et elle est localisée après le domaine d'interaction avec les sous-unités ELP1 et ELP3 (Fig.44 B et 46). Toutefois, le motif requis pour l'association entre ELP5 et ELP4 inclut quelques-uns de ces résidus hautement conservés (Fig.46).

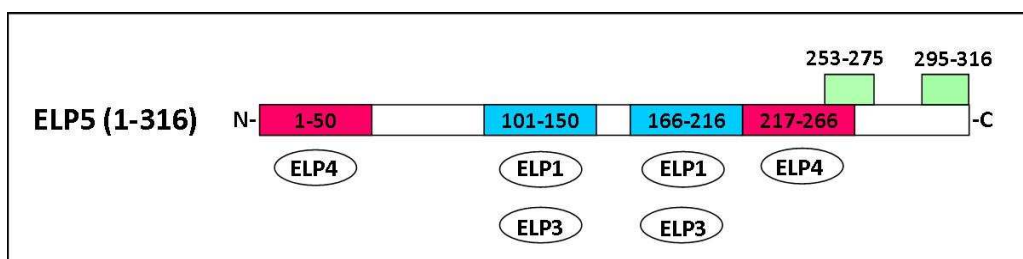


Figure 46. Domaines d'interaction d'ELP5 avec les autres sous-unités d'Elongator.

La protéine ELP5 humaine contient 316 acides aminés. Elle possède deux domaines d'interaction avec ELP4 (acides aminés 1 à 50 et 217 à 266, colorés en roses). Les domaines d'association avec les sous-unités ELP1 ou ELP3 sont représentés en bleu (acides aminés 101 à 150 et 166 à 216). Les acides aminés hautement conservés au cours de l'évolution sont représentés en vert (acides aminés 253 à 275 et 295 à 316).

Les derniers acides aminés, hautement conservés, d'ELP5 ne sont pas nécessaires pour l'interaction avec les sous-unités ELP1, ELP3 et ELP4. Ces résultats suggèrent qu'ELP5 pourrait avoir une fonction qui va au-delà de sa capacité à connecter les sous-unités d'Elongator.

Récemment, une étude réalisée chez la levure montre que l'acide glutamique 61 (E61) et l'acide aspartique 107 (D107) d'Elp5 sont des résidus critiques pour l'activité enzymatique ATPase permettant de libérer l'ARNt modifié (Glatt et al., 2012). De façon surprenante, ces résidus, de même que ceux qui les entourent, sont peu conservés au cours de l'évolution. Par contre, D107 est un acide aminé présent dans le premier motif de liaison d'ELP5 à ELP1 et ELP3. Chez la levure, la sous-unité Elp5 n'interagit pas directement avec Elp4, mais par l'intermédiaire d'Elp6 (Lin et al., 2012). Cette interaction pourrait être explorée chez l'homme par des expériences d'IP de la sous-unité ELP4 ou ELP5 dans des extraits de cellules déficientes pour ELP6. Différents travaux sont nécessaires afin de comprendre comment les deux sous-complexes s'assemblent. D'autre part, il serait également intéressant d'étudier le sous-complexe HAP humain afin de déterminer si celui-ci possède une activité enzymatique ATPase et dans l'affirmative, de voir si celle-ci est impliquée dans la fonction régulatrice d'Elongator au niveau de la migration et/ou du pouvoir transformant.

2. Régulation du complexe Elongator

La localisation cellulaire d'Elongator pourrait être régulée par acétylation, tout comme PCAF, une acétyltransférase nucléaire (Blanco-Garcia et al., 2009). En effet, PCAF possède un domaine NLS comprenant cinq lysines pouvant être acétylées par PCAF elle-même dans des conditions non encore élucidées. L'acétylation de ces lysines régule la localisation cellulaire de PCAF (Santos-Rosa et al., 2003). D'autre part, la localisation cellulaire et l'activité enzymatique de l'histone déacétylase HDAC6 sont également régulées par acétylation (Liu et al., 2012). De la même façon, des lysines présentes sur l'une ou l'autre sous-unité d'Elongator pourraient réguler la localisation et/ou l'activité d'Elongator. En effet, via le site « PhosphoSitePlus » qui reprend toutes les modifications post-traductionnelles identifiées par spectrométrie de masse, on peut voir qu'ELP4 et DERP6/ELP5 posséderaient au moins une lysine acétylée *in vivo* (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>). La mutation de ces lysines combinée à des expériences d'IF et/ou d'IP permettrait de déterminer dans quelle mesure la localisation ou la régulation du complexe Elongator dépendrait de l'acétylation, voire auto-acétylation.

3. Elongator dans les pathologies neurodégénératives

Nos résultats fournissent des informations quant au rôle biologique de DERP6/ELP5, une protéine précédemment décrite comme étant un régulateur positif de p53 (Yuan et al., 2006). Notre laboratoire a antérieurement montré qu'une perte de fonction d'Elongator stabilise faiblement p53 dans des cellules dérivées du cancer du côlon, les HCT116. Par contre, elle ne modifie pas le niveau de phosphorylation de p53 suite à l'induction de dommages à l'ADN (Cornez et al., 2008). Certains gènes cibles de p53 sont exprimés de façon aberrante suite à la perte d'Elongator, ce qui indique que ce complexe protège les cellules de l'expression inappropriée de gènes dépendants de p53 plutôt que de promouvoir l'activation de p53 (Cornez et al., 2008). De plus, une récente étude chez la drosophile indique qu'Elongator interviendrait comme régulateur positif dans la cascade de signalisation InR-TOR (*Insulin Receptor-Target Of Rapamycin*) laquelle intervient dans la régulation de la croissance et de la mort cellulaire. La mutation du gène poly, codant pour l'homologue d'Elp6 chez la drosophile, conduit à une augmentation de l'autophagie et de la mort cellulaire par apoptose dans les larves (Bolukbasi et al., 2012). En outre, notre laboratoire a montré précédemment que l'expression de la becline-1 est diminuée dans des cellules HeLa suite à la perte de fonction d'Elongator (Close et al., 2006). La becline-1 est une protéine importante dans la régulation de l'autophagie (Liang et al., 1999) et elle est essentielle pour le développement embryonnaire (Yue et al., 2003). Une activité autophagique anormale est fréquemment observée dans les populations de neurones affectés par les maladies neurodégénératives communes, telles qu'Alzheimer, Parkinson, Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Son et al., 2012). La perte de fonction d'Elongator résulte en un désordre neurodéveloppemental et neurodégénératif, la dysautonomie familiale, où la mort cellulaire précoce ou excessive est observée (Pearson et al., 1978). Ce phénotype plaide pour l'hypothèse qu'une augmentation de la mort cellulaire peut résulter d'une déficience de ce complexe. Toutefois, à l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si cette pathologie résulte d'une dérégulation de l'autophagie et/ou de la fonction de p53. Cependant, Elongator semble intervenir comme un régulateur négatif plutôt qu'un régulateur positif de p53.

Etant donné que les pathologies neurodégénératives précitées présentent également un défaut du trafic intracellulaire et que celui-ci joue un rôle crucial dans le développement neuronal, la dysautonomie familiale pourrait également résulter d'un défaut d'acétylation de

la tubuline- α suite à la perte de fonction d'Elongator (Creppe et al., 2009). De plus amples études sont nécessaires afin d'identifier les processus affectés par la perte de fonction d'Elongator, notamment au niveau du système nerveux et pour découvrir de nouvelles cibles potentielles de ce complexe. A cette fin, notre laboratoire a débuté l'étude de l'acétylome d'Elongator dans différents types cellulaires et la confirmation des substrats potentiels est en cours. Dans la lignée de mélanome murin B16-F10, USP33 (*Ubiquitin-Specific Protease 33*) pourrait être l'une des cibles d'Elongator. Parmi les substrats d'USP33, il y a la β -arrestine 2, une molécule adaptatrice multi-fonctionnelle qui agit en aval des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR). USP33 agit sur la β -arrestine, il intervient dans la terminaison du signal induit par l'activation du récepteur β 2AR (*β 2-Adrenergic Receptor*), ainsi que dans le recyclage de ce récepteur (Shenoy et al., 2009). Un autre substrat d'USP33 est le récepteur de la protéine Slit : Robo1 (*Roundabout*) (Yuasa-Kawada et al., 2009). Ces dernières protéines interviennent dans la guidance neuronale (Brose et al., 1999) et dans la migration de cellules cancéreuses (Yuasa-Kawada et al., 2009). Nos résultats préliminaires montrent par WB que la protéine USP33 est stabilisée en l'absence du complexe Elongator fonctionnel. De plus, la perte de fonction d'USP33 dans les cellules B16-F10 conduit à un défaut de migration. Nous étudions actuellement la relation qui existerait entre la dégradation d'USP33 et son acétylation par Elongator. Notre hypothèse est qu'Elongator acétyle USP33, ce qui conduirait à sa polyubiquitination et à sa dégradation.

Elongator dans le cancer et l'invasion métastatique

Nos résultats révèlent que les cellules dérivées de mélanome murin déficientes pour Elongator forment peu de colonies en agar mou. Par conséquent, ce complexe favorise la croissance et/ou la survie de ces cellules de façon indépendante à l'ancrage. Le mécanisme moléculaire qui implique Elongator dans la transformation cellulaire n'est pas encore connu, mais il est possible qu'Elongator soit impliqué dans les premières étapes de ce processus. Nous investiguons en ce moment le rôle de différentes sous-unités de ce complexe dans le développement et la progression tumorale. A cette fin, nous utilisons notamment un modèle de xénogreffe. Des cellules issues de mélanome murin (B16-F10-FI) ont été injectées dans la veine caudale de souris. Ces cellules expriment la luciférase et sont déficientes ou non pour Elp1. Les cellules peuvent être visualisées grâce à l'utilisation d'un appareil nommé le Xénogén, suite à l'injection de luciférine, le substrat de la luciférase, qui va émettre de la

luminescence. Les cellules tumorales B16-F10 ont la capacité de coloniser les poumons. Des résultats préliminaires montrent un retard dans le développement tumoral après 18 jours, dans les poumons des souris injectées avec les cellules déficientes pour Elongator, par rapport aux souris injectées avec des cellules contrôles. Ces résultats sont à confirmer avec des lignées cellulaires déficientes pour d'autres sous-unités d'Elongator afin d'attester l'implication de celui-ci dans le développement tumoral.

L'étude du rôle d'Elongator dans un modèle d'invasion cellulaire en 3D nous a permis d'identifier une nouvelle fonction pour ce complexe. En effet, Elongator est impliqué dans le pouvoir invasif des cellules issues de mélanome murin *in vitro*. Toutefois, le mécanisme moléculaire n'est pas encore identifié. Il serait intéressant d'explorer le rôle d'Elongator dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Par exemple, nous pourrions étudier le niveau d'expression de l'E-cadhérine suite à la perte de fonction d'Elongator. En effet, les cellules issues de mélanome invasif ont la caractéristique de ne plus exprimer l'E-cadhérine (Lopez-Bergami et al., 2008). Or, la perte d'expression de cette protéine est le point de départ de l'invasion métastatique (Derksen et al., 2006; Perl et al., 1998).

Au niveau du processus migratoire, de nombreuses pistes peuvent également être explorées. Nous pourrions étudier l'implication d'Elongator dans la première étape du processus de migration : la polarisation cellulaire (Etienne-Manneville, 2004b; Itoh et al., 2002). Il serait intéressant d'analyser le niveau d'expression, la localisation ou le niveau d'activation de Cdc42 en absence d'Elongator. Nous pourrions également analyser le rôle d'Elongator sur des molécules impliquées dans l'association et la dissociation des complexes d'adhérence, comme par exemple la protéine PTEN. Car, la perte de fonction de cette protéine entraîne l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation de la prolifération cellulaire. De plus, cette phosphatase est souvent inactivée dans les cancers dont les mélanomes (Miller and Mihm, 2006), ce qui fait que cette protéine un candidat intéressant pour les thérapies anti-cancéreuses. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le processus de migration cellulaire nécessite la rétractation de l'arrière de la cellule. Lors de cette étape, les intégrines sont recyclées (Ballestrem et al., 2001) par un mécanisme d'endocytose et les vésicules se déplacent le long des MTs (Proux-Gillardeaux et al., 2005). Pour rappel, ce mouvement est favorisé par l'acétylation des MTs (Dompierre et al., 2007; Reed et al., 2006) et Elongator est l'une des acétyltransférases des MTs (Creppe et al., 2009). L'observation moléculaire du phénomène de rétractation et plus précisément du recyclage des intégrines dans des cellules

déficientes pour Elongator pourrait nous fournir de précieuses informations qui permettraient peut-être de lier les événements impliqués dans le cancer et dans les pathologies neurodégénératives.

Bibliographie

- Albiges-Rizo, C., Frachet, P., and Block, M.R. (1995). Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci* *108 (Pt 10)*, 3317-3329.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhatter, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* *131*, 633-636.
- Anderson, S.L., Coli, R., Daly, I.W., Kichula, E.A., Rork, M.J., Volpi, S.A., Ekstein, J., and Rubin, B.Y. (2001). Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am J Hum Genet* *68*, 753-758.
- Ansieau, S., Courtois-Cox, S., Morel, A.P., and Puisieux, A. (2011). Failsafe program escape and EMT: a deleterious partnership. *Semin Cancer Biol* *21*, 392-396.
- Atta, M., Mulliez, E., Arragain, S., Forouhar, F., Hunt, J.F., and Fontecave, M. (2010). S-Adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules. *Curr Opin Struct Biol* *20*, 684-692.
- Axelrod, F.B. (2004). Familial dysautonomia. *Muscle Nerve* *29*, 352-363.
- Baker, S.P., and Grant, P.A. (2007). The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* *26*, 5329-5340.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* *280*, 26729-26734.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B.A., and Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* *155*, 1319-1332.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., and Imhof, B.A. (2000). Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell* *11*, 2999-3012.
- Barneda-Zahonero, B., and Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* *6*, 579-589.
- Barton, D., Braet, F., Marc, J., Overall, R., and Gardiner, J. (2009). ELP3 localises to mitochondria and actin-rich domains at edges of HeLa cells. *Neurosci Lett* *455*, 60-64.
- Bergen, L.G., and Borisy, G.G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J Cell Biol* *84*, 141-150.
- Berndsen, C.E., and Denu, J.M. (2008). Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* *18*, 682-689.

- Berndsen, C.E., Selleck, W., McBryant, S.J., Hansen, J.C., Tan, S., and Denu, J.M. (2007). Nucleosome recognition by the Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex. *Biochemistry* *46*, 2091-2099.
- Berndsen, C.E., Tsubota, T., Lindner, S.E., Lee, S., Holton, J.M., Kaufman, P.D., Keck, J.L., and Denu, J.M. (2008). Molecular functions of the histone acetyltransferase chaperone complex Rtt109-Vps75. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 948-956.
- Berrier, A.L., and Yamada, K.M. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* *213*, 565-573.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* *404*, 1007-1011.
- Blanco-Garcia, N., Asensio-Juan, E., de la Cruz, X., and Martinez-Balbas, M.A. (2009). Autoacetylation regulates P/CAF nuclear localization. *J Biol Chem* *284*, 1343-1352.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 769-784.
- Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 450-462.
- Bolukbasi, E., Vass, S., Cobbe, N., Nelson, B., Simossis, V., Dunbar, D.R., and Heck, M.M.S. (2012). *Drosophila* poly suggests a novel role for the Elongator complex in insulin receptor-target of rapamycin signalling. *Open Biology* *2*, 110031-110031.
- Boone, N., Loriod, B., Bergon, A., Sbai, O., Formisano-Treziny, C., Gabert, J., Khrestchatsky, M., Nguyen, C., Feron, F., Axelrod, F.B., *et al.* (2010). Olfactory stem cells, a new cellular model for studying molecular mechanisms underlying familial dysautonomia. *PLoS One* *5*, e15590.
- Bretscher, M.S. (1992). Cells can use their transferrin receptors for locomotion. *EMBO J* *11*, 383-389.
- Bretscher, M.S., and Aguado-Velasco, C. (1998). Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 537-541.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* *96*, 795-806.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S., and Workman, J.L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* *292*, 2333-2337.
- Brown, M.C., and Turner, C.E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* *84*, 1315-1339.

- Buchwald, M., Kramer, O.H., and Heinzl, T. (2009). HDACi--targets beyond chromatin. *Cancer Lett* 280, 160-167.
- Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153-158.
- Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559-1564.
- Chan, H.M., and La Thangue, N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-2373.
- Chen, C., Huang, B., Eliasson, M., Ryden, P., and Bystrom, A.S. (2011). Elongator complex influences telomeric gene silencing and DNA damage response by its role in wobble uridine tRNA modification. *PLoS Genet* 7, e1002258.
- Chen, C., Tuck, S., and Bystrom, A.S. (2009a). Defects in tRNA modification associated with neurological and developmental dysfunctions in *Caenorhabditis elegans* elongator mutants. *PLoS Genet* 5, e1000561.
- Chen, L.F., Mu, Y., and Greene, W.C. (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* 21, 6539-6548.
- Chen, Y.T., Hims, M.M., Shetty, R.S., Mull, J., Liu, L., Leyne, M., and Slaugenhaupt, S.A. (2009b). Loss of mouse Ikbkap, a subunit of elongator, leads to transcriptional deficits and embryonic lethality that can be rescued by human IKBKAP. *Mol Cell Biol* 29, 736-744.
- Chen, Z., Zhang, H., Jablonowski, D., Zhou, X., Ren, X., Hong, X., Schaffrath, R., Zhu, J.K., and Gong, Z. (2006). Mutations in ABO1/ELO2, a subunit of holo-Elongator, increase abscisic acid sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* 26, 6902-6912.
- Chinenov, Y. (2002). A second catalytic domain in the Elp3 histone acetyltransferases: a candidate for histone demethylase activity? *Trends Biochem Sci* 27, 115-117.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
- Close, P., Creppe, C., Gillard, M., Ladang, A., Chapelle, J.P., Nguyen, L., and Chariot, A. (2010). The emerging role of lysine acetylation of non-nuclear proteins. *Cell Mol Life Sci* 67, 1255-1264.
- Close, P., Gillard, M., Ladang, A., Jiang, Z., Papuga, J., Hawkes, N., Nguyen, L., Chapelle, J.P., Bouillenne, F., Svejstrup, J., *et al.* (2012). DERP6 (ELP5) and C3ORF75 (ELP6) regulate tumorigenicity and migration of melanoma cells as subunits of Elongator. *J Biol Chem*.
- Close, P., Hawkes, N., Cornez, I., Creppe, C., Lambert, C.A., Rogister, B., Siebenlist, U., Merville, M.P., Slaugenhaupt, S.A., Bours, V., *et al.* (2006). Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol Cell* 22, 521-531.

- Cohen, L., Henzel, W.J., and Baeuerle, P.A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* 395, 292-296.
- Coli, R., Anderson, S.L., Volpi, S.A., and Rubin, B.Y. (2001). Genomic organization and chromosomal localization of the mouse IKBKAP gene. *Gene* 279, 81-89.
- Collum, R.G., Brutsaert, S., Lee, G., and Schindler, C. (2000). A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10120-10125.
- Cornez, I., Creppe, C., Gillard, M., Henuy, B., Chapelle, J.P., Dejardin, E., Merville, M.P., Close, P., and Chariot, A. (2008). Deregulated expression of pro-survival and pro-apoptotic p53-dependent genes upon Elongator deficiency in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 75, 2122-2134.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., *et al.* (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136, 551-564.
- Cuajungco, M.P., Leyne, M., Mull, J., Gill, S.P., Gusella, J.F., and Slaugenhaupt, S.A. (2001). Cloning, characterization, and genomic structure of the mouse Ikbkap gene. *DNA Cell Biol* 20, 579-586.
- de Forges, H., Bouissou, A., and Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 266-274.
- Deribe, Y.L., Wild, P., Chandrashaker, A., Curak, J., Schmidt, M.H., Kalaidzidis, Y., Milutinovic, N., Kratchmarova, I., Buerkle, L., Fetchko, M.J., *et al.* (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci Signal* 2, ra84.
- Derksen, P.W., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J.R., Griffioen, A.W., Vink, J., Krimpenfort, P., *et al.* (2006). Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 10, 437-449.
- Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.
- Doillon, C.J., Gagnon, E., Paradis, R., and Koutsilieris, M. (2004). Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity. *Anticancer Res* 24, 2169-2177.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571-3583.
- Downing, K.H., and Nogales, E. (1998). Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Curr Opin Struct Biol* 8, 785-791.

Drake, P.J., Griffiths, G.J., Shaw, L., Benson, R.P., and Corfe, B.M. (2009). Application of high-content analysis to the study of post-translational modifications of the cytoskeleton. *J Proteome Res* 8, 28-34.

Esberg, A., Huang, B., Johansson, M.J., and Bystrom, A.S. (2006). Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis. *Mol Cell* 24, 139-148.

Etienne-Manneville, S. (2004a). Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5, 470-477.

Etienne-Manneville, S. (2004b). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117, 1291-1300.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 67-72.

Evers, E.E., Zondag, G.C., Malliri, A., Price, L.S., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* 36, 1269-1274.

Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2000). The Elp2 subunit of elongator and elongating RNA polymerase II holoenzyme is a WD40 repeat protein. *J Biol Chem* 275, 12896-12899.

Fichtner, L., Frohloff, F., Burkner, K., Larsen, M., Breunig, K.D., and Schaffrath, R. (2002a). Molecular analysis of KTI12/TOT4, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol Microbiol* 43, 783-791.

Fichtner, L., Frohloff, F., Jablonowski, D., Stark, M.J., and Schaffrath, R. (2002b). Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* Elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Microbiol* 45, 817-826.

Fichtner, L., Jablonowski, D., Schierhorn, A., Kitamoto, H.K., Stark, M.J., and Schaffrath, R. (2003). Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol* 49, 1297-1307.

Fidler, I.J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 35, 218-224.

Frohloff, F., Fichtner, L., Jablonowski, D., Breunig, K.D., and Schaffrath, R. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Embo J* 20, 1993-2003.

Frohloff, F., Jablonowski, D., Fichtner, L., and Schaffrath, R. (2003). Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA polymerase II elongator (gamma-toxin target (TOT)) complex. *J Biol Chem* 278, 956-961.

- Fuchs, E., and Cleveland, D.W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.
- Funasaka, K., Ito, S., Hasegawa, H., Goldberg, G.S., Hirooka, Y., Goto, H., Hamaguchi, M., and Senga, T. (2010). Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization during cell migration in response to wound healing. *FEBS J* 277, 3502-3513.
- Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.
- Gao, Z., He, Q., Peng, B., Chiao, P.J., and Ye, J. (2006). Regulation of nuclear translocation of HDAC3 by I κ B α is required for tumor necrosis factor inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function. *J Biol Chem* 281, 4540-4547.
- Gardiner, J., Barton, D., Marc, J., and Overall, R. (2007). Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic* 8, 1145-1149.
- Geiger, T.R., and Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1796, 293-308.
- Gilbert, C., Kristjuhan, A., Winkler, G.S., and Svejstrup, J.Q. (2004). Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell* 14, 457-464.
- Glatt, S., Letoquart, J., Faux, C., Taylor, N.M., Seraphin, B., and Muller, C.W. (2012). The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase. *Nat Struct Mol Biol* 19, 314-320.
- Gobeil, S., Zhu, X., Doillon, C.J., and Green, M.R. (2008). A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev* 22, 2932-2940.
- Goldman, R.D., Chou, Y.H., Prahlad, V., and Yoon, M. (1999). Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J* 13 Suppl 2, S261-265.
- Grant, S., Easley, C., and Kirkpatrick, P. (2007). Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov* 6, 21-22.
- Greenwood, C., Selth, L.A., Dirac-Svejstrup, A.B., and Svejstrup, J.Q. (2009). An iron-sulfur cluster domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *J Biol Chem* 284, 141-149.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338, 17-31.
- Gundersen, G.G., and Cook, T.A. (1999). Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 11, 81-94.
- Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.

Haigis, M.C., and Guarente, L.P. (2006). Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20, 2913-2921.

Hamburger, A.W., and Salmon, S.E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.

Hammond, J.W., Cai, D., and Verhey, K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20, 71-76.

Han, Q., Hou, X., Su, D., Pan, L., Duan, J., Cui, L., Huang, B., and Lu, J. (2007). hELP3 subunit of the Elongator complex regulates the transcription of HSP70 gene in human cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39, 453-461.

Han, Q., Lu, J., Duan, J., Su, D., Hou, X., Li, F., Wang, X., and Huang, B. (2008). Gcn5- and Elp3-induced histone H3 acetylation regulates hsp70 gene transcription in yeast. *Biochem J* 409, 779-788.

Hartman, H.B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T., and Lazar, M.A. (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep* 6, 445-451.

Hawkes, N.A., Otero, G., Winkler, G.S., Marshall, N., Dahmus, M.E., Krappmann, D., Scheidereit, C., Thomas, C.L., Schiavo, G., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2002). Purification and characterization of the human elongator complex. *J Biol Chem* 277, 3047-3052.

Heng, J.I., Chariot, A., and Nguyen, L. (2010). Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Trends Neurosci* 33, 38-47.

Hims, M.M., Shetty, R.S., Pickel, J., Mull, J., Leyne, M., Liu, L., Gusella, J.F., and Slaugenhaupt, S.A. (2007). A humanized IKBKAP transgenic mouse models a tissue-specific human splicing defect. *Genomics* 90, 389-396.

Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 5528-5540.

Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M., Strickland, D.K., and Trowbridge, I.S. (1994). In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J Cell Biol* 125, 1265-1274.

Huang, B., Johansson, M.J., and Bystrom, A.S. (2005). An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 11, 424-436.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.

Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581.

- Huber, M.A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548-558.
- Hunnicut, B.J., Chaverra, M., George, L., and Lefcort, F. (2012). IKAP/Elp1 Is Required In Vivo for Neurogenesis and Neuronal Survival, but Not for Neural Crest Migration. *PLoS One* 7, e32050.
- Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216-1219.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Yamada, H., Kishimoto, I., Yamaguchi, S., Nakano, S., Katoh, M., Ito, H., and Oshimura, M. (2007). SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene* 26, 945-957.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22, 6582-6591.
- Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I.H., Janda, E., Ludemann, S., Waerner, T., Seither, P., Weith, A., Beug, H., and Kraut, N. (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22, 7155-7169.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rudiger, M., Schluter, K., Stanke, G., and Winkler, J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 379-416.
- Johansen, L.D., Naumanen, T., Knudsen, A., Westerlund, N., Gromova, I., Junttila, M., Nielsen, C., Bottzauw, T., Tolkovsky, A., Westermarck, J., *et al.* (2008). IKAP localizes to membrane ruffles with filamin A and regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *J Cell Sci* 121, 854-864.
- Johnson, S.A., and Hunter, T. (2005). Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* 2, 17-25.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120, 1955-1958.
- Kaplan, R.N., Rafii, S., and Lyden, D. (2006). Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 66, 11089-11093.
- Kim, G.W., Gocevski, G., Wu, C.J., and Yang, X.J. (2010a). Dietary, metabolic, and potentially environmental modulation of the lysine acetylation machinery. *Int J Cell Biol* 2010, 632739.
- Kim, J.H., Lane, W.S., and Reinberg, D. (2002). Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1241-1246.

- Kim, J.Y., Shen, S., Dietz, K., He, Y., Howell, O., Reynolds, R., and Casaccia, P. (2010b). HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci* *13*, 180-189.
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., *et al.* (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* *23*, 607-618.
- Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., and Mizuno, K. (2007). Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J Cell Biol* *177*, 465-476.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Elgar, G., and van Heyningen, V. (2002). Characterization of a novel gene adjacent to PAX6, revealing synteny conservation with functional significance. *Mamm Genome* *13*, 102-107.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Schedl, A., Quinlan, R.A., Danes, S., and van Heyningen, V. (2001). Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum Mol Genet* *10*, 2049-2059.
- Kouskouti, A., and Talianidis, I. (2005). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J* *24*, 347-357.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* *18*, 601-607.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* *15*, 1942-1952.
- Krappmann, D., Hatada, E.N., Tegethoff, S., Li, J., Klippel, A., Giese, K., Baeuerle, P.A., and Scheidereit, C. (2000). The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem* *275*, 29779-29787.
- Kristjuhan, A., Walker, J., Suka, N., Grunstein, M., Roberts, D., Cairns, B.R., and Svejstrup, J.Q. (2002). Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell* *10*, 925-933.
- Krogan, N.J., and Greenblatt, J.F. (2001). Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *21*, 8203-8212.
- Kumar, L.D., and Clarke, A.R. (2007). Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from in vitro to in vivo applications. *Adv Drug Deliv Rev* *59*, 87-100.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E., and Allis, C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* *12*, 627-639.

Kwiatkowski, D.J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* 11, 103-108.

L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24, 473-478.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.

Lawson, M.A., and Maxfield, F.R. (1995). Ca²⁺- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377, 75-79.

Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.

Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3374-3379.

Leech, S.H., Evans, C.A., Shaw, L., Wong, C.H., Connolly, J., Griffiths, J.R., Whetton, A.D., and Corfe, B.M. (2008). Proteomic analyses of intermediate filaments reveals cytokeratin8 is highly acetylated--implications for colorectal epithelial homeostasis. *Proteomics* 8, 279-288.

Leyne, M., Mull, J., Gill, S.P., Cuajungco, M.P., Oddoux, C., Blumenfeld, A., Maayan, C., Gusella, J.F., Axelrod, F.B., and Slaugenaupt, S.A. (2003). Identification of the first non-Jewish mutation in familial Dysautonomia. *Am J Med Genet A* 118A, 305-308.

Li, F., Lu, J., Han, Q., Zhang, G., and Huang, B. (2005). The Elp3 subunit of human Elongator complex is functionally similar to its counterpart in yeast. *Mol Genet Genomics* 273, 264-272.

Li, Q., Fazly, A.M., Zhou, H., Huang, S., Zhang, Z., and Stillman, B. (2009). The elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents. *PLoS Genet* 5, e1000684.

Li, Y., Takagi, Y., Jiang, Y., Tokunaga, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R.D. (2001). A multiprotein complex that interacts with RNA polymerase II elongator. *J Biol Chem* 276, 29628-29631.

Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.P., and Comb, M.J. (2008). HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem* 283, 12686-12690.

- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672-676.
- Lin, Z., Zhao, W., Diao, W., Xie, X., Wang, Z., Zhang, J., Shen, Y., and Long, J. (2012). Crystal structure of the elongator subcomplex E1p4-6. *J Biol Chem*.
- Liotta, L.A., Rao, C.N., and Barsky, S.H. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* *49*, 636-649.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H., and Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 557-589.
- Liu, S., Thomas, S.M., Woodside, D.G., Rose, D.M., Kiosses, W.B., Pfaff, M., and Ginsberg, M.H. (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* *402*, 676-681.
- Liu, Y., Peng, L., Seto, E., Huang, S., and Qiu, Y. (2012). Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *J Biol Chem* *287*, 29168-29174.
- Lopez-Bergami, P., Fitchman, B., and Ronai, Z. (2008). Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochem Photobiol* *84*, 289-306.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Lucchini, R., and Sogo, J.M. (1995). Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature* *374*, 276-280.
- Marks, P.A., Richon, V.M., and Rifkind, R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* *92*, 1210-1216.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215-230.
- Mathis, D.J., Oudet, P., Wasylyk, B., and Chambon, P. (1978). Effect of histone acetylation on structure and in vitro transcription of chromatin. *Nucleic Acids Res* *5*, 3523-3547.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* *21*, 6820-6831.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 446-454.
- Mattson, M.P. (2003). Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* *2*, 329-342.
- Mehlgarten, C., Jablonowski, D., Wrackmeyer, U., Tschitschmann, S., Sondermann, D., Jager, G., Gong, Z., Bystrom, A.S., Schaffrath, R., and Breunig, K.D. (2010). Elongator function in

tRNA wobble uridine modification is conserved between yeast and plants. *Mol Microbiol* 76, 1082-1094.

Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118, 363-373.

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.

Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., and Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16, 4623-4635.

Miles, C., Elgar, G., Coles, E., Kleinjan, D.J., van Heyningen, V., and Hastie, N. (1998). Complete sequencing of the Fugu WAGR region from WT1 to PAX6: dramatic compaction and conservation of synteny with human chromosome 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13068-13072.

Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355, 51-65.

Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J., and Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J* 18, 5099-5107.

Miskiewicz, K., Jose, L.E., Bento-Abreu, A., Fislage, M., Taes, I., Kasprovicz, J., Swerts, J., Sigrist, S., Versees, W., Robberecht, W., *et al.* (2011). ELP3 controls active zone morphology by acetylating the ELKS family member Bruchpilot. *Neuron* 72, 776-788.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Hideshima, T., Akiyama, M., Chauhan, D., Munshi, N., Gu, X., *et al.* (2004). Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 540-545.

Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J.M., Iwama, T., and Miyaki, M. (1996). p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* 12, 1565-1569.

Nagy, Z., and Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26, 5341-5357.

Naumanen, T., Johansen, L.D., Coffey, E.T., and Kallunki, T. (2008). Loss-of-function of IKAP/ELP1: could neuronal migration defect underlie familial dysautonomia? *Cell Adh Migr* 2, 236-239.

Nelissen, H., De Groeve, S., Fleury, D., Neyt, P., Bruno, L., Bitonti, M.B., Vandenbussche, F., Van der Straeten, D., Yamaguchi, T., Tsukaya, H., *et al.* (2010). Plant Elongator regulates

auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 1678-1683.

Nelissen, H., Fleury, D., Bruno, L., Robles, P., De Veylder, L., Traas, J., Micol, J.L., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Lijsebettens, M. (2005). The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7754-7759.

Nguyen, L., Humbert, S., Saudou, F., and Chariot, A. (2010). Elongator - an emerging role in neurological disorders. *Trends Mol Med* *16*, 1-6.

Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* *147*, 631-644.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995a). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* *23*, 456-459.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53-62.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* *69*, 277-302.

North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* *11*, 437-444.

Nyakern-Meazza, M., Narayan, K., Schutt, C.E., and Lindberg, U. (2002). Tropomyosin and gelsolin cooperate in controlling the microfilament system. *J Biol Chem* *277*, 28774-28779.

Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T., and Zhang, Y. (2010). A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* *463*, 554-558.

Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A.M., Gustafsson, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* *3*, 109-118.

Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S.A., Lowe, D.J., Brick, P., and Onesti, S. (2006). The Elongator subunit Elp3 contains a Fe₄S₄ cluster and binds S-adenosylmethionine. *Mol Microbiol* *59*, 795-806.

Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., and Marks, P.A. (2008). HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 9633-9638.

Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* *116*, 1409-1416.

- Pearson, J., Pytel, B.A., Grover-Johnson, N., Axelrod, F., and Dancis, J. (1978). Quantitative studies of dorsal root ganglia and neuropathologic observations on spinal cords in familial dysautonomia. *J Neurol Sci* 35, 77-92.
- Perdiz, D., Mackeh, R., Pous, C., and Baillet, A. (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* 23, 763-771.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
- Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011, 371832.
- Petrakis, T.G., Wittschieben, B.O., and Svejstrup, J.Q. (2004). Molecular architecture, structure-function relationship, and importance of the Elp3 subunit for the RNA binding of holo-elongator. *J Biol Chem* 279, 32087-32092.
- Piperno, G., and Fuller, M.T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol* 101, 2085-2094.
- Pokholok, D.K., Hannett, N.M., and Young, R.A. (2002). Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell* 9, 799-809.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55, 987-1035.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Pollard, T.D., and Mooseker, M.S. (1981). Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J Cell Biol* 88, 654-659.
- Ponting, C.P. (2002). Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res* 30, 3643-3652.
- Pontrello, C.G., and Ethell, I.M. (2009). Accelerators, Brakes, and Gears of Actin Dynamics in Dendritic Spines. *Open Neurosci J* 3, 67-86.
- Proux-Gillardeaux, V., Gavard, J., Irinopoulou, T., Mege, R.M., and Galli, T. (2005). Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6362-6367.
- Puls, A., Eliopoulos, A.G., Nobes, C.D., Bridges, T., Young, L.S., and Hall, A. (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* 112 (Pt 17), 2983-2992.

- Qian, D.Z., Wang, X., Kachhap, S.K., Kato, Y., Wei, Y., Zhang, L., Atadja, P., and Pili, R. (2004). The histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 inhibits angiogenesis and has a greater antitumor effect in combination with the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* *64*, 6626-6634.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* *265*, 23-32.
- Rahl, P.B., Chen, C.Z., and Collins, R.N. (2005). Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell* *17*, 841-853.
- Rappoport, J.Z., and Simon, S.M. (2003). Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. *J Cell Sci* *116*, 847-855.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* *16*, 2166-2172.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 635-646.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401-410.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704-1709.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* *70*, 81-120.
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* *9*, 640-648.
- Ruiz-Carrillo, A., Wang, L.J., and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* *190*, 117-128.
- Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev* *90*, 259-289.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M., and Khochbin, S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* *90*, 306-312.
- Sadoul, K., Wang, J., Diagouraga, B., and Khochbin, S. (2011). The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol* *2011*, 970382.

Sanders, S.L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A.J., and Weil, P.A. (2002). Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol* 22, 4723-4738.

Santos-Rosa, H., Valls, E., Kouzarides, T., and Martinez-Balbas, M. (2003). Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acids Res* 31, 4285-4292.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.

Schmoranzler, J., Kreitzer, G., and Simon, S.M. (2003). Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci* 116, 4513-4519.

Schwartz, M.A., Schaller, M.D., and Ginsberg, M.H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 549-599.

Seo, J., and Lee, K.J. (2004). Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35-44.

Shahbazian, M.D., and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76, 75-100.

Shenoy, S.K., Modi, A.S., Shukla, A.K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K.D., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6650-6655.

Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem* 72, 693-715.

Shoulders, M.D., and Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929-958.

Simpson, C.L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W.J., Hansen, V.K., van Vught, P.W., Landers, J.E., Sapp, P., Van Den Bosch, L., Knight, J., *et al.* (2009). Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum Mol Genet* 18, 472-481.

Singh, N., Lorbeck, M.T., Zervos, A., Zimmerman, J., and Elefant, F. (2010). The histone acetyltransferase Elp3 plays an active role in the control of synaptic bouton expansion and sleep in *Drosophila*. *J Neurochem*.

Slaughaupt, S.A., Blumenfeld, A., Gill, S.P., Leyne, M., Mull, J., Cuajungco, M.P., Liebert, C.B., Chadwick, B., Idelson, M., Reznik, L., *et al.* (2001). Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 68, 598-605.

Slaughaupt, S.A., and Gusella, J.F. (2002). Familial dysautonomia. *Curr Opin Genet Dev* 12, 307-311.

Slaugenhaupt, S.A., Mull, J., Leyne, M., Cuajungco, M.P., Gill, S.P., Hims, M.M., Quintero, F., Axelrod, F.B., and Gusella, J.F. (2004). Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet* 13, 429-436.

Smith, A.T., Livingston, M.R., Mai, A., Filetici, P., Queener, S.F., and Sullivan, W.J., Jr. (2007). Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-independent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1109-1111.

Solinger, J.A., Paolinelli, R., Kloss, H., Scorza, F.B., Marchesi, S., Sauder, U., Mitsushima, D., Capuani, F., Sturzenbaum, S.R., and Cassata, G. (2010). The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genet* 6, e1000820.

Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.H., Ha, J.Y., and Han, J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* 44, 89-98.

Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., and Kramer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 185-198.

Spiegel, S., Milstien, S., and Grant, S. (2012). Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy. *Oncogene* 31, 537-551.

Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., and Bourne, H.R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160, 375-385.

Steege, P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3, 55-63.

Steinert, P.M., and Roop, D.R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 57, 593-625.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.

Stimson, L., Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Smith, N.F., Raynaud, F.I., Rogers, P., Bavetsias, V., Gorsuch, S., Jarman, M., Bannister, A., *et al.* (2005). Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* 4, 1521-1532.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13182-13187.

Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., and Price, B.D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol* 27, 8502-8509.

Svejstrup, J.Q. (2007). Elongator complex: how many roles does it play? *Curr Opin Cell Biol* 19, 331-336.

- Tang, B.L., and Chua, C.E. (2008). SIRT2, tubulin deacetylation, and oligodendroglia differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 179-182.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 282, 6823-6832.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- Thomas, S.L., Alam, R., Lemke, N., Schultz, L.R., Gutierrez, J.A., and Rempel, S.A. (2010). PTEN augments SPARC suppression of proliferation and inhibits SPARC-induced migration by suppressing SHC-RAF-ERK and AKT signaling. *Neuro Oncol* 12, 941-955.
- Tsubota, T., Berndsen, C.E., Erkmann, J.A., Smith, C.L., Yang, L., Freitas, M.A., Denu, J.M., and Kaufman, P.D. (2007). Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Mol Cell* 25, 703-712.
- Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* 14, 1430-1438.
- Viatour, P., Legrand-Poels, S., van Lint, C., Warnier, M., Merville, M.P., Gielen, J., Piette, J., Bours, V., and Chariot, A. (2003). Cytoplasmic I κ B α increases NF- κ B-independent transcription through binding to histone deacetylase (HDAC) 1 and HDAC3. *J Biol Chem* 278, 46541-46548.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-4919.
- Vidali, G., Boffa, L.C., Bradbury, E.M., and Allfrey, V.G. (1978). Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2239-2243.
- Vigushin, D.M., and Coombes, R.C. (2002). Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 13, 1-13.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N., and Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 408, 495-498.
- Walker, J., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., East, P., McNeill, H., and Svejstrup, J.Q. (2011). Role of elongator subunit Etp3 in *Drosophila melanogaster* larval development and immunity. *Genetics* 187, 1067-1075.
- Waltregny, D., Glenisson, W., Tran, S.L., North, B.J., Verdin, E., Colige, A., and Castronovo, V. (2005). Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α -actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J* 19, 966-968.

- Wang, W., Eddy, R., and Condeelis, J. (2007). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7, 429-440.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
- Wehrle-Haller, B., and Imhof, B.A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 39-50.
- Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* 118, 651-654.
- Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3517-3522.
- Winkler, G.S., Petrakis, T.G., Ethelberg, S., Tokunaga, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2001). RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes. *J Biol Chem* 276, 32743-32749.
- Witta, S.E., Gemmill, R.M., Hirsch, F.R., Coldren, C.D., Hedman, K., Ravdel, L., Helfrich, B., Dziadziuszko, R., Chan, D.C., Sugita, M., *et al.* (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 66, 944-950.
- Wittschieben, B.O., Fellows, J., Du, W., Stillman, D.J., and Svejstrup, J.Q. (2000). Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *EMBO J* 19, 3060-3068.
- Wittschieben, B.O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C.D., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 4, 123-128.
- Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.
- Yajima, H., Tokunaga, M., Nakayama-Murayama, A., and Hishinuma, F. (1997). Characterization of IKI1 and IKI3 genes conferring pGKL killer sensitivity on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 704-709.
- Yang, W.M., Tsai, S.C., Wen, Y.D., Fejer, G., and Seto, E. (2002). Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem* 277, 9447-9454.
- Yu, D.H., Qu, C.K., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G.S. (1998). Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem* 273, 21125-21131.
- Yuan, J., Tang, W., Luo, K., Chen, X., Gu, X., Wan, B., and Yu, L. (2006). Cloning and characterization of the human gene DERP6, which activates transcriptional activities of p53. *Mol Biol Rep* 33, 151-158.

Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009). Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14530-14535.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15077-15082.

Zaidel-Bar, R., and Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *J Cell Sci* *123*, 1385-1388.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* *9*, 858-867.

Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* *114*, 3583-3590.

Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.J., Dent, S.R., *et al.* (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* *27*, 197-213.

Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* *22*, 1168-1179.

Zhang, Y., Zhang, M., Dong, H., Yong, S., Li, X., Olashaw, N., Kruk, P.A., Cheng, J.Q., Bai, W., Chen, J., *et al.* (2009). Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene* *28*, 445-460.